



VNiVERSiDAD D SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

TESIS DOCTORAL

NADPH OXIDASAS COMO DIANA TERAPEÚTICA EN LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA (CML)

BEATRIZ SÁNCHEZ SÁNCHEZ

Salamanca, Junio 2014

D. ÁNGEL HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ , Profesor Titular de Universidad , del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

CERTIFICA:

Que la presente Memoria de tesis doctoral titulada "NADPH OXIDASAS COMO DIANA TERAPEÚTICA EN LA LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA" , de la que es autora Doña BEATRIZ SÁNCHEZ SÁNCHEZ y que presenta para optar al Grado de Doctora en Biología, ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

Considerando que la tesis doctoral se halla concluida , autoriza su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firma el presente certificado en Salamanca a 10 de Junio del 2014.

Fdo: Angel Hernández Hernández

ABREVIATURAS

ADN : Ácido desoxirribonucleico

ADNc : ADN copia

AKT = PKB (Protein Kinasa B) :Proteína quinasa B

AML (Acute Myeloid Leukemia) : Leucemia Mieloide Aguda

APE1/Ref1 (AP endonuclease 1 / redox factor 1) : AP endonucleasa 1 / factor redox 1

APL (Acute Promyelocytic Leukemia) : Leucemia Promielocítica Aguda

APO : Apocinina

As₂O₃ : Trióxido de arsénico

ATP : Adenosin trifosfato

BSA: Seroalbúmina Bovina

CaBD (Calcium-binding domain): Dominio de unión al Calcio

CD (Cluster of Differentiation) : Grupo de diferenciación .

CFU-G (Colony forming unit – granulocyte) : Unidad formadora de colonias de granulocitos

CFU-M (Colony forming unit – macrophage) : Unidad formadora de colonias de macrófagos

CFU-GM (Colony forming unit – granulocyte, macrophage) : Unidad formadora de colonias de granulocitos y macrófagos.

CI : Cociente de interacción

CLP (Common Lymphoid Progenitor) : Progenitor linfoide común

CML (Chronic Myelogenous Leukemia) : Leucemia Mieloide Crónica

CMNs : células mononucleadas

CMP (Common Myeloid Progenitor) : Progenitor mieloides común

CRKL (Crk-like protein) : proteína similar a Crk

Cromosoma Ph : cromosoma Philadelphia

Cys : Cisteína

dH₂O : Agua ultrapura

DMSO : Dimetilsulfóxido

DNMT_s : DNA-metil transferasas

DPI : Difenil iodonium

DSBs (Double Strand breaks): roturas de doble hebra

Elementos ARE (Antioxidant Responsive Elements): Elementos de respuesta antioxidante.

Elementos ORE (Oxidative Responsive Elements) :Elementos de respuesta a oxidación

Elementos HRE (Hypoxia Response Elements) : Elementos de respuesta a hipoxia

ERK (Extracellular signal- regulated kinase) : Quinasa regulada por señales extracelulares.

Fa : Fracción afectada

FAD : Flavina Adenina Dinucleótido

FBS : Suero Fetal Bovino

FT : Factor de Transcripción

GAPDH (“Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase”): gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

Gln : Glutamina

GRX : Glutarredoxina

GSH : glutatión reducido

GSSG : Glutatión oxidado

G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor) : Factor estimulador de colonias de granulocitos

H₂O₂ : Peróxido de Hidrógeno

HAT_s: Histonas acetilasas

HDAC_s : Histonas deacetilasas

HIF_s (Hypoxia Inducible Factors) : Factores inducibles por hipoxia

His : Histidina

HRP (Horseradish Peroxidase) : Peroxidasa de rábano

HSC (Hematopoietic Stem Cells) : Células madre hematopoyéticas

Ig_s : Inmunoglobulinas

IL : interleucina

IM : Imatinib

IP : Ioduro de propidio

JAK_s (Janus Kinases) : Quinasas de la familia “Janus”

JNK (c-Jun amino-terminal kinase) : Quinasa del extremo amino terminal de c- Jun

KDa : KiloDalton

LMC : Leucemia mieloide crónica

LPS : lipopolisacáridos

LSC (Leukemic Stem Cells) : Células madre leucémicas

MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases) :Proteínas quinasas activadas por mitógenos.

MBP (Methyl-CpG- binding proteins) : Proteínas de union a metil-CpG

MEKK1 : MEK quinasa 1

MO : Médula Osea

MTT : 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

NADPH: Nicotinamina Adenina Dinucleótido Fosfato

NF-κB (nuclear factor- kappa B) : Factor nuclear kappa B

NILO : Nilotinib

NOX : NADPH oxidasa

Nrf1 y Nrf2 : “ Nuclear factor erythroid-derived 2 – related factors 1 and 2”

O₂⁻: Anión Superóxido

OH[•] : Radical Hidroxilo

p/v : peso/ volumen

PAGE (Polyacrilamide Gel Electrophoresis) : Electroforesis en gel de poliacrilamida

pb : pares de bases

PBS (Phosphate Buffer Saline) : Tampón fosfato salino ó solución amortiguadora de fosfatos

PCR (Polimerasa Chain Reaction) : Reacción en cadena de la polimerasa

PEI : Polietilenimina lineal

PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) : Fosfatidil inositol 3 quinasa

PKA : Proteína quinasa A

PKC : Proteína quinasa C

pNPP: bis-paranitrofenil fosfato

PP2A (“*protein phosphatase 2A*”): Proteína fosfatasa 2A

PTK_s: Proteína Tirosina quinasas

PTP_s (“Protein tyrosin phosphatases”): Proteína Tirosina Fosfatasas

PVDF : Difluoruro de polivinilideno

ROS (“Reactive Oxygen Species”) : Especies Reactivas del Oxígeno

rpm : Revoluciones por minute

RT-qPCR (“Real time-quantitative PCR”) : PCR a tiempo real cuantitativa

SCF (Stem Cell factor) : Factor de células madre

SDS : Dodecil sulfato sódico

siRNA (small interference RNA) : ARN pequeño de interferencia

shRNA (small hairpin RNA) : ARN pequeño de horquilla

SH2 (Src homology 2 domain : Dominios homólogos al dominio 2 de la proteína Src

SH3 (Src homology 3 domain): Dominios homólogos al dominio 3 de la proteína Src

STAT_s (Signal transducers and activators of transcription): Proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción.

T-ALL (T cell Acute Lymphoblastic Leukaemia : Leucemia Linfoblástica aguda de células T

TBS (Tris Buffer Saline) : Tampón Tris Salino

TEMED : *N,N,N',N'*-tetrametil-etilendiamida

TGF-β (Transforming growth factor β) : factor de transformación de crecimiento β

TNFα (Tumor necrosis factor α) : Factor de necrosis tumoral α

Tris : Tris(hidroximetil)aminometano

TRX : Tiorredoxina

TrxR : Tiorredoxina Reductasa

Tween 20 : Polioxietileno 20 sorbitan monolaurato

Tyr : Tirosina

ÍNDICE

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

- 1. ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ROS).**
 - 1.1 Fuentes intracelulares de ROS.
 - 1.2 Sistemas celulares antioxidantes.
 - 1.3 ROS como reguladores de la señalización intracelular: “Redox signalling”.
 - 1.4 ROS como reguladores de la expresión génica.

- 2. FAMILIA NADPH OXIDASA.**
 - 2.1 Estructura de las NADPH oxidasas:
 - 2.2 Mecanismo de acción de la subunidad catalítica
 - 2.3 Regulación de la activación del complejo NADPH oxidasa.
 - I. Dependientes de p22^{phox}: NOX1, NOX2, NOX3 y NOX4.
 - II. Dependientes de Ca²⁺: NOX5, DUOX1 y DUOX2.
 - 2.4 Distribución y localización subcelular de la familia NADPH oxidasa.
 - 2.5 Regulación de la expresión de la familia NADPH oxidasa.

- 3. ROS Y NADPH OXIDASAS EN CÁNCER**
 - 3.1 ROS y NADPH oxidasas en cánceres hematopoyéticos.

- 4. LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA (LMC).**
 - 4.1 Fase crónica de la enfermedad.
 - 4.2 Vías de señalización asociadas a BCR-ABL en LMC.
 - 4.3 Tratamiento de la leucemia mieloide crónica.
 - 4.4 ROS en leucemia mieloide crónica.

CAPÍTULO II. OBJETIVOS

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

- 1. APARATOS :**

- 2. MATERIALES:**
 - 2.1 MATERIAL BIOLÓGICO:
 - 2.1.1. Líneas celulares:
 - 2.1.2 Células de médula ósea de pacientes con LMC y de donantes sanos
 - 2-1-3 Cepas bacterianas:
 - 2.2 MATERIAL INFORMÁTICO:

- 3. REACTIVOS :**

- 4. MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES:**
 - 4.1 MEDIOS DE CULTIVO CELULAR :
 - 4.2 MEDIOS DE CULTIVO BACTERIANO.
 - 4.3 SOLUCIONES Y TAMPONES.

- 5. MÉTODOS:**
 - 5.1 CULTIVOS CELULARES
 - 5.2 AISLAMIENTO DE LAS CÉLULAS MONONUCLEADAS Y CD34+ DE MÉDULA ÓSEA.
 - 5.3 ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN MEDIANTE EL SISTEMA DEL MTT

- 5.4 ENSAYOS DE FORMACIÓN Y CONTAJE DE COLONIAS. CLONOGENICIDAD.
- 5.5 GENERACIÓN DE UN MODELO ANIMAL XENOINJERTO DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA.
- 5.6 ANÁLISIS DE LOS TRATAMIENTOS EN UN MODELO DE RATÓN TRANSGÉNICO PARA LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA .
 - 5.6.1 Aplicación del tratamiento de los ratones.
 - 5.6.2 Análisis del porcentaje de granulocitos:
 - 5.6.3 MEDIDA DE LOS NIVELES DE ROS INTRACELULARES.
- 5.7 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS CELULARES PROTEICOS
- 5.8 VALORACIÓN DE PROTEÍNAS.
- 5.9 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE TRANSFERENCIA DE WESTERN.
 - 5.9.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.
 - 5.9.2 Transferencia de las proteínas a la membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF).
 - 5.9.3 Incubación de la membrana con los anticuerpos.
 - 5.9.4 Detección.
 - 5.9.5 Cuantificación.
- 5.10 ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR
- 5.11 MEDIDA DEL DAÑO EN EL DNA (roturas de doble hebra “DSBs”)
- 5.12 ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR
- 5.13 EXTRACCIÓN DE ARN
- 5.14 SÍNTESIS DE ADN COPIA (ADNc) Ó RETROTRANSCRIPCIÓN
- 5.15 PCR CUANTITATIVA O A TIEMPO REAL (qPCR)
- 5.16 SILENCIAMIENTO DE NADPH OXIDASAS MEDIANTE ARN DE INTERFERENCIA.
 - 5.16.1 Diseño las parejas de oligonucleótidos para el silenciamiento.
 - 5.16.2 Clonaje de los siRNA en el plásmido lentiviral pLVTHM.
 - a) Preparación de los oligonucleótidos.
 - b) Preparación del plásmido
 - c) Ligación en pLVTHM.
 - 5.16.3 Transformación de bacterias mediante choque térmico.
 - 5.16.4 Comprobación de los clones.
 - a) Comprobación mediante el análisis del patrón de restricción.
 - b) Comprobación mediante PCR convencional.
 - c) Electroforesis en gel de agarosa
 - 5.16.5 Amplificación de las construcciones
 - 5.16.6 Transfección de las células HEK 293T.
 - 5.16.7 Transduccion lentiviral de la línea celular K562 con el ARN de interferencia (iRNA)
- 5.17 SILENCIAMIENTO DE LA PROTEÍNA REGULADORA p22^{phox} Y DE LA PTP SHP1 MEDIANTE ARN DE INTERFERENCIA.
- 5.18 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

CAPÍTULO IV : RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. **EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD NADPH OXIDASA SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS LEUCÉMICAS.**
 - 1.1 El tratamiento con inhibidores de la actividad NADPH oxidasa inhibe el crecimiento de la línea celular leucémica K562.
 - 1.2 El tratamiento con inhibidores de la actividad NADPH oxidasa inhibe el crecimiento de las células mononucleadas de médula osea de pacientes con leucemia mieloide crónica.
2. **EMPLEO DE INHIBIDORES DE LA QUINASA BCR-ABL**

3. **COMBINACIÓN DE INHIBIDORES DE LA QUINASA BCR-ABL CON INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD NADPH OXIDASA EN LÍNEAS CELULARES DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA.**
 - 3.1 Efecto combinado de la inhibición de NADPH oxidasas y BCR-ABL sobre la proliferación de líneas celulares de leucemia mieloide crónica.
 - 3.2 Estudio de la relación entre los inhibidores de NADPH oxidasas y los inhibidores de la quinasa BCR-ABL en líneas celulares de leucemia mieloide crónica.
4. **COMBINACIÓN DE INHIBIDORES DE LA QUINASA BCR-ABL CON INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD NADPH OXIDASA EN CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA DE PACIENTE.**
 - 4.1 Efecto combinado de la inhibición de NADPH oxidasas y BCR-ABL sobre la proliferación de células mononucleadas de médula osea de paciente.
 - 4.2 Estudio de la relación entre los inhibidores de NADPH oxidasas y BCR-ABL en células mononucleadas de paciente.
5. **COMBINACIÓN DE INHIBIDORES DE LA QUINASA BCR-ABL CON INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD NADPH OXIDASA EN CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA DE INDIVIDUOS SANOS**
6. **ANÁLISIS “in vivo” DE LA EFECTIVIDAD DE LA INHIBICIÓN DE LAS NADPH OXIDASAS COMO TRATAMIENTO EN LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA.**
 - 1.44 Evaluación del uso de inhibidores de NADPH oxidasas como tratamiento en LMC en un Modelo de ratones Xenoinjerto.
 - 1.45 Evaluación del uso de inhibidores de NADPH oxidasas como tratamiento en leucemia mieloide crónica en ratones transgénicos *BCR-ABL* positivos.
7. **ANÁLISIS DE LOS NIVELES INTRACELULARES DE ROS**
8. **IMPLICACIÓN DE LA ACTIVIDAD NADPH OXIDASA EN LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN DE BCR-ABL EN CÉLULAS K562.**
 - 8.1 Efecto de la inhibición química de las NADPH oxidasas sobre la señalización de BCR-ABL.
 - 8.2 Efecto del silenciamiento de la proteína reguladora p22^{phox} sobre la señalización de BCR-ABL.
9. **ESTUDIO DEL PAPEL DE LAS PTPs COMO REGULADORAS DEL ESTADO ACTIVO DE BCR-ABL: SHP1 Y SHP2**
 - 9.1 Efecto de SHP1 y SHP2 en los niveles de fosforilación de BCR-ABL en células K562.
 - 9.2 Efecto de SHP1 y SHP2 sobre la proliferación de células K562.
 - 9.3 Medida de la actividad de SHP1 y SHP2 en células Boff210 bajo inhibidores de la actividad NADPH oxidasas e inhibidores de BCR-ABL.
10. **ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR EN LAS CÉLULAS LEUCÉMICAS K562.**
 - 10.1 Bloqueo de la progresión del ciclo celular por la inhibición de la actividad NADPH oxidasa.
 - 10.2 Efecto de los inhibidores de la actividad NADPH oxidasa sobre la Inestabilidad genómica.
 - 10.3 Efecto de la inhibición de NADPH oxidasas sobre la viabilidad celular.
11. **PATRÓN DE EXPRESIÓN DE NADPH OXIDASAS DE LAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA.**
 - 11.1 Análisis del patrón de expresión de la familia NADPH oxidasas en células K562 y células CMNs de médula osea de pacientes.
 - 11.2 Silenciamiento de las NADPH oxidasas expresadas en K562

CAPÍTULO V : CONCLUSIONES

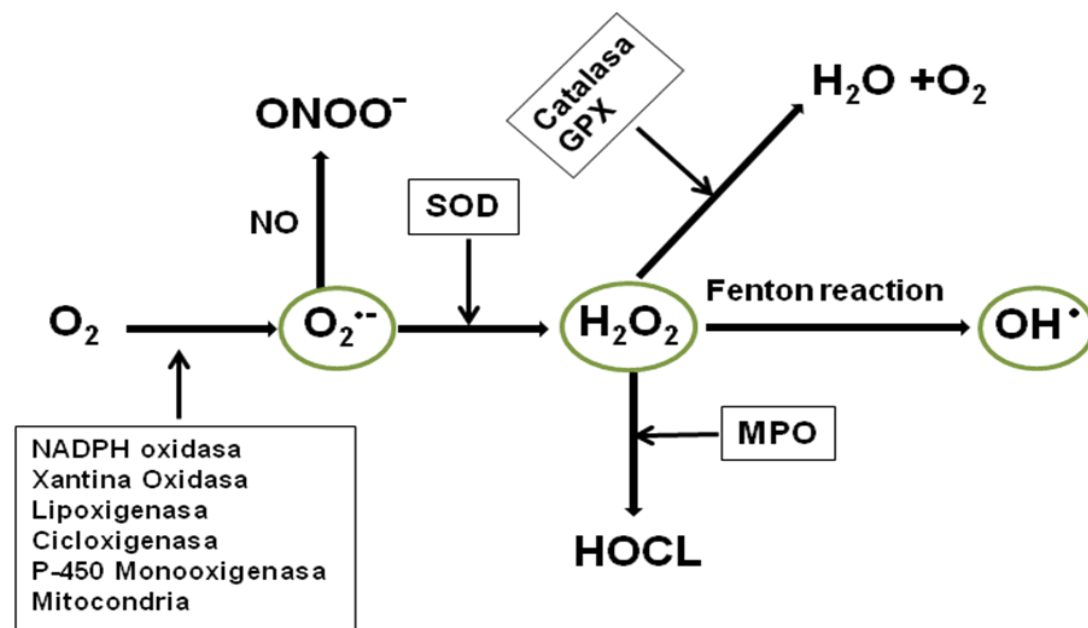
CAPÍTULO VI : BIBLIOGRAFÍA

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1. ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ROS).

Como consecuencia de su metabolismo aerobio, las células eucarióticas tienen que lidiar de manera constante con la producción de especies reactivas del oxígeno o ROS (del inglés “Reactive Oxygen Species”), que se forman continuamente en la célula a causa de la reducción parcial del oxígeno (O_2).

La generación de ROS es generalmente una cascada de reacciones que comienza con la producción de anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$) a partir del O_2 (Figura I-1). Este superóxido puede dismutar a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), bien espontáneamente, particularmente a pH ácido, o bien catalizado por la superóxido dismutasa (SOD). El $O_2^{\cdot -}$ puede reaccionar también con el óxido nítrico (NO) para formar peroxinitrito ($ONOO^-$), dando lugar a las especies reactivas del Nitrógeno (RNS). A partir del H_2O_2 , se puede generar el radical hidroxilo (OH^\cdot) mediante la reacción de Fenton, o bien formar ácido hipocloroso ($HOCl$) por la acción de la mieloperoxidasa. El peróxido de hidrógeno suele ser eliminado en la célula mediante su transformación a H_2O y O_2 por acción de catalasas y de la glutatión peroxidasa (GPX), principalmente (Turrens, 2003).



Esquema I-1. Principales especies reactivas del oxígeno (ROS). Las más relevantes son el anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^\cdot). Modificada de Kyaw et al., 2004.

Las ROS presentan una elevada reactividad, en especial el radical OH^\cdot , pudiendo oxidar, y en muchos casos dañar, gran cantidad de biomoléculas (proteínas, lípidos y ácidos nucleicos fundamentalmente), lo que puede eliminar o alterar de manera irreversible la función de estas moléculas dianas. La respuesta celular ante elevados niveles de ROS suele ser un bloqueo del ciclo celular para intentar reparar los daños generados en la célula, o bien, si esto no resulta suficiente, la iniciación de programas de muerte celular (Beckman and Ames, 1998). Así, una producción excesiva de ROS, lo que habitualmente se denomina estrés oxidativo, se relaciona con el envejecimiento, con enfermedades degenerativas y con cáncer (Genestra, 2007).

Sin embargo, durante los últimos años, el crecimiento del estudio de las ROS ha evidenciado que estas moléculas presentan un carácter dual ya que, si bien un aumento excesivo en sus niveles provoca daño celular, una producción moderada de ROS resulta ser un mecanismo de regulación de la señalización celular (Tatla et al., 1999) y de la expresión génica (Goldstone et al., 1996), necesario en gran cantidad de procesos celulares, como defensa e inflamación, procesos de diferenciación, proliferación y crecimiento celular, migración, apoptosis, etc (revisado en Bedard and Krause, 2007).

1.1 Fuentes intracelulares de ROS.

En organismos pluricelulares, todos los tipos celulares son capaces de producir ROS. La mitocondria es cuantitativamente la principal generadora de ROS en la célula (Poyton et al., 2009) debido a que durante el proceso de producción de energía a través de la cadena respiratoria, aproximadamente el 2 % del O_2 consumido es prematuramente reducido por un único electrón, quedando parcialmente reducido, lo que da lugar a la producción de superóxido (O_2^\cdot) (Boveris et al., 1972).

Se considera que los dos principales puntos en los que se genera O_2^\cdot en la cadena de transporte electrónico son los complejos I y III (complejo “NADH-Coenzima Q oxirreductasa” y complejo “Coenzima Q-citocromo c oxidorreductasa” respectivamente). El anión superóxido generado en estos dos complejos puede ser transformado a H_2O_2 por la acción de superóxido dismutasas existentes en la mitocondria (CuZnSOD o MnSOD)(Esquema I-2). Este compuesto es permeable debido a su ausencia de carga, por lo que difunde fácilmente a través de las membranas mitocondriales y llega finalmente al citosol (revisado en Venditti et al., 2013).

Existen, además de las mitocondrias, otros sistemas enzimáticos celulares productores de ROS en las células, que son la xantina oxidasa, las NADPH oxidasas (NOX, de las que hablaremos en profundidad más adelante), las óxido nítrico sintasas (NOS), las ciclo-oxigenasas, las mono-oxigenasas y las lipoxigenasas (Paravicini and Touyz, 2008).

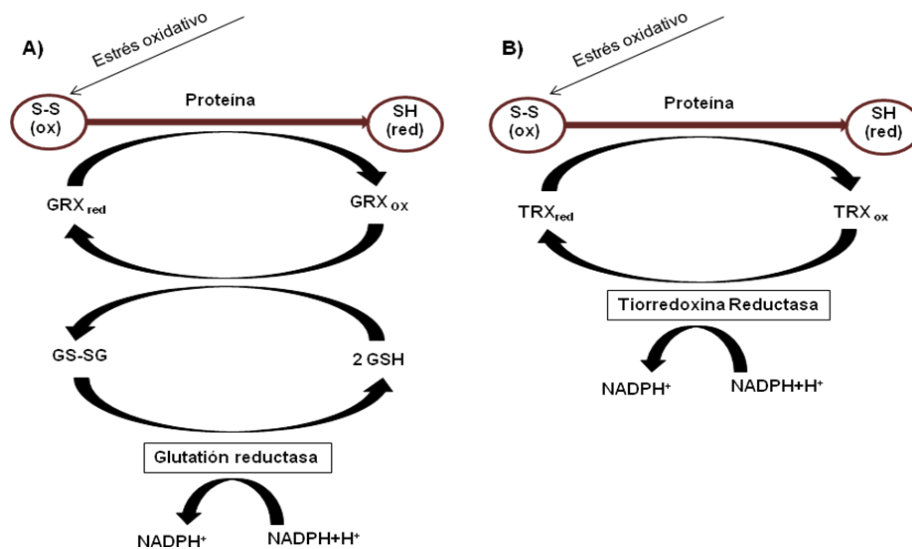
1.2 Sistemas celulares antioxidantes.

Para lidiar con la generación continua de ROS y su alta reactividad con otras biomoléculas, las células aerobias han desarrollado mecanismos antioxidantes que se encargan de contrarrestar sus efectos nocivos, manteniendo un balance entre producción y eliminación de ROS. Si existe un desequilibrio en este balance, favoreciéndose la formación intracelular de ROS, se va a desarrollar una situación de estrés oxidativo, lo que va a provocar daño celular (Halliwell et al., 1992).

Los sistemas antioxidantes celulares más conocidos (Esquema I-3) son:

- Sistema de la glutaredoxina: es un sistema enzimático formado por *glutaredoxina* (GRX), glutatión y NADPH. Se basa en la capacidad reductora del glutatión. Es un tripéptido (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) que gracias al grupo tiol (SH) de la Cisteína (Cys) tiene la capacidad de oxidarse para reducir a la glutaredoxina. El glutatión oxidado (GSSG) puede ser regenerado a glutatión reducido (GSH) por acción de la enzima glutatión reductasa, que le dona un electrón a partir del NADPH. El glutatión es considerado el principal regulador del estado redox en las células de mamíferos (Gómez et al., 2004; Wu et al., 2004), ya que interviene también en la regulación de las vías de señalización activadas por estrés oxidativo (Haddad et al., 2000; Meister, 1988).

- Sistema de la tiorredoxina : es un sistema formado por *tiorredoxina* (TRX) y NADPH. En su estado reducido la TRX muestra dos grupos tiol (-SH) en su sitio activo. Las proteínas oxidadas pueden reducirse en el citoplasma cuando reciben los electrones de TRX, que entonces se oxida formando puentes disulfuro (S-S). La forma oxidada de la TRX es reducida de nuevo por la tiorredoxina reductasa (TRXR), que le transfiere electrones desde el NADPH (Bjornstedt et al., 1994; Holmgren, 1979; Holmgren, 1984). La proteína TRX se expresa de manera ubicua, y es un importante sensor redox porque su expresión está regulada por elementos ORE (del inglés “Oxidative Responsive Elements”) y elementos ARE (del inglés “Antioxidant-Responsive Elements”) (Das, 2004; Nakamura et al., 1997).



Esquema I-3. Esquema de los principales sistemas celulares antioxidantes. A) Sistema de la Glutarredoxina. B) Sistema de la Tiorredoxina.

1.3 ROS como reguladores de la señalización intracelular: “Redox signalling”.

La idea de que las ROS intracelulares pueden jugar un papel importante en la regulación de la señalización intracelular surgió hace varias décadas. Ya en los años 70 se sugirió un papel de los ROS en la inmunidad innata, señalando que el aumento intracelular de estos era necesario para la actividad bactericida de los leucocitos (Babior et al., 1973). En esta misma década se descubrió que el H₂O₂ añadido exógenamente podía mimetizar la actividad señalizadora de la insulina (Czech et al., 1974), y en los años 80 se publicó que bajas concentraciones de H₂O₂ exógeno inducían la proliferación celular (Burdon et al., 1989). El descubrimiento de la familia NADPH oxidasa y sus diferentes isoformas en los años posteriores intensificó el interés por las ROS como reguladoras de la señalización celular, produciéndose una expansión en este campo de investigación que ha puesto de manifiesto en la última década el papel fundamental de las ROS en la regulación de numerosos procesos fisiológicos, siendo en la actualidad totalmente aceptado y utilizado el término “*redox signalling*”.

Una molécula que funciona como señalizadora suele reunir tres características principales:

- 1) Su concentración está regulada tanto a nivel de síntesis como de eliminación.
- 2) Presenta dianas o receptores específicos
- 3) Su efecto en la señalización es reversible

La mayoría de las ROS (OH^\cdot , OCl^\cdot , radicales orgánicos, etc), presenta una reactividad muy alta e inespecífica, y su presencia no está controlada a nivel enzimático. Sin embargo, el $\text{O}_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 , según estos criterios, serían candidatos válidos para ejercer un papel en la señalización celular, ya que: i) ambas pueden ser producidas y eliminadas enzimáticamente, regulándose así sus concentraciones en la célula (Tabla I-1), y ii) presentan cierta selectividad de reacción.

Tabla I-1. Principales factores reguladores de los niveles de anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en la célula. (tomada de Bartosz, 2009)

	Superoxide	Hydrogen peroxide
Formation	Mitochondrial respiratory chain Nox Some other enzymes (e.g. xanthine oxidase) Microsomes Autoxidation of reduced form of flavins, quinones, metals, metallo-proteins, thiols Ionizing radiation Photochemical reactions Ultrasound	Non-enzymatic dismutation of O_2^\cdot Dismutation of O_2^\cdot by SODs Reduction of O_2^\cdot Peroxidases Peroxisomal oxidases Some other enzymes (e.g. monoamine oxidase)
Removal	CuZnSOD (cytosol) MnSOD (mitochondria) EC-SOD (extracellular space) Low-molecular mass antioxidants	Catalase Glutathione peroxidases Peroxiredoxins

Por tanto, al utilizar el concepto de ROS como segundos mensajeros, se está aludiendo exclusivamente al $\text{O}_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 . Numeroso estudios (revisado en Bartosz, 2009) han demostrado que los niveles de estas moléculas son incrementados en la célula como respuesta a diferentes estímulos, entre los que se encuentran:

- Factores de crecimiento: EGF (“epidermal growth factor”), PDGF (“platelet-derived growth factor”), VEGF (“vascular endotelial growth factor”), bFGF (“basic fibroblast growth factor”) o TGF- β 1 (“transforming growth factor β 1”).
- Citoquinas: $\text{TNF}\alpha$ (“Tumoral necrosis factor α ”) y IL1 (Interleucina 1)
- Agonistas de receptores acoplados a proteínas G: Angiotensina II, trombina, endotelina, serotonina, ceramida, histamina, etc.

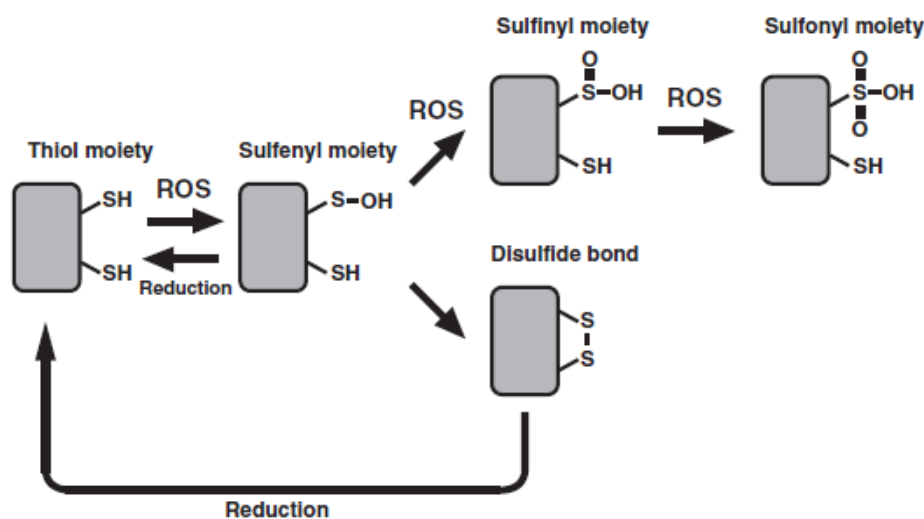
En la mayoría de los casos, la generación de ROS mediada por estos factores ocurre a través de la inducción de las NADPH oxidasas.

El mecanismo por el cual las ROS participan en la señalización celular, es una cuestión de gran importancia que aún no se conoce completamente, pero que parece dirigirse hacia dos caminos no excluyentes, que son la sucesión de cambios en el estado “redox” de la célula y la modificación de proteínas diana. El estado redox de una célula está definido por el potencial de reducción-oxidación que presentan las principales reservas redox intracelulares en los distintos

compartimentos de la célula (GSSC/GSH, NADP⁺/NADPH, glutarredoxina y tioredoxina). Está comprobado que este estado redox cambia según los acontecimientos celulares, siendo diferente en células con crecimiento activo, que en células diferenciadas o en células apoptóticas. (revisado en Bartosz, 2009).

En cuanto a la modificación de proteínas diana, las especies reactivas del oxígeno producen la oxidación de otras biomoléculas, por lo que la señalización asociada a ROS debe estar mediada por proteínas que puedan ser sensibles y reversiblemente oxidadas. El aminoácido cisteína (Cys) presenta en su cadena lateral un grupo tiol (-SH), que es altamente susceptible a oxidación. De acuerdo con esto, una de las dianas en la señalización de los ROS serán proteínas que dependan de residuos de cisteína para llevar a cabo su actividad enzimática, ya que van a ser muy sensibles a un incremento de los niveles de ROS intracelulares, sufriendo modificaciones en su estado activo.

La cisteína puede presentar distintos grados de oxidación (Esquema I-4), de manera que el grupo tiol (-SH), por la acción de las ROS, puede dar lugar a un grupo sulfénico (-SOH), a un grupo sulfínico (-SO₂H) ó finalmente a un grupo sulfónico (-SO₃H). Cuando la cisteína está parcialmente oxidada (-SOH) puede unirse también con otros residuos Cys, formando puentes disulfuro (S-S). Cabe destacar que de estos 4 estados, -SOH (sulfénico) y S-S (puentes disulfuro) son reversibles en condiciones celulares normales por la acción de antioxidantes, mientras que los motivos altamente peroxidados no pueden ser reducidos nuevamente por la célula, lo que se traducirá en un daño irreversible en la estructura de la proteína, con la consecuente pérdida de función.



Esquema I-4. Oxidación de la Cisteína (Cys) por las especies reactivas del oxígeno. Tomado de Miki and Funato, 2012.

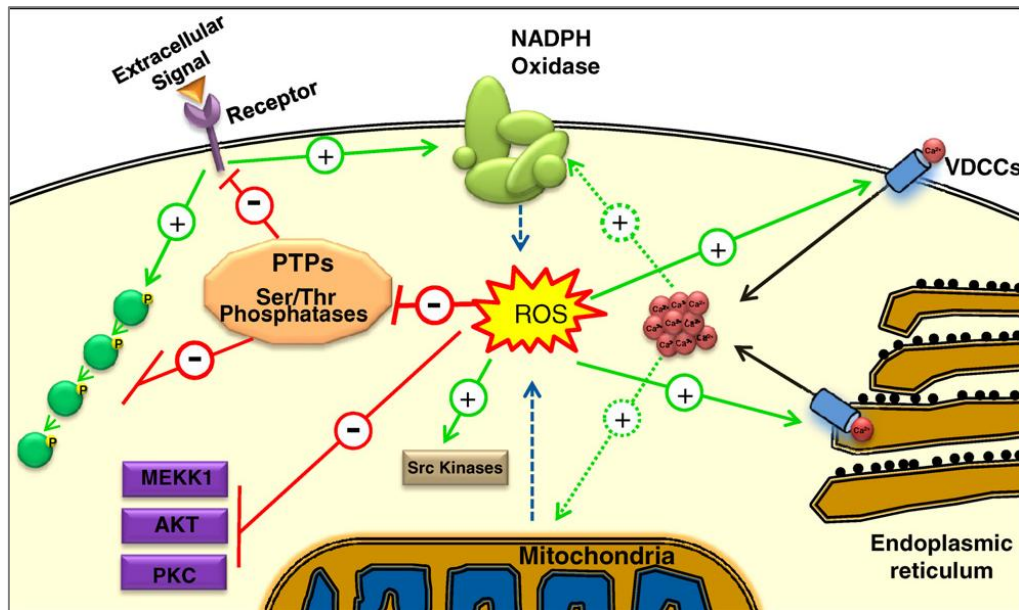
La función catalítica de las PTKs (proteína tirosina quinasas) es la fosforilación de otras proteínas en residuos de tirosina, promoviendo cascadas de señalización intracelular que permiten regular procesos celulares esenciales, tales como la transcripción, proliferación, diferenciación, ciclo celular, apoptosis, etc (Hunter, 1989; Mustelin et al., 2002). Las PTPs (proteína tirosina fosfatasas) ejercen la función contraria. Son una familia de enzimas que catalizan la desfosforilación de otras proteínas en residuos de tirosina (Tyr), lo que suele traducirse en una inactivación de estas. La actividad antagónica de estas dos familias permite una fina e intrincada regulación de los procesos de señalización intracelulares.

Se conocen hasta 107 genes en humanos que codifican PTPs, lo que hace de ellas una familia muy compleja (Alonso et al., 2004). Todas las PTPs comparten un dominio catalítico conservado de 240 residuos, en el cual el residuo 215 resulta ser invariable en todas ellas, y es una cisteína (Cys) que funciona como un aceptor transitorio de fosfato durante la actividad de la enzima, siendo este aminoácido indispensable para la catálisis (Zhang et al., 1994). El grupo tiol (-SH) de esta Cys es susceptible a ser oxidado. Así, una gran cantidad de PTPs son reguladas negativamente por oxidación (Hernández-Hernández et al., 1999; Ostman et al., 2011), la cual puede ser inducida en respuesta a factores de crecimiento u otras señales extracelulares, como ocurre por ejemplo en PTP1B, SHP1, SHP2 ó PTEN (Kwon et al., 2004; Lee et al., 1998; Meng et al., 2002; Singh et al., 2005).

Aunque hay menos evidencias, parece que las serina-treonina fosfatasas también podrían ser reguladas por ROS. Por ejemplo, PP2A (del inglés “Protein phosphatase 2A”) parece ser inhibida de manera directa y reversible por oxidación (Finnegan et al., 2010; Foley et al., 2007).

Por lo tanto, la inhibición reversible de PTPs por oxidación en respuesta a señales externas es un importante mecanismo de regulación de la señalización celular. Dicha inhibición puede afectar a PTPs particulares, alcanzándose cierta especificidad de acción (Choi et al., 2011).

También algunas quinasas intracelulares pueden ser activadas por oxidación, como por ejemplo ERK2, p38, JNK2, Src (revisado en Corcoran and Cotter, 2013 y en Giannoni et al., 2010) y receptores tirosina quinasa (RTKs) (Nakashima et al., 2002).



Esquema I-5. Señalización redox. Las especies reactivas del oxígeno (ROS) pueden actuar como segundo mensajero, regulando la actividad de diferentes enzimas implicadas en señalización y la concentración de Ca²⁺ citosólico. Tomado de Sardina et al., 2012.

Pero no todas las quinasas son reguladas positivamente mediante oxidación. Se ha descrito que algunas PTKs pueden ser inhibidas vía ROS, como por ejemplo MEKK1 (MAPK/ERK kinasa1) (Cross and Templeton, 2004), AKT (Murata et al., 2003; Wani et al., 2011), PKA (Protein kinasa dependiente de AMPc) (Humphries et al., 2005) y c-ABL (Leonberg and Chai, 2007).

La actividad de otras proteínas implicadas en señalización como la GTPasa Ras puede ser regulada por unión de glutatión debido a un incremento de las ROS intracelulares (Adachi et al., 2004).

La reversibilidad de la oxidación de la gran mayoría de estas proteínas recae generalmente sobre la tiorredoxina (TRX), que como se ha explicado anteriormente (véase 1.2), reduce los puentes disulfuro de sus dianas, siendo reciclada de nuevo por la TRX-reductasa (TRXR). De esta manera, la función general de esta proteína es el mantenimiento del ambiente redox global de la célula. Sin embargo, se ha descubierto recientemente que la familia TRX actúa también como regulador específico de otras rutas de señalización, como es la ruta de señalización de Ask1 (del inglés "Apoptosis signal-regulating kinase 1") (Liu and Min, 2002; Tobiume et al., 2002). La nucleorredoxina (NRX), miembro de la familia de las tiorredoxinas, se ha identificado también como regulador de la ruta de señalización Wnt/ β -catenina (Funato and Miki, 2007).

Finalmente, ha de señalarse que existe un complicado “cross-talk” entre los niveles de Ca^{2+} y las ROS. El Ca^{2+} puede regular la producción de ROS a nivel mitocondrial y a nivel de las NADPH oxidasas, y también puede regular la eliminación de ROS, ya que algunas enzimas antioxidantes son dependientes de Ca^{2+} . Además, las ROS pueden regular los niveles citosólicos de este catión, bien mediante la activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VDCCs) en la membrana plasmática, o bien facilitando la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares (Touyz, 2005; Yan et al., 2006), aumentando los niveles intracelulares en ambos casos.

1.4 ROS como reguladores de la expresión génica.

La expresión génica puede variar en función de los niveles de ROS intracelulares. Uno de los mecanismos que tiene la célula para mantener la homeostasis redox ante una situación de estrés oxidativo es la activación de la expresión de genes con función antioxidante o detoxificante, que están regulados por secuencias ARE (del inglés “antioxidant response elements”), a las que se unen los factores de transcripción Nrf1 and Nrf2 (del inglés “nuclear factor erythroid-derived 2-related factors 1 and 2”), (Maher and Yamamoto, 2010). Nrf2, en condiciones basales, se encuentra secuestrada en el citoplasma por su inhibidor, Keap1 (del inglés “Kelch like ECH-associated protein 1”), lo cual supone su degradación vía proteasoma. Cuando los niveles de ROS se incrementan en la célula, las cisteínas 151, 273 y 288 de Keap1 van a resultar oxidadas, lo que provoca la disociación del complejo de Nrf2, translocándose al núcleo y activando la expresión de genes de citoprotección (Yamamoto et al., 2008).

Además, en una situación de hipoxia se activan los factores de transcripción HIF (del inglés “Hypoxia Inducible Factors”) que se unen a elementos HRE (del inglés “Hypoxia Response Elements”). Las secuencias reguladoras HRE están presentes en genes que regulan la angiogénesis, el tono vascular, la glucólisis, la función mitocondrial, el crecimiento celular o la supervivencia (Webb et al., 2009).

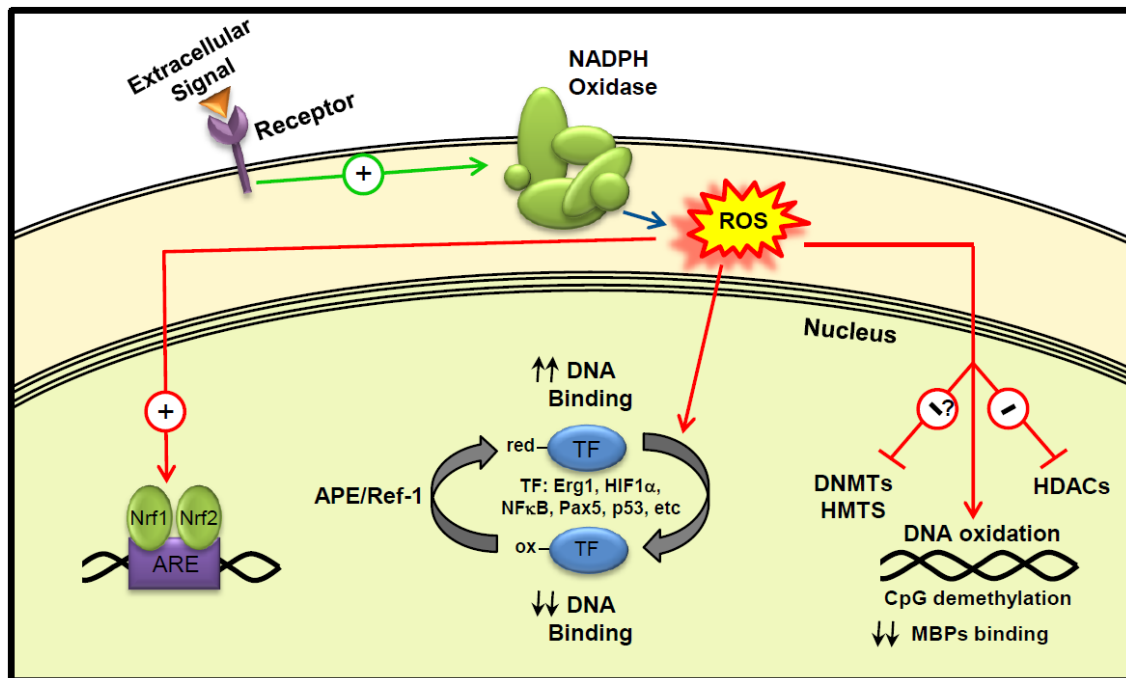
Las ROS pueden regular la expresión génica de manera indirecta, a través de la regulación de distintas vías de señalización (Allen and Tresini, 2000); o directamente, modulando la actividad de distintos factores de transcripción (AP-1, ATF/CREB, Egr-1, HIF1 α , HLF, NF κ B, Pax5, Pax8 o p53), cuya oxidación reduce su capacidad para unirse a DNA.

El factor de transcripción NF κ B (del inglés “nuclear factor kappa B”) es un heterodímero que regula procesos de inmunidad, inflamación y supervivencia celular. En estado inactivo, se encuentra en el citoplasma asociado a su inhibidor I κ B. Un aumento en los niveles intracelulares

de ROS, en concreto del H_2O_2 , va a provocar la activación de la quinasa que fosforila a I κ B (IKK), marcándolo para su degradación vía proteasoma, liberando a NF κ B de su inhibición y pudiendo translocarse al núcleo (Janssen-Heininger et al., 2000). Sin embargo, para que se produzca la unión de NF κ B al DNA, es necesario un ambiente reducido, que su citoína 62 no esté oxidada, por lo que las ROS pueden ejercer efectos opuestos sobre este factor de transcripción (Bubici et al., 2006).

El factor de transcripción p53 es ampliamente conocido por su función proapoptótica, siendo uno de los más destacados supresores tumorales, pero también activa la expresión de genes que codifican proteínas antioxidantes. La actividad de p53 presenta una regulación redox. La oxidación y la glutationilación de los grupos tiol (-SH) localizados en el dominio de unión a DNA de este factor de transcripción provocan cambios conformacionales que inhiben la capacidad de unión al DNA de esta proteína (Hainaut and Milner, 1993; Buzek et al., 2002).

La proteína APE1/Ref-1 (del inglés “AP Endonuclease 1/Redox Factor 1”) es una proteína multifuncional con actividad endonucleasa, que está implicada en procesos de reparación de DNA. También regula el estado redox de estos factores de transcripción oxidados por ROS, mediando su reducción, lo que incrementa su capacidad de unión al DNA (Tell et al., 2009).



Esquema I-6. Modulación de la expresión génica mediada por ROS. Tomado de Sardina et al., 2012.

El alto grado de organización de la cromatina en mamíferos hace que, a veces, las modificaciones epigenéticas sean más importantes que los propios elementos genéticos contenidos en la secuencia del DNA en términos de regulación de la expresión génica. Los mecanismos epigenéticos contribuyen al establecimiento y mantenimiento de los patrones de expresión génica específicos de los distintos tipos celulares. Las modificaciones de las histonas (fosforilación, metilación, acetilación y ubiquitinación, etc) la metilación reversible del DNA y los complejos remodeladores regulan la estructura de la cromatina y por lo tanto la accesibilidad al DNA de las proteínas que regulan la expresión génica (Murr, 2010). Algunas proteínas implicadas en estos procesos de regulación epigenética también pueden ser reguladas por mecanismos redox. La acetilación de la cola N-terminal de las histonas por parte de histonas acetilasas (HATs) incrementa la accesibilidad al DNA y está por tanto relacionada con activación transcripcional. La desacetilación de histonas por las histonas deacetilasas (HDACs) ejercería el efecto contrario, disminuye la unión de factores de transcripción al DNA. Se ha descrito recientemente que la actividad de HDACs está regulada por el estado redox de dos residuos de cisteína. La oxidación de estos parece inhibir la actividad catalítica de algunas HDACs (Doyle and Fitzpatrick, 2010).

La metilación del DNA y de las histonas se correlaciona con el estado de transcripción de los genes y es llevada a cabo por las DNMTs (del inglés “DNA methyl-transferasas”) y por las HMTs (del inglés “Histone methyl transferases”) respectivamente. Ambas enzimas muestran residuos de cisteína altamente conservados en el sitio activo necesario para su actividad catalítica, lo que sugiere una posible inactivación de estas enzimas mediante oxidación (revisado en Sardina et al., 2012).

Además, las ROS pueden modificar los procesos epigenéticos mediante oxidación del DNA: la 8-Hidroxil-2'-deoxiguanosina, un producto de la oxidación de la guanosina, es capaz de inhibir a las DNA-metil transferasas (DNMTs), induciendo una desmetilación del DNA en determinados sitios (Turk et al., 1995; Weitzman et al., 1994). La progresiva oxidación de la 5-metilcitosina puede conducir a la desmetilación *in vivo* de islas CpG (Parker et al., 2008), y la oxidación de citosina y guanina puede inhibir la unión de MBP (del inglés “Methyl-CpG-Binding Proteins”) al DNA, lo que alteraría la regulación epigenética de ciertos genes (Valinluck et al., 2004).

2. FAMILIA NADPH OXIDASA.

Las NADPH oxidasas (NOX) son la principal fuente de ROS no mitocondrial (Nauseef, 2008). Esta familia de enzimas es la única cuya función fundamental es la formación de ROS (O_2^-

principalmente), a diferencia del resto de sistemas enzimáticos, que generan ROS como subproducto de su actividad catalítica principal. Además, la activación de estas proteínas puede ser inducida específicamente por diferentes estímulos celulares.

La familia NOX comprende 7 isoformas enzimáticas: NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5 y dos oxidasas duales denominadas DUOX1 y DUOX2. Todas las NADPH oxidasas son complejos multiproteicos asociados a membrana que catalizan el transporte de electrones del NADPH a través de la membrana hasta el oxígeno, produciéndose su reducción parcial y la generación del anión superóxido (O_2^-).

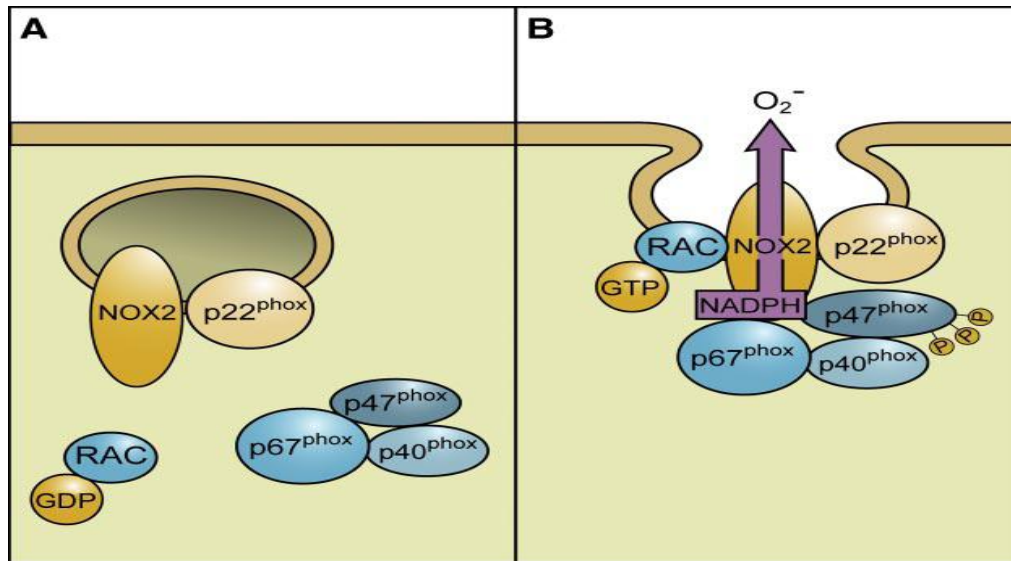
Cada miembro de la familia presenta un patrón de expresión particular según el tejido (Paravicini, 2008), y presentan además diferentes localizaciones subcelulares, que incluyen núcleo, retículo endoplasmático, endosomas, fagosomas, mitocondrias y membrana plasmática (Lassegue, 2010), lo que sugiere que cada isoforma pueda tener funciones específicas en la célula.

2.1 Estructura de las NADPH oxidasas:

La primera NADPH oxidasa que se descubrió fue la oxidasa de fagocitos (Phox, del inglés “*phagocyte oxidase*”) durante el análisis del origen de la gran cantidad de O_2^- y ROS producidos durante el estallido respiratorio, clave en la respuesta inmune frente a infecciones (Rossi, 1964). Es el complejo NADPH oxidasa más estudiado y del que más se conoce, ya que el resto de miembros de la familia NOX comenzaron a describirse 35 años después (Cheng et al., 2001; Geiszt et al., 2000; Kikuchi et al., 2000). Por eso, esta NADPH de fagocitos se considera el prototipo de la familia.

La subunidad catalítica de este complejo, denominada gp91^{phox} o NOX2, está constitutivamente asociada a la proteína transmembrana p22^{phox}, siendo ésta necesaria para la estabilización del complejo activo en la membrana plasmática. Juntas forman el citocromo b₅₅₈, que en fagocitos no estimulados reside en vesículas intracelulares. Cuando estas células se activan, se induce la fosforilación de la subunidad reguladora citosólica p47^{phox}, lo que provoca un cambio conformacional en esta proteína que permite su unión con la proteína p22^{phox}, y el reclutamiento de las subunidades reguladoras restantes, p40^{phox} y p67^{phox}, quedando esta última en contacto con la subunidad catalítica. Por tanto, p47^{phox} es considerada una subunidad organizadora. La GTPasa Rac, por último, va a interactuar con NOX2 en dos pasos, primero se produce un

contacto directo con NOX2 y seguidamente se produce la interacción con p67^{phox}, que es la subunidad activadora del complejo. Con todos los componentes del complejo ensamblados, las vesículas portadoras migran y se fusionan con la membrana plasmática del fagocito para dar lugar al complejo NADPH oxidasa activo (revisado en Bedard and Krause, 2007), que comenzará a producir anión superóxido (O_2^-) (Esquema I-7).

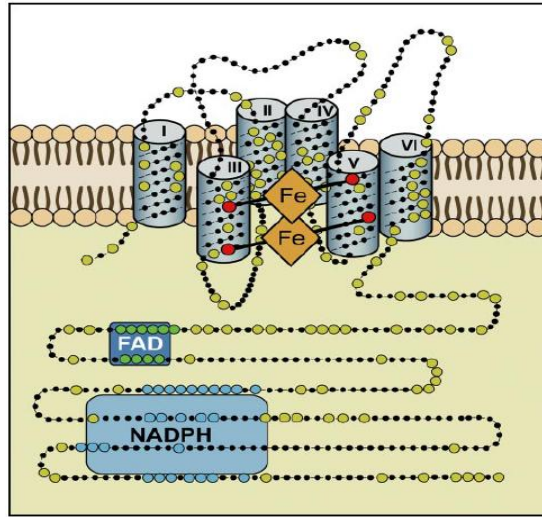


Esquema I-7: Activación del complejo NADPH oxidasa de fagocitos NOX2. A) Subunidades del complejo NOX2 en fagocitos inactivos. B) Ensamblaje del complejo proteico en la membrana tras la activación de los fagocitos. Tomado de Bedard and Krause, 2007.

Un desorden genético ligado a la pérdida de actividad de esta NADPH oxidasa provoca la enfermedad granulomatosa crónica ó CGD (del inglés “chronic granulomatous disease”), en la que los pacientes sufren granulomas y numerosas infecciones fúngicas y bacterianas recurrentes, a menudo provocadas por microorganismos inocuos para individuos sanos. Esta inmunodeficiencia se debe a mutaciones en el gen codificante de NOX2 (CYBB), que se reflejan en la disminución o incluso inhibición de la producción de ROS, por lo que los fagocitos no tienen la capacidad de provocar el “estallido respiratorio” al enfrentarse a los patógenos (Baehner RL, 1967; Holland, 2010; Rada et al., 2008).

Todas las NADPH oxidasas son flavoproteínas y presentan una estructura común y altamente conservada que se corresponde con el centro catalítico del complejo NADPH oxidasa: presentan seis dominios transmembrana conservados, un dominio de unión a NADPH en el extremo COOH-terminal, una región de unión a FAD y cuatro residuos de histidina (His-101,

115, 209 y 222) que se unen a grupos hemo localizados en el tercer y el quinto segmentos transmembrana (Esquema I-8).

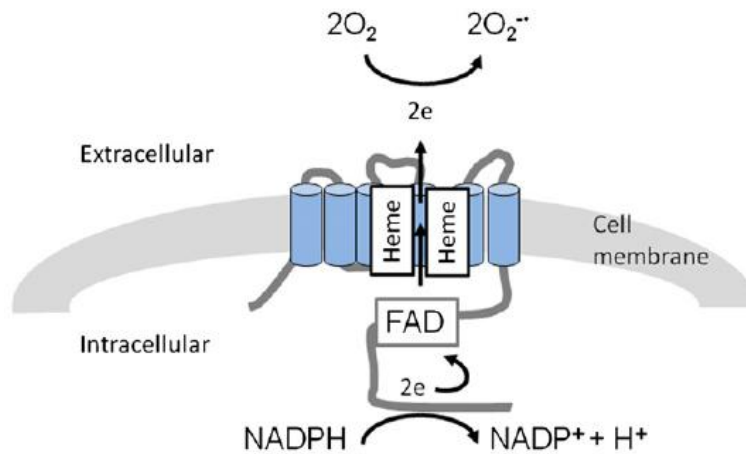


Esquema I-8: Estructura del centro catalítico conservado de la familia NADPH oxidasa. Tomado de Bedard and Krause 2007.

2.2 Mecanismo de acción de la subunidad catalítica

Dado que la estructura catalítica está altamente conservada en los 7 complejos de la familia, el mecanismo de acción de estas enzimas va a ser común para todos los miembros, y consiste en lo siguiente: en un primer paso se transfieren los 2 electrones del NADPH al FAD mediante gradiente electroquímico, desde donde los electrones de la flavina reducida (FADH_2) van a ser cedidos de forma univalente (de uno en uno) a la molécula de hierro central del grupo hemo interno (revisado en Bedard and Krause, 2007). El paso de electrones entre los dos grupos hemo se ve favorecido únicamente cuando una molécula de O_2 se une al grupo hemo externo, convirtiéndose en el aceptor final de los electrones, formándose el O_2^- (Esquema I-9).

Dependiendo de la localización subcelular de la isoforma, este O_2^- va a generarse dentro de la propia célula (NADPH oxidasas localizadas en las membranas de orgánulos) o en el espacio extracelular (NADPH oxidasas asociadas a la membrana plasmática). En este último caso, el O_2^- puede atravesar la membrana plasmática para entrar en la célula mediante canales de aniones ó bien puede dismutar a H_2O_2 , que rápidamente difunde a través de la membrana de la célula.



Esquema I-9: Mecanismo de acción del complejo NADPH oxidasa. Tomado de Maghzal et al., 2012)

Existen múltiples estudios que señalan al H_2O_2 como principal ROS generada a partir de la actividad de NOX4, DUOX1 y DUOX2. A diferencia del resto de NADPH oxidasas, tras la activación de estas tres isoformas, se detecta un incremento en los niveles de H_2O_2 en la célula, no existiendo sin embargo un aumento detectable de O_2^- , como se observa con el resto de enzimas de esta familia. El origen de este H_2O_2 , que actúa como molécula de señalización tras la activación de estos complejos enzimáticos, se ha sometido a debate, existiendo dos hipótesis principales: i) el H_2O_2 se forma a partir de una transformación del O_2^- generado en la subunidad catalítica del complejo, bien por dismutación espontánea, ó bien llevada a cabo por otras enzimas, siendo esta transformación tan rápida que experimentalmente no se detecta la formación del O_2^- ; ii) estos tres complejos NADPH oxidasa tienen la capacidad catalítica de generar esta molécula de manera directa.

Aunque esta cuestión todavía no ha sido resuelta, los resultados de los últimos años parecen inclinar la balanza a favor de la primera teoría. Serrander y colaboradores consiguieron detectar por primera vez la producción de O_2^- específica de NOX4 en orgánulos intracelulares, indicativo de que esta isoforma no generaría directamente el H_2O_2 (Serrander et al., 2007). En estudios más recientes se ha observado que el bucle-E de NOX4 (bucle que queda en el exterior de la membrana) resulta ser 28 aminoácidos más largo que el presente en NOX1 y NOX2, y que presenta una histidina altamente conservada que parece actuar como una fuente de protones que acelera la dismutación espontánea del O_2^- a H_2O_2 , ya que la mutación de esta histidina hace que aumenten los niveles de O_2^- mayoritariamente, en lugar de H_2O_2 (Takac et al., 2011). DUOX1 y 2 presentan dos estados de N-glicosilación: las isoformas parcialmente glicosiladas se encuentran en el RE, donde incrementan los niveles de O_2^- , mientras que las formas completamente glicosiladas están asociadas a membrana plasmática y en ellas se

detecta la formación de H_2O_2 . Por tanto, la generación de H_2O_2 en este caso no parece deberse a una producción directa de estas enzimas, sino que estaría asociado a una dismutación muy rápida del O_2^- a H_2O_2 favorecida por las modificaciones post-transduccionales que tienen lugar en el proceso de maduración de estas isoformas (Ameziane.El-Hassani et al , 2005).

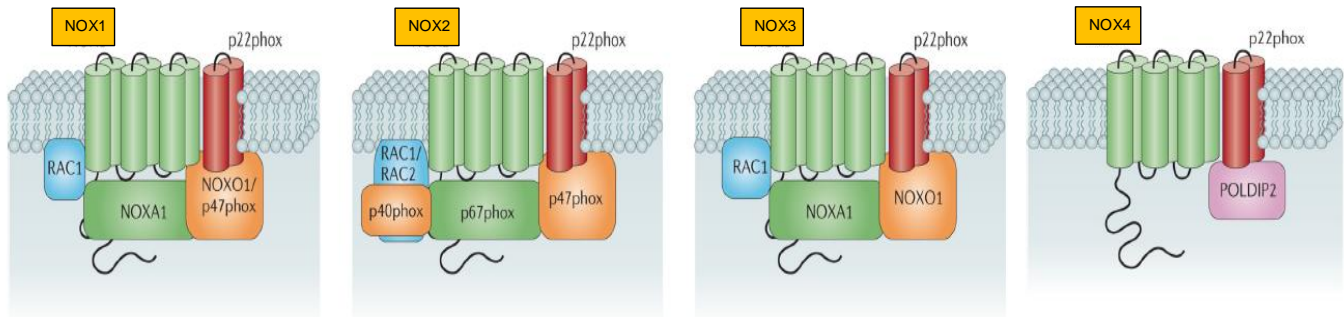
2.3 Regulación de la activación del complejo NADPH oxidasa.

La diferencia entre los miembros de esta familia reside en sus subunidades reguladoras y en los requerimientos para la activación del complejo. Siguiendo estos criterios, las NADPH oxidasas pueden clasificarse en dos grandes grupos: dependientes de $p22^{phox}$ y dependientes de Ca^{2+} .

I. Dependientes de $p22^{phox}$: NOX1, NOX2, NOX3 y NOX4.

En los complejos de NOX1 a NOX4, la proteína transmembrana $p22^{phox}$ es necesaria tanto para la estabilización de la subunidad catalítica NOX, a la que se encuentra unida tanto en estado inactivo como en estado activo del complejo (formando como se ha citado anteriormente el citocromo b_{558}), así como para el anclaje de las subunidades reguladoras. Estas proteínas reguladoras varían según el complejo NADPH oxidasa y son :

- **En NOX1:** NOXO1 (del inglés “NOX organizer 1”) , NOXA1 (del inglés “NOX activator 1”) y Rac1. En células vasculares de músculo liso, NOXO1 puede ser reemplazado por su homólogo $p47^{phox}$ (Drummond et al , 2011). En ratón, el complejo proteico parece tener una actividad constitutiva. Sin embargo, estudios de estas proteínas en células humanas sugieren que esta NADPH oxidasa presenta una actividad constitutiva muy débil, residual, y que su activación completa requiere la activación de PKC (del inglés “protein kinase C”) (Geiszt M. et al., 2003) (Esquema I-10).
- **En NOX2:** $p40^{phox}$, $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ y Rac1 y 2 (Esquema I-10).
- **En NOX3:** NOXO1. Puede requerir la actuación de NOXA1 según la especie, y la necesidad de la GTPasa Rac todavía no está clara, aunque parece ser menos importante para la activación que en el caso de NOX1 y 2 (revisado en Lambeth et al., 2007) (Esquema I-10).



Esquema I-10. Estructura de las isoformas dependientes de $p22^{phox}$ NOX1, NOX2, NOX3 y NOX4 de la familia NADPH oxidasa en mamíferos. Modificado de Drummond et al., 2011

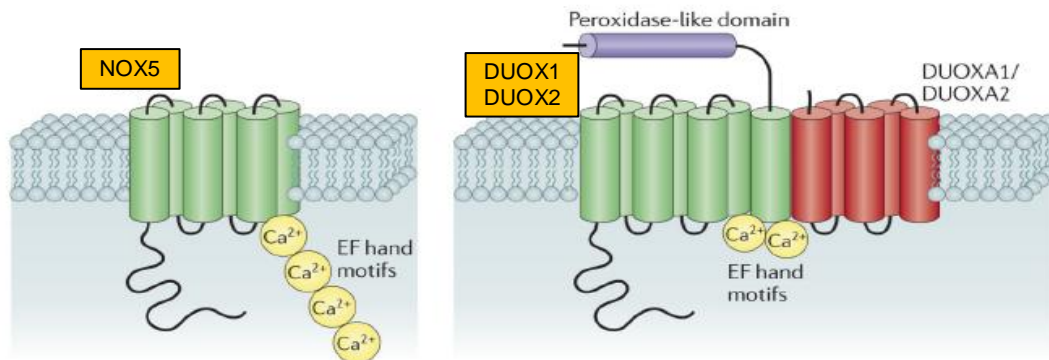
NOXO1, $p40^{phox}$ y $p47^{phox}$ son subunidades organizadoras, que colaboran en el reclutamiento de todos los miembros del complejo activo. NOXA1 y $p67^{phox}$ se consideran activadoras del complejo.

- **NOX4:** Es la única isoforma constitutivamente activa, es independiente de subunidades reguladoras citosólicas adicionales (Esquema I-10). Esta isoforma, a diferencia de las anteriores, sólo requiere la estabilización mediada por $p22^{phox}$ para que la subunidad catalítica lleve a cabo su función. El mecanismo de regulación de la actividad de esta isoforma todavía resulta desconocido. Los últimos estudios parecen indicar que esta NADPH oxidasa estaría regulada mediante factores de transcripción a nivel del ARNm que hacen que la subunidad catalítica sea rápidamente sintetizada y degradada, mientras que en otras NOX, la proteína y su función se mantienen en la célula varios días después de su transcripción (Serrander et al., 2007). En investigaciones posteriores se ha encontrado que, en células de músculo liso vasculares, la proteína Poldip2 (del inglés “polymerase (DNA-directed) δ -interactin protein 2”), actuaría como regulador positivo de la actividad enzimática de esta isoforma. Esta proteína se une a $p22^{phox}$, facilitando la unión y estabilización en la membrana del citocromo b_{558} en NOX4 (Lyle et al., 2009). Lyle y colaboradores sugieren múltiples niveles de regulación de esta isoforma por parte de Poldip2, que serían: i) incremento en la activación y producción de ROS, desempeñando una función similar a otras subunidades reguladoras, como $p47^{phox}$, $p67^{phox}$, NOXO1 y NOXA1; ii) dirigir la localización de NOX4 a compartimentos celulares específicos iii) mediar en el procesamiento traduccional y post-traduccional de NOX4 y $p22^{phox}$ que tiene lugar en el retículo endoplasmático y aparato de Golgi.

II. Dependientes de Ca²⁺ : NOX5, DUOX1 y DUOX2.

A este grupo pertenecen NOX5, DUOX1 y DUOX2, que se caracterizan por presentar un dominio N-terminal de unión a Ca²⁺ con varios motivos en mano-EF (en inglés “EF-hands”). De esta manera, la activación de estas NADPH oxidasas va a estar determinada por un aumento de iones Ca²⁺ en la célula.

- **NOX5:** su activación, a diferencia del resto de isoformas de esta familia, no requiere la asociación con ninguna subunidad reguladora. El dominio de unión a calcio de NOX5 consta de 4 motivos en mano-EF, formando dos parejas (Esquema I-11). La mitad N-terminal del dominio (residuos 1-78) contiene el primer y segundo motivo mano-EF, que tienen una afinidad de unión por el Ca²⁺ menor que el tercer y cuarto motivo, que se sitúan en la mitad C-terminal (residuos 79-169). Parece ser que la sensibilidad inherente de NOX5 al Ca²⁺ libre en el citoplasma es baja, requiere para su activación concentraciones muy elevadas que, fisiológicamente, únicamente pueden darse en los alrededores de la membrana plasmática. Sin embargo, la interacción de esta NADPH oxidasa con la calmodulina (Tirone, 2007) y su fosforilación en los residuos treonina 494 y serina 498 (Jagnandan, 2007) aumenta notablemente su sensibilidad al Ca²⁺, permitiendo su activación en presencia de niveles de este catión más moderados, habituales tras una estimulación de las células. Se piensa también que los dominios en mano-EF interactúan entre sí para aumentar su afinidad por el Ca²⁺ (Wei et al., 2012). Parece ser que ante un aumento en los niveles intracelulares de Ca²⁺ se produce un cambio conformacional en la estructura en mano-EF que permite su interacción específica con dos secuencias peptídicas del dominio catalítico de NOX5, lo que activa la transferencia de electrones del NADPH al O₂ (Wei et al., 2010; Tirone, 2010).



Esquema I-11. Estructura de las isoformas dependientes de Ca²⁺ NOX5, DUOX1 y DUOX2 de la familia NADPH oxidasa en mamíferos. Modificado de Drummond et al., 2011

- DUOX1 Y DUOX2: su dominio de unión al Ca^{2+} consta de 2 motivos en mano-EF. Además de estar reguladas por los niveles de Ca^{2+} en la célula, ambas requieren la asociación de una subunidad reguladora citosólica que forma heterodímeros con la subunidad catalítica de manera similar a p22^{phox} , que se denomina DUOXA (del inglés “DUOX activator”) 1 ó 2 según la DUOX con la que interaccionan (Esquema I-11). Esta proteína reguladora actúa como factor de maduración, mediando el procesamiento post-traducciona l y la transición de las subunidades catalíticas DUOX desde el RE al aparato de Golgi, y también participa en la translocación a la membrana plasmática (Grasberger et al., 2006). Un indicativo de la importancia de esta proteína reguladora sobre la actividad de estas isoformas es que curiosamente los genes de DUOX y los de su correspondiente DUOXA se encuentran adyacentes en el cromosoma, lo que sugiere una coregulación de la enzima y de su maduración a nivel de operón (revisado en Lambeth et al., 2007). Las DUOX presentan un séptimo dominio transmembrana unido en su extremo N-terminal con un dominio externo homólogo a peroxidasa, de ahí su nombre (DUOX, del inglés “Dual oxidases”). Este dominio parece no ser funcional. Desde un punto de vista estructural, no presenta algunos aminoácidos en su secuencia considerados esenciales para esta actividad (Daiyasu and Toh, 2000) y además, se ha observado que estas dos isoformas normalmente colocalizan con otras peroxidasa s, como tiroperoxidasa s en el tiroides o lactoperoxidasa en las glándulas salivares, que podrían llevar a cabo esta actividad enzimática en su lugar (revisado en Bedar and Krause, 2007).

2.4 Distribución y localización subcelular de la familia NADPH oxidasa:

- NOX1.

Se encuentra altamente expresada en el epitelio del colon y está presente en menor medida en gran cantidad de tejidos, como músculo liso de los vasos sanguíneos, células endoteliales, osteoclastos, placenta, útero y próstata (revisado en Bedard and Krause, 2007). En colon, aparece un gradiente de expresión de esta NADPH oxidasa, encontrándose bajos niveles en la región proximal del colon que van aumentando progresivamente hacia el área distal (Glebov et al., 2003). En este tejido, NOX1 ejerce dos funciones: defensa inmune y proliferación celular

(Rokutan, 2006; Rokutan, 2008). Esta isoforma parece localizarse principalmente en la membrana plasmática de las células, pero también se ha descrito su presencia en endosomas (Helmcke et al., 2009; Hilenski et al., 2004).

- NOX2.

Muy abundante y característica en fagocitos, donde las ROS que genera son necesarias principalmente para la defensa frente a patógenos (responsable del estallido respiratorio) y para las rutas de señalización relacionadas con la respuesta inflamatoria e inmunoprotectora, esenciales para la respuesta innata del individuo. También se expresa en neuronas, cardiomiocitos, músculo esquelético, músculo liso, linfocitos B, endotelio, células madre hematopoyéticas y hepatocitos (revisado en Bedard and Krause, 2007).

En la célula, su localización más habitual es la membrana plasmática (von Löhneysen et al., 2010), pero no es exclusiva, ya que también se ha encontrado su expresión en endosomas (Munmenbegwi et al., 2008; Ushio-Fukai, 2006), en el citoesqueleto perinuclear de células musculares lisas (Li and Shah, 2002) y en las sinapsis de las neuronas del hipocampo (Tejada-Simon, 2005).

- NOX3.

En el adulto, se expresa en gran medida en el oído interno, concretamente en cóclea y epitelio sensorial vestibular (Banfi et al., 2004; Krause, 2004). Sin embargo, se ha detectado también su expresión a muy bajos niveles en los huesos del cráneo, en cerebro, en pulmón, en bazo y en riñón fetales (Banfi et al., 2004; Cheng et al., 2001), expresión que desaparece en los tejidos del adulto, lo que sugiere que esta enzima debe jugar un papel importante en el desarrollo del feto. En el oído interno, esta isoforma es necesaria para la formación de la otoconia, que es el conjunto de otolitos ó cristales de Calcio implicados en la regulación del aparato vestibular (Paffenholz et al., 2004). En cuanto a su distribución subcelular, NOX3 parece localizarse exclusivamente en la membrana plasmática (Nakano et al., 2007).

- NOX4.

Es una isoforma ampliamente distribuída. Su mayor expresión se da en riñón, adulto y fetal, y se encuentra tanto en túbulos renales distales (Shiose et al., 2001) como en los proximales (Geiszt et al., 2000). En menor medida, NOX4 se expresa también en células endoteliales,

osteoclastos, páncreas, placenta, ovario, testículos, adipocitos, músculo liso vascular y músculo esquelético y neuronas (revisado en Bedard and Krause, 2007). Además de en riñón, se ha detectado una alta presencia de esta enzima en gran cantidad de tejidos fetales: corazón, cerebro, hígado, pulmón, músculo esquelético y bazo (Cheng et al., 2001).

Su localización subcelular ha sido estudiada principalmente en músculo liso vascular y endotelio. En estos tejidos esta isoforma se encuentra en niveles muy elevados en retículo endoplasmático (Van Buul et al., 2005). Se piensa que la alta presencia de NOX4 en este orgánulo no se debe únicamente a una localización funcional, sino también a la acumulación de la proteína durante su síntesis. Se ha demostrado también su expresión y actividad en el interior del núcleo (Anilkumar et al., 2013, Hilenski et al., 2004; Kuroda et al., 2005), lo cual resulta muy curioso e interesante teniendo en cuenta que es un espacio sin membranas y que la subunidad catalítica de NOX4, como la de todas las NOX, está formada por seis dominios transmembrana. Esta isoforma se encuentra también en la mitocondria (Case et al., 2013). En músculo liso vascular, está presente en las proximidades de las adhesiones focales (revisado en Drummond et al., 2012).

- NOX5.

Es la única enzima de la familia que no posee un tejido de expresión claramente principal. Tiene niveles de expresión altos en tejido linfático, en hígado, bazo, músculo liso vascular y testículos, y más bajos en estómago, páncreas, ovario y placenta (Bánfi et al., 2001; Cheng et al., 2001; Salles et al., 2005). Se considera que NOX5 puede jugar un papel importante en la proliferación celular (Brar et al., 2003). Esta NADPH oxidasa parece localizarse dentro de la célula en membranas internas en ausencia de estímulos, sin embargo, en respuesta a determinados agentes parece translocarse a la membrana plasmática de la célula (Kawahara and Lambeth, 2008).

- DUOX1 y 2.

En humanos, son conocidas también como las oxidasas del tiroides (ThOX), debido a que en esta glándula se encuentran muy expresadas y están muy implicadas en la síntesis de las hormonas tiroideas (De Deken et al., 2002). También se expresan en gran medida en otros tejidos, como son epitelio respiratorio, páncreas, próstata, testículos, glándulas salivares en el caso de DUOX1 (De Deken et al., 2000; Edens et al., 2001; Forteza et al., 2005) y tracto gastrointestinal (estómago, colon, recto), glándulas salivares y epitelio respiratorio en el caso

de DUOX2 (Edens et al., 2001; El Hassani et al., 2005; Forteza et al., 2005; Krause KH, 2004). En el tejido respiratorio, las dos isoformas parecen tener funciones diferentes: en condiciones fisiológicas, predomina la expresión de DUOX1, mientras que la expresión de DUOX2 parece ser inducible, y estar más involucrada en respuesta a infecciones (Harper et al., 2005).

En cuanto a su localización en las células, se ha visto que en tirocitos se localizan principalmente en la membrana apical de la célula, aunque también se encuentran en el interior de la célula, sobre todo en RE (De Deken et al., 2000; De Deken et al 2002). En el epitelio respiratorio también se expresan fundamentalmente en la membrana apical de las células (Schwarzer et al., 2004).

2.5 Regulación de la expresión de la familia NADPH oxidasa:

La capacidad de la célula de producir ROS a través de las NADPH oxidasas va a estar determinada tanto por el estado de activación de estas enzimas, como por los niveles de expresión de cada proteína. Por tanto, es necesaria también una regulación minuciosa de la expresión génica de todos los miembros del complejo activo.

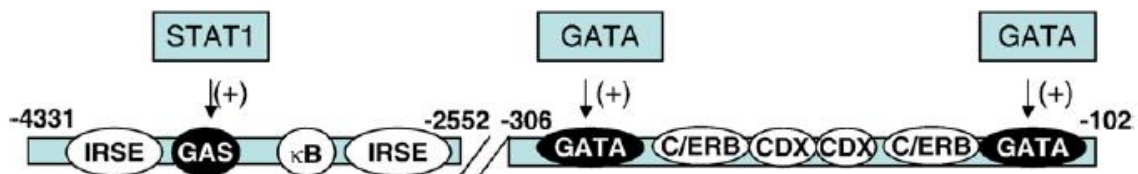
- **NOX1.**

NOX1 fue el primer homólogo de *NOX2* que se describió. Curiosamente, la longitud y el número de exones es idéntico en los genes de estas dos isoformas, y a nivel de proteína, presentan un grado de identidad de secuencias del 60% (Banfi et al., 2000; Banfi et al., 2003). La expresión de *NOX1* es también inducible por moléculas mediadoras de la inflamación, como Interferón- γ (IFN- γ), y por moléculas bacterianas asociadas a patógenos, como lipopolisacáridos (LPS), y, curiosamente, ambas moléculas actúan también como inductoras de la expresión de la subunidad reguladora *NOXO1*. La vitamina D3 parece inducir también la expresión de esta isoforma en colon (Geiszt et al., 2003; Kawahara et al., 2005; Kuwano et al., 2006).

La transcripción del RNAm de *NOX1* se ve incrementada también por factores de crecimiento y agonistas relacionados con estos. En células vasculares de músculo liso estos factores incluyen la Angiotensina II, PDGF (del inglés “platelet-derived growth factor”), prostaglandina F2 α (Katsuyama et al., 2002; Lassegue et al., 2001). Estudios en el sistema vascular apuntan como posibles implicados en la inducción de la expresión de esta NADPH oxidasa la transactivación del receptor de EGF (del inglés “epidermal growth factor”), la ruta PI3K/ATF-1

(del inglés “phosphatidyl-inositol 3-kinase”) y la PKC- δ (del inglés “protein kinase C”) (Fan et al., 2005). En células endoteliales BMP4 (del inglés “bone morphogenic protein 4”) actúa como inductor de la expresión de *NOX1* (Sorescu et al., 2004).

En humanos, el gen de *NOX1* se encuentra localizado en el cromosoma X (Esquema I-14). La región 5' del gen de *NOX1* (Esquema I-12) contiene elementos de unión para factores de transcripción activadores, como los STATs (del inglés “signal transducers and activators of transcription”), IRF (del inglés “interferon regulatory factor), AP-1, NF κ B, elementos CREB y CBP/p300, y factores GATA (Brewer et al., 2006; Kuwano et al., 2006).



Esquema I-12. Esquema de las regiones del promotor de *NOX1* en humanos. Los círculos negros indican regiones identificadas como responsables de la regulación de la expresión génica. Los círculos blancos indican regiones con secuencias consenso para un determinado factor de transcripción, representado en los rectángulos azules. Sus abreviaturas, provenientes del inglés, son las siguientes: IRSE, IFN- γ -responsive stimulated elements; GAS, γ -activated sequence; C/ERB, CCAAT/enhancer binding protein; CDX, caudal-related homeobox. Tomado de Lambeth et al., 2007.

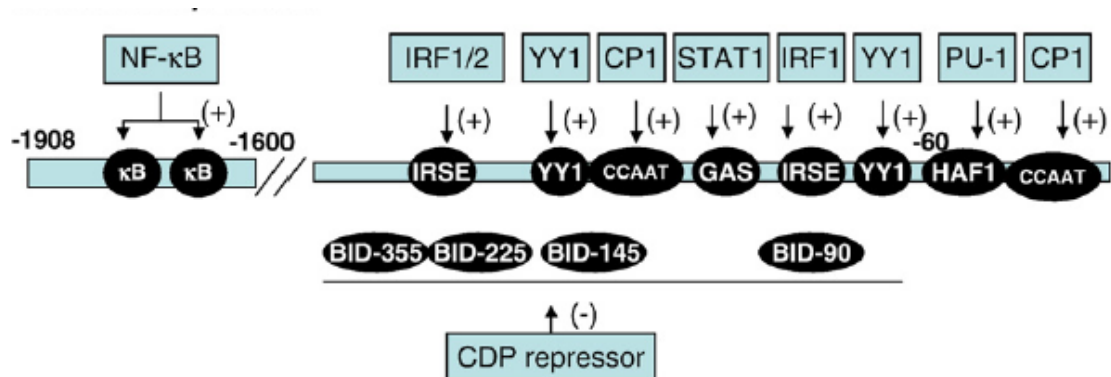
La unión de los factores de transcripción GATA (GATA-4 a GATA6) al promotor regulan la expresión constitutiva de *NOX1* en el epitelio intestinal (Brewer et al., 2006). La inducción de la expresión por el IFN- γ está mediada y regulada a través de STAT1, que se une a los elementos GAS (del inglés “ γ -activated sequence”) (Kuwano et al., 2005).

- *NOX2*

Se ha demostrado que la expresión del gen *NOX2* es inducible, aumentando sus transcritos de ARNm, al igual que *NOX1*, en respuesta a interferón- γ y a lipopolisacáridos bacterianos en fagocitos (revisado en Lambeth et al., 2007), y a Angiotensina II en tejido adiposo, islotes pancreáticos, aorta y corazón (Hattori et al., 2005; Touyz et al., 2004).

Su expresión génica está regulada por factores de transcripción activadores o represores. Entre los factores activadores se encuentran PU.1, Elf-1, YY1, IRF1 y 2, STAT1, NF κ B, HOXA9 y PB1 (Anrather et al., 2006; Bei et al., 2005; Eklund et al., 1996; Jacobsen and Skalnik, 1999;

Suzuki et al., 1998; Voo and Skalnik, 1999). Los elementos de unión de estos factores de transcripción en el promotor del gen *NOX2* quedan reflejados en el esquema I-13.



Esquema I-13: Esquema de las regiones del promotor de *NOX2* en humanos. Los círculos negros indican regiones identificadas como responsables de la regulación de la expresión génica. Sus abreviaturas, provenientes del inglés, son las siguientes: IRSE, IFN- γ -responsive stimulated elements; GAS, γ -activated sequence; HAF-1, haematopoietic-associated factor1; CCATT, CCATT box binding, BID, binding increased during differentiation. Los factores de transcripción están representados con un rectángulo azul. Tomado de Lambeth et al 2007.

IRF1 y 2 (del inglés “interferon regulatory factor 1 y 2”) se unen a elementos IRSE. STAT1 interacciona con la región GAS, y PU.1 lo hace con el elemento de unión de HAF1. YY1 se une a los sitios de unión YY1. El factor de transcripción NF κ B se va a unir a elementos reguladores situados en la parte distal del promotor. Todas estas interacciones se traducen en un incremento en la expresión de *NOX2*. Los factores represores de la expresión de *NOX2* son CDP (del inglés “CCATT displacement protein”), HOXA10 y Meis1 (Bei et al.,2005; Luo and Skalnik, 1996). CDP se une a cinco sitios en el promotor proximal en las células inmaduras, suprimiendo constitutivamente la expresión de *NOX2*. Durante la maduración de monocitos y macrófagos, la expresión de CDP disminuye, lo que resulta en un incremento en la expresión de esta NADPH oxidasa. Además, cuando CDP no está presente, el factor de unión a CCAAT conocido como CP1 puede unirse al promotor, actuando como un activador (Skalnik et al., 1991).

- *NOX3*.

NOX3 comparte con *NOX2* una identidad en la secuencia de aminoácidos del 56%. El gen se encuentra en el cromosoma 6. Su distribución en adulto, restringida al oído interno, sugiere que en este tejido quizás podría existir una expresión y activación constitutiva. Sin embargo, en la

actualidad, no existen publicaciones que definan el promotor de esta isoforma, por lo que su regulación a nivel génico o transcripcional es desconocida.

- NOX4.

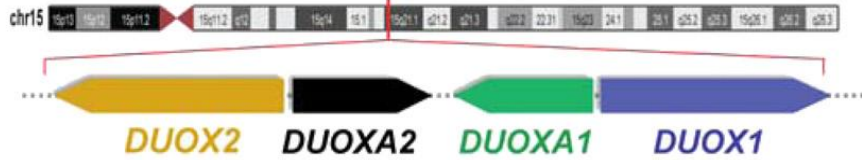
El gen *NOX4* se sitúa en el cromosoma 11 en humanos. Evolutivamente, esta isoforma está más distanciada de *NOX2* que el resto de enzimas de este subgrupo (dependientes de p22^{phox}), compartiendo una identidad aminoacídica del 39%. En tejido vascular, la expresión del ARNm aumenta en respuesta a las siguientes condiciones y factores: distintos tipos de estrés (Hwang et al., 2003; Pedruzzi et al., 2004), daño vascular, isquemia e hipoxia (Suliman et al., 2004; Vallet et al., 2005), TGF- β 1 , TNF- α (Moe et al., 2006; Sturrock et al., 2005) y Angiotensina II (Higashi et al., 2003; Wingler et al., 2001). La expresión de *NOX4* se ve disminuída en respuesta a ligandos de PPAR- γ (del inglés “Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma”) y a BMP4 (Hwang et al., 2005).

- NOX5.

El gen *NOX5* se localiza en el cromosoma 15 en humanos. Solamente comparte con *NOX2* una identidad de la secuencia aminoacídica del 27%. La región proximal del promotor de esta isoforma presenta diversos sitios putativos de unión para NF- κ B, AP1, STATs, C/EBP (CCAAT/enhancer binding proteins), Sp1 (“specificity protein 1”) y GATA (revisado en Manea et al., 2012). El IFN- γ induce un aumento de la translocación nuclear de los factores de transcripción C/EBP, activando la expresión del promotor de *NOX5* en células de músculo liso vasculares (Manea et al., 2014). A nivel epigenético, parece ser que la metilación del gen que codifica esta NADPH oxidasa se correlaciona con una menor expresión de su ARNm (Zhu et al., 2011).

- DUOX1 y DUOX2:

Ambos genes se encuentran localizados en el cromosoma 15. Los genes codificantes de *DUOX1* y de *DUOX2* se encuentran organizados en el cromosoma (Esquema I-14), siguiendo una configuración cabeza-cabeza (del inglés “head-to-head”) y separados por una región relativamente corta (de 16 Kb). Comparten con *NOX2* el 57% y 43% de la secuencia de aminoácidos de la proteína, respectivamente. Sin embargo, *DUOX1* y 2 presentan una homología muy grande entre sí, del 83% (De Deken et al., 2000).



Esquema I-14: esquema representativo de la organización cabeza-cabeza y localización de los genes codificantes de DUOX1 y DUOX2 y sus correspondientes subunidades reguladoras a lo largo del cromosoma. Tomado de Hulur et al., 2011.

La expresión de las *DUOX* es también inducible. En el epitelio del tracto respiratorio, parece que aumenta en respuesta a las citoquinas IL-4 e IL-13 y al IFN- γ (Harper et al., 2005). En líneas celulares animales del tiroides se ha observado una inducción de estas NADPH oxidasas en respuesta a insulina (Morand et al., 2003). Estudios más recientes en tirocitos humanos demuestran un aumento muy rápido de la expresión tanto de *DUOX2* como de su subunidad reguladora *DUOXA2* en respuesta a las citoquinas tiroideas IL-4 e IL-13. *DUOX1/DUOXA1* sin embargo no parecen estar reguladas por estas citoquinas. La inducción en respuesta a la IL-4 parece requerir la unión de esta citoquina a su receptor de tipo 2 y la consecuente activación de las rutas de señalización JAK1-STAT6 (Esquema I-17). El IFN- γ por el contrario, en estas células, parece inhibir la expresión de las *DUOX*, y es capaz de reprimir la inducción dependiente de estas citoquinas tiroideas. (Raad et al., 2013).

Esta regulación positiva de IL-4 e IL-13 sobre *DUOX2* se ha podido observar también en líneas celulares humanas de colon y en células de la piel para *DUOX1* (Hirakawa et al., 2011). En páncreas, al igual que en epitelio respiratorio, el IFN- γ actúa como regulador positivo de la expresión de *DUOX2* (Wu et al., 2011).

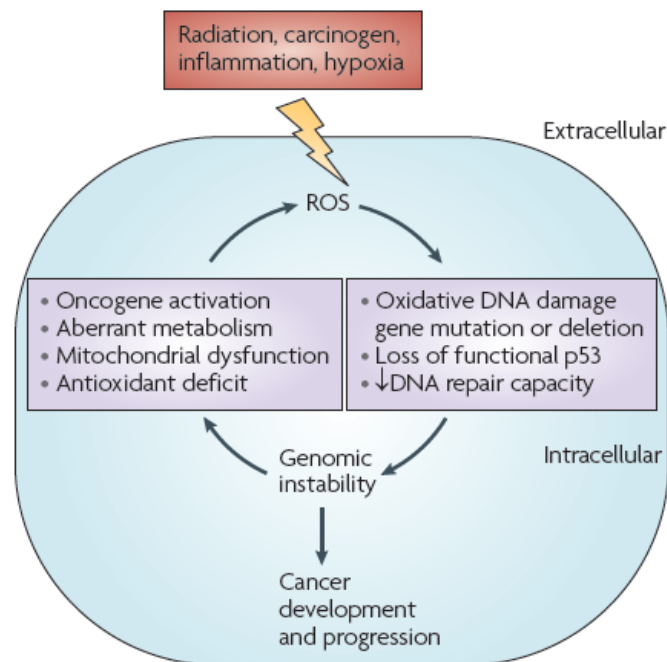
Se ha descubierto muy recientemente que la expresión de *DUOX2* es inducida en las células del epitelio respiratorio como una respuesta antiviral (Fink et al., 2013).

3. ROS Y NADPH OXIDASAS EN CÁNCER

En la actualidad, está ampliamente demostrado que las células tumorales muestran niveles de ROS más elevados que las células sanas (Szatrowski and Nathan, 1991; Toyokuni et al., 1995). Se ha descrito que las mitocondrias de las células tumorales están funcionalmente alteradas, y

una producción aberrante de ROS mitocondrial contribuye a la carcinogénesis (Gius and Spitz, 2006; Spitz et al., 2000). Además, la expresión de algunas enzimas antioxidantes se encuentra también alterada en células cancerosas (Oberley, 2005; Oberley and Buettner, 1979; Ridnour et al., 2004).

Teniendo en cuenta el papel dual de las ROS, que por un lado, son reguladores de la señalización celular y la expresión génica en gran cantidad de procesos en la célula, y por otro lado capaces de provocar daños en prácticamente todos los tipos de biomoléculas por su oxidación, generando, entre otros eventos, mutaciones en el DNA e inestabilidad genómica, es lógico que niveles elevados de ROS contribuyan a la inducción y al mantenimiento del fenotipo tumoral (Behrend et al., 2003; Wu, 2006) (Esquema I-15).



Esquema I-15. Ciclo de estrés generado por ROS en cáncer. Las especies reactivas del oxígeno generadas por fuentes intra o extracelulares pueden producir daños en el DNA, que se van acumulando, comprometiendo la correcta reparación. Esto promueve la inestabilidad genómica, que va a llevar a la activación de oncogenes, a un metabolismo aberrante, a una disfunción de la mitocondria y a una disminución de la defensa antioxidante. Todos estos eventos elevan aún más los niveles de ROS en la célula, aumentando el daño en el DNA y la inestabilidad genómica. Así, se forma un círculo vicioso que da lugar al desarrollo y progresión del cáncer (Tomado de Trachootham et al., 2009)

Las NADPH oxidasas regulan en las células sanas procesos fisiológicos homólogos a fenotipos tumorales, como son el aumento de la supervivencia, proliferación, angiogénesis, migración, etc, por lo que no resulta extraño que en muchos tipos de cáncer, se haya identificado un aumento en la inducción de la expresión y actividad de isoformas específicas de las NADPH oxidasas como

causa de esta sobreproducción de ROS en las células tumorales, sugiriéndose una relación NOX-oncogenes (Ushio-Fukai and Nakamura, 2008; Wu, 2006). Así, NOX1 se relaciona fundamentalmente con cáncer de colon (Fukuyama et al., 2005), y se ha demostrado también su asociación con cáncer de estómago (Tominaga et al., 2007) y de próstata (Lim et al., 2005). NOX4 está sobreexpresada en glioblastoma, melanoma, cáncer renal y cáncer de ovarios (Graham et al., 2010; Maranchie and Zhan, 2005; Shono et al., 2008; Vaquero et al., 2004; Yamaura et al., 2009). NOX5 está implicada en cáncer de próstata, cáncer de esófago y tricoleucemia (Brar et al., 2003; Fu et al., 2006; Hong et al., 2010) y DUOX1 y 2 se asocian a cáncer de tiroides, pulmón y páncreas (revisado en Meitzler et al., 2013).

Se conocen numerosos oncogenes y receptores de factores de crecimiento constitutivamente activos capaces de inducir tanto la expresión como la actividad de NOX, por ejemplo: mutaciones en el oncogen K-Ras se correlacionan con un incremento en el RNAm y actividad de NOX1 (Laurent et al., 2008); los receptores constitutivamente activos FLT3/ITD (del inglés “Receptor FMS-like tyrosine kinase-3/Internal Tandem Duplications”), mantienen la señalización de NOX1 y 2 mediante la fosforilación y activación del factor de transcripción STAT5, que colocaliza con Rac1 (Sallmyr et al., 2008); BLT-2 (del inglés “leukotriene-B4 receptor-2”) parece ser capaz de inducir a NOX1 y NOX4 para aumentar la activación de la proteína MMP2 (del inglés “matrix metalloproteinase 2”), favoreciendo la invasión y metástasis (Kim et al., 2010; Seo et al., 2012). Se ha descrito también que HIPK2, un correpresor transcripcional, induce la expresión de NOX1, impidiendo así la transcripción de genes pro-apoptóticos mediante la inactivación de p53 (Puca et al., 2010).

Avances recientes muestran que en algunos cánceres, como el de pulmón, en un estadio temprano de la transformación neoplásica, tiene lugar el silenciamiento epigenético de las NADPH oxidasas mediante hipermetilación de la región del promotor o de los genes requeridos para el correcto ensamblaje y actividad del complejo (revisado en Hayes and Knaus, 2013), lo que significa que no solo el incremento de la expresión y actividad de las NADPH oxidasas, sino también su silenciamiento, promoverían la tumorigénesis.

Se ha descrito también como las NOX ejercen un papel de protección frente a anoikis. Se denomina anoikis al proceso de apoptosis inducido por la pérdida de contacto con la matriz extracelular (ECM, del inglés “Extracellular matrix”) en células adherentes normales (Giannoni et al., 2008). En una situación normal, parece que el contacto ECM-célula durante la expansión y crecimiento celular estimula la producción de ROS por NADPH oxidasas dependientes de Rac1, que oxidan y activan a la quinasa Src, que promueve la fosforilación del EGFR (del inglés “Epidermal growth factor receptor”), activando la señalización a través de ERK y AKT, que resultan

en la degradación de la proteína pro-apoptótica Bim, inhibiendo la apoptosis (Peshavariya et al., 2009). Se ha demostrado que la actividad de NOX1 estimulada por ANGPTL-4 (del inglés “Angiopietin-related protein-4”) puede mimetizar las condiciones del crecimiento dependiente de anclaje a matriz extracelular en células tumorales, facilitando la metástasis del cáncer (Terada and Nwariaku, 2011).

3.1 ROS y NADPH oxidasas en cánceres hematopoyéticos:

La implicación de las ROS y NADPH oxidasas en neoplasias hematopoyéticas está menos estudiada. Se sabe que las ROS pueden controlar la longevidad (Ito et al., 2006) y la capacidad de autorrenovación (Jang and Sharkis, 2007) de las células madre hematopoyéticas (HSCs del inglés “Haematopoietic Stem Cells”). Además se conoce que distintas citoquinas hematopoyéticas son capaces de inducir la producción de ROS (Sattler et al., 1999). Nuestro grupo de investigación ha demostrado recientemente que, en células madre hematopoyéticas humanas, la producción de ROS por una NADPH oxidasa dependiente de p22^{phox} es necesaria para que se produzca una completa activación de las vías de señalización que guían la megacariopoyesis (Sardina et al., 2010). Por lo tanto, si las ROS son importantes en la diferenciación hematopoyética y en la biología de las HSC, un desequilibrio en la homeostasis redox celular podría implicar el desarrollo de neoplasias hematológicas.

En la leucemia mieloide aguda (LMA o AML, del inglés “acute myeloid leukaemia”) aparece con frecuencia el receptor FLT3 mutado por duplicaciones internas en tándem, (FLT3/ITD), obteniendo una actividad quinasa constitutiva. Este receptor activo induce un incremento de ROS vía NADPH oxidasas, que se relaciona con mayor daño en el DNA y mayor tasa de errores en su reparación, contribuyendo a la transformación a células leucémicas (Sallmyr et al., 2008). Además, un alto riesgo de desarrollar LMA parece estar asociado con la expresión de una forma truncada del receptor del factor estimulador de colonias granulocíticas (G-CSF), y se ha observado que la producción de ROS es más alta en presencia de esta forma truncada del receptor que en células con el receptor silvestre, lo que una vez más relaciona el aumento de ROS con la leucemogénesis (Zhu et al., 2006). Los pacientes con síndromes mielodisplásicos (MDS) tienden a desarrollar leucemia mieloide aguda. Existe un modelo *in vivo* de ratón que muestra como la producción de ROS por las NOX contribuiría a la inestabilidad genómica que llevaría a la progresión de síndromes mielodisplásicos a leucemia mieloide aguda. También se ha observado que las alteraciones genéticas más comunes en paciente con MDS son mutaciones activadoras de N-Ras, y se conoce que la activación de Ras induce la activación de NADPH oxidasas en células

humanas progenitoras normales CD34+, concediendo una proliferación independiente de factores de crecimiento. Esto sugiere que la producción de ROS dependiente de Ras colaboraría en el progreso de la mielodisplasia a la leucemia (Hole et al., 2010; Rassool et al., 2007).

El origen y desarrollo de la leucemia mieloide crónica (LMC o CML, del inglés “Chronic Myelogenous Leukaemia”) está también conectado con la producción de ROS. Esta conexión será descrita en el siguiente punto de la introducción.

Las leucemias linfoides también parecen estar vinculadas a ROS. Se ha descrito que en leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL), las células primarias presentan niveles de ROS más elevados, que conducen a la oxidación e inactivación de la fosfatasa PTEN. La inhibición de PTEN lleva a una hiperactivación de las vías de señalización PI3K/AKT, favoreciendo la viabilidad de las células leucémicas (Silva et al., 2008).

NOX5 se encuentra expresada en células B circulantes malignas en tricoleucemia (HCL, del inglés “Hairy Cell leukaemia”) pero no en células B circulantes normales. Los autores sugieren que la producción de ROS por NOX5 promueve la inactivación de SHP1, lo que contribuiría a la activación constitutiva de células HCs (Kamiguti et al., 2005).

4. LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA (LMC).

La leucemia mieloide crónica (LMC o CML [del inglés “*Chronic myelogenous leukemia*”]) es un desorden hematológico mieloproliferativo caracterizado por una excesiva e incontrolada acumulación de células mieloides en médula osea y sangre periférica, que tienen su origen en una célula madre pluripotente transformada. Su incidencia es de 1-1,5 casos por cada 100.000 personas al año y afecta normalmente a individuos adultos, con una edad media de inicio de entre 50 y 60 años. Los síntomas ligados a esta enfermedad son letargo, pérdida de peso, sangrados inusuales, sudores y anemias o esplenomegalia, aunque el 50% de los casos detectados en países desarrollados son asintomáticos (Perrotti et al., 2010). Este tipo de leucemia representa el 15-20% de las leucemias (Ghaffari et al., 1999).

Esta enfermedad comienza con una fase inicial, denominada fase crónica, que se caracteriza por la expansión de células mieloides funcionales, principalmente granulocitos, apareciendo también un incremento de sus células progenitoras en sangre periférica (Champlin and Golde, 1985; Clark et al., 1989). En ausencia de tratamiento, la LMC progresa a un estadio más agudo, que se puede subdividir en las fases acelerada y blástica. La fase blástica, también llamada crisis blástica, se

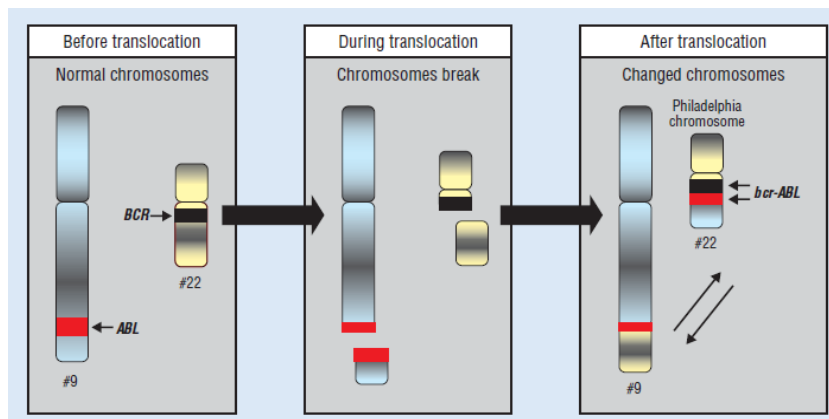
identifica por la pérdida de la capacidad de diferenciación de las células, produciéndose un bloqueo en la diferenciación hematopoyética que provoca la acumulación de células inmaduras (blastos) tanto en médula ósea como en sangre periférica (Calabretta and Perrotti, 2004; Melo and Barnes, 2007). Esta fase es terminal debido a la pérdida de funcionalidad de las células mieloides. Los pacientes que llegan a la fase blástica tienen una supervivencia media de tan sólo 6 meses.

El mecanismo molecular responsable de la progresión de la enfermedad desde la fase crónica hasta la fase blástica no se conoce exactamente, aunque se piensa que puede estar relacionado con la aparición de mutaciones en supresores tumorales como p53, la activación de factores oncogénicos o el incremento de la inestabilidad genómica y la aparición de alteraciones epigenéticas (Calabretta and Perrotti, 2004).

4.1 Fase crónica de la enfermedad.

A nivel molecular, la fase crónica de la enfermedad se caracteriza por la presencia del cromosoma Philadelphia (Ph), que resulta de la translocación recíproca $t(9;22)(q34;q11)$. Esta translocación entre cromosomas (Esquema I-16) yuxtapone el extremo 3' del proto-oncogén *ABL* (del inglés “Abelson murine leukemia viral oncogen homolog 1”) en el cromosoma 9 con el extremo 5' del gen *BCR* (del inglés “B-cell receptor”) en el cromosoma 22, lo que da lugar a la fusión génica *BCR-ABL* (Bartram et al., 1983; Groffen et al., 1984). Se piensa que la adquisición del oncogén *BCR-ABL* sucede inicialmente en una única célula madre leucémica (LSC, del inglés “Leukemic Stem Cell”), que adquiere una ventaja proliferativa sobre las células madre hematopoyéticas (HSC, del inglés “Hematopoietic stem cells”) normales (Bruns et al., 2009).

La proteína quimérica BCR-ABL codificada por este oncogén presenta actividad tirosina

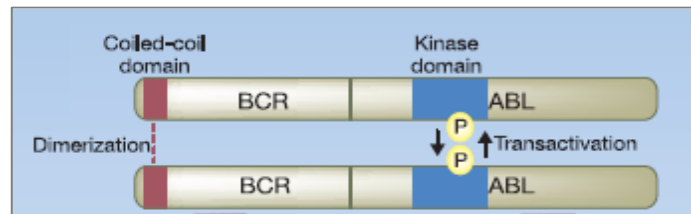


Esquema I-16. Translocación recíproca que da lugar al cromosoma Philadelphia.

Tomado de Hazlehurst et al., 2009.

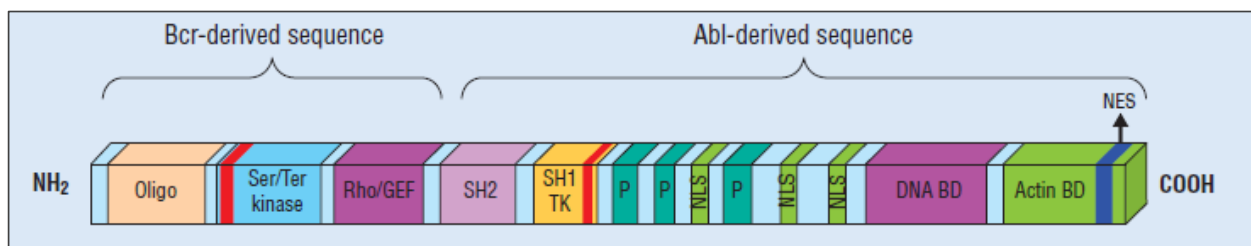
quinasa constitutiva y va a ser la responsable del fenotipo tumoral de estas células leucémicas, ya que su expresión en las células hematopoyéticas induce resistencia a la apoptosis (Bedi et al., 1994; McGahon et al., 1994), independencia de factores de crecimiento para crecer (Sirard et al., 1994) y leucemogénesis (Daley et al., 1990; Heisterkamp et al., 1990; Kelliher et al., 1990).

Aunque la proteína BCR posee actividad serina-treonina quinasa, la actividad catalítica de la oncoproteína va a residir en la secuencia derivada de ABL, concretamente en su dominio SH1 (del inglés “SRC homology 1”). La fusión de BCR con ABL permite la dimerización ó tetramerización de la oncoproteína a través del dominio de oligomerización del extremo N-terminal, también denominado “coiled-coil” (Esquema I-17), y con esto, su autofosforilación en la tirosina-177 (Y-177). Esto se traduce en un incremento en el número de residuos de fosfotirosina en BCR-ABL, hecho que otorga a la quinasa una activación constante, y que además va a permitir su interacción con un mayor número de proteínas citoplasmáticas a través de su dominio SH2 (del inglés “SRC homology 2”) (Esquema I-18).



Esquema I-17. Dimerización de BCR-ABL. Modificado de O’Hare et al., 2011

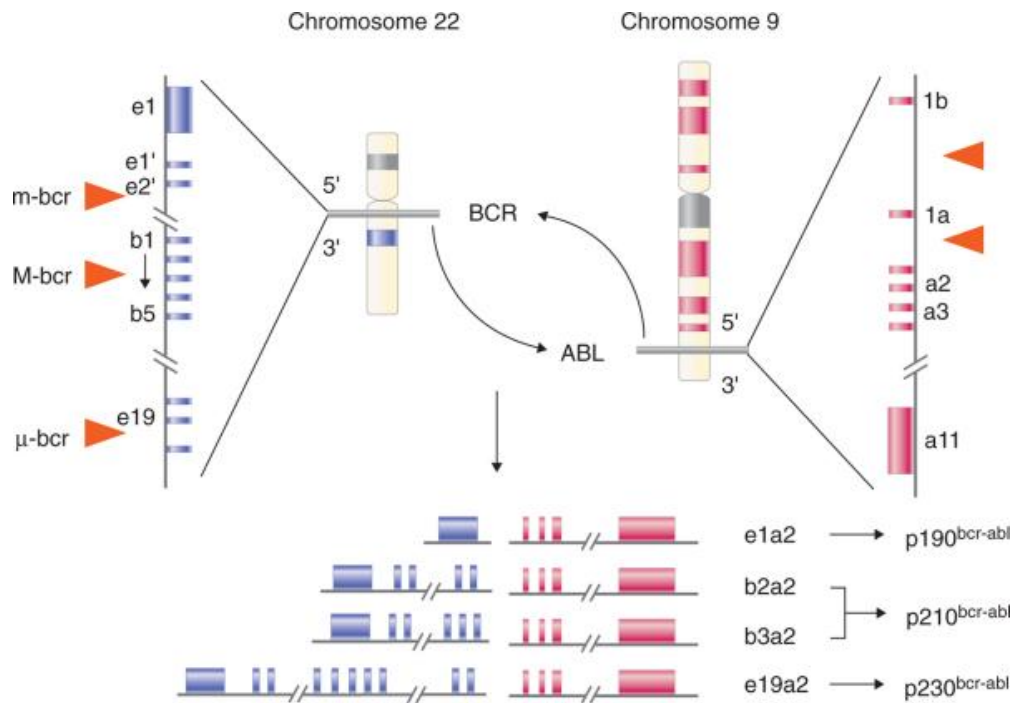
BCR-ABL presenta además un dominio Rho/GEF, intercambiador de nucleótidos de guanina, que permite a esta quinasa participar en la señalización de proteínas G. También posee un dominio de unión a actina y otro de unión a ADN y varias señales de localización nuclear (NLS, del inglés “nuclear localization signal”) (Bernt and Hunger, 2014).



Esquema I-18. Dominios estructurales de la oncoproteína BCR-ABL. Tomado de Hazlehurst et al., 2009.

El punto exacto de rotura dentro de los genes *BCR* y *ABL* durante la translocación cromosómica va a determinar tres isoformas diferentes de la proteína BCR-ABL, de 190, 210 y 230 kDa (Esquema I-19). La mayoría de las roturas en el gen de *ABL* suceden entre los exones 1a y 1b, mientras que las roturas en el locus *BCR* ocurren en un área de mayor tamaño que abarca 20 exones (Wonh and Witte, 2001).

Las tres isoformas de BCR-ABL presentan distintas capacidades de transformación celular dando lugar a diferentes fenotipos tumorales. Así, existe una fuerte asociación de las tres formas de BCR-ABL con tipos específicos de leucemia.



Esquema I-19. Puntos de rotura en los genes *BCR* y *ABL* y las distintas isoformas *BCR-ABL* resultantes. Tomado de <http://www.cixip.com/index.php/page/content/id/612> (Medical books online, chapter 195, "The chronic leukemias")

La isoforma p210^{BCR-ABL} es el marcador patológico de la leucemia mieloide crónica (LMC). Está también implicada en un tercio de las leucemias linfocíticas agudas cromosoma philadelphia positivas (Ph+) (ALLs, del inglés "acute lymphocytic leukemia") (Deininger et al., 2000), y ocasionalmente, en leucemia mieloide aguda (LMA) y mieloma (Kantarjian et al., 1991; Martiat et al., 1990).

Los dos tercios restantes de los casos de Ph+ ALL están ligados a p190^{BCR-ABL} (Kantarjian et al., 1991; Melo, 1996), y también el 3% de los casos atípicos de LMC que presentan monocitosis en vez de granulocitosis, denominada leucemia mielomonocítica crónica (Melo et al., 1994).

La forma p230^{BCR-ABL} ha sido la última en identificarse, y parece estar relacionada principalmente con la aparición simultánea de LMC y neutropenia (Pane et al., 1996).

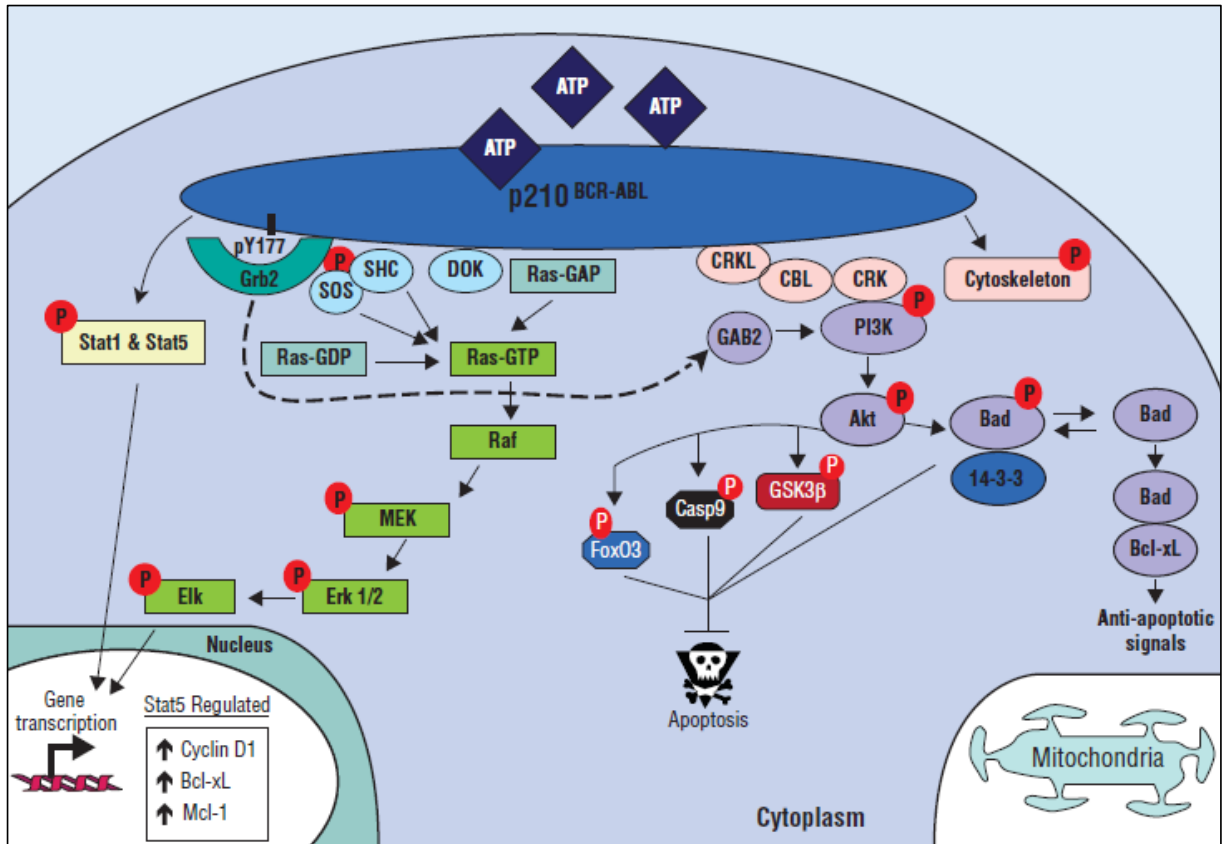
Aún se desconoce la razón por la que distintas formas de la oncoquinasa BCR-ABL están asociadas preferentemente a determinados tipos de leucemia, aunque una posible explicación sería las células diana en las que aparece el cromosoma Philadelphia y el tipo de quinasa que se forma.

4.2 Vías de señalización asociadas a BCR-ABL en LMC.

La quinasa BCR-ABL presenta dos diferencias fundamentales con la quinasa parental c-ABL, por una parte BCR-ABL presenta mayor diversidad de dominios de interacción con otras proteínas, y por otra mientras que c-ABL tiene localización nuclear, BCR-ABL se sitúa en el citoplasma. Esto determina que BCR-ABL pueda activar varias cascadas de señalización que provocan la supervivencia celular (Esquema I-23). La activación de la ruta de PI3K/AKT por BCR-ABL parece esencial para el mantenimiento de la supervivencia de las células leucémicas (Kharas et al., 2004; Skorski et al., 1997). PI3K es una proteína heterodimérica, con una subunidad reguladora (p85) que contiene un dominio SH3 y dos dominios SH2, y una subunidad catalítica (p110). Para activarse, p85 ha de unirse a proteínas fosforiladas en tirosina, y la activación a través de BCR-ABL parece deberse a una interacción indirecta entre ambas proteínas. Para que se produzca esta activación es necesaria la autofosforilación de la tirosina-177 (Y-177) de BCR-ABL, lo que permite la unión con Grb2 y Gab2 lo que induce la activación de PI3K (Sattler et al., 2002). También hay evidencias que demuestran que la fosforilación de CRKL por BCR-ABL contribuye a la activación de PI3K (Sattler et al., 1996).

Se han identificado múltiples dianas de PI3K, entre las que destaca AKT, pues produce una ventaja de supervivencia contribuyendo a la transformación celular. AKT activa una red de proteínas, incluyendo FoxO, Bad o GSK3 β que favorecen la supervivencia celular. La fosforilación de los factores de transcripción FoxO por parte de AKT determina su migración al citoplasma, impidiendo de esta manera que activen la transcripción de varias moléculas proapoptóticas como Bim y Trail (Modur et al., 2002; Stahl et al., 2002). Además AKT es capaz de fosforilar Bad, lo que contribuye a la supervivencia celular (Neshat et al., 2000). AKT también fosforila a GSK3 β provocando su inactivación. Dos de las dianas de GSK3 β son la ciclina D1 y β -catenina, cuya fosforilación determina su degradación vía proteasoma (Diehl et al., 1998).

La autofosforilación de la Y177 de BCR-ABL determina también la activación de la ruta de las MAPKs Raf/MEK/ERK a través de la GTPasa Ras, lo que finalmente desemboca en la fosforilación de Elk, favoreciendo la transcripción génica (Hazlehurst et al., 2009).



Esquema I-20. BCR-ABL activa múltiples rutas de señalización que contribuyen al crecimiento y supervivencia. Tomado de Hazlehurst et al , 2009

Las proteínas STAT (signal transducer and activator or transcription) son activadas por receptores de citoquinas y activan la transcripción de genes necesarios para el crecimiento, supervivencia y diferenciación de células hematopoyéticas. BCR-ABL fosforila a STAT5 y en menor grado a STAT3 y STAT1. La activación constitutiva de STAT5 en células que expresan BCR-ABL explicaría su independencia de factores de crecimiento. La activación de STAT5 contribuye a aumentar la expresión de proteínas antiapoptóticas como BCL-X (Gesbert and Griffin, 2000), o al incremento de la ciclina D1, lo que facilitaría la entrada en fase S del ciclo celular (de Groot et al., 2000).

Por tanto, la activación constitutiva de las rutas que acabamos de describir por BCR-ABL contribuye a la transformación y resistencia a la apoptosis de las células leucémicas.

4.3 Tratamiento de la leucemia mieloide crónica.

La importancia de BCR-ABL en la leucemia mieloide crónica se estableció hace dos décadas con el uso de modelos murinos, en los que los animales irradiados y transplantados con células de médula ósea p210^{BCR-ABL} desarrollaban un desorden mieloproliferativo muy cercano a la fase crónica de LMC (Daley et al., 1990). Los ratones que expresaban la quinasa BCR-ABL inactiva, sin embargo, no manifestaban la enfermedad (Zhang and Ren, 1998). Estos estudios confirmaron el requerimiento de la quinasa activa en la génesis de la leucemia *in vivo*, y expusieron a BCR-ABL como una diana terapéutica para este tipo de cáncer.

Actualmente, la mayoría de los pacientes con leucemia mieloide crónica son tratados con los denominados inhibidores de tirosina quinasa (TKIs, del inglés “tyrosin-kinase inhibitors”), y por lo tanto son agentes que inhiben la actividad de la oncoproteína BCR-ABL. Así, el primer fármaco que se desarrolló fue el imatinib (STI-571, Gleevec) que inhibe la actividad de la quinasa al unirse específicamente al dominio de unión a ATP (Schindler et al., 2000). Entre el 60 y el 70% de los pacientes tratados con Imatinib en las fases iniciales de la enfermedad muestran una desaparición casi completa de las células portadoras del cromosoma Ph en su médula ósea 5 años después de iniciar el tratamiento. Aunque el tratamiento con imatinib es muy efectivo no erradica la enfermedad. Incluso en pacientes con buena respuesta al tratamiento, se pueden detectar células portadoras del oncogén mediante PCR (Druker et al., 2006). Hay distintas hipótesis para explicar la incapacidad del imatinib para erradicar la enfermedad, entre ellas la aparente insensibilidad de las células madre leucémicas (LSCs) portadoras del oncogén *BCR-ABL* al tratamiento con imatinib (Cortes et al., 2004; Michor et al., 2005). Se especula con la posibilidad de que el nicho donde se alojan las LSCs sea responsable de conferir resistencia intrínseca a este tratamiento. Por otra parte, el tratamiento con imatinib es menos efectivo durante la fase blástica, lo que sugiere que la evolución de la enfermedad hasta esta fase pueda ser debida a un crecimiento independiente de BCR-ABL. En cualquier caso si el paciente responde al tratamiento con imatinib es muy improbable que progrese hasta la fase blástica, esto ocurre tan solo en un 2% de los individuos (Druker et al., 2006).

No obstante, hay pacientes que muestran insensibilidad al imatinib al inicio del tratamiento, presentando así resistencia primaria, mientras que otros desarrollan la resistencia tras un tiempo de administración (resistencia secundaria o adquirida). Esto suele ser consecuencia de la aparición de mutaciones en el bolsillo de unión a ATP del dominio quinasa, lugar al que se unen estos inhibidores de BCR-ABL (Apperley, 2007; Druker et al., 2006). Por este motivo, en los

últimos años se han desarrollado nuevas generaciones de inhibidores de BCR-ABL, buscando una mayor especificidad de unión a la oncoproteína, entre los que destacan el nilotinib, el dasatinib y el ponatinib, encontrándose este último aún en fase de ensayo en pacientes. Estos nuevos inhibidores son más potentes que el imatinib y se muestran efectivos en pacientes en los que la terapia inicial con Imatinib ha fallado. No obstante, entre el 15 y el 20% de los pacientes en fase crónica no responden a ninguno de los inhibidores, y por lo tanto su prognosis es mala debido a la posibilidad de progresar hasta las fases avanzadas de la enfermedad (Feroni et al., 2009).

4.4 ROS en leucemia mieloide crónica.

Como hemos descrito en el punto 3 de la introducción, el proceso de carcinogénesis está ligado en varios tipos de tumores a una mayor producción de ROS en las células. Se ha descrito que la transformación de células hematopoyéticas por *BCR-ABL* provoca un aumento en los niveles intracelulares de ROS no observable en células hematopoyéticas quiescentes no transformadas, y que este aumento de las especies reactivas del oxígeno es directamente inducido por esta oncoquinasa, ya que su inhibición directa bloquea la producción de ROS (Nowicki et al., 2004; Sattler et al., 2000). Como hemos citado anteriormente, la resistencia secundaria que presentan muchos pacientes a los tratamientos con inhibidores de BCR-ABL suele estar ocasionada por mutaciones en el dominio quinasa de esta proteína. Parece ser que la generación de ROS estimulada por BCR-ABL provoca daños oxidativos en el ADN que promueven la inestabilidad genómica de las células leucémicas, aumentando la aparición de estas mutaciones en el dominio quinasa de la misma oncoproteína, proporcionando resistencia al imatinib. La tasa mutagénica y la resistencia a los inhibidores de BCR-ABL queda reducida cuando se tratan las células con antioxidantes, como la N-acetil cisteína (NAC) o la vitamina E, y también al silenciar con herramientas moleculares la expresión de *BCR-ABL* (Koptyra et al., 2006; Skorski, 2008), lo que sugiere una relación directa entre BCR-ABL, ROS y la inestabilidad genómica que contribuye a la transformación y progresión de la leucemia mieloide crónica.

CAPÍTULO II . OBJETIVOS

La implicación de las ROS en la transformación y desarrollo de las células cancerosas hace que sean consideradas como una posible diana terapéutica. Así, la modificación de los niveles de ROS mediante el uso de antioxidantes o agentes prooxidantes es una estrategia antitumoral que está comenzando a ser utilizada en clínica y que parece ser bastante efectiva (Chou et al., 2004, Finch et al., 2006; Trachootham et al., 2009; Wondrak, 2009).

La finalidad de este proyecto es analizar el potencial de la familia NADPH oxidasa como diana terapéutica en Leucemia Mieloide Crónica, para lo cual se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1. Efecto de la inhibición de la actividad NADPH oxidasa sobre la proliferación de células leucémicas.
2. Empleo de inhibidores de la quinasa BCR-ABL
3. Combinación de inhibidores de la quinasa BCR-ABL con inhibidores de la actividad NADPH oxidasa en líneas celulares de leucemia mieloide crónica.
4. Combinación de inhibidores de la quinasa BCR-ABL con inhibidores de la actividad NADPH oxidasa en células de médula ósea de paciente.
5. Combinación de inhibidores de la quinasa BCR-ABL con inhibidores de la actividad NADPH oxidasa en células de médula ósea de individuos sanos
6. Análisis “in vivo” de la efectividad de la inhibición de las NADPH oxidasas como tratamiento en leucemia mieloide crónica.
7. Análisis de los niveles intracelulares de ROS.
8. Implicación de la actividad NADPH oxidasa en las rutas de señalización de BCR-ABL en células K562.
9. Estudio del papel de las PTPs como reguladoras del estado activo de BCR-ABL: SHP1 y SHP2.
10. Análisis del ciclo celular en las células leucémicas K562.
11. Patrón de expresión de NADPH oxidasas en las células de leucemia mieloide crónica.

CAPÍTULO III . MATERIALES Y MÉTODOS

APARATOS :

- Agitador balancín BFR 25 de “Grant Boekel”.
- Agitador magnético Minimix de “OVAN”.
- Aparatos de electroforesis horizontal: GNA 100 de “Pharmacia Biotech” y “BioRad DNA Sub Cell™”.
- AutoMACS (“Automate Magnetic Activated Cell Sorting”) de “Miltenyi”.
- Autoclaves: Steam Sterilizer de “Raypa” y Autester-G de “Selecta”.
- Balanza analítica 40SM-200A de “Precisa” y granataria Electronic Scale de “Want”.
- Baño termoregulables: SBS TFB serie B, Memmert y Retostat.
- Cámara Gel Logic 100 Imaging System de “Kodak”
- Campanas de flujo laminar ESCO class II BSC , de “Labcultures” y Telstar Bio IIA, class II cabinet, de “Fisher”.
- Centrífugas: Allegra™ 21R Centrifuge y Avanti™ J-25 Centrifuge de “Beckman”, Optima™ XL-100K Ultracentrifuge de “Beckman coulter” , Sorvall Legend Micro 21R Centrifuge de “Thermo Scientific”, IEC MicroCL 17 Centrifuge de “Thermi Electron Corporation” y 5810R Centrifuge de “Eppendorf”, Citómetro BD Accuri™ C6 de “BD Bioscience”.
- Citómetro FACSCalibur de “Becton Dickinson Biociencias” y Citómetro BD Accuri™ C6
- Congeladores: de -20° C “IGNIS” y de -80° C Forma -86C ULT Freezer de “Thermo Electron Corporation”.
- Contenedor de nitrógeno líquido “Thermo Forma”.
- Densitómetro CS-9000 de “Shimadzu”
- Escáner Hewlett-Packard, modelo Scanjet 3C.
- Incubador modelo 311 de “Thermo scientific”, y Orbital Shaker de “Thermo Forma”.
- Lectores de ELISA: Multiskan FC de “Thermo Scientific”
- Máquina de revelado para Western “Medical X-ray Processor” de “Kodak”.
- Microscopios de luz invertida: Olympus 1X51 y Nikon TMS.
- Nanodrop 1000 Spectrophotomer “Thermo Scientific”
- pH-metro Crison micropH 2001.
- Roller mix (agitador) de “Ovan”
- Sistema de electroforesis vertical, sistema para el montaje de los cristales y polimerización de los geles de poliacrilamida de “BioRad”.
- Sistema de purificación de agua ultrapura Milli Q (Millipore).

- Termocicladores: Mastercycler egradient de “Eppendorf” y Step One Real Time PCR System de “Applied Biosystems”.
- Transiluminador TFX 35M de “Vilber Lourmat”.
- Unidades de corriente: Electroforesis Power Suply EPS 200 de “Pharmacia Biotech”, GPSU-200/100 de “BioRad DNA Sub Cell™” y “Power Pac HC y Power Pac Basic de “BioRad”
- Otros aparatos de uso frecuente en el laboratorio.

1. **MATERIALES:**

1.1 **MATERIAL BIOLÓGICO:**

1.1.1 **Líneas celulares:**

Las líneas celulares empleadas en este trabajo son las siguientes:

- **HEK 293T:** Línea celular derivada de células tumorales de riñón humano embrionario. Se crecieron en DMEM-10% FBS/PS/Gln a 37 °C en una atmósfera del 5% de CO₂.
- **K562:** Línea celular eritroleucémica derivada de un paciente con leucemia mieloide crónica (LMC). Se crecieron en RPMI 1640-10% FBS/PS/Gln a 37°C en una atmósfera del 5% de CO₂ y a una densidad de 2x10⁵ a 6x10⁵ células / mL .
- **Boff210:** Línea celular murina con crecimiento independiente de IL-3 derivada de la línea celular hematopoyética Baf/3, que expresa *BCR-ABL* como un transgen regulado por tetraciclina, de manera que la expresión de *BCR-ABL* es constitutiva en ausencia de tetraciclina o doxiciclina. Se crecieron en RPMI 1640-10% FBS/PS/Gln a 37°C en una atmósfera del 5% de CO₂ a densidades altas, siempre superiores a 3x10⁵ células/mL (Gutiérrez-berzal et al., 2006).

1.1.2 **Células de médula ósea de pacientes con LMC y de donantes sanos:**

A partir de muestras de médula ósea de pacientes recién diagnosticados en fase crónica de la enfermedad y de médula osea de donantes sanos, se aislaron las células mononucleadas de baja densidad (CMNs) mediante separación por gradiente de ficoll. Una fracción de las células CMNs obtenida de cada individuo fue utilizada para obtener las células CD34 +. Ambas fueron utilizadas inmediatamente para los diferentes experimentos.

Las muestras de los pacientes fueron proporcionadas por el Servicio de Hematología del Hospital Clínico de Salamanca. Para ello se contó con la autorización pertinente del Hospital Clínico Universitario de Salamanca y se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes para la realización de dichos experimentos de acuerdo con la Declaración de Helsinki .

1.1.3 Cepas bacterianas:

- ***Escherichia coli* DH5 α** : Cepa bacteriana con elevada competencia utilizada para transformar por choque térmico. Se crecieron generalmente en medio de cultivo LB a 37°C.

1.2 MATERIAL INFORMÁTICO:

- **Adobe Photoshop**: procesamiento de las imágenes.
- **BD Accuri C6 Software** : análisis de las muestras adquiridas en el citómetro Accuri.
- **Cell Quest Pro “BD Biociences”**: adquisición de muestras en el citómetro FACscalibur.
- **Calculusn Biosoft**. se empleó este programa para calcular el coeficiente de interacción (CI) entre las diferentes drogas a través del algoritmo de Chou-Talalay (Chou, 2006).
- **DP Controller “Olimpus”**: realización de fotografías al microscopio de luz invertida Olimpus 1X51.
- **Flowing Software 2.5.1 y WinMDI 2.9** : análisis de las muestras adquiridas en el citómetro FACscalibur.
- **IBM SPSS Statistics 21.** : Análisis estadístico.
- **ND.1000 v.3.7.1**: programa asociado al nanodrop para valorar la concentración de ARN y ARN.
- **Paquete DNA STAR**: se emplearon los programas de este paquete de software para el análisis de secuencias de ADN y el diseño de oligonucleótidos.
- **Paquete Microsoft Office**: realización de la redacción del trabajo, construcción de figuras y análisis de resultados: Word, Excel y Power Point.

- **Quantity One:** programa utilizado junto al transiluminador para visualizar y analizar la electroforesis en geles de agarosa.
- **Refworks y Write-N-Cite:** bases de datos para la generación de la bibliografía.
- **StepOne Software v.2.1:** para el diseño y análisis de las reacciones de PCR cuantitativa ó Tiempo Real (RT-qPCR)

2. REACTIVOS :

Todos los productos empleados en este trabajo fueron de calidad analítica.

- El Imatinib mesylate (STI-571, Gleevec) y el Nilotinib (AMN107, Tasigna) fueron amablemente cedidos por **Novartis Pharma AG** (Basilea, Suiza).
- Los siguientes reactivos fueron suministrados por **Sigma Chemical Co (Sigma-Aldrich-Química, Madrid, España)**: anticuerpo anti- β -tubulina, bromuro de etidio, cóctel de inhibidores de proteasas, 2',7'-diacetato de diclorohidrofluoresceína (DCFDA), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio(MTT), difenileneiodonium (DPI), dimetilsulfóxido (DMSO), 4'-Hydroxy-3'methoxyacetophenon (Apocinina), yoduro de propidio (IP), *N*-acetil-L-cisteína (NAC), pNPP (bis-paranitrophenil-phosphate) ribonucleasa A, seroalbúmina bovina (BSA), TRI-reagent, tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), Triton X-100 y Tween 20 (polioxietileno 20 sorbitan monolaurato).
- Reactivos suministrados por **LONZA** (Barcelona, España): estreptomina, medios de cultivo RPMI 1640, DMEM, Hank's y IMDM, L-glutamina, penicilina, y tripsina-EDTA.
- El suero fetal bovino (FBS) fue proporcionado por **Biowest** (Nuaillé, Francia).
- El medio de cultivo de células primarias Cell Grow® SCGM fue obtenido de **CellGenix** (Freiburg, Alemania).
- De **Miltenyi Biotec** (Madrid, España) se obtuvieron los medios de cultivo semisólido en metilcelulosa "HSC-CFU complete w/o Epo" y semisólido de "HSC-CFU basic" y el Kit CD34 Microbeads.
- El inhibidor de RAC (RAC1 Inhibitor 1, NSC23766 de Calbiochem) fue proporcionado por **Merck Chemicals Ltd** (Nottingham, NG9 2JR, Reino Unido).

- Los anticuerpos contra phospho-c-ABL (Tyr245), phospho-CRKL (Tyr207) y phospho-STAT5 (Y694) proceden de **Cell Signalling Technology** (Danvers MA, EEUU). Los anticuerpos CRK-L (C-20), c-ABL (K12), phospho-ERK (E-4), ERK 1 (K-23), STAT5 (H-134), SHP1 (C-19), SHP2 (C-18) y WEE1 (H-300) y la proteína A agarosa fueron adquiridos de **Santa Cruz Biotechnology** (Santa Cruz, CA, EEUU). El anticuerpo contra p-Histona H3 (S-10) fue proporcionado por **Millipore** (Burlington, EEUU). El anticuerpo contra GAPDH y el sistema de revelado de los Westerns (“ECL 2 Western Blotting Substrate”) por **Thermo Fischer Scientific** (Waltham, EEUU).
- El anticuerpo frente a Ly 6G/6C (Gr1) se obtuvo de **BD Pharmingen** (BD Biosciences, CA, EEUU).
- La acrilamida, bisacrilamida, dodecil sulfato sódico (SDS), persulfato amónico, *N,N,N',N'*-tetrametil-etilendiamida (TEMED) y las membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) fueron adquiridos en **Bio-Rad Laboratories** (Barcelona, España)
- El extracto de levaduras, el agar bacteriológico y la bactotriptona fueron proporcionados por **Laboratorios Conda** (Torrejón de Ardoz, Madrid, España)
- El Ficoll (Ficoll-Paque™ PLUS), el anticuerpo α -mouse IgG conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) y el hyperfilm-ECL fue suministrado por **GE Healthcare Limited** (Buckinghamshire, Reino Unido).
- El kit de detección de apoptosis (“apoptosis detection kit”) fue adquiridos de **BD Bioscience** (Madrid, España).
- Los Kits de extracción de DNA plasmídico “HiPure Plasmid Midiprep”, “HiPure Plasmid filter Maxiprep” y “PureLink® Quick Plasmid Miniprep” fueron proporcionados por **Invitrogen** (Carlsbad, CA, EEUU). Los Kits de extracción de DNA plasmídico “Qiagen® Plasmid Plus Midi Kit” y “Endofree® Plasmid Maxi Kit” fueron obtenidos de **Qiagen** (Hilden, Alemania).
- El marcador de peso molecular para SDS-PAGE “BenchMark™ Prestained Protein Ladder”, el inhibidor de RNAsa (RNAsa Out®), la transcriptasa reversa (SuperScript® II Reverse Transcriptase), el dithiothreitol (DTT) y el anticuerpo α -rabbit IgG-HRP (Zymed) fueron suministrados por **Invitrogen** (Carlsbad, CA, EEUU).
- La Taq DNA polimerasa fue obtenida de **Biotoools** (Madrid, España).

- De **Fermentas** (Domaine de Saint Paul, Francia) fueron adquiridos los desoxirribonucleótidos trifostato (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) y el marcador de tamaño de DNA “Gene Ruler™ DNA Ladder Mix”.
- Los oligonucleótidos para RT-qPCR fueron suministrados por **Eurofins MWG Operon** (Alabama, EEUU).
- La ligasa “T4 DNA Ligase”, la T4 polinucleótido quinasa y las endonucleasas de restricción procedían de **Takara** (Saint-Germain-en-Laye, Francia).
- El Power SYBR® Green (PCR Master MIX) fue proporcionado por **Applied Biosystems** (Warrington, Reino Unido).
- El agua bidestilada fue obtenida de **Laboratorios Serra Pamies** (Reus, Tarragona, España).
- Los restantes productos empleados en este trabajo fueron proporcionados por **Probus** (Badalona, España) o **Panreac** (Castellar del Vallès, España).

3. MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES:

3.1 MEDIOS DE CULTIVO CELULAR :

- **DMEM-10%FBS/PS/Gln:** DMEM suplementado con suero fetal bovino (FBS) 10% (inactivado por calentamiento a 55°C durante 1h), 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL estreptomina, y L-glutamina 2 mM.
- **Hank's:** es una solución salina equilibrada. Utilizamos este medio para diluir las células de médula ósea antes de realizar el gradiente de Ficoll para extraer las células mononucleadas.
- **Iscove (IDMD,** del inglés “Iscove’s Modified Dulbecco’s Medium”): suplementado con 0,584 g/L de L-glutamina. Este medio es una modificación del medio DMEM (“Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”). Contiene selenio, aminoácidos adicionales y vitaminas, piruvato sódico, buffer HEPES y nitrato potásico en lugar de nitrato sódico.
- **Medio de cultivo semisólido en metilcelulosa “HSC-CFU complete w/o Epo”:** Contiene: IMDM, L-Glutamina, metilcelulosa, suero fetal bovino, albúmina de suero

bovino, 2-Mercaptoetanol, SCF, GM-CSF, IL-3 e IL-6. Dicho medio permite el crecimiento de colonias de granulocitos (CFU-G), macrófagos (CFU-M) y granulocitos/macrófagos (CFU-GM).

- **Medio de cultivo semisólido en metilcelulosa “HSC-CFU basic”:** Contiene: IMDM, L-Glutamina, metilcelulosa, suero fetal bovino, albúmina de suero bovino y 2-Mercaptoetanol. Permite la adición de factores de crecimiento ó citoquinas a elección.
- **RPMI 1640-10%FBS/PS/Gln:** RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (FBS) 10% (inactivado por calentamiento a 55°C durante 1h), 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL estreptomycin, y L-glutamina 2 mM.
- **SCGM-PS/Gln:** medio libre de suero (“serum free media”) normalmente utilizado para la expansión de células madre y progenitores hematopoyéticos. 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL estreptomycin y L-glutamina 2 mM.

3.2 MEDIOS DE CULTIVO BACTERIANO.

- **LB (Luria-Bertoni):** Extracto de levadura 0,5%; bacto triptona 1%; NaCl 1%; NaOH 1mM.
- **LB-Agar:** Extracto de levadura 0,5%; bacto triptona 1%; NaCl 1%; NaOH 1mM; agar bacteriológico 1,5%.
- **TB (Terrific Broth Medium):** Extracto de levadura 2,4%; bacto triptona 1,2%; glicerol 0,4%; KH_2PO_4 0,17 M; K_2HPO_4 0,72 M.

3.3 SOLUCIONES Y TAMPONES.

Todas las soluciones empleadas se prepararon con H₂O ultrapura.

- **PBS 1X (Solución amortiguadora de fosfatos):** NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na_2HPO_4 100 mM; KH_2PO_4 2 mM; pH 7,0.
- **Poliacrilamida al 40%:** acrilamida al 38.96% y bis-acrilamida al 1.04%.
- **Solución de arrastre de los anticuerpos unidos a una membrana de transferencia de western (solución de arrastre):** Tris 62,5 mM pH 6,8; SDS 2% p/v; β -mercaptoetanol 100 mM.

- **Solución de bloqueo:** leche desnatada al 5% (p/v) ó BSA al 2% (p/v) en tampón de lavado (TBS-tween).
- **Solución de lisis de las células de la serie roja :** NH_4Cl 0,155 M , KHCO_3 10 mM , EDTA 10 mM a pH 7,4.
- **Soluciones de revelado de western (AB):** Solución A (Luminol 1mM; Ácido cumárico 0,4 mM; Tris-HCl 100 mM pH 8,5) y solución B (H_2O_2 0,02%; Tris-HCl 100 mM pH 8,5)
- **Solución de precipitación/purificación de ADN (Fenol/cloroformo/isoamílico):** Fenol/cloroformo 1:1. El cloroformo se estabiliza con alcohol isoamílico 4%. La mezcla se cubre con Tris-HCl 10 mM pH 8.
- **Solución de trabajo de ioduro de propidio (IP):** IP 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; ribonucleasa A 0,1 mg/mL ; en PBS 1X.
- **Solución de MTT :** 2,5-difeniltetrazolio (MTT) 0,05 mg/mL en PBS 1X..
- **Tampón concentrante:** Tris 0,5 M, pH 6,8 ajustado con HCl.
- **Tampón de anillamiento:** Acetato sódico 100 mM; acetato de magnesio 2 mM; HEPES 30 mM. Se ajustó a pH 7,4 con KOH.
- **Tampón de carga o de muestra para proteínas:** Tris 125 mM; SDS 2% (p/v); glicerol 5% v/v; azul de bromofenol 0,003% (p/v) y β -mercaptoetanol 1% (v/v). Se ajustó a pH 6,8 con HCl.
- **Tampón de electroforesis de agarosa TAE (Tris-Acético-EDTA):** Tris 40 mM; ácido acético glacial 20 mM; EDTA 2 mM.
- **Tampón de electroforesis para western 5X:** Tris 25 mM; glicina 200 mM y SDS al 0,1% (p/v), se ajustó a pH 8,3 con HCl.
- **Tampón de lavado (TBS-tween):** Tris 10 mM y tween 20 0,05% (v/v).
- **Tampón de lisis MLB:** HEPES 25 mM pH 7,5; NaCl 150 mM, Igepal 1% (v/v), glicerol 10% (v/v), MgCl_2 10 mM, EDTA 1mM, NaF 25 mM, Na_3VO_4 1mM e inhibidores de proteasas.
- **Tampón de reacción fosfatasa:** Hepes 50 mM pH 7,2, NaCl 60 mM, KCl 50 mM y EDTA 5 mM.
- **Tampón de transferencia:** Tris 25 mM; glicina 190 mM; metanol 20% v/v. pH 8,1-8,4.
- **Tampón separador:** Tris 1,5 M, pH 8,8 ajustado con HCl.
- **Tampón STET:** Sacarosa 15% (p/v); Tris-HCl 50 mM pH 8; EDTA 50 mM pH 8; Triton X-100 1% (p/v).
- **TE (Tris-EDTA):** Tris 10 mM; EDTA 1 mM.

4. **MÉTODOS:**

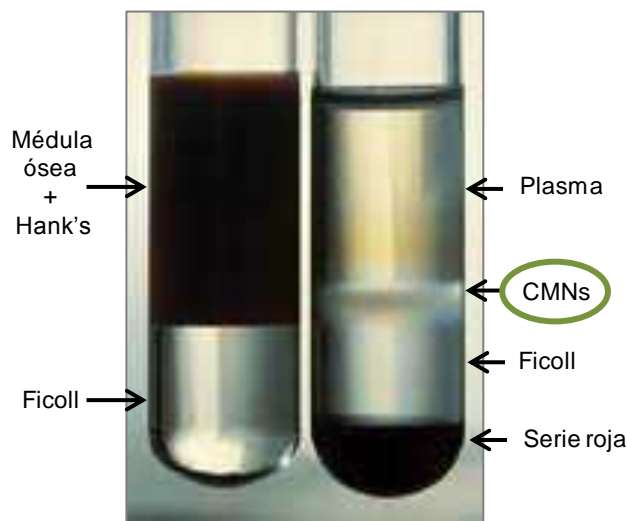
4.1 **CULTIVOS CELULARES**

- Las células K562 y las Boff210 se crecieron a una densidad entre 2×10^5 células/mL y 7×10^5 células/mL . Para cambiar el medio se centrifugaron a 1.200 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos 1X (PBS; Phosphate Buffer Saline), y se resuspendieron en medio fresco, RPMI ó DMEM respectivamente, a una concentración de 2×10^5 células/mL .
- Las células HEK 293, que se adhieren a la placa, se dejaron crecer hasta confluencia. Se retiró el medio de cultivo, se lavaron 2 veces con PBS, y se añadió Tripsina-EDTA durante 1-2 minutos para liberar las células. Posteriormente, se añadió medio DMEM fresco y las células se depositaron en nuevas placas de cultivo diluyéndolas cinco veces.
- Las células monocucleadas obtenidas de los pacientes recién diagnosticados en fase crónica de la enfermedad, se usaron de manera inmediata, resuspendiéndose a la densidad requerida para cada experimento, desde $2,5 \times 10^5$ células/ mL hasta 10×10^5 células/mL , en RPMI fresco.
- Las células CD34+ seleccionadas de las células mononucleadas de médula ósea, tanto de pacientes con leucemia mieloide crónica, como de donantes sanos, se usaron de manera inmediata tras su aislamiento, resuspendiendo toda la cantidad de células obtenida en 1 mL de medio libre de suero SCGM complementado con los siguientes factores de crecimiento y citoquinas: trombopoyetina (TPO) 30 ng/mL , factor de células madre (SCF, del inglés “Stem Cells Factor”) 100 ng/mL y ligando Flt3 humano (hFlt3) 30 ng/mL.

4.2 **AISLAMIENTO DE LAS CÉLULAS MONONUCLEADAS Y CD34+ DE MÉDULA ÓSEA.**

Las muestras de médula ósea, tanto de pacientes como de donantes sanos, fueron proporcionadas por el Servicio de Hematología del Hospital Clínico de Salamanca tras su extracción, mediante punción en la cadera, con el consentimiento informado de los individuos de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Una vez recibida la muestra en tubos de cristal con EDTA (para evitar la coagulación de la muestra), comenzamos con el procesamiento, llevado a

cabo en condiciones de esterilidad en campanas de flujo laminar clase II. Las células de médula ósea tienden a agregarse, formando grumos de textura viscosa. Por esto, en primer lugar se agitó vigorosamente el tubo contenedor manualmente y se disolvieron los grumos mediante el paso de la muestra varias veces por jeringuillas de 5 mL con agujas de diámetro descendente: primero agujas de 18G (color rosa), posteriormente agujas de 23G (color azul) y por último de 25G (color naranja), tras lo cual se fue depositando la muestra en un tubo tipo Falcon de 50 mL. El volumen de sangre obtenido se diluyó tres veces (1:3) con medio de cultivo Hank's. Se depositaron 4 mL de Ficoll en tubos de 15 mL y, con sumo cuidado para que no se mezclasen y se rompiera el gradiente, se fue añadiendo un volumen de 6 mL de la mezcla médula ósea + medio Hank's a cada tubo con Ficoll (como se muestra en la imagen inferior). Estos se centrifugaron a 500 xg durante 30 minutos con una aceleración y deceleración mínimas. De esta manera se produce una separación por gradiente de densidad de las distintas fracciones sanguíneas.



Fotografía tomada de Proteogenix

Con una pipeta Pasteur estéril se succionó la capa fina blanquecina situada justo en la parte superior del Ficoll, correspondiente a la fracción de células mononucleadas (CMNs) dónde se encontrarán también los granulocitos inmaduros (CD15 negativos), y se depositó en un tubo limpio, dónde se fueron juntando las células succionadas de todos los tubos en los que se había realizado el gradiente de Ficoll. Las células, una vez separadas, se centrifugaron 10 minutos a 300 xg y se lavaron dos veces con medio Hank's, resuspendiéndose finalmente para la correspondiente experimentación en RPMI1640-10%FBS/PS/Gln.

La porción de CMNs dirigida a la obtención de las células CD34+ se resuspendió en medio SCGM/PS/Gln, se contó el número de células y se procedió a la selección inmunomagnética en

el AutoMACS (del inglés “Automate Magnetic Activated Cell Sorting”) utilizando el kit de aislamiento de células progenitoras CD34+ (CD34 Microbead Kit, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), según describe el fabricante. En la separación se empleó el programa “posseld”, que mediante el pase de las células por 2 columnas inmunomagnéticas permite obtener una mayor pureza en la sección positiva. Una vez seleccionadas, las células CD34+ se lavaron dos veces con medio de cultivo RPMI 1640 y se resuspendieron en medio SCGM (con los factores señalados en el punto 5.1) para comenzar la experimentación.

4.3 ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN MEDIANTE EL SISTEMA DEL MTT

El método del MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) fue propuesto por Mosmann (Mosmann, 1983) como un método para evaluar los efectos citotóxicos de una sustancia así como para realizar estudios de proliferación celular. El MTT es una sal de tetrazolio de color amarillo, que es convertida por las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas en cristales de formazán de color azul oscuro-violeta. Después de la solubilización de los cristales de MTT en DMSO, se obtiene un medio de color violeta, cuya mayor o menor absorbancia a 570 nm se relaciona directamente con el número de células vivas presentes en el cultivo.

Mediante este método se midió la proliferación de las líneas celulares K562 y Boff210 y de las células mononucleadas procedentes de pacientes recién diagnosticados. Las células, a una densidad inicial de 2×10^5 células/mL en el caso de células K562 y Boff210, y 10×10^5 células/mL en el caso de las células de los pacientes, fueron incubadas en presencia o ausencia de los distintos agentes y se midió su proliferación a las 24 horas (en células Boff210) o a las 48h (células K562 y CMNs) de la siguiente manera: las células se centrifugaron en placa a 1500 rpm durante 5 minutos, se lavaron con PBS y se resuspendieron en 100 μ L de la solución de MTT (figura II-1B) en la cual se incubaron durante 75 minutos a 37°C.

Posteriormente las células se centrifugaron y lavaron de nuevo con PBS y se resuspendieron en 200 μ L de DMSO para solubilizar los cristales (figura II-1C) y poder medir la absorbancia de las muestras a 570 nm en un lector de placas ELISA Multiskan FC de “Thermo Scientific”.

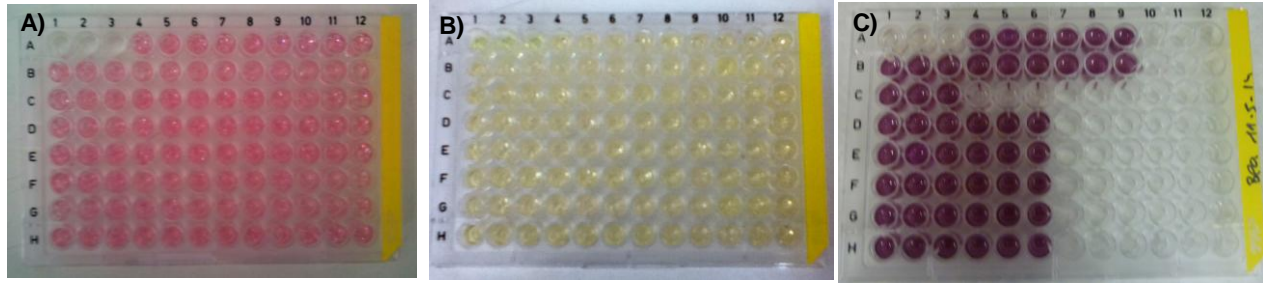


Figura II-1: Ensayos de proliferación mediante el sistema del MTT. Placa con las células K562 tras 48 horas con los tratamientos (A). Placa con las células resuspendidas en la solución MTT (B). Placa tras disolver los cristales de formazán con DMSO.

4.4 ENSAYOS DE FORMACIÓN Y CONTAJE DE COLONIAS. CLONOGENICIDAD.

Estos ensayos se llevaron a cabo para determinar el efecto de distintos tratamientos sobre la capacidad de formación de colonias de las líneas celulares K562 y Boff210 y de las células mononucleadas y CD34+ de médula ósea de paciente.

Las células se cultivaron con los tratamientos correspondientes durante 48 horas en el caso de células K562 y CMNs y 24 horas para células Boff210 y CD34+ a una concentración de 2×10^5 células/mL. Posteriormente se tomaron 50.000 células de cada tratamiento y se resuspendieron en 500 μ l de medio Iscove 1X (suplementado con L-Glutamina), añadiendo a continuación el volumen de células correspondiente para obtener una cantidad final de 2.000 células en el caso de células K562 y Boff210 (20 μ L) o de 10.000 células en el caso de células CMNs y CD34+ de médula ósea (100 μ L) a 1 mL de medio de metilcelulosa (HSC-CFU basic en el caso de las líneas celulares, HSC-CFU complete w/o EPO para células de individuos), previamente alícuotado en tubos estériles. Se agitaron vigorosamente los distintos tubos y con una jeringuilla de 1 mL y aguja 18G, se depositaron 500 μ l de la suspensión células/metilcelulosa en cada uno de los dos pocillos de la placa correspondientes a cada tratamiento. De esta manera cada pocillo tiene la cantidad de 1000 ó 5000 células iniciales (K562/Boff210 y células CMNs/CD34+ respectivamente). Se quitaron todas las burbujas formadas durante el procedimiento y se incubaron las placas durante 7 días en las líneas celulares K562 y Boff210 o durante 14 días en células CMNs y CD34+, a 37°C y 5% CO₂. A día 7 ó 14, respectivamente, se procedió al conteo del número de unidades formadoras de colonias (CFUs) mediante la observación a microscopía óptica con el objetivo 4X.

4.5 GENERACIÓN DE UN MODELO ANIMAL XENOINJERTO DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA.

Para el estudio de los tratamientos *in vivo* se utilizaron ratones hembra atímicos CB17-SCID de seis semanas de edad suministrados por el Laboratorio Charles River, aislados en un ambiente libre de patógenos. Estos ensayos fueron realizados en el animalario del Edificio Departamental de Salamanca con la ayuda del servicio de oncofarmacología del CIC (Centro de Investigación del Cáncer).

Para la generación del modelo xenoinjerto (del inglés “xenograft”), se inoculó a estos ratones inmunocomprometidos subcutáneamente en el flanco derecho con 10×10^6 células K562 en 100 μL de medio RPMI-1640 y 100 μL de Matrigel. Las células K562 inyectadas constaban de un pequeño número de pasajes y fueron previamente tratadas en el laboratorio durante 10 días con ciprofloxacino 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para eliminar posibles micobacterias.

Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 120 mm^3 , siendo ya palpables (15-20 días post-inoculación), los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en los cuatro grupos de trabajo para recibir diariamente (de lunes a viernes) los tratamientos correspondientes que fueron los siguientes:

1. Grupo Control: vehículo (PBS 1x). Volumen administrado: 5 μL / $g_{\text{ratón}}$.
2. Grupo Imatinib: imatinib 100 mg /Kg (disuelto con agua bidestilada). Administración oral a través de una sonda. Volumen administrado: 5 μL / $g_{\text{ratón}}$.
3. Grupo DPI: DPI 1 mg / Kg (disuelto en DMSO y diluido 20X con PBS estéril) Administración mediante inyección intraperitoneal con aguja de insulina (25G). Volumen administrado: 5 μL / $g_{\text{ratón}}$.
4. Grupo I+D: imatinib 100 mg /Kg + DPI 1 mg / Kg. Administración oral y mediante inyección intraperitoneal respectivamente. Volumen administrado 5 μL / $g_{\text{ratón}}$.

Se incluyeron 4 ratones por grupo, a los que se administró el tratamiento durante 22 días. La eficacia de los fármacos fue monitorizada a través de la medida del diámetro del tumor con un Caliper dos veces/semana, siendo el volumen del tumor estimado como el volumen de una elipse, usando la siguiente fórmula:

$$V = 1/3\pi \times (a/2) \times (b/2)^2$$

dónde “a” y “b” corresponden al diámetro más largo y más corto respectivamente. La toxicidad de los fármacos se siguió a través del peso de los animales medido en una balanza analítica y mediante observación del comportamiento.

4.6 ANÁLISIS DE LOS TRATAMIENTOS EN UN MODELO DE RATÓN TRANSGÉNICO PARA LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA.

Los animales utilizados para realizar este tipo de estudios *in vivo* fueron ratones transgénicos que expresaban p210^{bcr/abl} bajo la dirección del promotor de ratón del gen *tec*, que es una tyrosina kinasa citoplasmática que se encuentra expresada fundamentalmente en progenitores hematopoyéticos tempranos. Estos ratones van a desarrollar a lo largo de su vida LMC, presentando hiperplasia de granulocitos, siguiendo un curso clínico de la enfermedad muy similar a la LMC en humanos (Honda et al., 1998; Honda and Hirai, 2001).

Los cruces de los ratones para la obtención de las nuevas camadas *BCR-ABL* positivas necesarias para el estudio fueron realizados por el laboratorio de la Dra. Carmen Guerrero (Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca), dónde también fueron genotipados (para discriminar los ratones *BCR-ABL* positivos y negativos) y criados hasta que desarrollaron la enfermedad, momento en que los animales fueron trasladados al animalario de nuestro edificio (con el correspondiente permiso del Dr. Honda, creador de esta línea de ratones p210^{BCR/ABL} positivos), para comenzar con el tratamiento (tras unos días de acondicionamiento). Se mantuvo una estrecha colaboración con el laboratorio de la Dra. Carmen Guerrero durante todo el proceso de experimentación relativo a este modelo de ratón.

4.6.1 Aplicación del tratamiento de los ratones.

A partir de los dos meses de edad se hizo un seguimiento de los ratones *BCR-ABL* positivos mediante la extracción semanal de sangre periférica para analizar el porcentaje de granulocitos por citometría de flujo. En condiciones fisiológicas, el porcentaje de granulocitos en sangre periférica respecto al total de leucocitos se encuentra en torno al 15-20 % (Ting Zhao et al., 2014). En estos ratones transgénicos, los niveles de granulocitos van aumentando con el tiempo, desarrollándose la leucemia mieloide crónica. Así, se comenzó a tratar a los ratones cuando presentaban ya un porcentaje de granulocitos elevado (igual o superior al 50% respecto al total de leucocitos), momento que se corresponde con la fase crónica de esta enfermedad.

Los tratamientos y los grupos de trabajo fueron los siguientes:

1. Grupo Control: sin tratamiento.
2. Grupo Imatinib: imatinib 100 mg /Kg (disuelto con agua bidestilada). Administración oral a través de una sonda. Volumen administrado: 5 μ L / g_{ratón}.
3. Grupo DPI: DPI 1 mg / Kg (disuelto en DMSO y diluido 20X con PBS estéril) Administración mediante inyección intraperitoneal con aguja de insulina (25G). Volumen administrado: 5 μ L / g_{ratón}.
4. Grupo I+D: imatinib 100 mg /Kg + DPI 1 mg / Kg. Administración oral y mediante inyección intraperitoneal respectivamente. Volumen administrado 5 μ L / g_{ratón}.

Los tratamientos fueron administrados diariamente (de lunes a viernes) durante dos semanas. Los ratones se mantuvieron en todo momento en el animalario bajo condiciones de esterilidad.

4.6.2 Análisis del porcentaje de granulocitos:

La metodología utilizada fue la misma para el seguimiento de granulocitos pre-tratamiento y para el análisis del número de granulocitos post-tratamiento. Se extrajo a los ratones aproximadamente 200 μ L de sangre mediante punción en el plexo submandibular, que se depositó directamente en microtubos comercialmente preparados para muestras de sangre (con EDTA y Heparina entre otros componentes para evitar la coagulación).

Se mezclaron 170 μ L de sangre periférica con 12 mL de solución de lisis de las células de la serie roja (ver 5.3), previamente enfriada a 4°C, en tubos tipo Falcon. Se agitó y se mantuvo en hielo durante 15 minutos. Posteriormente se centrifugó 10 minutos a 300 xg, se retiró el sobrenadante con los eritrocitos lisados y se lavaron las muestras con 5 mL de PBS 1X estéril. Se centrifugó de nuevo y se resuspendieron las células en 100 μ L de PBS. Se pasaron a tubos tipo eppendorf y se marcaron con 0,8 μ L del anticuerpo Gr1A - FITC (dilución 1:200) durante 15 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad. Seguidamente las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo BD Accuri™ C6, y se analizaron con el software asociado “BD Accuri C6 Software”. Gr1A es un marcador de granulocitos (FITC se detecta en FL1, fluorescencia verde).

4.7 MEDIDA DE LOS NIVELES DE ROS INTRACELULARES.

Los niveles intracelulares de ROS fueron medidos por citometría de flujo mediante tinción de las células con la sonda fluorescente oxidable 2',7'-diacetato de diclorohidrofluoresceína (DCFH₂-DA). Se trata de un compuesto no fluorescente que es capaz de penetrar en las células por difusión pasiva. Así, una vez en el citoplasma celular, la DCFDA es hidrolizada por la acción de diesterasas a 2',7'- diclorohidrofluoresceína (DCFH₂), compuesto que es susceptible de ser

oxidado por las ROS dando lugar al compuesto fluorescente 2',7'- diclorofluoresceína (DCF). La longitud de onda de excitación-emisión para la DCF es 488/530 nm, por lo tanto pudimos determinar la cantidad de ROS en una muestra celular en función de la fluorescencia media observada para la DCF en el fotomultiplicador FL1 del citómetro (fluorescencia verde).

Para llevar a cabo estos experimentos las células K562 se crecieron durante al menos 24 horas a baja densidad celular (por debajo de 3×10^5 células/mL), y las células de los pacientes se emplearon inmediatamente después de ser recibidas. Se utilizaron aproximadamente 400.000 células para cada condición. Después de 2 horas con los tratamientos correspondientes, las células se pasaron a tubos de citometría, se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos, se lavaron y se resuspendieron en 1 mL de PBS 1X, de tal forma que las células quedaran a una densidad de 4×10^5 células/mL. Se añadieron nuevamente a las células (en PBS) los tratamientos respectivos junto con la sonda (DCFH₂-DA), a una concentración final 10 µM, y se mantuvieron 30 minutos en oscuridad, a 37°C. Posteriormente se lavaron las células con PBS 1X con el fin de eliminar la sonda no unida a las células y los tratamientos, y finalmente se resuspendió el botón celular en 400 µL de PBS para su análisis por citometría de flujo FACSCalibur.

4.8 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS CELULARES PROTEICOS

Después de cultivar las células a una densidad de $3,5 \times 10^5$ células/mL en presencia ó ausencia de los distintos tratamientos durante el tiempo correspondiente, las células se lavaron con PBS 1X, se centrifugaron a 300xg 5 minutos y se resuspendieron en tampón MLB con inhibidores de proteasas (HEPES 25mM, pH 7,5; NaCl 150mM; Igepal CA-630 1% (v/v), glicerol 10% (v/v); NaF 25mM; Mg₂Cl 10mM; EDTA 1mm; Na₂VO₄ 1mM; leupeptina 10 µg/mL; aprotinina 10 µg/mL), manteniéndolas en hielo durante 20 minutos, lo que permite la rotura y solubilización de las membranas celulares y por tanto, la obtención de los extractos celulares. Estos extractos se centrifugaron durante 15 minutos a 4°C en una centrifuga de mesa (para tubos tipo eppendorf) a 13.500 rpm, separándose el sobrenadante para su uso posterior.

4.9 VALORACIÓN DE PROTEÍNAS.

Las proteínas totales se valoraron según el método de Bradford (Bradford, 1976). El patrón de concentraciones conocidas utilizado fue seroalbúmina bovina (BSA), con las que se obtuvo una recta de la que se extrapola la concentración de proteínas de las muestras de trabajo. Para realizar las mediciones de la absorbancia de las muestras se empleó un lector de placas de ELISA Multiskan FC de "Thermo Scientific".

4.10 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE TRANSFERENCIA DE WESTERN.

Para estudiar el efecto de los distintos tratamientos sobre la cascada de señalización de la proteína fusogénica BCR-ABL se analizaron los niveles de fosforilación de dicha proteína, de dos de sus sustratos directos (CRKL y STAT5) y de la MAPK ERK1/2 mediante transferencia de western.

4.10.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.

Los extractos proteicos se sometieron a electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) en condiciones reductoras, siguiendo el método de Laemmli (Laemmli, 1970). Las muestras se incubaron a 100° C durante 5 minutos en tampón de carga (ver 4.3). En cada carril del gel se depositó una cantidad variable de proteínas dependiendo de la naturaleza del anticuerpo, con una concentración de proteínas equivalente para todos los pocillos. Las electroforesis se efectuaron en una disolución amortiguadora (tampón de electroforesis [ver 3.3]) aplicándose un voltaje constante de 125 V a temperatura ambiente.

4.10.2 Transferencia de las proteínas a la membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF).

Tras la electroforesis se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF como se ha descrito previamente (Hernandez-Hernandez *et al.*, 2006). Para ello se empleó un sistema de transferencia húmedo utilizando una disolución amortiguadora (tampón de transferencia, ver 4.3]). La transferencia se efectuó aplicando un amperaje constante de 400 mA durante 4 horas a 4°C

4.10.3 Incubación de la membrana con los anticuerpos.

Una vez realizada la transferencia se bloqueó la membrana mediante inmersión de ésta en una disolución de bloqueo que contenía leche desnatada o BSA al 5% (p/v) (se utilizó BSA para los western en los que se pretendía detectar proteínas fosforiladas) en TBS (ver 4.3), durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación constante. A continuación, se incubó la membrana con el anticuerpo primario convenientemente diluido durante toda la noche a 4 °C y con agitación constante. Después de la incubación con el anticuerpo primario la membrana se lavó con TBS (tres veces, durante 10 minutos cada vez) y se incubó con el correspondiente anticuerpo

secundario convenientemente diluido, que está conjugado a la peroxidasa de rábano, durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación constante.

4.10.4 Detección.

Una vez incubada la membrana con los anticuerpos se lavó de nuevo con TBS (tres veces, durante 10 minutos cada vez) y se sometió al revelado por el sistema de sustrato luminiscente para la peroxidasa de rábano mediante el kit comercial “Pierce® ECL 2 Western Blotting Substrate”, siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Cuando la señal del anticuerpo primario era muy fuerte se empleó un sistema de revelado basado en el empleo de la solución de revelado AB (ver 4.3). Las membranas se incubaron durante tres minutos con esta solución de revelado AB. El tiempo de exposición de las películas a las membranas varió en función de la muestra y del anticuerpo primario utilizado. Tras la exposición la película se reveló en una máquina de revelado para Western “Medical X-ray Processor” de “Kodak”.

Tabla II-1: Especificaciones de la incubación, bloqueo y revelado para las distintas proteínas analizadas por transferencia de Western.

Proteína	Anticuerpo 1º	Anticuerpo 2º	Sol. Bloqueo	Sol. Revelado
p-cABL	(Tyr245) 1:2000	Anti- rabbit 1:20.000	BSA 2%	ECL plus
ABL	(K-12) 1:1000	Anti- rabbit 1:20.000	Leche 5%	Solución AB
pCRKL	(Tyr207) 1:4000	Anti- rabbit 1:20.000	BSA 2%	ECL plus
CRKL	(C-20) 1:2000	Anti- rabbit 1:20.000	Leche 5%	Solución AB
pErk1/2	(E-4) 1:3000	Anti- mouse 1:10.000	BSA 2%	ECL plus
ERK1/2	(K-23) 1:5000	Anti- rabbit 1:20.000	Leche 5%	Solución AB
pSTAT5	(Y694) 1:2000	Anti- rabbit 1:20.000	BSA 2%	ECL plus
STAT5	(H-134) 1:2000	Anti- rabbit 1:20.000	Leche 5%	Solución AB
β-Tubulina	1:2000	Anti- mouse 1:10.000	Leche 5%	Solución AB
GAPDH	1:40.000	Anti- mouse 1:10.000	Leche 5%	Solución AB
SHP1	(C-19) 1:1000	Anti- rabbit 1:20.000	Leche 5%	ECL plus
SHP2	(C-18) 1:2000	Anti- rabbit 1:20.000	Leche 5%	ECL plus
pHistonaH3	(S-10) 1:1000	Anti- rabbit 1:20.000	Leche 5%	ECL plus
WEE1	(H-300) 1:1000	Anti- rabbit 1:20.000	Leche 5%	ECL plus

En el caso de las membranas hibridadas con anticuerpos frente a las formas fosforiladas de una proteína (pABL, pCRKL, pSTAT5 y pERK1/2), después de haber sido reveladas fueron sometidas a un proceso destinado a eliminar los anticuerpos unidos a las mismas. Esta eliminación se llevó a cabo con el fin de reutilizar esas membranas para determinar los niveles

de las proteínas totales correspondientes a las formas fosforiladas de las mismas (ABL, CRKL, STAT5 y ERK).

Inicialmente las membranas fueron lavadas con TBS, con el fin de eliminar los restos de las soluciones de revelado, para después incubarse durante 5 min a 55°C en la solución de arrastre (ver 4.3). Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las membranas fueron lavadas repetidamente con TBS. El lavado con TBS permite arrastrar todas las proteínas que quedan unidas débilmente a la membrana tras la incubación con la solución de arrastre en las condiciones anteriormente citadas (anticuerpo 1º, anticuerpo 2º y la proteína de bloqueo). Por lo tanto, tras el lavado con TBS las membranas fueron bloqueadas de nuevo e hibridadas con los anticuerpos correspondientes a las formas totales de las proteínas.

4.10.5 Cuantificación.

Los resultados de las películas obtenidas por transferencia de western fueron cuantificados con un densitómetro CS-9000 de “Shimadzu”, haciendo pasar un haz de luz de longitud de onda de 580 nm sobre las bandas presentes, de manera que se registró la intensidad de señal de cada banda.

4.11 MEDIDA DE LA ACTIVIDAD PROTEÍNA TIROSINA -FOSFATÁSICA DE PTPs (SHP1 Y SHP2).

El protocolo seguido para medir la actividad enzimática de las fosfatasas SHP1 y SHP2 fue modificado de Zhang et al., 2009: se cultivaron las células a una densidad de $3,5 \times 10^5$ en presencia o ausencia de los distintos tratamientos. Tras 16 horas se obtuvieron los extractos proteicos (véase 5.8), utilizando como tampón de lisis MLB (véase punto 4.4) sin Na_2VO_4 , ya que este es un inhibidor de PTPs. Tras valorar la concentración de proteínas de cada extracto (véase 5.9), se separaron 1.000 μg de proteínas para ser sometidas a inmunoprecipitación, para lo cual se añadieron 4 μL de anticuerpo específico contra SHP1 o SHP2 (Santa Cruz Biotechnology) y se incubaron durante 2 horas, a 4 °C en agitación. Posteriormente se añadieron 20 μL de proteína A agarosa (Santa Cruz Biotechnology) y se incubaron a 4 °C durante una hora, en agitación. Con esto se consigue que la proteína A agarosa se una a las cadenas pesadas de las Inmunoglobulinas. Una vez inmunoprecipitadas SHP1 o SHP2, se centrifugaron las muestras a 1000 xg durante 3 minutos para sedimentar la proteína A agarosa y se lavaron 3 veces con el tampón de lisis MLB (sin Na_2VO_4 y glicerol). Se realizó un último lavado con el tampón de reacción fosfatasa (véase 4.3) y se resuspendieron las proteínas en 220 μL de este mismo

tampón. Para iniciar la reacción se añadió pNPP 50mM (bis-para-Nitrofenilfosfato), que es un sustrato inorgánico fosforilado, y se incubó a 37 °C durante dos horas. Se agitaron los tubos cada 5 minutos, observando la aparición progresiva de color amarillo en la reacción como consecuencia de la defosforilación del sustrato por las fosfatasa. Se midió la absorbancia a 495 nm en un lector de placas ELISA Multiskan FC de “Thermo Scientific”.

En cada experimento, un control negativo sin inmunoprecipitar fue analizado simultáneamente para cada tratamiento y para cada PTP. La absorbancia obtenida en la reacción de los controles negativos fue restada a la absorbancia obtenida para los inmunoprecipitados correspondientes con la finalidad de eliminar de los resultados toda actividad fosfatásica inespecífica de SHP1 y SHP2. Los datos se relativizaron al tratamiento con imatinib. Tras la medida colorimétrica de la actividad de estas proteínas, se lavaron los inmunoprecipitados con el tampón de lisis MLB (véase 4.4) y se resuspendieron en 20 µL de tampón de muestra para analizar los niveles de SHP1 y SHP2 mediante transferencia de western.

4.12 ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR

El estudio del ciclo celular se llevó a cabo mediante tinción de la línea celular K562 con yoduro de propidido. Este compuesto de color rojo se une a los ácidos nucleicos cuando la membrana celular ha perdido su integridad, lo cual permite la cuantificación del ADN mediante citometría de flujo. La luz fluorescente emitida puede ser detectada en el fotomultiplicador FL2 (fluorescencia roja), siendo esta proporcional al contenido de ADN en cada célula., lo que nos da información sobre la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular (Fase Sub G₁, fase G₀/G₁, fase S ó fase G₂/M).

Para llevar a cabo estos análisis se procesaron las células de la siguiente manera: se tomaron 6x10⁵ células K562 a una densidad de 2x10⁵ células/mL para cada condición y se mantuvieron con los tratamientos correspondientes (control, DPI 5 µM , IM 0,5 µM ó combinación) durante distintos tiempos: 24, 32 y 48 horas, después de los cuales las células fueron lavadas con PBS 1X, centrifugadas a 300 xg durante 5 minutos y resuspendidas en 50 µL de etanol al 70%, en el que se fijaron durante 1 hora a 4°C. Posteriormente las células se volvieron a lavar con PBS 1X, se centrifugaron a 500 xg durante 7 minutos y se añadió a cada muestra 500 µL de la solución de trabajo de yoduro de propidido (25 µL de IP 1 mg/mL, 2,5 µL de ribonucleasa A 0,1 mg/mL y 472,5 µL de PBS 1X), con la que se incubaron las células 45 minutos a 37 °C en oscuridad (es necesario añadir a la solución de trabajo de IP ribonucleasa A ya que el IP se une por igual al ADN y al ARN).

Se lavaron las células una vez más, se centrifugaron y se resuspendieron en 350 μ L de PBS 1X para ser adquiridas en el citómetro FACSCalibur. Para analizar los perfiles FACS del ciclo celular se utilizaron los programas informáticos Paint a Gate y Win MDI 2.9.

4.13 MEDIDA DEL DAÑO EN EL DNA (roturas de doble hebra “DSBs”)

La generación de roturas de doble hebra (DSBs, del inglés “double strand breaks”) en el ADN es una forma de daño en el material genético muy frecuente en células *BCR-ABL* positivas (Nowicki et al., 2004). Tras la introducción de una rotura de doble hebra (DSBs), se produce rápidamente la fosforilación en la serina-139 (Ser-139) de una forma especial de la histona 2A, conocida como H2AX, de manera que miles de estas histonas van a ser fosforiladas en la misma región, lo que se denota como γ -H2AX, rodeando la rotura de doble hebra tras su formación (Burma et al., 2001; Rogakou E.P. et al., 1998). Así, mediante citometría de flujo, podemos detectar los niveles de gamma-H2AX (γ -H2AX) en nuestras células leucémicas y correlacionarlos con el número de roturas en el DNA.

Se cultivaron las células a una densidad de 2×10^5 células/mL en presencia o ausencia de los distintos tratamientos. Tras 24, 32 y 48 horas se tomaron 500.000 células de cada condición, se centrifugaron a 300 xg 5 minutos y se lavaron con PBS 1X. Se resuspendió el botón celular en 50 μ L de paraformaldehído al 4% y se fijaron durante 1 hora a 4°C, tras lo cual se lavaron nuevamente con PBS 1X, centrifugándose a 500 xg, 7 minutos. Se resuspendieron en 50 μ L de Triton X-100 al 0,25% y se permeabilizaron durante 15 minutos en hielo. Tras un lavado, se resuspendieron las células en 100 μ L de PBS 1X y se marcaron durante 15 minutos a temperatura ambiente con 2,5 μ L del Anticuerpo anti γ H2AX- FITC. Se procedió con un último lavado para eliminar el exceso de anticuerpo y finalmente las células fueron resuspendidas en 350 μ L de PBS 1X para ser adquiridas en el citómetro FACSCalibur, detectando la fluorescencia emitida en el fotomultiplicador 1 (FL1), correspondiente al color verde. Para determinar el contenido de γ H2AX se analizó la fluorescencia media de las células mediante el programa informático WinMDi 2.9.

4.14 ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad celular de las células K562 y de las células primarias de los pacientes fue determinada tras someter las células a los distintos tratamientos durante 48 horas. Para llevar a cabo este tipo de estudio se empleó el kit comercial “AnnexinV-PE/7-AAD apoptosis detection

kit” siguiendo las intrucciones del fabricante. Se pusieron de forma general, 5×10^5 células por muestra en un tubo de citometría, donde fueron lavadas con PBS y resuspendidas en 100 μL de “Binding Buffer” (1:10 diluido en dH_2O). En este tampón que contenía calcio, las células se marcaron con 5 μL de Anexina V-PE y 5 μL de 7-Aminoactinomicina D (7-AAD) y se incubaron en oscuridad y a temperatura ambiente durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron por adicción a cada muestra de 400 μL más de “Binding Buffer” 1X. Para cada condición se adquirieron en el citómetro 50.000 células, las cuales fueron posteriormente analizadas empleando el programa WinMDI 2.9. La Anexina V es una proteína que se une específicamente a la fosfatidilserina en presencia de Ca^{2+} , la cual se externaliza en los procesos de apoptosis, y la 7-AAD se une específicamente al ADN (para lo cual es necesario que la membrana plasmática esté rota, proceso que ocurre frecuentemente en los últimos pasos de la apoptosis y en procesos de necrosis). Así, se consideraron como células viables las Anexina V / 7-AAD dobles negativas (-/-), células en apoptosis temprana las positivas para Anexina V (+/-), células apoptóticas tardías las dobles positivas (+/+) y necróticas las células positivas para 7AAD (-/+).

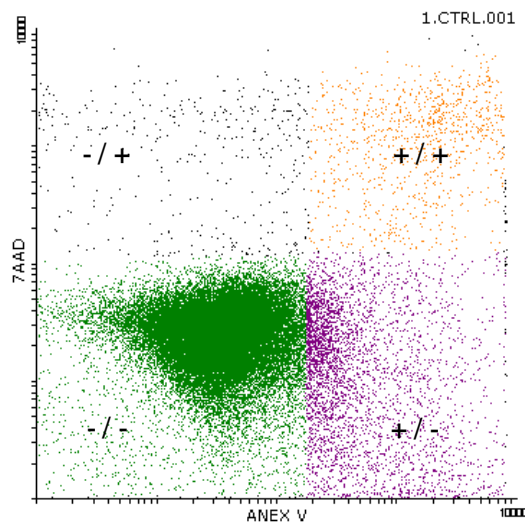


Figura II-2: Gráfica de puntos representativa de las distintas regiones AnexinaV/7AAD positivas y negativas.

4.15 EXTRACCIÓN DE ARN

El ARN total de las células se obtuvo a partir de muestras celulares. Se empleó el reactivo “TRI reagent” de SIGMA, siguiendo las instrucciones de la casa comercial para la extracción: 7×10^6

células se resuspendieron en 1 mL de TRI reagent. Se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación, se añadieron 0,2 mL de cloroformo y se agitaron los tubos durante 15 segundos. Se incubaron de nuevo a temperatura ambiente durante 2-3 minutos, y se centrifugaron a 12.000 x g durante 15 minutos a 4°C. Tras la centrifugación, la fase acuosa superior se transfirió a un tubo limpio y se añadieron 0,5 mL de isopropanol, incubándose a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se centrifugaron a 12.000 x g durante 10 minutos a 4°C para precipitar el ARN. El ARN se sometió a un lavado con 1 mL de etanol al 75% y se volvió a centrifugar a 7.500 x g durante 5 minutos a 4°C. Se dejó secar el precipitado y se resuspendió en tampón TE (ver 4.3). Para facilitar la dilución del ARN en el tampón TE, se incubó la mezcla 10 minutos a 55 °C.

La concentración de ARN se calculó midiendo la absorbancia a 260 nm en el espectrofómeto Nanodrop1000 “Thermo Scientific”. La integridad del ARN se comprobó corriendo 1 µg de ARN en un gel de agarosa al 1%.

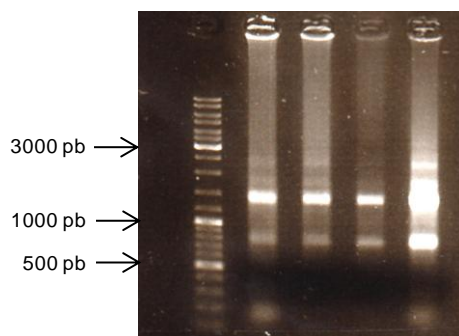


Figura II-3: Imagen de las bandas de ARN tras una electroforesis en gel de agarosa.

4.16 SÍNTESIS DE ADN COPIA (ADNc) Ó RETROTRANSCRIPCIÓN

Se realizó a partir del ARN total obtenido tal y como se describe anteriormente (ver 5.15). La reacción se llevó a cabo del siguiente modo: a la cantidad de ARN a transcribir (5 µg) se le añadieron 2 µL de oligo-dT (0,25 µg/µL) y se llevó a un volumen final de 11 µL con agua ultrapura. Se incubó a 65 °C durante 5 minutos y se enfrió en hielo. A continuación, siguiendo las instrucciones del fabricante, se añadieron: 4 µL del tampón de reacción comercial de la retrotranscriptasa, 2 µL de dNTPs 10 mM, 0,5 µL del inhibidor de ribonucleasa (20U), y 2 µL de DTT. Se incubó la mezcla a 42°C durante 5 minutos, y finalmente se añadió 200U (1µL) de la retrotranscriptasa (SuperScript® II Reverse Transcriptase).

Se dejó transcurrir la reacción durante 50 minutos a 37°C, y se paró calentando la mezcla a 70°C durante 10 minutos.

4.17 PCR CUANTITATIVA O A TIEMPO REAL (qPCR)

La PCR cuantitativa o a tiempo real es una técnica que combina la amplificación y la detección en un único paso. Así, permite reunir datos al mismo tiempo que ocurre el proceso de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), lo cual supone una ventaja frente a la PCR convencional. La cuantificación de la expresión génica se consigue mediante el uso de distintos compuestos fluorescentes, que permiten correlacionar la intensidad de la fluorescencia con la concentración del producto final obtenido en la reacción de amplificación del ADN (revisado en Wong and Medrano, 2005). El parámetro que caracteriza las reacciones de RT-qPCR es el denominado Ciclo Umbral o C_t (del inglés “cycle threshold”), que se define como el punto en el tiempo (el ciclo de PCR) donde se detecta por primera vez la amplificación de una diana específica.

En este trabajo, esta técnica se realizó a partir de ADNc procedente de la línea celular K562 (obtenido mediante retrotranscripción del ARN, tal y como se describe anteriormente. Ver 5.16), con el objetivo de analizar el patrón de expresión de la familia NADPH oxidasa en estas células. Este análisis fue realizado por el método de la curva estándar. Se partió de una cantidad inicial de ADNc de 200 ng y se realizaron diluciones seriadas (con factor de dilución 1:5) hasta obtener cinco concentraciones distintas de este ADNc molde: 200 ng, 40 ng, 8 ng, 1,6 ng y 0,32 ng.

La mezcla de reacción se realizó para un volumen final de 10 μ L, y contenía: 0,1 μ L de cada oligonucleótido (sentido y antisentido) diseñado frente a cada NADPH oxidasa a 10 μ M; 6 μ L de PCR Master MIX (“Power SYBR[®] Green”, que contiene ampliTaq Gold DNA polimerasa LD, dNTPs, y SYBR[®] Green I dye); 2 μ L de la dilución de ADNc muestra (100 ng/ μ L; 20 ng/ μ L; 4 ng/ μ L; 0,8 ng/ μ L ó 0,16 ng/ μ L) y 1,8 μ L de agua ultrapura estéril. Todas las reacciones se hicieron por duplicado y con un control negativo de la muestra (H₂O en lugar de ADNc).

El método de reacción queda reflejado en la figura II-4. Consistió en tres fases:

- I. La primera fase conlleva un aumento progresivo de la temperatura, necesario para conseguir la temperatura requerida para el inicio de la fase 2 (95°C). En esta primera fase comenzará a unirse la polimerasa (la Taq polimerasa es una enzima termoestable) al ADN molde. Tiene una duración de 10 minutos.

- II. La segunda fase es en la que tiene lugar la reacción en cadena de la polimerasa. Son 40 ciclos de temperatura consecutivos, basados en 2 etapas: una primera etapa de desnaturalización de la doble hebra de ADN a 95°C durante 15 segundos, y una segunda etapa de unión o anillamiento de los oligonucleótidos al molde durante 31 segundos a la temperatura de unión óptima para cada pareja de oligonucleótidos (tabla II-2)
- III. La tercera fase genera la curva de desnaturalización de la reacción (en inglés “Melt curve”), indicando la temperatura a la que la doble hebra se separa. Sirve para comprobar si han tenido lugar amplificaciones inespecíficas.

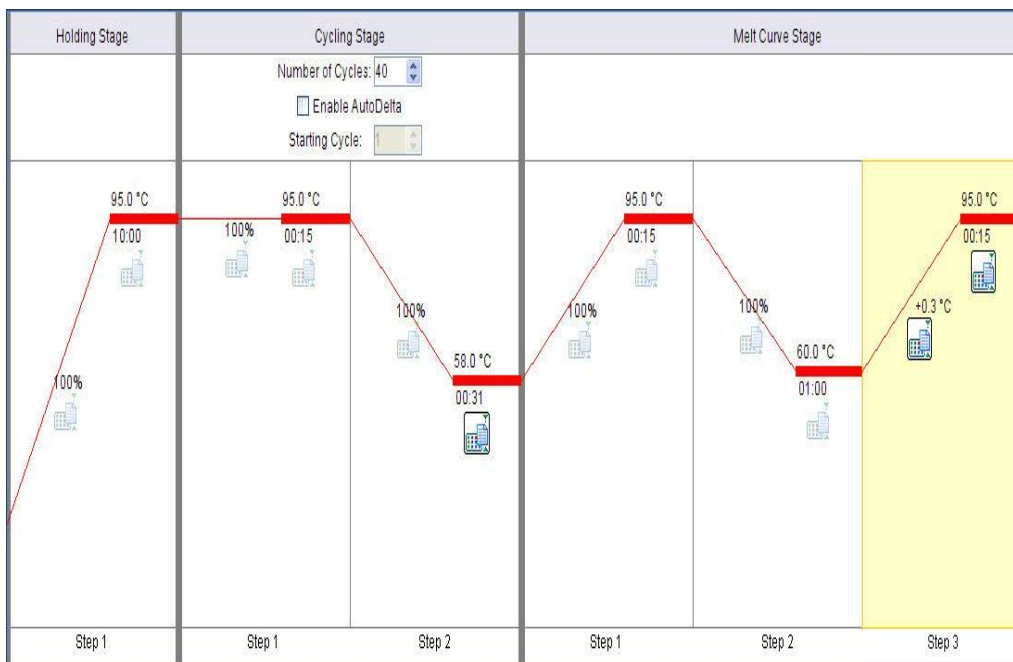


Figura II-4: Método de la reacción de RT-qPCR. Imagen obtenida del software asociado al termociclador donde se especifican los parámetros temporales y de temperatura correspondientes a cada fase de PCR.

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada una de las isoformas NADPH oxidasa mediante el paquete informático DNA Star. Se utilizó como control interno (“housekeeping”) para las reacciones la amplificación de la β -actina. Las secuencias de los oligonucleótidos se encuentran especificadas en la tabla II-2.

Tabla II-2: Secuencias y temperaturas de anillamiento de los oligonucleótidos empleados en la reacción de RT-qPCR.

	Oligo sentido	Oligo antisentido	T ^a unión	Amplificón
Nox1	CTGTAGGCGCCCTAAGTTTG	AAACCGGAGGATCCTTTCAC	58°C	97 pb
Nox2	ATGCAGGAAAGGAACAATGC	GTGCACAGCAAAGTGATTGG	60°C	90 pb
Nox3	ACAAATGCAGTGAGGCACAG	CCGTGTTTCCAGGGAGAGTA	58°C	119 pb
Nox4	TGCAGAGATATCCAGTCCTTCC	TCCCATCTGTTTGACTGAGG	58°C	124 pb
Nox5	GCCTGCTGACTAAACTGGAGA	TGGCCTTCATGTCAATTCTTG	56°C	111 pb
Duox1	CTGACCCACCACCTCTACATC	CAGGAAGAAGATGTGGAAACG	60°C	96 pb
Duox2	TGAGAATGGCTTCCTCTCCA	TCCCGGAACATAGACTCCAC	58°C	120 pb
β-actina	GATCTGGCACCCTCCTTCTACAAT	GCCACATAGCACAGCTTCTCCTTGA	54°C	438 pb

Todas las parejas de oligonucleótidos utilizadas fueron validadas previamente en nuestro laboratorio con muestras de células que expresaban las distintas isoformas de la familia NADPH oxidasa, comprobando así la especificidad de cada pareja de oligonucleótidos por su diana.

4.18 SILENCIAMIENTO DE NADPH OXIDASAS MEDIANTE ARN DE INTERFERENCIA.

4.18.1 Diseño las parejas de oligonucleótidos para el silenciamiento.

Se diseñó una pareja de oligonucleótidos frente a cada NOX expresada en la línea K562 (NOX2, NOX5 y DUOX2) empleando la ayuda para el diseño de las secuencias de la página web de Dharmacon RNA technologies y los criterios de diseño racional de ARNs de interferencia (Reynolds et al., 2004). Estos criterios son los siguientes:

1. Contenido en GC: 30-52%.
2. Al menos 3 A/U en posiciones 15-19.
3. Ausencia de repeticiones internas.
4. A en posición 19.
5. A en posición 3.
6. U en posición 10.
7. No G/C en posición 19.
8. No G en posición 13.

Como control del silenciamiento se utilizó la secuencia de 19 nucleótidos descrita por Ohtsuka *et al.* (Ohtsuka, 2004) frente la Luciferasa de luciérnaga, que denominaremos LUC. Las secuencias de los distintos oligonucleótidos de ARN de interferencia (siRNA) se encuentran descritas en la tabla II-3.

Tabla II- 3 : Secuencias de los oligonucleótidos de ARN de interferencia (siRNA).

	5' ----- 3'	
Luciferasa	cgcgtCTGACGCGGAATACTTCGAtcaagagaTCGAAGTATTCGCGTCAGttttggaaat	Oligo sentido
	cgatttcaaaaaCTGACGCGGAATACTTCGAtctctttaaTCGAAGTATTCGCGTCAGa	Oligo antisentido
NOX2 (127/128)	cgcgtGCTATGAGGTGGTGTGTTtcaagagaAACATCACCTCATAGCttttggaaat	Oligo sentido
	cgatttcaaaaaGCTATGAGGTGGTGTGTTtctctttaaAACATCACCTCATAGCa	Oligo antisentido
NOX5 (193/194)	cgcgtTGACTAACTGGAGATGGAAtcaagagaTCCATCTCCAGTTTAGTCAttttggaaat	Oligo sentido
	cgatttcaaaaaTGACTAACTGGAGATGGAAtctctttaaTCCATCTCCAGTTTAGTCAa	Oligo antisentido
DUOX2 (197/198)	cgcgtACAAGAAGCTACAAAAGAAAtcaagagaTTCTTTGTAGCTTCTTGTttttggaaat	Oligo sentido
	cgatttcaaaaaACAAGAAGCTACAAAAGAAAtctctttaaTTCTTTGTAGCTTCTTGTa	Oligo antisentido

4.18.2 Clonaje de los siRNA en el plásmido lentiviral pLVTHM.

Los oligonucleótidos diseñados se clonaron en todos los casos en el plásmido lentiviral pLVTHM, amablemente cedido por el Dr. Didier Trono (Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausanne, Suiza). Este plásmido es un vector de transferencia de segunda generación cuya estructura consta de diferentes secuencias que permiten llevar a cabo silenciamientos altamente específicos y estables (figura II.5), como las siguientes:

- **H1:** Promotor de la histona H1. Va a ser el que dirija la expresión de los shRNA.
- **EF1 α :** Promotor de elongación factor 1 α . Se usa para la expresión de un gen marcador, como por ejemplo, GFP.
- **GFP:** Proteína verde fluorescente. Sirve de marcador de las células infectadas.
- **WPRE:** Aumenta la expresión de los shRNA.

- **Amp R:** Gen de resistencia a la Ampicilina. Sirve para seleccionar los clones bacterianos con el vector de transfección.

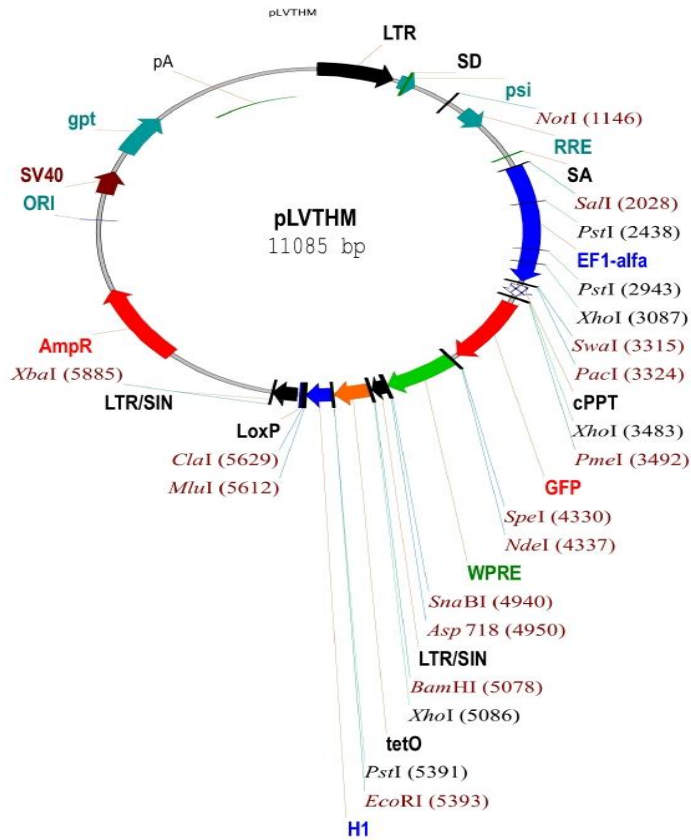


Figura II-5. Mapa de la estructura del plásmido lentiviral pLVTHM. Tomado de addgene.

El procedimiento por el cual se llevó a cabo el clonaje de los siRNAs en pLVTHM fue el siguiente:

A. Preparación de los oligonucleótidos.

Una vez diseñados y obtenidos, los oligonucleótidos de interferencia se prepararon sometidos a un proceso de anillamiento por calentamiento hasta 95°C durante 4 minutos, y enfriamiento lento y progresivo. Para ello, se pipeteó 1µL de oligo sentido y antisentido (previamente resuspendidos en agua ultrapura a una concentración de 3 mg/mL) junto a 48µL de tampón de anillamiento, y se calentaron en un recipiente hermético hasta los 95°C durante 4 minutos. Tras esto se apagó la placa calefactora y se dejó enfriar progresivamente la mezcla durante toda una mañana. Cuando la mezcla se encontró a 37°C, se sacó del recipiente hermético y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente, y otros 5 minutos en hielo.

Seguidamente se realizó una fosforilación de sus extremos por la enzima T4 Polinucleótido Kinasa (T4 PNK), siguiendo las especificaciones de la casa comercial: se pipetearon 2 μL de oligonucleótidos anillados, 1 μL del tampón de la enzima T4 PNK, 1 μL de ATP 10 mM, 1 μL de la enzima T4 PNK (10 U) y 5 μL de agua estéril libre de nucleasas. La mezcla resultante se incubó a 37°C durante 30 minutos, luego a 70°C 10 minutos con el fin de inactivar la enzima, y finalmente se puso 5 minutos en hielo.

B. Preparación del plásmido

La preparación del vector se llevó a cabo por digestión del mismo con MluI/ClaI, ya que al anillarse los oligonucleótidos diseñados dejan extremos de este tipo. Se llevaron a cabo digestiones simples, primero con MluI y luego con ClaI, en las condiciones aconsejadas por la casa comercial, y tras éstas se desfosforiló el vector mediante la reacción catalizada por una fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP, de Takara). Para la reacción, a los 30 μL de plásmido digerido obtenidos se les añadió 5 μL del tampón de reacción de la enzima, 1 μL de la enzima CIAP, y se llevó hasta 50 μL finales con agua ultrapura. La mezcla se incubó a 37°C durante 15 minutos, y luego otros 10 minutos a 75°C, para inactivar la enzima. La desfosforilación es un tratamiento importante ya que dificulta que el vector se pueda religar y por lo tanto favorece la posterior ligación de los oligonucleótidos en el mismo.

El ADN fue purificado tras cada reacción mediante un proceso de fenolización. Este proceso permite eliminar las proteínas que tenemos con nuestro ADN, y además bloquea la reacción de digestión por medio de la desnaturalización de las enzimas, para así disponer del ADN purificado. En el proceso, a las muestras se les añadió el mismo volumen de F/C/I (fenol-cloroformo estabilizado con alcohol isoamílico) que el preexistente de la muestra, se agitaron en vortex y se centrifugaron durante 2 minutos a 13.000 rpm. Recuperamos la fase acuosa en un tubo limpio y repetimos la extracción, esta vez centrifugando durante 5 minutos. Volvimos a recuperar la fase acuosa y le añadimos 2,5 volúmenes de etanol 100%, 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M a pH 5,2, y 2 μL de glucógeno 20 mg/mL (para poder visualizar posteriormente el precipitado). Lo mezclamos bien y lo depositamos a -20°C entre 30 minutos y 24 horas. Tras ese tiempo centrifugamos la muestra durante 15 minutos a 4°C y 13.000 rpm. Nos deshacemos del sobrenadante y al precipitado le añadimos 200 μL de etanol 75% para lavarlo, volviendo a centrifugar 10 minutos. Retiramos el sobrenadante de nuevo y dejamos secar el precipitado antes de resuspenderlo en agua ultrapura, para su posterior utilización en otras reacciones.

C. Ligación en pLVTHM.

Para llevar a cabo la ligación de los oligonucleótidos en el plásmido se tomaron 2 μL de los oligonucleótidos anillados y fosforilados y se pusieron en un tubo eppendorf junto con 1 μL del tampón de la ligasa, 1 μL de pLVTHM preparado (digerido y desfosforilado), un 1 μL de T4 DNA ligasa y 5 μL de agua ultrapura estéril. La mezcla de ligación resultante se incubó a 16°C durante toda la noche.

4.18.3 Transformación de bacterias mediante choque térmico.

Se utilizaron bacterias *E. coli* DH5 α , proporcionadas por los técnicos de nuestro Departamento de Bioquímica y Biología Molecular obtenidas según el protocolo de Inoue et al. (Inoue et al., 1990).

Las bacterias competentes se descongelaron en hielo utilizándose una alícuota de 100 μL para cada transformación. Se añadió la mezcla de ligación y se incubó en hielo durante 25 minutos, para después someter a las bacterias al choque térmico durante 1 minuto a 42°C. Se depositaron nuevamente en hielo durante 2 minutos y se pasaron a un tubo estéril con 1 mL de medio LB, incubándolas 1 hora a 37°C con agitación suave (100 rpm). Tras la incubación, las bacterias se centrifugaron a 16.000 xg durante un minuto y se retiró todo el medio excepto unos 200 μL para resuspenderlas y depositarlas en placas con medio LB + ampicilina, creciéndolas durante toda la noche a 37°C.

4.18.4 Comprobación de los clones.

Se pusieron 3 mL de LB + ampicilina (0,1 mg/mL) en tubos estériles y en cada tubo se inoculó una colonia procedente de la placa que se incubó con las bacterias transformadas. Los tubos se incubaron a 37°C en agitación (200 rpm) hasta el día siguiente. Se pasaron los cultivos a tubos tipo eppendorf y se centrifugaron a máxima velocidad durante 30 segundos. Se retiró el sobrenadante y sobre el sedimento bacteriano se añadieron 200 μL de tampón STET y 50 μL de lisozima 5 mg/mL. Se resuspendieron los sedimentos por raspado contra la gradilla y se dejaron incubar las bacterias durante 2 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, hervimos las muestras durante un minuto y las dejamos en hielo 5 minutos. Centrifugamos 5 minutos a velocidad máxima y se retiraron los precipitados con un palillo estéril. A continuación, añadimos 250 μL de isopropanol a

los sobrenadantes, mezclándolos y manteniéndolo en hielo durante 5 minutos. Se centrifugaron de nuevo durante 15 minutos a velocidad máxima y se retiraron los sobrenadantes vigilando el precipitado, donde se encuentra el ADN plasmídico. Después los dejamos secar y los resuspendimos en 50 μ L de TE + 0,5 μ L de RNAasa 20 mg/mL. Las muestras fueron entonces incubadas durante 30 minutos a 37°C para permitir a la RNAasa degradar el ARN que quedaba en la muestra y recuperar el ADN de los clones.

1. Comprobación mediante el análisis del patrón de restricción.

El ADN plasmídico resultante fue comprobado mediante doble digestión con las endonucleasas de restricción EcoRI y ClaI, de tal forma que los clones positivos tenían un tamaño de inserto de 301 pb, frente al vector vacío, que liberaba con esta digestión un fragmento de tan sólo 236 pb. Para poder discriminar ambas bandas en un gel de agarosa, éste se preparó a una concentración de 1,5% (p/v) de agarosa, lo cual favorece la separación de las bandas de menor tamaño en una muestra.

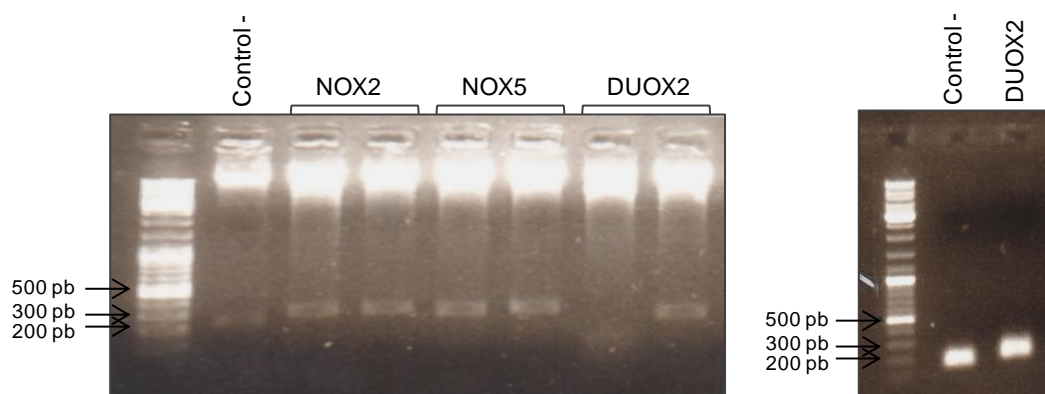


Figura IV-6. Productos de la digestión del ADN plasmídico obtenido de los clones con las enzimas de restricción EcoRI y ClaI. Se comprobó que los clones portaban el inserto comparándolos con el plásmido pLVTHM vacío (control -).

2. Comprobación mediante PCR convencional.

Los plásmidos obtenidos también fueron comprobados por medio de reacción de PCR, en la que se utilizaron cebadores dirigidos a reconocer zonas adyacentes al punto de inserto de nuestros oligonucleótidos de RNAi en el plásmido, de manera que se amplificase esta zona de forma específica.

La mezcla de reacción de las PCR se hizo para un volumen final de 15 μ L, y contenía: 1,5 μ L del tampón de reacción comercial de la Taq DNA polimerasa (que contenía el Mg^{2+}), 0,3 μ L de dNTPs

10 mM, 0,6 μ L de cada oligonucleótido a 10 μ M, 1 μ L del ADN plasmídico obtenido, 0,4 μ L (0,4U) de Taq DNA polimerasa y 10,6 μ L de agua ultrapura estéril.

Las secuencias de los cebadores fueron: oligo sentido: CGCTATGTGTTCTGGGAAATC, y antisentido: GGTCTAACCAGAGAGACC.

Las reacciones se sometieron a 35 ciclos de temperatura basados en tres etapas: una inicial de desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, una de anillamiento de los oligonucleótidos a 55 °C durante 1 minuto, y una final de amplificación a 72°C durante 45 segundos.

2.1. Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR obtenidos fueron comprobados por medio de electroforesis en gel de agarosa. Esta técnica consiste en separar los fragmentos de ADN de una muestra en función de su tamaño, gracias al paso de una corriente eléctrica. Para la preparación de los geles se realizó una disolución de agarosa al 1,5% en TAE. Una vez disuelta la agarosa se añadieron 3 μ L de bromuro de etidio (10 mg/mL) por cada 50 mL de gel y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Una vez preparado el gel se le colocó en la posición adecuada de la cubeta y se cargaron las muestras de ADN obtenidas por PCR mezcladas con tampón de carga. La electroforesis se realizó a 100V, usando el tampón TAE como tampón de electroforesis (véase 4.3).

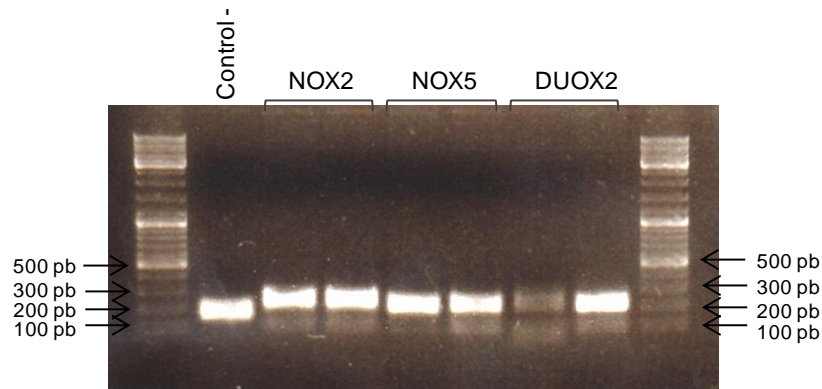


Figura II-7. Comprobación de los plásmidos obtenidos de los clones mediante PCR convencional.

Los clones positivos presentaban una banda de amplificación de 232 pb, mientras que el control negativo con el vector vacío presentaba bandas de amplificación de tamaño inferior, de 185 pb (figura II-7).

4.18.5 Amplificación de las construcciones

Una vez comprobamos que los clones que teníamos eran positivos, los guardamos a -80°C en glicerol al 50% (v/v) con el fin de mantenerlos en stock indefinidamente.

Así, posteriormente sacamos del stock de bacterias a -80°C los clones deseados haciendo una estría en placa para crecerlos y obtener cantidad suficiente de las construcciones para poder transfectar las células HEK 293T. Así, lo que hicimos fue picar una colonia de la estría correspondiente a cada clon y ponerla a crecer en 15 mL LB+Amp a 30°C con agitación hasta el día siguiente, comprobando como el medio de cultivo se enturbiaba. A la mañana siguiente los cultivos bacterianos se precipitaron centrifugando 1 minuto a velocidad máxima (17.000 xg) y el ADN plasmídico de cada una de las construcciones se purificó utilizando el sistema PureLink® Quick Plasmid Miniprep de Invitrogen, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido mediante este sistema se encontraba en cantidad suficiente y tenía la calidad necesaria para poder llevar a cabo la transfección de las células HEK 293T.

4.18.6 Transfección de las células HEK 293T.

Para la producción de lentivirus se necesitan tres componentes básicos:

- Un vector lentiviral (pLVTHM), que contiene el shRNA
- Un vector empaquetador del virus (pSPAX2)
- Un vector de la envoltura vírica (pMD2G)

Las partículas virales con las construcciones creadas se produjeron por medio de un protocolo de transfección con polietilenimina lineal (PEI) descrito anteriormente (Torres-Torronteras, 2011). Se cultivaron células HEK 293T en placas de 60 mm^2 , en un volumen de 9,6 mL de DMEM completo (10%FBS/Gln/PS), y a una confluencia del 80%.

Se preparó una mezcla de transfección para cada construcción: 1,2 mL de NaCl 150 mM, 15 μg de plásmido pSPAX2, 10 μg de plásmido pMD2G, 20 μg del vector pLVTHM con la secuencia de interferencia, y 60 μL de PEI 1 mg/mL (previamente calentado a 37°C). La mezcla se incubó 20 minutos a temperatura ambiente, y se añadió al medio de las células HEK 293T, con cuidado de no levantarlas. A las 24 horas el medio de cultivo de las células fue retirado y renovado. A las 48 y 72 horas post-transfección fue recogido el sobrenadante con los virus, y guardado a 4°C , obteniendo así unos 30 mL finales de medio con presencia de lentivirus. Posteriormente, los

virus fueron concentrados por medio de ultracentrifugación a 50.000 xg y 16°C durante 2 horas en un rotor oscilante SW 28. Se retiró el sobrenadante y los virus se resuspendieron en 200 µL de medio RPMI (1% FBS/Gln/PS), siendo necesario mantenerlos a 4°C durante aproximadamente 4 horas para que el sobrenadante vírico se despegue. Se separaron 4µL de lentivirus para proceder a su titulación y el volumen restante se alicuotó y se congeló a – 80 °C.

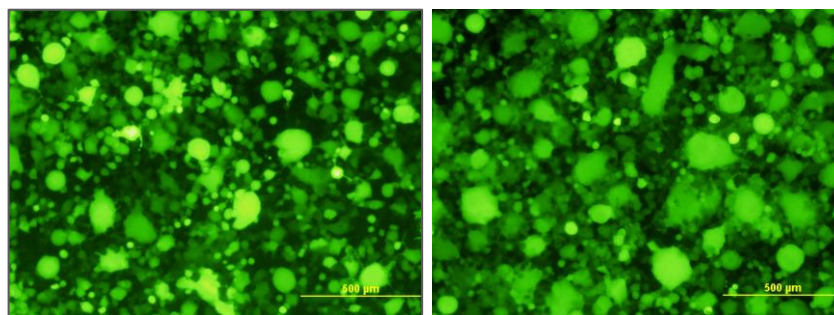


Figura II-8: Fotografías representativas de células HEK 293T. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia 48 horas después de la transfección de las células HEK 293T.

4.18.7 Transduccion lentiviral de la línea celular K562 con el ARN de interferencia (iRNA)

Durante la noche previa a su transducción, las células K562 se cultivaron a una concentración de 3×10^5 células /mL en medio RPMI con bajo porcentaje de suero (1%FBS) para bloquear su proliferación, ya que se ha comprobado que en estas condiciones la transducción es más efectiva. Posteriormente se añadió a todas las células ciprofloxacino (0,02 mg/mL) y se descongelaron los lentivirus. Se estableció para la transducción una MOI de 15 virus por célula, mezclando así 150 µL de lentivirus con la cantidad de células K562 correspondiente, previamente calculada a partir de la titulación obtenida para cada transfección en las células HEK 293T (ver 5.12.6). Se añadió también polibreno (8 ng/mL) para favorecer la fusión. La mezcla lentivirus-células se dispuso en placas de 96 pocillos (200 µL/pocillo), y se centrifugó durante 90 minutos, a 30°C, con una velocidad de 1000 xg. Finalmente se incubó la placa durante toda la noche a 37°C, y al día siguiente se retiraron los virus y se lavaron las células para su cultivo habitual.

Para comprobar la efectividad de las transducciones analizamos las células a las 72 horas en microscopio de luz ultravioleta, para observar aquellas que se vean verdes debido a la expresión de la proteína GFP, y que por tanto serán las que hayan sido transducidas (Figura II-9) Además,

también realizamos el análisis por medio de citometría, ya que esta proteína puede detectarse directamente a través del canal FL1 (verde) del citómetro FACSCalibur, sin necesidad de utilizar ningún tipo de marcador adicional para su análisis (Figura II-9)

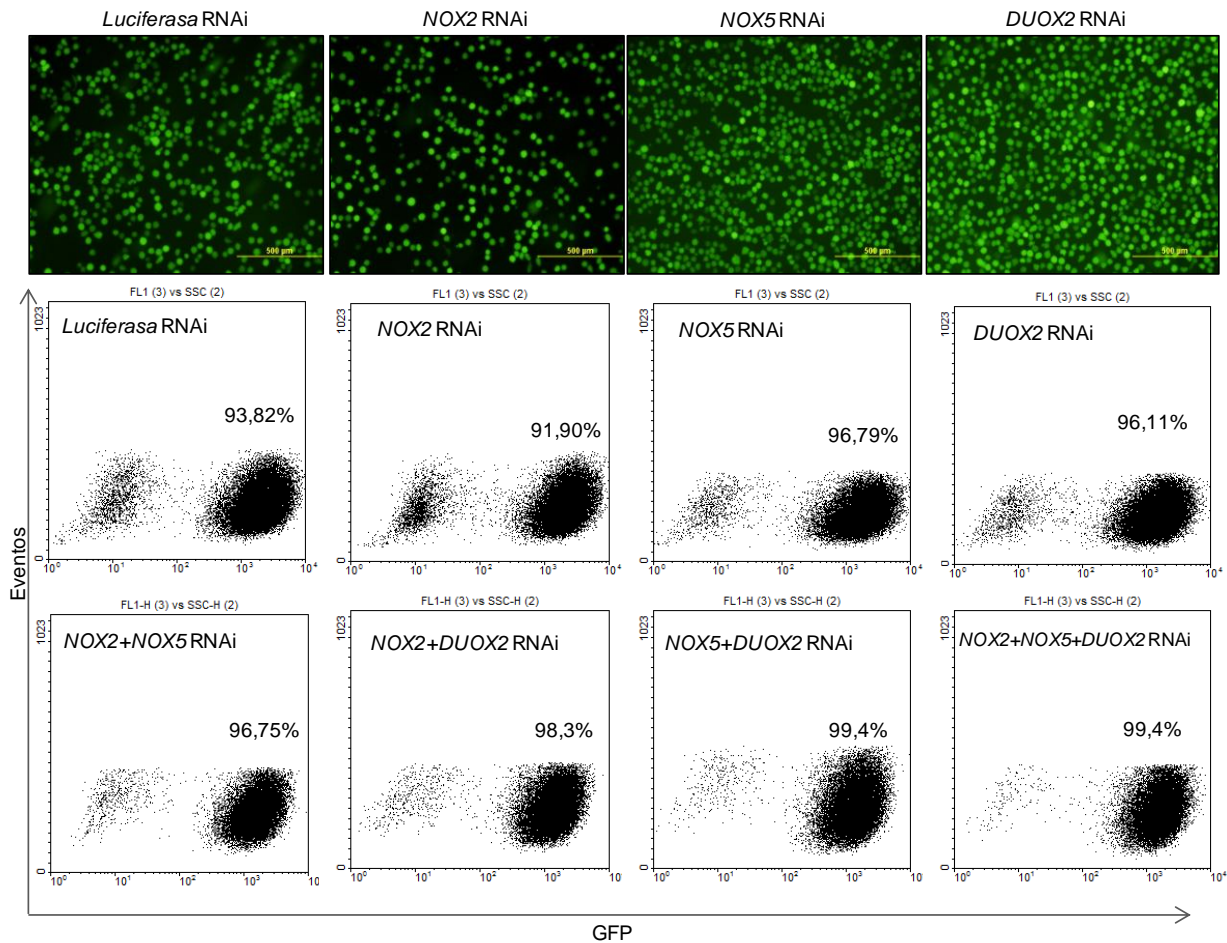


Figura II-9: Comprobación de la efectividad de la transducción de las células K562. En el panel superior se muestran las células verdes (GFP+) fotografiadas 72 horas después de la transducción con un microscopio de fluorescencia. En el panel inferior se muestra el análisis mediante citometría de la efectividad de la transducción, reflejando el porcentaje de células GFP+.

4.18.8 Comprobación del silenciamiento de la expresión de las NADPH oxidasas

Con el objetivo de confirmar que los vectores lentivirales con el ARN de interferencia (RNAi) están realmente reduciendo los niveles del ARN mensajero (mRNA), y con ello silenciando la expresión de las diferentes NADPH oxidasas presentes en las células K562, realizamos un nuevo análisis por medio de RT-qPCR. En esta ocasión utilizamos el método del $\Delta\Delta C_t$ (Schmittgen and Livak, 2008), comparando los ciclos umbral de amplificación de las células

NADPH oxidasas RNAi respecto al de las células control Luciferasa RNAi, y así calcular su expresión de mRNA relativa. Se analizó simultáneamente como control interno el mRNA de la actina en estas células. Se usaron los mismos oligonucleótidos y condiciones de reacción que para analizar el patrón de expresión de las células K562 (ver tabla IV-3), partiendo en todos los casos de 100 ng de ADNc.

4.19 SILENCIAMIENTO DE LA PROTEÍNA REGULADORA p22^{phox} Y DE LA PTP SHP1 MEDIANTE ARN DE INTERFERENCIA.

El silenciamiento de estas dos proteínas fue realizado previamente a este estudio en nuestro laboratorio. La metodología utilizada fue la misma que para el silenciamiento de las NADPH oxidasas descrito en el punto 5.18. Los oligonucleótidos de interferencia utilizados frente a la proteína citoplasmática p22^{phox} se encuentran descritos en Sardina et al., 2010. Los utilizados para interferir el ARN de la proteína tirosina fosfatasa SHP1 fueron los siguientes:

Oligo sentido:

gatccccGCAGGAGGTGAAGAACTTGtcaagagaCAAGTTCTTCACCTCCTGCtttttgaaa

Oligo antisentido:

agctttccaacaaaGCAGGAGGTGAAGAACTTGtctcttgaaCAAGTTCTTCACCTCCTGCggg

4.20 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos son expresados como la media \pm error estándar (ESM). Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante la prueba Student's *t*-test analizando previamente la varianza entre las muestras mediante la prueba F, utilizando la herramienta de análisis de datos del Excel. Para los modelos animales, las diferencias se analizaron con la prueba U de Mann Whitney, utilizando el programa IBM SPSS Statistics 21. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

El cálculo del Coeficiente de interacción (CI) entre las diferentes combinaciones de drogas usadas se llevó a cabo mediante el algoritmo de Chou-Talalay (Chou, 2006; Chou and Talalay, 1984) usando el programa Calcosyn Biosoft.

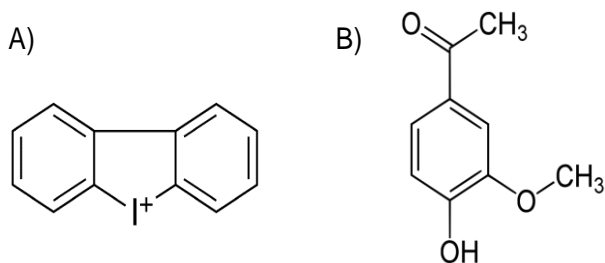
CAPÍTULO IV : RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD NADPH OXIDASA SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS LEUCÉMICAS.

Como hemos citado en la introducción de este trabajo, el estudio en la última década de la familia de proteínas NADPH oxidasa, ha revelado su implicación en la transformación y progresión de distintos tipos de células cancerosas (revisado en Hayes and Knaus, 2013 y en Meitzler et al., 2013). Por esto, el comienzo de nuestro estudio se dirigió a determinar la importancia de estas enzimas en la proliferación de las células leucémicas mediante la utilización de distintos inhibidores de la actividad NADPH oxidasa.

1.1.El tratamiento con inhibidores de la actividad NADPH oxidasa inhibe el crecimiento de la línea celular leucémica K562.

La línea celular K562 deriva de un paciente con Leucemia mieloide crónica (LMC), por lo que expresa constitutivamente el gen BCR-ABL, haciendo de ella un modelo útil y apropiado para el estudio de esta enfermedad. Para comprobar si la capacidad de crecimiento de estas células depende de la actividad NOX, las tratamos en primer lugar con DPI (Difenileno iodonio, esquema IV-1A), inhibidor comúnmente utilizado en investigación para inhibir las enzimas NADPH oxidasas (Burek and Rose, 2008; Don and Cheng, 2013; Doroshov et al., 2013). Observamos como la proliferación sufre una inhibición significativa de manera dosis-dependiente (Figura 1A), quedando reducida incluso a concentraciones bajas de DPI, lo que sugiere que la actividad de estos complejos enzimáticos es necesaria para el crecimiento de las células K562. La dosis media (Dm) calculada para el DPI era 0,25 μM . Sin embargo, a pesar de que el DPI es el compuesto más utilizado para inhibir NADPH oxidasas, no es un inhibidor totalmente específico (revisado en Aldieri et al., 2008). Se conoce que a concentraciones más altas es capaz de inhibir también flavoproteínas de la cadena respiratoria mitocondrial (Gatley and Sherratt, 1976). No obstante, en nuestro estudio utilizamos este inhibidor a bajas concentraciones.



Esquema IV-1. Estructura de los inhibidores de NADPH oxidasas DPI (A) y Apocinina (B).
Tomado de Aldieri et al., 2008.

Para confirmar que el efecto observado sobre proliferación era debido a la inhibición específica de NADPH oxidasas, tratamos las células con un segundo inhibidor denominado apocinina o acetovanilona (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona, esquema IV-1B) compuesto que se extrae de extractos de la raíz de la planta *Picrorhiza kurroa*, que crece en el Himalaya. Su efecto inhibitorio sobre la actividad NOX se debe a que bloquea la migración a la membrana de p47^{phox} y p67^{phox} (Stolk et al., 1994), impidiendo por tanto la formación del complejo enzimático NOX2. Aunque según esto la apocinina sería un inhibidor específico de NOX2, existen algunos trabajos que demuestran que también es capaz de inhibir otras NOX, como por ejemplo NOX4 (Rossary et al., 2007; Serrander et al., 2007), o NOX5 (Fu et al., 2006).

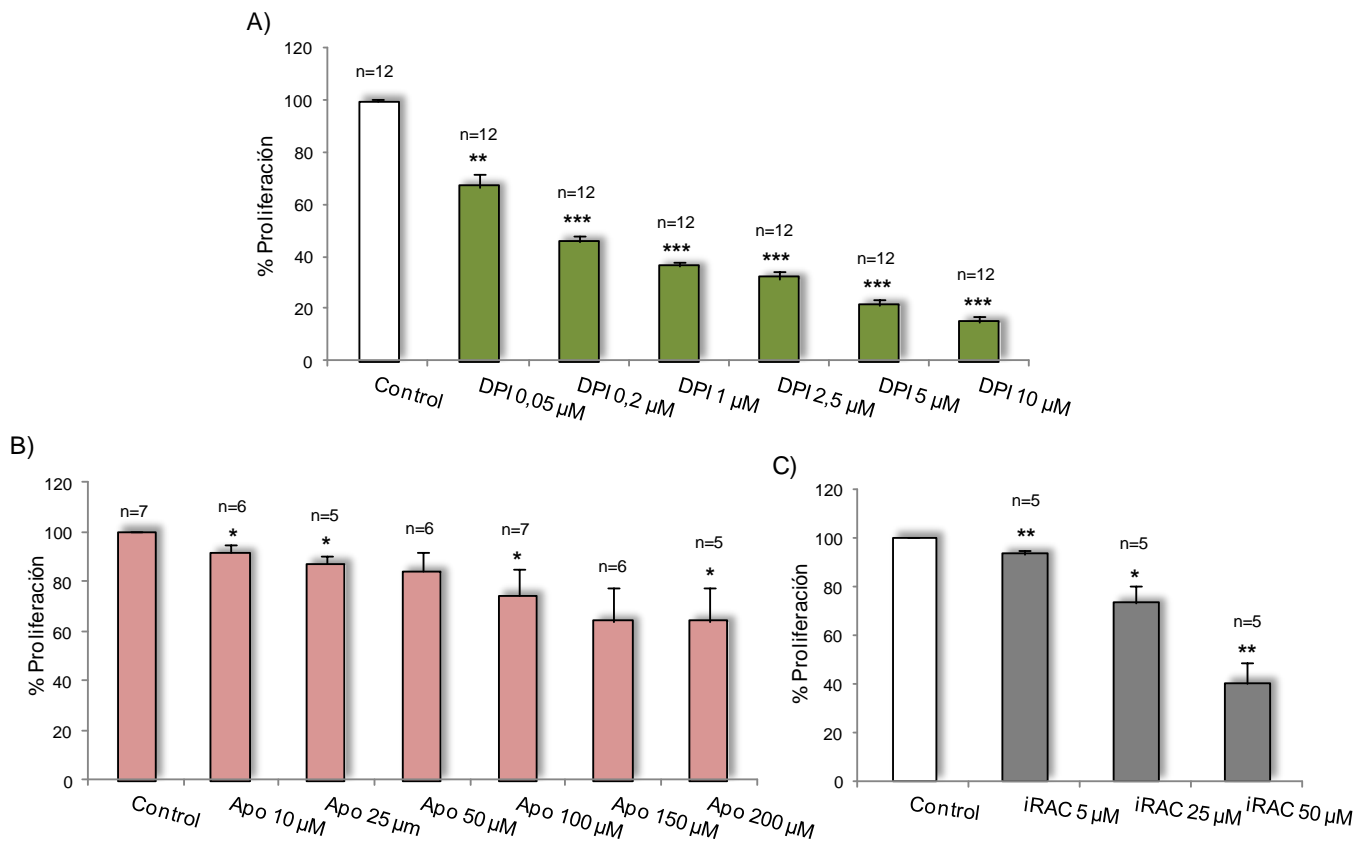


FIGURA IV-1. La inhibición de la actividad NADPH oxidasasa dificulta el crecimiento de células K562. Las células K562 se cultivaron a una densidad de 2×10^5 células/ml en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de DPI (A), apocinina (B) o inhibidor de RAC1 (C). La tasa de proliferación se analizó 48h después por el ensayo del MTT. Los resultados están representados como la media \pm ESM. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ refleja diferencias significativas respecto a células control no tratadas.

El tratamiento de las K562 con distintas concentraciones de apocinina provocaba de nuevo una disminución significativa de la proliferación celular (Figura 1B), obteniendo una Dm de este inhibidor de 554 μ M.

Del mismo modo que sucedía con el DPI, la apocinina es capaz de inhibir además otras actividades enzimáticas, como por ejemplo, la del citocromo P450 (Pietersma et al., 1998), por lo que decidimos probar el efecto de un tercer compuesto. Escogimos el inhibidor de la GTPasa Rac1 (NSC23766), ya que los complejos NADPH oxidasas NOX1 y NOX2 dependen de esta proteína para su ensamblaje (revisado en Bedard and Krause, 2007), y por tanto para su activación. Los resultados mostraban nuevamente una inhibición significativa de la proliferación de las células (Figura 1C), con una Dm = 40,1 μ M.

De todos los inhibidores de la actividad NADPH oxidasa utilizados, el DPI mostraba una Dosis media menor que el resto, y por tanto, un mayor efecto sobre proliferación con concentraciones menores que la apocinina o el inhibidor de RAC1.

Si bien estos tres inhibidores no son totalmente específicos, su diana común son las NADPH oxidasas. Por tanto, la obtención de un efecto semejante al tratar las células con cualquiera de ellos sugiere que el descenso significativo observado sobre proliferación es efectivamente debido a la inhibición específica de la actividad NOX.

Así, los resultados indican que el crecimiento de las células K562 es dependiente de la actividad NADPH oxidasa.

1.2.El tratamiento con inhibidores de la actividad NADPH oxidasa inhibe el crecimiento de las células mononucleadas de médula osea de pacientes con leucemia mieloide crónica.

Una vez comprobado que la familia NADPH oxidasa es necesaria para el crecimiento de las células K562, y teniendo en cuenta que esta línea celular inmortalizada puede haber sufrido múltiples mutaciones y modificaciones a lo largo de los años, creímos necesario analizar también el efecto de estos inhibidores en células de pacientes. Para ello se aislaron las células mononucleadas (CMNs) de muestras de médula osea (MO) procedentes de individuos en fase crónica de la enfermedad y recién diagnosticados (es decir, que todavía no habían comenzado ningún tratamiento), y se incubaron con DPI (figura 2A), apocinina (figura 2B) e inhibidor de RAC1 (figura 2C).

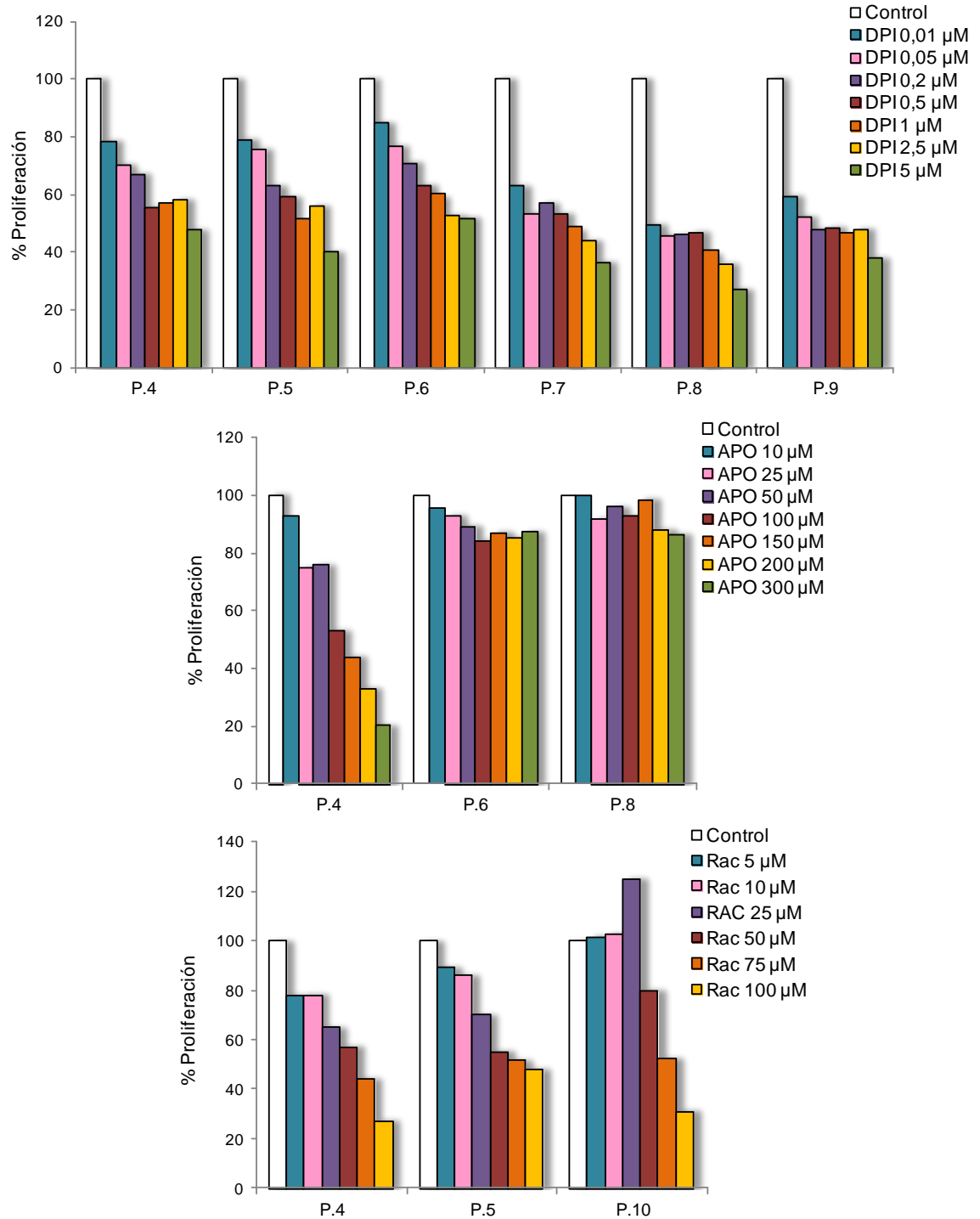


FIGURA IV-2. La inhibición de la actividad NADPH oxidasa dificulta el crecimiento de células CMNs de médula ósea de pacientes. Las células mononucleadas se cultivaron a una densidad de 10×10^5 células/mL en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de DPI (A), apocinina (B) o inhibidor de RAC1 (C). La tasa de proliferación se analizó 48h después por el ensayo del MTT. Se muestra un experimento representativo de distintos pacientes.

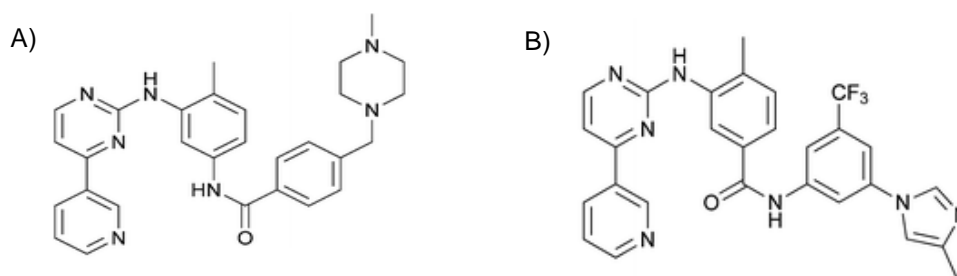
A pesar de que los resultados mostraron distinta sensibilidad entre los diferentes pacientes al tratar las células con estos tres inhibidores de la actividad NADPH oxidasa, la respuesta fue en todos los casos un descenso de la proliferación celular, observándose el mayor efecto inhibitorio en respuesta al DPI. Estos resultados coinciden con los obtenidos en células K562, lo que valida los datos adquiridos en esta línea celular. Capto nuestra atención el menor efecto que ejerce la apocinina y la Dosis media tan elevada que presenta, tanto en células K562 como en células de paciente, respecto a los otros dos inhibidores de la actividad NADPH oxidasa utilizados. El autor Vejrazka M. y sus colegas describen un papel dual de la apocinina, de manera que puede inhibir la actividad de la oxidasa de fagocitos (NOX2), pero también es capaz de estimular la producción de ROS en células no fagocíticas (Vejrazka et al., 2005), lo que podría estar enmascarando en gran medida el efecto antiproliferativo en nuestras células.

Así, podemos afirmar que la actividad de los complejos NADPH oxidasa es necesaria para el crecimiento de las células cancerosas en la leucemia mieloide crónica, manifestando que el uso de inhibidores de esta familia de proteínas podría ser una alternativa terapéutica para esta enfermedad.

2. EMPLEO DE INHIBIDORES DE LA QUINASA BCR-ABL

Como decíamos en la introducción, la leucemia mieloide crónica es una neoplasia caracterizada por la presencia del cromosoma Philadelphia (Ph), que resulta de la translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22, lo que da lugar a la fusión génica *BCR-ABL*. La proteína resultante es una quinasa constitutivamente activa cuya actividad provoca el crecimiento incontrolado de las células mieloides (Bedi et al., 1994; Steelman et al., 2004). Los inhibidores de la quinasa fusogénica, como por ejemplo el imatinib mesylate (STI-571, Gleevec) o el nilotinib (AMN107, Tasigna) (esquema IV-2) se utilizan en el tratamiento de esta enfermedad con muy buenos resultados en la mayoría de los pacientes (Druker et al., 2006), aunque en pacientes con remisiones citogenéticas completas aún se encuentra leucemia residual en las células madre primitivas (Bhatia et al., 2003; Bocchia et al., 2008). A pesar de conseguir una remisión completa, estos tratamientos no son curativos, ya que la suspensión del tratamiento con Imatinib se ha asociado con más del 50% de los casos de recurrencia estudiados (Cortes et al., 2004; Rousselot et al., 2007), por lo que son tratamientos crónicos que el individuo debe mantener de por vida.

El imatinib inhibe la actividad tirosina-quinasa de BCR-ABL mediante su unión al bolsillo de unión a ATP en el centro catalítico del dominio SH-1 (Src-homology región 1) de ABL, lo que previene su activación y la fosforilación de sus proteínas diana (Schindler et al., 2000). Aunque esta droga supuso un gran avance en el tratamiento de la LMC, hay gran número de casos en los que se generan resistencias, fundamentalmente por alteraciones en la superficie de unión del imatinib a la proteína (Gorre et al., 2001).



Esquema IV-2. Estructura de los inhibidores de la oncoquinasa BCR-ABL Imatinib (A) y Nilotinib (B). Tomado de Deadman et al., 2012

El nilotinib pertenece a una segunda generación de inhibidores (esquema IV-2) diseñado racionalmente explotando las ventajas estructurales de un bolsillo lipofílico adicional adyacente al sitio de unión del ATP, lo que permite que incremente su selectividad por BCR-ABL, de manera que este compuesto es entre 10 y 50 veces más eficaz y un potente inhibidor de la actividad tirosina-quinasa de formas mutantes de BCR-ABL resistentes a imatinib (Manley et al., 2004; O'Hare et al., 2005; Weisberg et al., 2005).

Decidimos analizar el efecto de imatinib y nilotinib sobre la proliferación de la línea celular K562 y células primarias procedentes de pacientes. Como era de esperar tanto el imatinib como el nilotinib inhibían significativamente el crecimiento de las células K562 (Figura IV-3) con Dm de 0,14 μ M y 3 nM respectivamente.

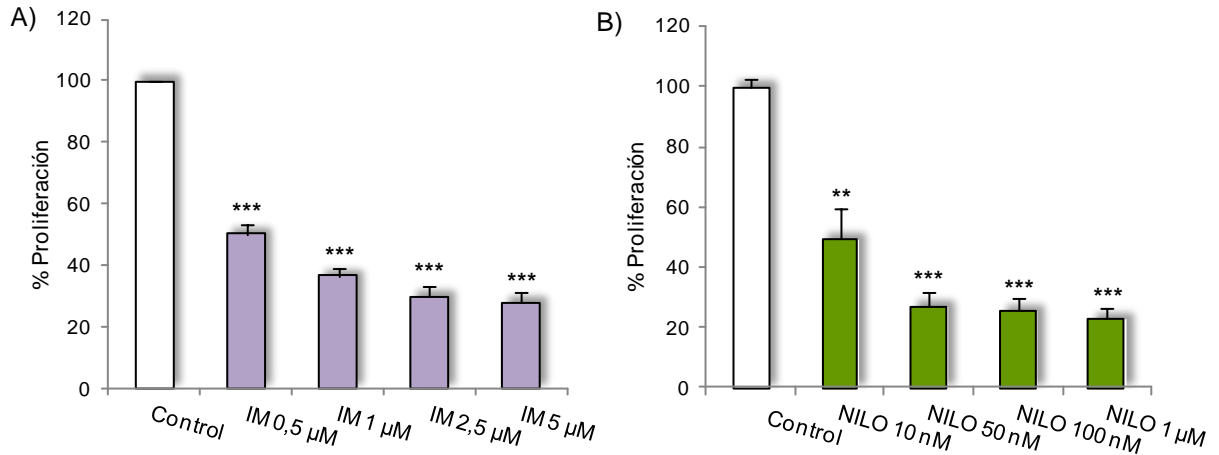


Figura IV-3. Los inhibidores de la oncoquinasa BCR-ABL, imatinib y nilotinib, impiden el crecimiento de células K562. Las células K562 se cultivaron a una densidad de 2×10^5 células/mL en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de imatinib (A) o nilotinib (B). La tasa de proliferación se analizó 48h después por el ensayo del MTT. Los resultados se representan como la media \pm ESM de 17 experimentos en el caso del imatinib y de 12 en el caso del nilotinib. *** $p < 0,001$ y ** $p < 0,01$ reflejan diferencias significativas respecto a células control no tratadas.

En el caso de las células primarias procedentes de los pacientes, la sensibilidad variaba de unos individuos a otros. En general, tanto el imatinib (Figura IV-4A) como el nilotinib (Figura IV-4B) eran capaces de disminuir ligeramente la proliferación de estas células de pacientes, aunque el efecto era menos evidente que en células K562.

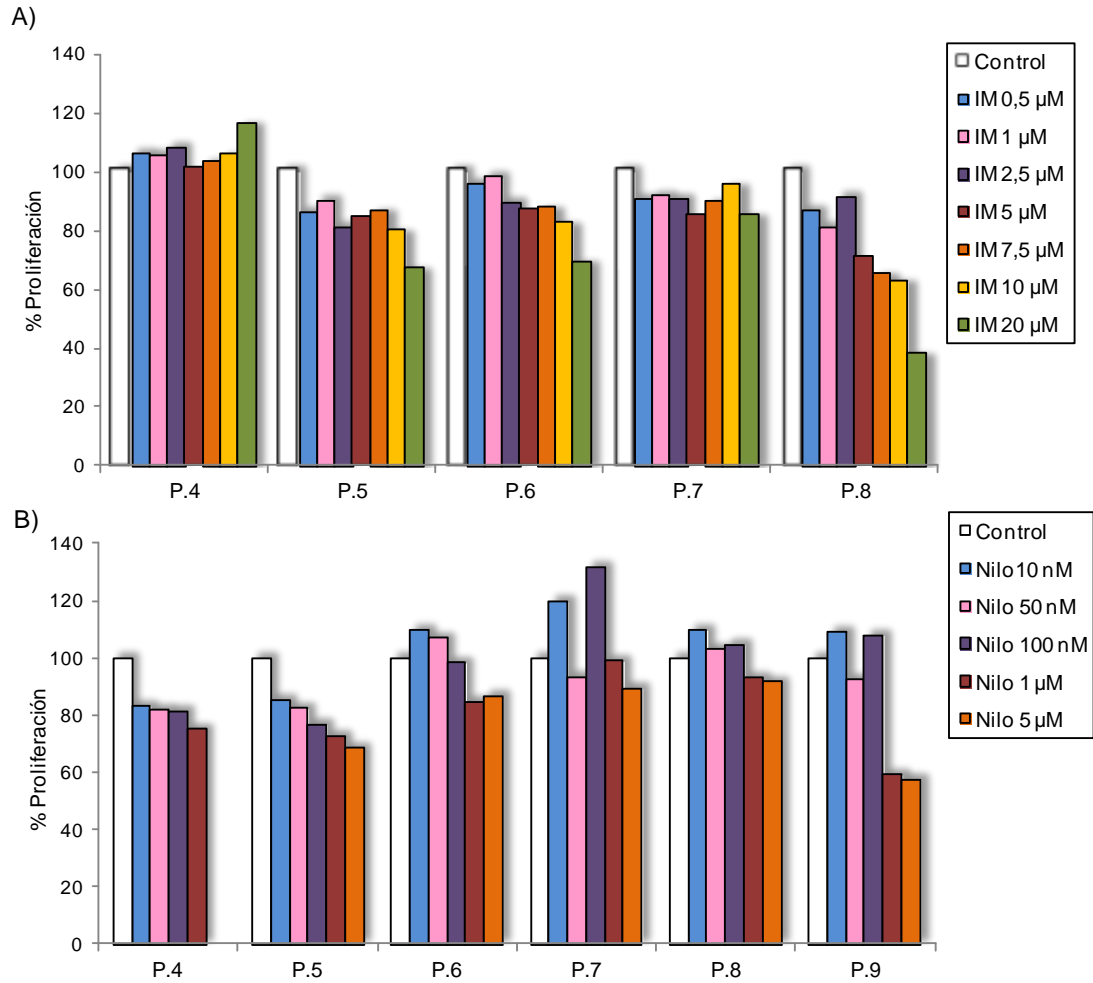


Figura IV-4. Los inhibidores de la oncoquinasa BCR-ABL, imatinib y nilotinib, impiden el crecimiento de células CMNs de médula osea de pacientes. Las células mononucleadas se cultivaron a una densidad de 10×10^5 células/mL en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de imatinib (A) o Nilotinib (B). La tasa de proliferación se analizó 48h después por el ensayo del MTT. Se muestra un experimento representativo de distintos pacientes.

En conjunto, parece que las células mononucleadas de pacientes son más resistentes al tratamiento con estos inhibidores que las líneas celulares, lo que podría estar relacionado con la baja acumulación de estas drogas en las células de la médula osea, tal y como se ha descrito recientemente (Engler et al., 2010). Hemos de destacar los datos del paciente 4 (P.4), cuyas células parecen presentar insensibilidad al tratamiento con Imatinib, pero no al Nilotinib. Como hemos citado anteriormente, este podría ser un caso de resistencia primaria al Imatinib, que se resolvería con el uso de inhibidores de BCR-ABL de segunda generación (Nilotinib, dasatinib...) como tratamiento de elección para el paciente.

3. COMBINACIÓN DE INHIBIDORES DE LA QUINASA BCR-ABL CON INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD NADPH OXIDASA EN LÍNEAS CELULARES DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA.

El uso de altas concentraciones de una droga en el tratamiento de una enfermedad puede provocar efectos tóxicos no deseados en células sanas. Por ello, una estrategia cada vez más empleada es combinar la droga de interés con otras moléculas tratando de buscar efectos aditivos, o en el mejor de los casos sinérgicos que permitan reducir la concentración del fármaco sin comprometer el efecto sobre las células tumorales. Por ello, y debido a los resultados que hemos descrito para los inhibidores de la actividad NADPH oxidasa, nos propusimos analizar el efecto conjunto de estos agentes con los inhibidores de BCR-ABL.

3.1. Efecto combinado de la inhibición de NADPH oxidasas y BCR-ABL sobre la proliferación de líneas celulares de leucemia mieloide crónica.

Comenzamos estudiando la proliferación de las células K562 tras someterlas a un tratamiento de 48 horas en el que combinábamos un inhibidor de la actividad NOX (DPI, apocinina o inhibidor de RAC1) con un inhibidor de la quinasa constitutiva BCR-ABL (imatinib o nilotinib).

Así, se probaron distintas combinaciones posibles : imatinib + DPI (Figura IV-5A), nilotinib + DPI (Figura IV-5B), imatinib + apocinina (Figura IV-6A), imatinib + iRAC (Figura IV-6B), y varias concentraciones diferentes para cada inhibidor.

Curiosamente, en todos los casos el resultado fue el mismo: el tratamiento combinado siempre provocaba un descenso de la proliferación significativamente mayor que el reflejado por los tratamientos individuales.

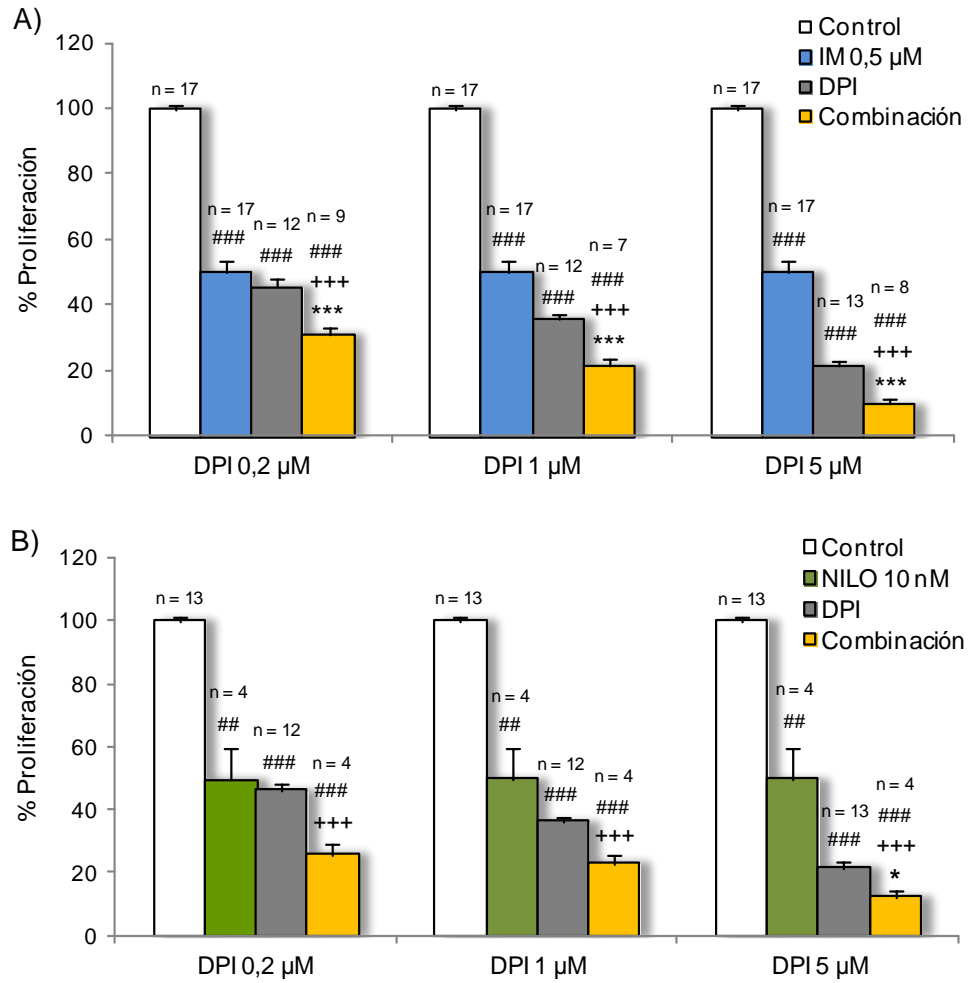


Figura IV-5. La combinación del inhibidor de NADPH oxidasas DPI con inhibidores de BCR-ABL en células K562 es más efectiva que los tratamientos individuales. Las células K562 se cultivaron a una densidad de 2×10^5 células/mL en presencia de imatinib 0,5 μM (IM), diferentes concentraciones de DPI o de la combinación imatinib + DPI (A) y en presencia de nilotinib 10 nM (NILO), diferentes concentraciones de DPI o de la combinación nilotinib + DPI (B). La tasa de proliferación se analizó 48h después por el ensayo del MTT. Los resultados están representados como la media \pm ESM. ###p<0,001, ##p<0,01, #p<0,05 reflejan diferencias significativas respecto a las células control no tratadas. ***p<0,001, *p<0,05 reflejan diferencias significativas respecto a células tratadas únicamente con el inhibidor de BCR-ABL (imatinib(A) o nilotinib(B)), +++p<0,001, reflejan diferencias significativas respecto a células tratadas únicamente con DPI.

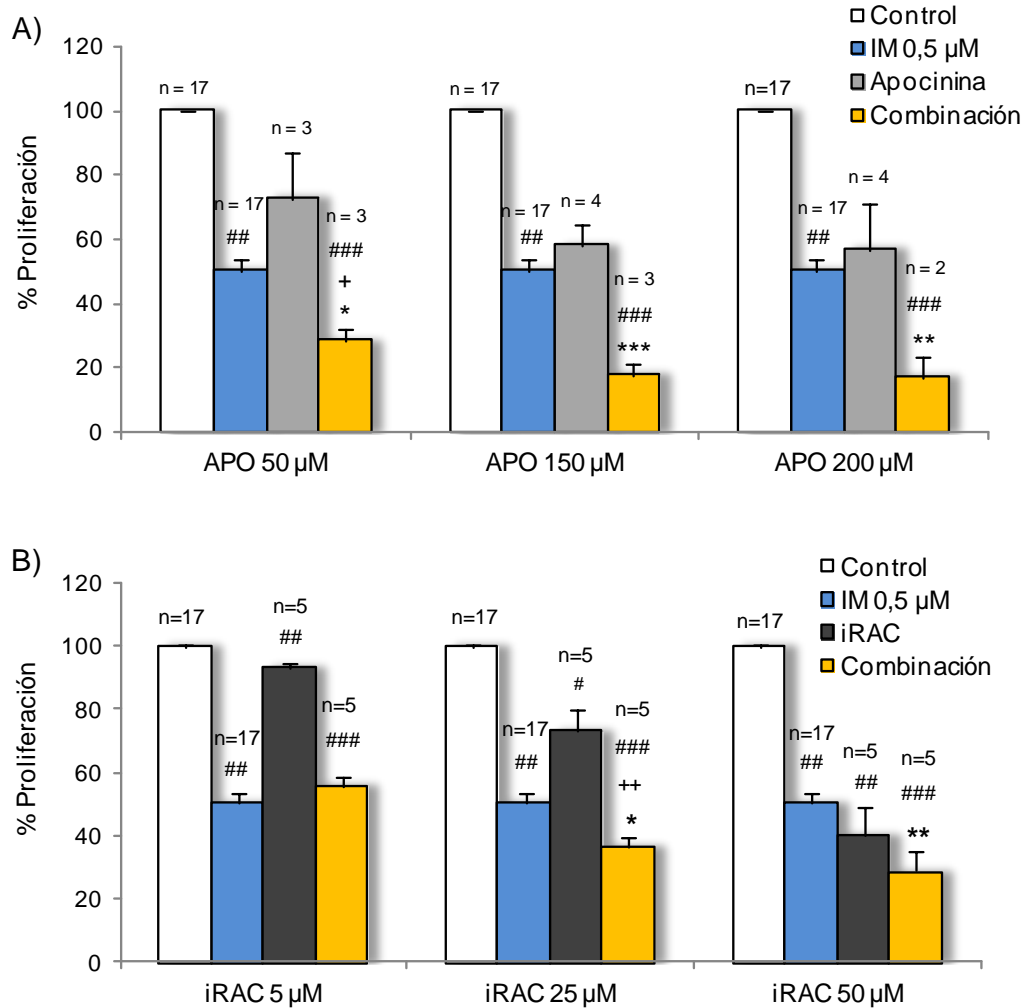


Figura IV-6. La combinación del inhibidor de NADPH oxidasas apocinina o del inhibidor de RAC1 con inhibidores de BCR-ABL en células K562 es más efectiva que los tratamientos individuales. Las células K562 se cultivaron a una densidad de 2×10^5 células/mL en presencia de imatinib 0,5 μM (IM), diferentes concentraciones de apocinina (APO) o de la combinación imatinib + APO (A) y en presencia del imatinib 0,5 μM (IM), diferentes concentraciones del inhibidor de RAC (iRAC) o de la combinación imatinib + iRAC (B). La tasa de proliferación se analizó 48h después por el ensayo del MTT. Los resultados están representados como la media \pm ESM. ### $p < 0,001$, ## $p < 0,01$, reflejan diferencias significativas respecto a las células control no tratadas. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ reflejan diferencias significativas respecto a células tratadas únicamente con Imatinib. ++ $p < 0,01$, + $p < 0,05$ reflejan diferencias significativas respecto a células tratadas únicamente con inhibidores de la actividad NADPH oxidasa (APO (A) o iRAC (B)).

A la vista de nuestros resultados anteriores y teniendo en cuenta que la leucemia mieloide crónica se caracteriza por un crecimiento incontrolado de células mieloides, decidimos ampliar

nuestro análisis y examinar la clonogenicidad de las células K562 tras los distintos tratamientos. Los ensayos de clonogenicidad son experimentos que determinan la capacidad de las células para llevar a cabo una división “ilimitada”. Se utilizan comúnmente para medir la efectividad de un agente sobre la proliferación y supervivencia celular y se basan en la facultad de una única célula para crecer y formar una colonia (CFU), considerándose como colonia un grupo de al menos 50 células (Franken et al., 2006).

Así, tras 48 horas con DPI 1 μ M, imatinib 0,5 μ M, nilotinib 50 nM o la combinación de los agentes (IM+DPI o NILO+DPI) se sembraron el mismo número de células de cada tratamiento en medio semisólido de metilcelulosa básico (HSC-CFU basic) y se procedió al contaje de colonias presentes en la placa al cabo de 7 días.

El número de CFUs que se formaron con el tratamiento combinado resultó ser significativamente menor que con los tratamientos individuales, tanto para la combinación imatinib y DPI (Figura IV-7A), como para la combinación nilotinib y DPI (Figura IV-7B), como podía observarse a simple vista (Figura IV-7D).

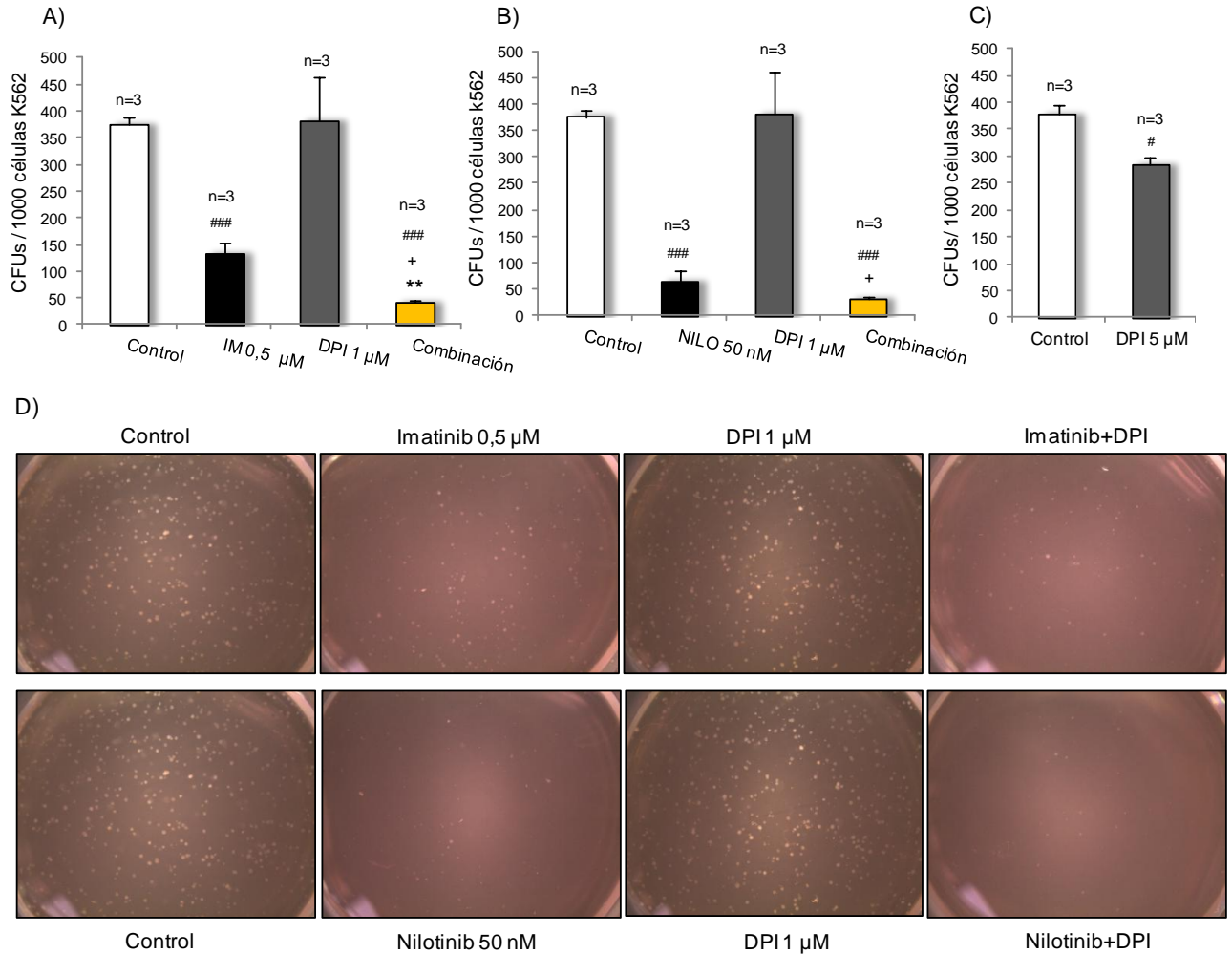


Figura IV-7. La capacidad de formación de colonias (CFUs) de las células K562 es fuertemente inhibida por la combinación de inhibidores de NADPH oxidasas con inhibidores de BCR-ABL. Las células K562 se cultivaron a una densidad de 2×10^5 células/mL en presencia de imatinib $0,5 \mu\text{M}$ (IM), DPI $1 \mu\text{M}$ o la combinación NILO+DPI (A); en presencia de Nilotinib 50 nM (NILO), DPI $1 \mu\text{M}$ o la combinación NILO+DPI (B) y en presencia de DPI $5 \mu\text{M}$ (C). A las 48 horas se retiraron los fármacos y se sembraron 1000 células de cada condición en medio semisólido de metilcelulosa y se contó el número de unidades formadoras de colonias (CFUs) 7 días después mediante microscopía. Los resultados están representados como la media \pm ESM (A,B y C). ### $p < 0,001$, # $p < 0,05$, reflejan diferencias significativas respecto a las células control no tratadas. ** $p < 0,01$, refleja diferencias significativas respecto a células tratadas únicamente con Imatinib. + $p < 0,05$, refleja diferencias significativas respecto a células tratadas únicamente con DPI.

Si bien la combinación imatinib $0,5 \mu\text{M}$ + DPI $1 \mu\text{M}$ resultaba tener un efecto significativamente mayor que los tratamientos individuales, observábamos como el DPI por sí solo parecía no mostrar un efecto significativo, por lo que quisimos comprobar si era debido a la dosis aplicada a las células o a que este inhibidor realmente no afectaba a la capacidad de formación de colonias de las células K562. Así, encontramos como al aumentar la

concentración de DPI a 5 μM sí se producía una disminución significativa del número de CFUs presentes (Figura IV-6C). La morfología de las colonias observadas en estos experimentos indicaba que se trataban mayoritariamente de CFU-GM (unidades formadoras de colonias de granulocitos-macrofagos) y de CFU-G (unidades formadoras de colonias de granulocitos), y solamente se pudo apreciar alguna colonia CFU-M (unidades formadoras de colonias de macrofagos). Estos tipos se corresponden con lo esperado para la leucemia mieloide crónica, ya que recordemos que se caracteriza por la alta presencia de leucocitos mieloides, principalmente granulocitos. En la figura IV-8 se muestran algunos ejemplos de colonias observadas durante el contaje.

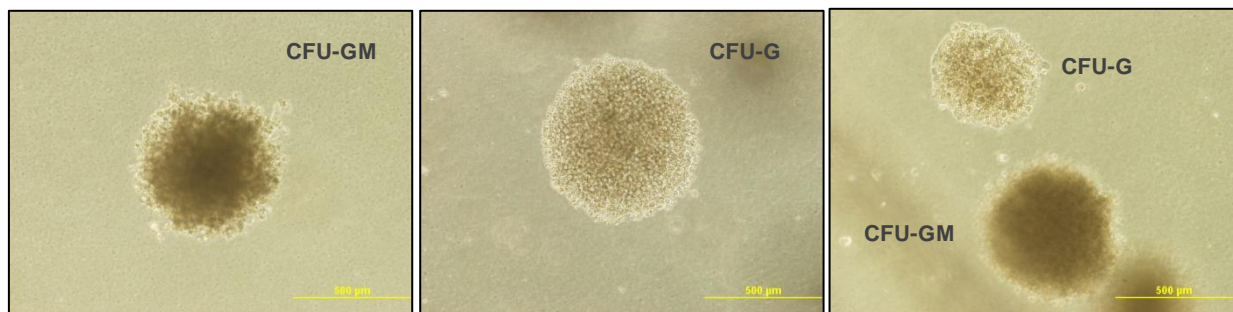


Figura IV-8. Fotografías representativas de los tipos de colonias observados en los ensayos de clonogenicidad de las células K562. CFU-GM = unidades formadoras de colonias de granulocitos-macrofagos ; CFU-G = unidades formadoras de granulocitos.

Las células K562 son un modelo adecuado para el estudio de la leucemia mieloide crónica ya que derivan de un paciente con esta enfermedad, pero no hemos de olvidar que es una línea celular inmortalizada que probablemente habrá sufrido gran cantidad de mutaciones a lo largo de los años. Por esta razón, quisimos reproducir nuestros datos en otra línea celular que presentara también una expresión constitutiva de la quinasa BCR-ABL p210, directora de este tipo de leucemia. Así, escogimos la línea celular murina Boff210 (Gutiérrez-Berzal et al., 2006) y repetimos los mismos experimentos de proliferación (MTT y clonogenicidad) llevados a cabo en células K562. En el caso de las células Boff210, la incubación con los distintos tratamientos fue de 24 horas debido a que presentaban una tasa de crecimiento muy alta.

Los resultados obtenidos en esta segunda línea celular respaldaban los descritos para la línea celular K562: la inhibición de las NADPH oxidasas con DPI, o de la quinasa BCR-ABL con imatinib, por separado, reflejaba un descenso significativo del crecimiento celular y de la formación de colonias, descenso que se veía significativamente intensificado cuando se aplicaba la conjunción de inhibidores (Figura IV-9).

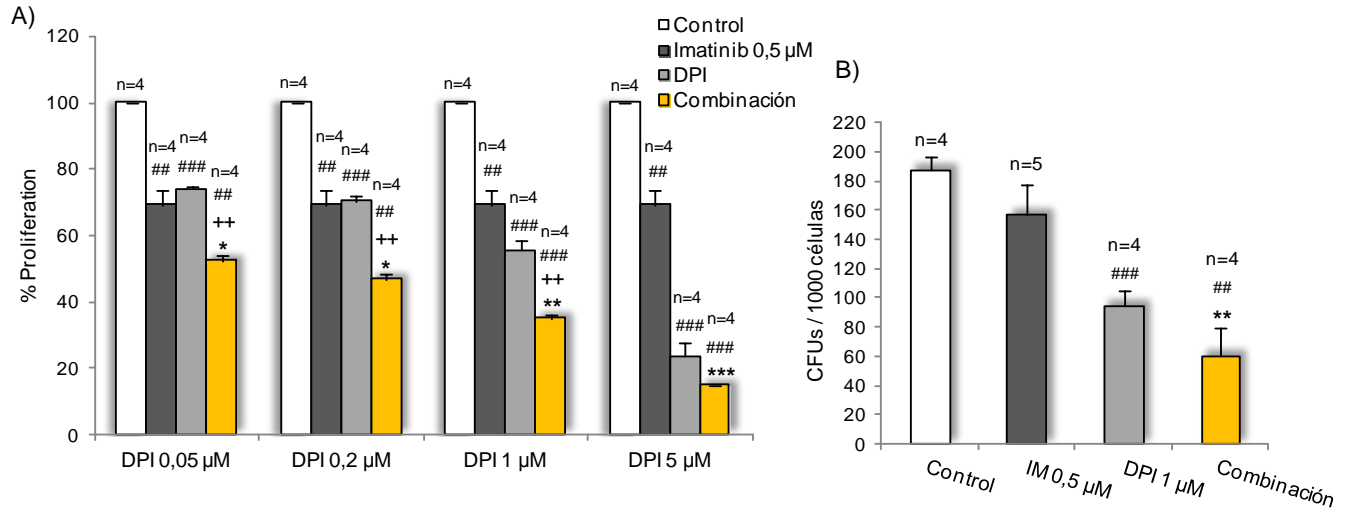


Figura IV-9. La combinación de la inhibición de NADPH oxidasas con la inhibición de BCR-ABL impide la proliferación y la formación de colonias de las células Boff210. Las células se cultivaron a una densidad de 2×10^5 células/mL en presencia de imatinib 0,5 μ M (IM), DPI 1 μ M o la combinación IM+DPI (A) durante 24 horas. La tasa de proliferación se analizó por el ensayo del MTT (A). Para los estudios de clonogenicidad, tras las 24 horas se retiraron los fármacos y sembraron 1000 células en medio semisólido de metilcelulosa y se contó el número de CFUs por microscopía 7 días después (B). Los resultados están representados como la media \pm ESM. ### $p < 0,001$ y ## $p < 0,01$ reflejan diferencias significativas respecto a las células control no tratadas. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ y * $p < 0,05$ reflejan diferencias significativas respecto a células tratadas únicamente con Imatinib. ** $p < 0,05$, refleja diferencias significativas respecto a células tratadas únicamente con DPI.

Por tanto, según estos resultados podemos afirmar que la inhibición combinada de la actividad NADPH oxidasa y la quinasa BCR-ABL provoca una disminución en la proliferación de líneas celulares LMC significativamente mayor que la inhibición de estas proteínas de manera individual.

3.2. Estudio de la relación entre los inhibidores de NADPH oxidasas y los inhibidores de la quinasa BCR-ABL en líneas celulares de leucemia mieloide crónica.

La combinación de fármacos es una estrategia muy investigada y utilizada actualmente, no solo en el tratamiento contra el cáncer, sino también para otras enfermedades de gran importancia, como es por ejemplo el SIDA (Arribas, 2009; 2001; Monticelli et al., 2000 Pérez-Molina et al.). El objetivo de esta terapia combinada es, en todos los casos, lograr un efecto sinérgico entre agentes que permita, en primer lugar, reducir la dosis de ambas drogas para limitar los efectos tóxicos sobre las células sanas, y en segundo lugar retrasar la aparición de resistencias (Chou, 2006).

Considerando la efectividad que manifestaba el tratamiento de las células leucémicas K562 con la combinación de inhibidores de la actividad NADPH oxidasa e inhibidores de BCR-ABL (figura IV-5, IV-6, IV-7 y IV-9), creímos necesario analizar la relación existente entre estos agentes para determinar si estábamos ante un efecto sinérgico o aditivo.

El método de Chou-Talalay es uno de los mejores y más empleado para precisar si una combinación de drogas ejerce un efecto sinérgico o no. Los profesores Ting-Chao Chou y Paul Talalay introdujeron en los años 80 del pasado siglo el concepto de “índice de combinación” (CI, del inglés “Combination index”), que permite cuantificar el sinergismo ($CI < 1$), antagonismo ($CI > 1$) o efecto aditivo ($CI = 1$) (Chou, 2010; Chou y Talalay, 1984) existente entre dos o más agentes. Actualmente el cálculo del CI por el algoritmo de Chou-Talalay se hace de manera computerizada mediante programas informáticos.

Mediante este método analizamos con el programa informático Calcsyn todas las combinaciones de tratamientos empleadas en los ensayos de proliferación (IM + DPI , IM + APO, IM + iRAC, NILO+DPI).

Los índices de combinación (CI) resultaron ser, en ambas líneas celulares (K562 y Boff210) y para la mayoría de las concentraciones utilizadas, muy inferiores a 1 ($CI < 1$), indicativo de una fuerte relación sinérgica entre los inhibidores de NADPH oxidasas y los inhibidores de la tirosina-quinasa BCR-ABL (Figura IV-10 y IV-11), lo cual quiere decir que estos agentes son capaces de potenciar su efecto entre sí.

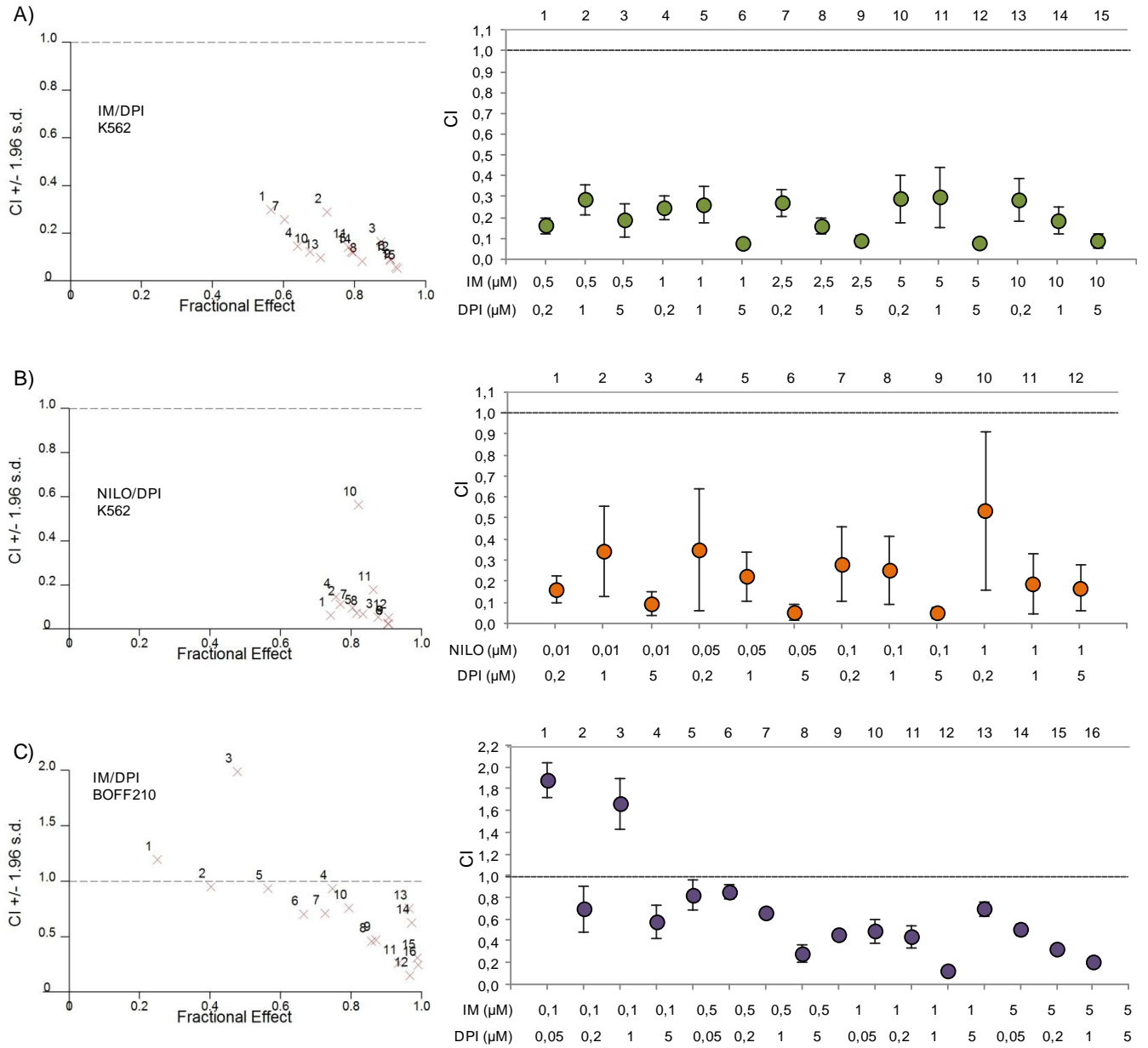


Figura IV-10. La interacción entre el inhibidor de NADPH oxidasas DPI y los inhibidores de BCR-ABL es fuertemente sinérgica en las líneas celulares K562 y Boff210. Los efectos sobre proliferación celular obtenidos por MTT fueron analizados con el programa informático Calcsyn. Se muestra un experimento representativo de la sinergia de cada combinación en los paneles de la izquierda y la media de los CIs (expresados como media ± ESM) de 8 experimentos (A) o 4 experimentos (B y C) en el panel de la derecha, indicando encima debajo de las gráficas las concentraciones de los inhibidores utilizadas, correspondientes a cada número del panel de la izquierda. A) Sinergia entre la combinación imatinib+DPI en las células K562. B) Sinergia entre la combinación nilotinib+DPI en las células K562. C) Sinergia entre la combinación imatinib+DPI en células Boff210.

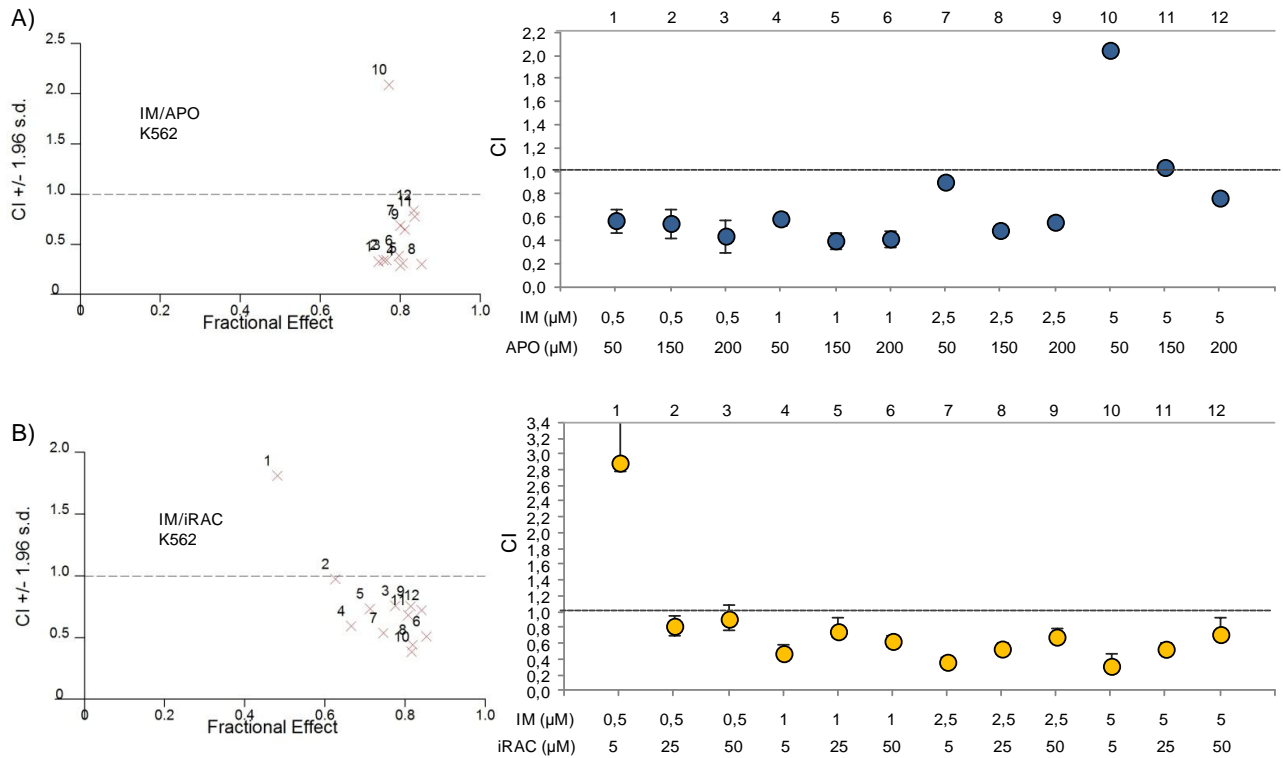


Figura IV-11. La interacción entre el inhibidor de NADPH oxidasas apocinina o el inhibidor de RAC1 y los inhibidores de BCR-ABL es fuertemente sinérgica en células K562. Los efectos sobre proliferación celular obtenidos por MTT fueron analizados con el programa informático Calcsyn. Se muestra un experimento representativo de la sinergia de cada combinación en los paneles de la izquierda y la media de los CIs (expresados como media \pm ESM) de 3 experimentos (A) o de 5 experimentos (B) en el panel de la derecha, indicando debajo de las gráficas las concentraciones de los inhibidores utilizadas, correspondientes a cada número del panel de la izquierda. A) Sinergia entre la combinación imatinib+apocinina en las células K562. B) Sinergia entre la combinación imatinib+inhibidor de RAC

Esta fuerte sinergia sugiere una posible estrategia terapéutica aplicable en un futuro a la leucemia mieloide crónica, que permitiría disminuir las concentraciones de los inhibidores de Tirosina-quinasa y sin embargo aumentar sus efectos, mediante la combinación de estos fármacos con inhibidores de la actividad NADPH oxidasa.

4. COMBINACIÓN DE INHIBIDORES DE LA QUINASA BCR-ABL CON INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD NADPH OXIDASA EN CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA DE PACIENTE.

Para comprobar la importancia de la sinergia encontrada decidimos seguir la misma estrategia que en las líneas celulares y probar el tratamiento combinado de inhibidores en las células primarias de médula ósea procedente de pacientes.

4.1. Efecto combinado de la inhibición de NADPH oxidasas y BCR-ABL sobre la proliferación de células mononucleadas de médula osea de paciente.

Mediante un gradiente de densidad con Ficoll, se separó la fracción de células mononucleadas de cada muestra de médula ósea completa extraída de pacientes. Los resultados que obtuvimos en los ensayos de proliferación con estas células fueron muy semejantes a los observados en las líneas celulares K562 y Boff210.

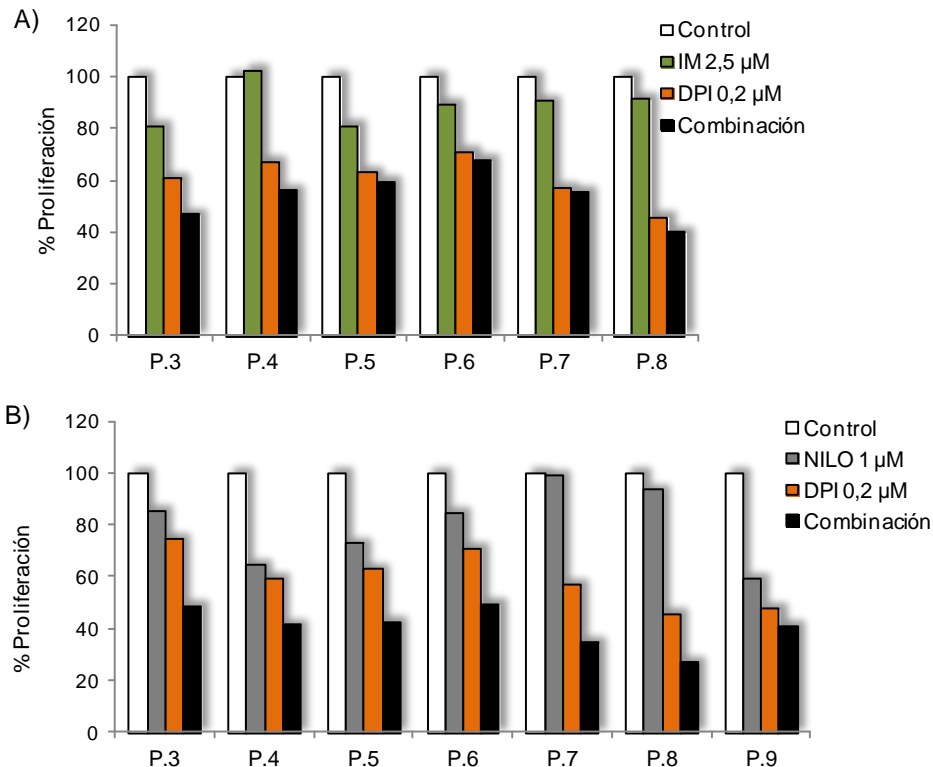


Figura IV-12. La combinación de la inhibición de NADPH oxidasas con la inhibición de BCR-ABL es más efectiva en las células mononucleadas de pacientes que los tratamientos individuales. Las células se cultivaron a una densidad de 10×10^5 células/mL en presencia de imatinib 0,5 µM (IM),

DPI 0,2 μM o la combinación IM+DPI (A) o bien en presencia de nilotinib 1 μM (NILO), DPI 0,2 μM o la combinación NILO+DPI (B). La tasa de proliferación se analizó por el ensayo del MTT a las 48 horas. Se muestra un experimento representativo de distintos pacientes.

Cuando combinábamos imatinib con DPI (Figura IV-12A) o nilotinib con DPI (Figura IV-12B) la proliferación celular era menor que cuando las células eran tratadas con los fármacos por separado, especialmente con nilotinib.

Cabe destacar el paciente 4, que, como señalábamos en el apartado 2, parecía resistente a Imatinib, y sin embargo, la combinación Imatinib + DPI consigue un mayor efecto que el DPI por sí solo, lo cual sugiere que, como hipotetizamos en este trabajo, la terapia combinada dirigida a inhibir simultáneamente NADPH oxidasas y BCR-ABL podría ser muy útil en pacientes de LMC que generan resistencias a los inhibidores de tirosina quinasa administrados como tratamiento.

Esto mismo ocurría cuando estudiamos la alteración en la capacidad para formar colonias de estas células de pacientes, una vez más el efecto superior de la combinación se hacía evidente en el conteo de CFUs (Figura IV-13).

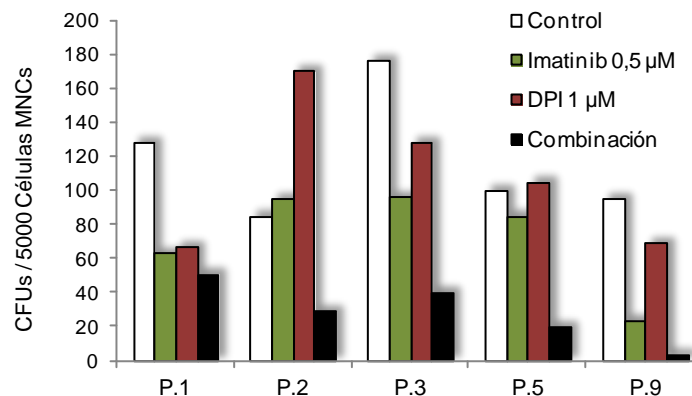


Figura IV-13. La capacidad de formación de colonias (CFUs) de las células mononucleadas de pacientes es fuertemente inhibida por la combinación de inhibidores de NADPH oxidasas con inhibidores de BCR-ABL. Las CMNs de médula ósea de pacientes con LMC se cultivaron a una densidad de 2×10^5 células/mL en presencia de imatinib 0,5 μM (IM), DPI 1 μM o la combinación IM +DPI. A las 48 horas se retiraron los fármacos y se sembraron 5000 células de cada condición en medio semisólido de metilcelulosa y se contó el número de CFUs 14 días después mediante microscopía. Se muestra un experimento representativo de distintos pacientes.

Tras finalizar los experimentos correspondientes con las células mononucleadas de muestras de médula osea completa de pacientes, decidimos analizar la respuesta a los tratamientos de los progenitores hematopoyéticos. Para ello, con la colaboración del personal investigador perteneciente al Servicio de Hematología del Hospital Clínico de Salamanca, se aislaron de la fracción de CMNs, previamente separadas por gradiente de Ficoll, las células CD34 positivas (CD34+) usando el separador de columnas magnéticas autoMACS (del inglés “automate Magnetic Activated Cell Sorting”).

Las células que expresan el marcador de superficie CD34, representan tan solo el 1-2% del número total de células presentes en médula osea, lo que supone que un individuo sano contenga solamente 2×10^5 células CD34+ en un mililitro de médula osea (Bender et al., 1994). Esto implica que la experimentación con estos progenitores sea bastante limitada.

Una vez aisladas, tratamos las células CD34+ durante 24 horas con imatinib 0,5 μ M, DPI 1 μ M o ambos inhibidores en conjunto para analizar su efecto sobre la clonogenicidad de estos progenitores hematopoyéticos. Pasadas las 24 horas, se contó el número de células correspondiente a cada tratamiento y se sembraron 5000 células de cada condición en medio semisólido de metilcelulosa completo sin eritropoyetina (“HSC-CFU complete w/o Epo”). El contaje de colonias (CFUs) se realizó 14 días después.

En el recuento realizado tras las 24 horas de incubación con los fármacos, aparecía ya un efecto significativo del DPI y aún mayor de su combinación con Imatinib sobre estas CD34+ de pacientes (Figura IV-14A), sin embargo, el número de células contadas tras el tratamiento con Imatinib no variaba respecto al control sin tratamiento.

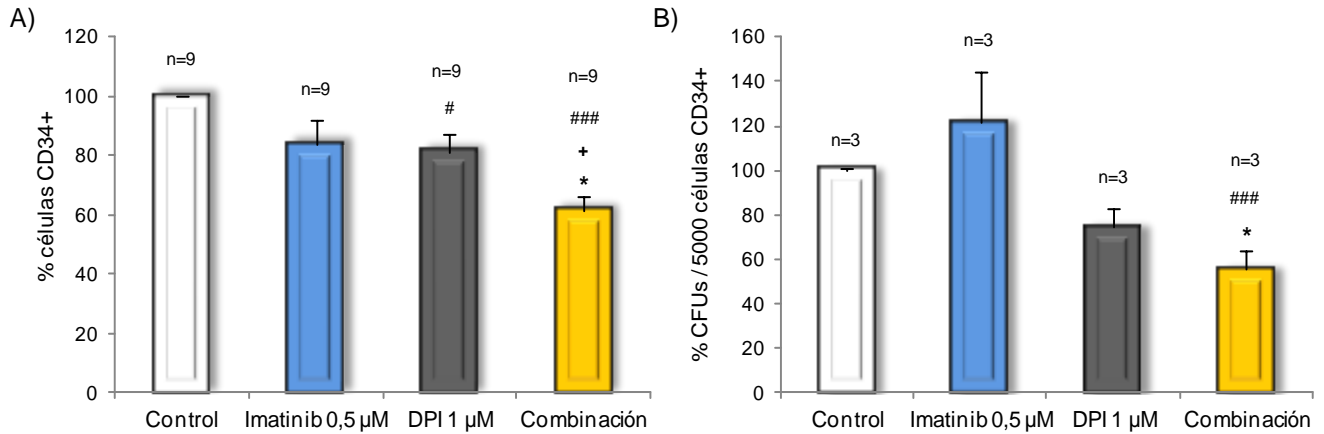


Figura IV-14. La proliferación y la capacidad de formación de colonias (CFUs) de las células CD34+ de pacientes es fuertemente inhibida por la combinación de inhibidores de NADPH oxidasas con inhibidores de BCR-ABL. Las células CD34+ de médula ósea de pacientes con LMC se cultivaron a una densidad de 2×10^5 células/mL en presencia de imatinib 0,5 μ M (IM), DPI 1 μ M o la combinación IM +DPI. A las 24 horas se contó el número de células presentes bajo cada tratamiento y fue relativizado respecto a las células control (A) y, tras retirar los fármacos, se sembraron 5000 células de cada condición en medio semisólido de metilcelulosa y se contó el número de CFUs 14 días después mediante microscopía. Los datos están representados como la media \pm ESM. ###p<0,001 y #p<0,05 reflejaban diferencias significativas respecto a células no tratadas. *p<0,05 refleja diferencias significativas respecto a células tratadas únicamente con Imatinib. *p<0,05 refleja diferencias significativas respecto a células tratadas únicamente con DPI.

En cuanto a la clonogenicidad, de los 9 experimentos realizados, en tan solo tres de los casos las células sembradas consiguieron formar colonias. Esto fue debido principalmente a contaminaciones del medio semisólido de metilcelulosa (ya que no lleva antibiótico). Con el conteo de colonias encontramos que el imatinib y el DPI, individualmente, no parecían alterar el crecimiento de estas células de manera estadísticamente significativa, aunque las células tratadas con DPI mostraban una clara tendencia a presentar un menor número de colonias. Sin embargo, las células tratadas con ambos agentes sí mostraban una pérdida significativa de la capacidad para formar colonias (Figura IV-14B). La insensibilidad de las células madre leucémicas (LSC, del inglés “Leukemic stem cells”) al tratamiento con inhibidores de BCR-ABL ha sido altamente divulgada. Un estudio muy interesante afirma que la resistencia de las LSCs al imatinib se debe a que estas células no dependen de la actividad de BCR-ABL para sobrevivir ya que, en ausencia de esta oncoquinasa, el aporte de citoquinas permitiría una supervivencia y crecimiento de estas células comparable al de las células madre normales (Corbin et al., 2011).

Por tanto, los resultados indicaban que las células progenitoras hematopoyéticas de pacientes con leucemia mieloide crónica también parecen depender de la actividad NADPH oxidasa para su crecimiento y que además son significativamente más sensibles al tratamiento con inhibidores de esta actividad enzimática que al tratamiento con el inhibidor de BCR-ABL imatinib.

4.2. Estudio de la relación entre los inhibidores de NADPH oxidasas y BCR-ABL en células mononucleadas de paciente.

Comprobada la efectividad del doble tratamiento en las células primarias (CMNs) provenientes de pacientes, analizamos la relación existente entre nuestros inhibidores. Los índices de combinación (CI) se correspondían con una relación sinérgica de las drogas (CI<1) en la mayoría de concentraciones utilizadas para la combinación imatinib + DPI y en su totalidad para nilotinib + DPI (Figura IV-15).

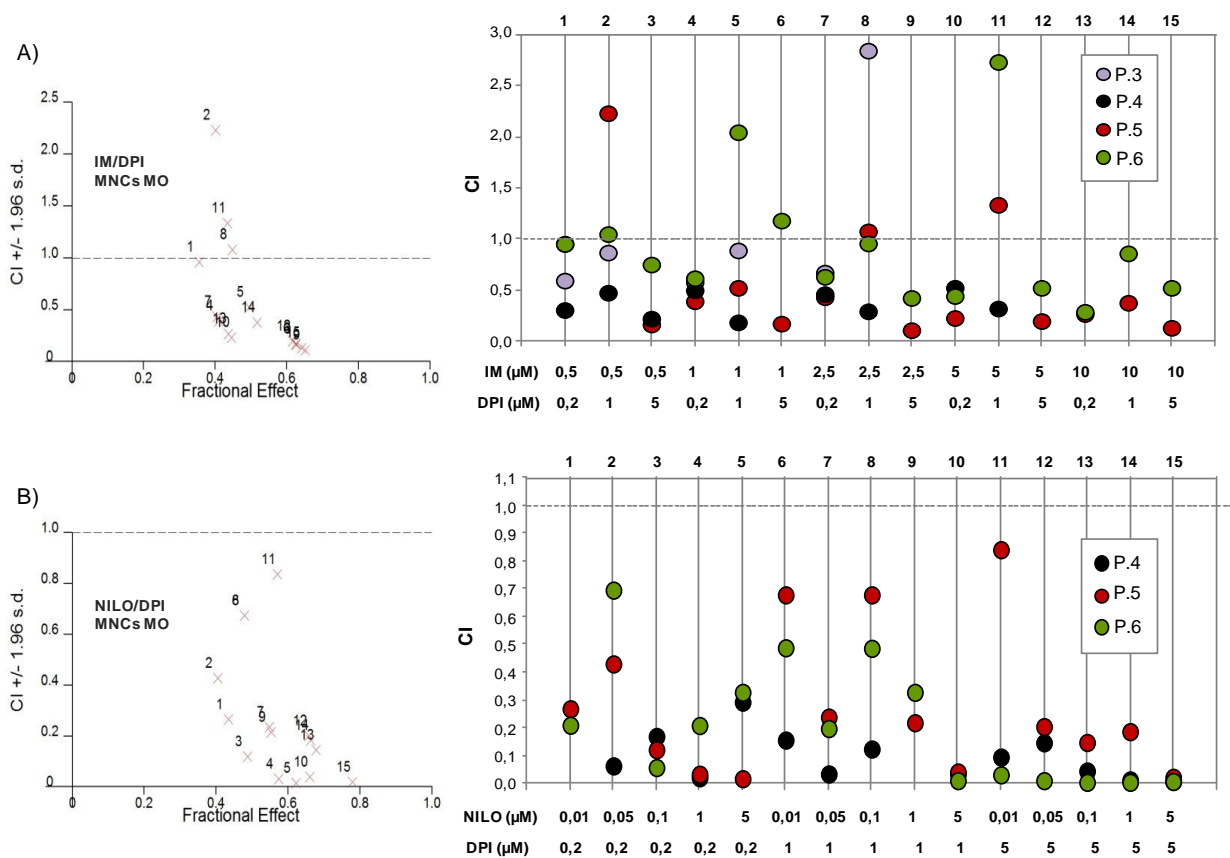


Figura IV-15. La interacción entre el inhibidor de NADPH oxidasas DPI y los inhibidores de BCR-ABL es fuertemente sinérgica en las células mononucleadas de pacientes. Los efectos sobre

proliferación celular obtenidos por MTT en las CMNs fueron analizados con el programa informático Calculusyn. Se muestra un experimento representativo de la sinergia de cada combinación en los paneles de la izquierda y los CIs de 4(A) o 3(B) pacientes diferentes en el panel de la derecha, indicando debajo de las gráficas las concentraciones de los inhibidores utilizadas, correspondientes a cada número del panel de la izquierda. A) Sinergia entre la combinación imatinib+DPI en las CMNs. B) Sinergia entre la combinación nilotinib+DPI en las CMNs.

En el Paciente 4, insensible al tratamiento con imatinib, todas las combinaciones probadas resultaron ser fuertemente sinérgicas. Este resultado nos pareció muy interesante y abre una nueva posible vía de continuidad de este trabajo en el futuro, que podría dirigirse al estudio del uso de inhibidores de NADPH oxidasas en casos de resistencia a inhibidores de BCR-ABL, pudiendo utilizarse como modelo líneas celulares de LMC modificadas genéticamente para que porten las mutaciones características de BCR-ABL que determinan la resistencia a imatinib.

En conjunto, la fuerte sinergia que presenta el tratamiento doble en pacientes concuerda perfectamente con los resultados descritos para las células K562 y Boff210, lo que demuestra que la inhibición de las NADPH oxidasas potencia el efecto de los inhibidores de BCR-ABL, y por tanto la idoneidad de esta familia de proteínas como posibles dianas en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica.

5. COMBINACIÓN DE INHIBIDORES DE LA QUINASA BCR-ABL CON INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD NADPH OXIDASA EN CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA DE INDIVIDUOS SANOS

Tras estudiar el efecto sobre la proliferación celular de la inhibición de las NADPH oxidasas en pacientes con LMC, nos pareció interesante y necesario conocer como afectaban estos mismos tratamientos a la proliferación de células mononucleadas procedentes de donantes sanos de médula osea. El procedimiento de separación de las células CMNs de la muestra total de estos individuos fue el mismo utilizado para las de pacientes, disponiendo, naturalmente, de una cantidad final de células extraordinariamente menor que en las muestras de leucemia, lo que limitó en gran medida los experimentos.

Como era esperable, la proliferación de las células mononucleadas sanas no se veía prácticamente afectada por el tratamiento con imatinib, ya que estas células no expresan

BCR-ABL, aunque sí se veía significativamente reducida por el DPI (Figura IV-16A). Teniendo en cuenta el papel tan importante de las ROS producidas por las NADPH oxidasas como reguladores de la señalización en gran cantidad de procesos fisiológicos, no es de extrañar que un descenso brusco de los niveles intracelulares de ROS derivado del tratamiento con DPI afecte a las células sanas. Sin embargo, la combinación de inhibidores imatinib + DPI, no ejercía un efecto mayor que aquel observado por el DPI, presentando unos índices de combinación superiores a 1 (CI>1), lo que indicaba una ausencia de sinergia entre el inhibidor de BCR-ABL y el de NADPH oxidasas (Figura IV16-B), a diferencia de lo manifestado en las líneas celulares de LMC y en las células mononucleadas de pacientes, por lo que la combinación de estos agentes nos parece una estrategia terapéutica interesante, puesto que se podrían usar bajas concentraciones de DPI para limitar los efectos secundarios en las células sanas mientras que las células que expresen BCR-ABL se verán afectadas, consiguiéndose cierta selectividad del tratamiento por las células tumorales.

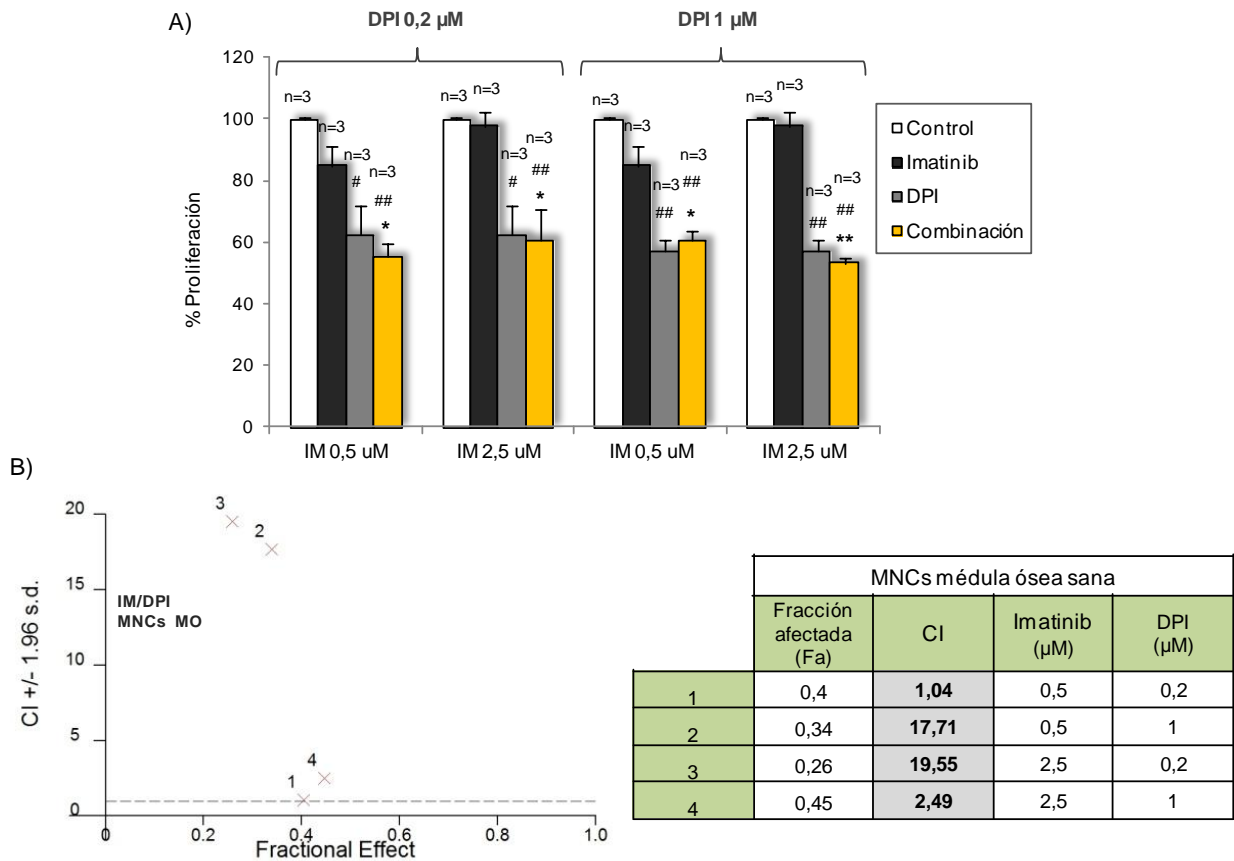


Figura IV-16. La combinación de inhibidores de NADPH oxidasas con inhibidores de BCR-ABL en células mononucleadas sanas no presenta efectos sinérgicos. Las CMNs de médula osea de

donantes sanos se cultivaron a una densidad de 10×10^5 células/mL en presencia de varias concentraciones de imatinib (IM), de DPI o de la combinación IM +DPI. La tasa de proliferación se analizó por el ensayo del MTT a las 48 horas (A) y está representada como la media \pm ESM. $^{##}p < 0,01$ y $^{\#}p < 0,05$ reflejan diferencias significativas respecto a las células control no tratadas. $^{**}p < 0,01$ y $^{*}p < 0,05$ reflejan diferencias significativas respecto a células tratadas únicamente con imatinib. La interacción entre los agentes fue analizada con el Calcsyn. Se muestran los CIs de un experimento representativo.

Analizamos también la capacidad de formación de colonias de células primarias CD34+ sanas, aisladas de la fracción de mononucleadas de la médula ósea de donantes, de la misma manera que analizamos las CD34+ de pacientes (véase figura IV-14). Curiosamente, el conteo de células realizado tras 24 horas de tratamiento con Imatinib 0,5 μ M, DPI 1 μ M o con ambos agentes, no manifestaba diferencias con las células control no tratadas (Figura IV-17A), y, sin embargo, transcurridos 14 días desde la siembra de las células en medio semisólido de metilcelulosa, la clonogenicidad de las células sanas sí se veía alterada por la inhibición de las NADPH oxidadasas (Figura IV-17B), formando un número de colonias significativamente menor que el control no tratado. El efecto del doble tratamiento sobre las células coincidía con aquel obtenido por el tratamiento individual con DPI, resultado semejante al descrito para las CMNs sanas en el punto anterior, lo que está en consonancia con la falta de sinergia encontrada en estas células (Figura IV-16).

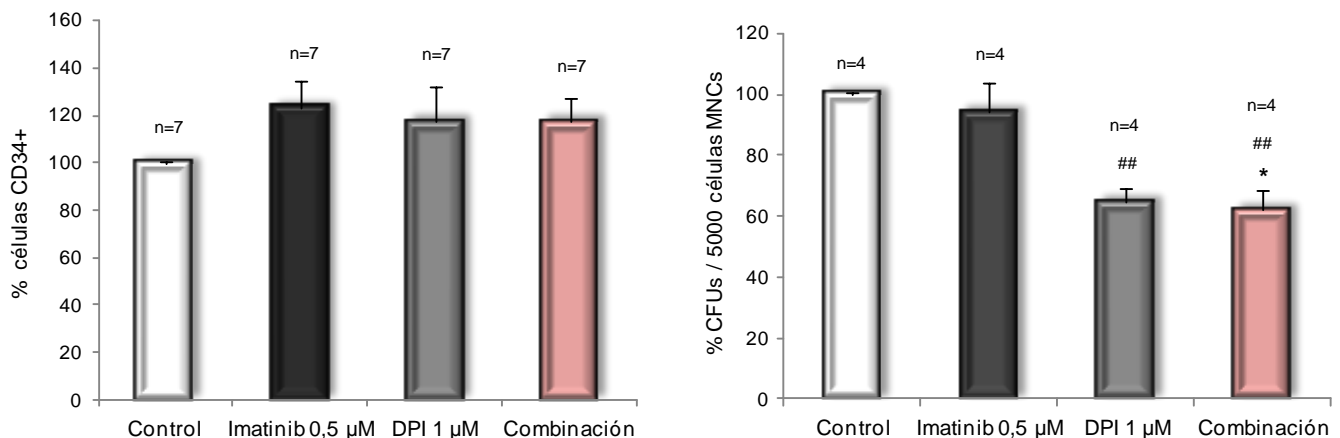


Figura IV-17. La capacidad de formación de colonias (CFUs) de las células CD34+ es alterada por la inhibición de la actividad NADPH oxidada. Las células CD34+ de médula ósea de individuos sanos se cultivaron a una densidad de 2×10^5 células/ml en presencia de imatinib 0,5 μ M (IM), DPI 1 μ M o la combinación IM +DPI. A las 24 horas se contó el número de células presentes bajo cada tratamiento y fue relativizado respecto a las células control (A) y, tras retirar los fármacos, se

sembraron 5000 células de cada condición en medio semisólido de metilcelulosa y se contó el número de CFUs 14 días después mediante microscopía. Los datos están representados como la media \pm ESM. ^{##} $p < 0,01$ reflejaba diferencias significativas respecto a células no tratadas. ^{*} $p < 0,05$ reflejaba diferencias significativas respecto a células tratadas únicamente con imatinib.

Por tanto, las células CMNs y CD34+ sanas parecen ser sensibles a la inhibición de la actividad NADPH oxidasa. Bajo nuestro punto de vista, este resultado no disminuye la idoneidad de esta familia de enzimas como diana terapéutica para la leucemia mieloide crónica, puesto que en las células de donantes sanos la combinación de inhibidores no es más efectiva que el DPI, y sin embargo sí lo es en las células de pacientes.

6. ANÁLISIS “in vivo” DE LA EFECTIVIDAD DE LA INHIBICIÓN DE LAS NADPH OXIDASAS COMO TRATAMIENTO EN LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA.

Los resultados tan uniformes y positivos del estudio *in vitro* de las NADPH oxidasas como posibles dianas terapéuticas animaban a probar la eficacia de la inhibición de estas enzimas *in vivo*, mediante el uso de modelos animales adecuados para el estudio de la leucemia mieloide crónica.

6.1. Evaluación del uso de inhibidores de NADPH oxidasas como tratamiento en LMC en un Modelo de ratones Xenoinjerto.

Gran cantidad de modelos murinos han sido desarrollados para estudiar el cáncer humano. Se usan tanto para investigar los factores implicados en la transformación de las células malignas, invasión y metástasis como para examinar respuestas terapéuticas. Uno de los modelos más utilizados es el xenoinjerto (del inglés “Xenoinjerto”), donde células tumorales humanas son transplantadas, normalmente bajo la piel o dentro del órgano en que el tumor se suele originar, en ratones inmunocomprometidos que no sean capaces de rechazar las células humanas injertadas (Morton and Houghton, 2007).

Nuestro ensayo *in vivo* se llevó a cabo a través de la unidad de oncofarmacología del CIC (Centro de Investigación del Cáncer) en ratones inmunodeprimidos CB17-SCID. La estrategia terapéutica seguida para los animales fue la misma que para las células en los ensayos *in vitro*: inhibición de las NADPH oxidasas, inhibición de la quinasa BCR-ABL y combinación de ambas inhibiciones.

Así, tras conseguir que las células K562 inoculadas en los ratones generaran un tumor palpable, los animales comenzaron a recibir tratamiento diario con DPI (1mg/Kg), imatinib

(100mg/Kg) o con la combinación de los dos agentes. Para analizar el efecto de los distintos fármacos, el volumen del tumor fue medido dos veces por semana.

El imatinib ralentizó significativamente el crecimiento del tumor, como cabría esperar, ya que el efecto de este inhibidor de BCR-ABL sobre tumores de K562 en xenoinjertos ya había sido descrito en otros trabajos (Wu JY et al., 2009). El tratamiento con DPI conseguía también disminuir de forma significativa el volumen respecto a los ratones no tratados, y sorprendentemente, el efecto obtenido era muy similar al descrito para el imatinib, sugiriendo que el tratamiento *in vivo* con inhibidores de NADPH oxidasas sería una buena estrategia para la leucemia mieloide crónica (Figura IV-18A). Además, el doble tratamiento mostraba una clara tendencia de mayor efectividad que los agentes individuales, mostrando tumores más reducidos, concordando con la sinergia observada *in vitro*.

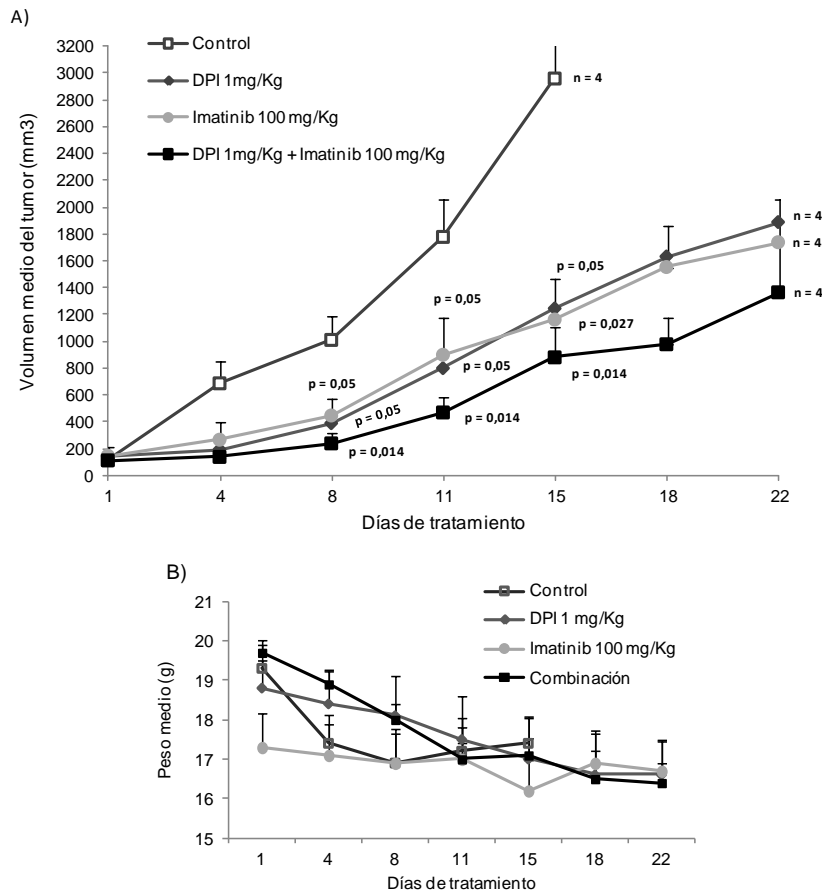


Figura IV-18. La inhibición de las NADPH oxidasas reduce significativamente el crecimiento de un tumor sólido en ratones xenoinjertados con células K562, tanto individualmente como en combinación con inhibidores de la quinasa BCR-ABL. Los ratones CB17-SCID fueron tratados diariamente con Imatinib 100 mg/Kg, DPI 1mg/Kg o la combinación de ambos fármacos durante 22

días. A) Volumen medio del tumor durante la administración de los distintos tratamientos. Medidas tomadas 2 veces/semana. B) Peso medio de los ratones durante la administración de los tratamientos. Los resultados están representados como la media \pm ESM de 4 ratones/grupo. $p < 0,05$ reflejaba diferencias significativas respecto al grupo control tratado con el vehículo (PBS).

El peso de los ratones fue monitorizado durante el tratamiento para controlar que no se produjera una bajada de peso excesiva que indicara toxicidad de los fármacos (Figura IV-18B).

El tratamiento con DPI en un modelo xenoinjerto de LMC nunca había sido probado. Sí existen, sin embargo, estudios con antioxidantes como la NAC (Rakshit et al., 2010), que indican una disminución del volumen del tumor de células K562 ante el tratamiento con este agente. El efecto observado en nuestro ensayo por el DPI parece ser mucho mayor que el descrito para la NAC por estos autores, lo que sugiere, como hipotizamos al inicio de este trabajo, que la inhibición específica de la producción de ROS a través de NADPH oxidasas sería más eficaz en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica que el uso de antioxidantes que disminuyan de manera global los niveles intracelulares de ROS.

6.2. Evaluación del uso de inhibidores de NADPH oxidasas como tratamiento en leucemia mieloide crónica en ratones transgénicos *BCR-ABL* positivos.

Dada la efectividad del uso de inhibidores de la actividad NOX en el modelo de ratones xenoinjertados con células K562, nos planteamos buscar un modelo de estudio de la enfermedad que se ajustara en mayor medida al curso real de esta leucemia en humanos, es decir, un modelo más fisiológico. Gracias a la Dra. Carmen Guerrero (CIC, Salamanca), dispusimos de una línea de ratones transgénicos que expresan específicamente el gen *BCR-ABL* que codifica la proteína BCR-ABL p210 en progenitores hematopoyéticos tempranos. Estos animales, con la edad, presentan una excesiva proliferación de células mieloides que resulta en granulocitosis, por lo que desarrollan leucemia mieloide crónica de manera muy similar a los pacientes (Honda and Hirai, 2001).

Nuestro ensayo resulta novedoso, ya que en este modelo de ratón generado por el Dr. Honda, no existía, sorprendentemente, ningún estudio en el que se hubieran examinado los efectos de la inhibición de BCR-ABL sobre la progresión de la leucemia que desarrollan estos animales, ni tampoco el de la inhibición de las NADPH oxidasas.

Consideramos el punto de inicio de tratamiento cuando los análisis de sangre periférica de los distintos ratones, mediante citometría de flujo, indicaban un porcentaje de granulocitos igual o superior al 50 % respecto al número total de leucocitos presentes en la muestra tomada (Figura IV-19).

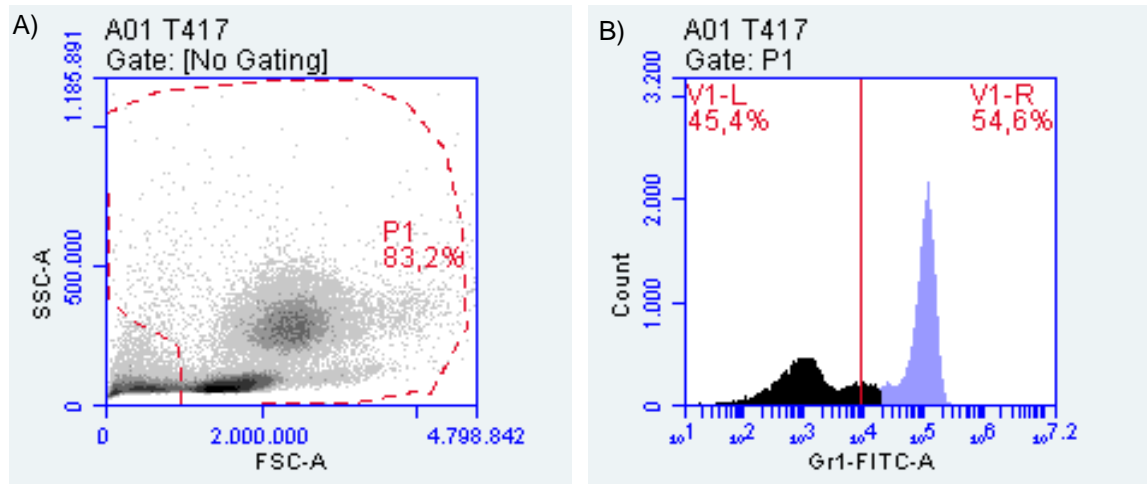


Figura IV-19. Análisis mediante citometría de flujo del porcentaje de granulocitos presentes en sangre periférica de ratones. En primer lugar se hizo una región para seleccionar únicamente los leucocitos de la muestra (A). Después se analizó el porcentaje de células Gr1 +, marcador característico de granulocitos (B).

Así, los ratones se fueron distribuyendo aleatoriamente en los distintos grupos de trabajo para recibir los tratamientos diarios correspondientes, que fueron los mismos que se administraron en el modelo de xenoinjerto de LMC: imatinib (100 mg/Kg), DPI (1mg/Kg) o la combinación de ambos fármacos.

Al final de la primera y segunda semana de tratamiento se procedió a la extracción de sangre para poder examinar la efectividad de la terapia individual y combinada en el curso de la enfermedad.

La eficacia del DPI y de la combinación ya quedaba patente con tan solo una semana de tratamiento. (Figura IV-20A). Tras finalizar las dos semanas de administración de los fármacos, los análisis por citometría indicaban que tanto el Imatinib como el DPI eran capaces de reducir significativamente el porcentaje de granulocitos en sangre, y que los ratones con el doble tratamiento presentaban niveles de estas células significativamente inferiores que aquellos a los que se administraron los fármacos individuales. En los animales control no

tratados, el número de granulocitos continuó ascendiendo lentamente, siguiendo el curso habitual de la enfermedad. (Figura IV-20A).

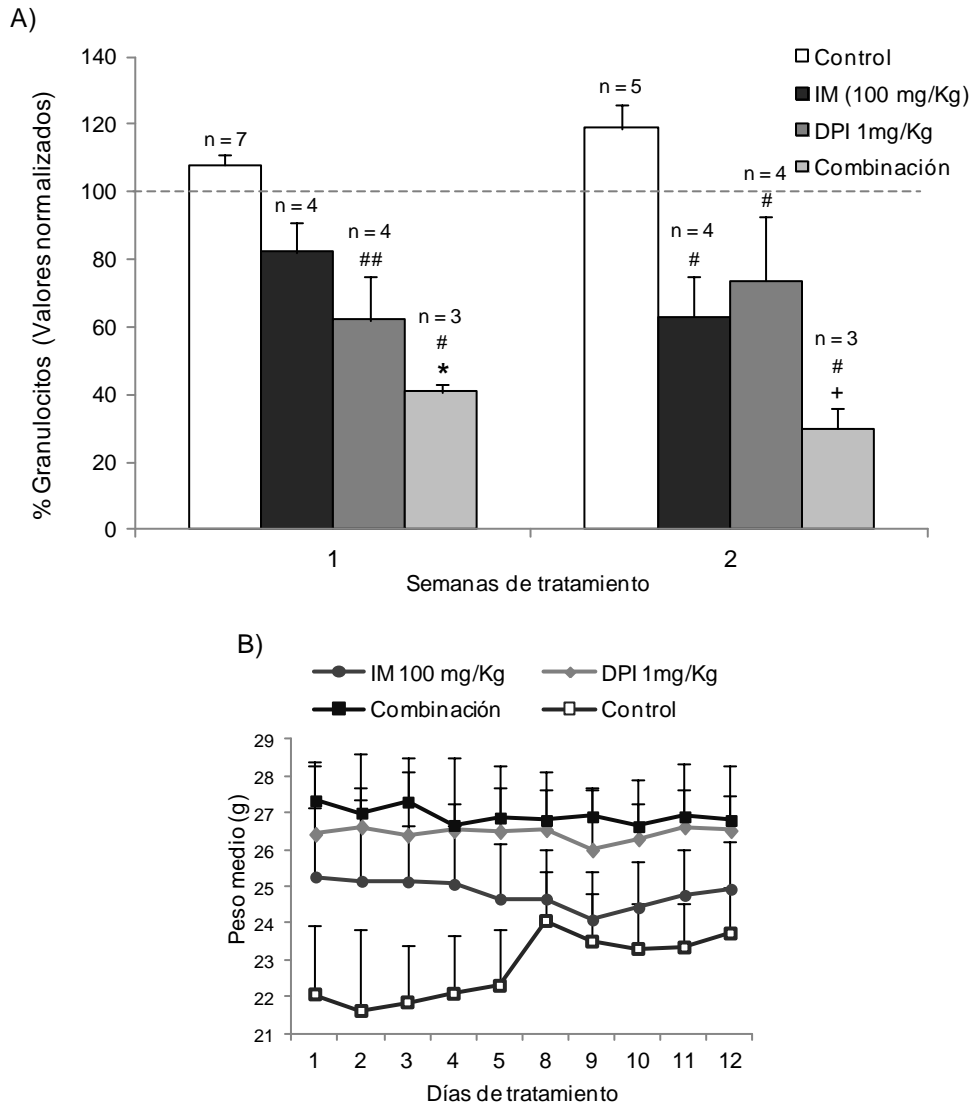


Figura IV-20. La inhibición de la actividad NADPH oxidasa, individual o en combinación con inhibidores de BCR-ABL, reduce significativamente el porcentaje de granulocitos presentes en sangre periférica de ratones transgénico p210^{BCR/ABL}. Los ratones fueron tratados diariamente con imatinib 100 mg/Kg, DPI 1mg/Kg o la combinación de ambos fármacos durante dos semanas. A) Porcentaje de granulocitos tras la primera y segunda semana de tratamiento. Los valores están normalizados con respecto al porcentaje a día 0 de tratamiento, que fue considerada 100. Véase el incremento de granulocitos en el grupo control. B) Peso medio de los ratones a lo largo del tratamiento, tomado diariamente. Los resultados se muestran como la media ± ESM de los ratones pertenecientes a cada grupo. ^{##}p<0,01 y [#]p<0,05 reflejan diferencias significativas respecto al grupo control sin tratamiento. ^{*}p<0,05 refleja diferencias significativas respecto al grupo tratado únicamente con imatinib. ⁺p<0,05 refleja diferencias significativas respecto al grupo tratado únicamente con DPI.

El peso de los ratones se mantuvo constante a lo largo de todo el tratamiento, señal de que las drogas no produjeron toxicidad en nuestros animales (Figura IV-20B).

Los resultados extraídos de los dos modelos animales de LMC coincidían. En ambos sistemas de estudio la inhibición de la actividad NADPH oxidasa (con DPI) provocaba un efecto antiproliferativo significativo, disminuyendo así el crecimiento bien del tumor de células K562 en el caso del modelo xenoinjerto, o bien de las células tumorales granulocíticas en el modelo de raton transgénico. Además, la administración de este inhibidor junto con el inhibidor de la onquinasa Imatinib parecía reducir en mayor medida la proliferación de las células cancerosas en los ratones que los agentes por separado.

En los dos ensayos se observó que la eficacia mostrada por el DPI resultó ser de igual magnitud que la alcanzada por el tratamiento con el imatinib. Este dato es muy relevante, ya que este fármaco es el tratamiento de elección en la actualidad para los enfermos con LMC.

Por tanto, la uniformidad de los resultados, tanto *in vitro* como *in vivo*, señala a las NADPH oxidasas como una oportuna diana terapéutica a considerar en el futuro tratamiento de los pacientes con Leucemia mieloide crónica.

7. ANÁLISIS DE LOS NIVELES INTRACELULARES DE ROS

Una vez confirmada la eficacia antiproliferativa de la inhibición de las NADPH oxidasas, tanto de manera individual, como en conjunción con inhibidores de BCR-ABL, quisimos averiguar cuál es el mecanismo por el que estos tratamientos son capaces de provocar ese efecto sobre el crecimiento de las células.

Sabiendo que la familia NADPH oxidasa tiene como única función conocida la producción de ROS, y que las células que expresan constitutivamente el gen *BCR-ABL* producen niveles de ROS más elevados que las células no transformadas (Naughton et al., 2009; Sattler et al., 2000), sería lógico, dada la sinergia observada entre los inhibidores de estas proteínas, que el mecanismo de actuación de los tratamientos esté relacionado con este punto común entre ambas.

Recordemos que, como hemos descrito en la introducción de este trabajo, la implicación de las especies reactivas del oxígeno en la señalización y expresión génica de gran cantidad de procesos fisiológicos en las células hace que la producción y eliminación de estas se

encuentre altamente regulada. Esto supone que cualquier cambio en el estado redox intente ser rápidamente equilibrado por la célula, lo que dificulta en gran medida la detección de diferencias en los niveles globales de ROS citoplasmáticos.

Con todo esto en mente, nos dispusimos a analizar si existía una correspondencia entre los efectos observados en proliferación para los distintos inhibidores y los niveles intracelulares de ROS, para lo cual medimos dichos niveles en la línea celular K562 y en las CMNs de los pacientes.

El tratamiento individualizado con inhibidores de NADPH oxidasas (DPI) o de BCR-ABL (imatinib), como cabría esperar, reducía de manera significativa los niveles intracelulares de ROS en K562, sin embargo, el mayor cambio se detectaba en las células tratadas con ambos inhibidores (Figura IV-21A).

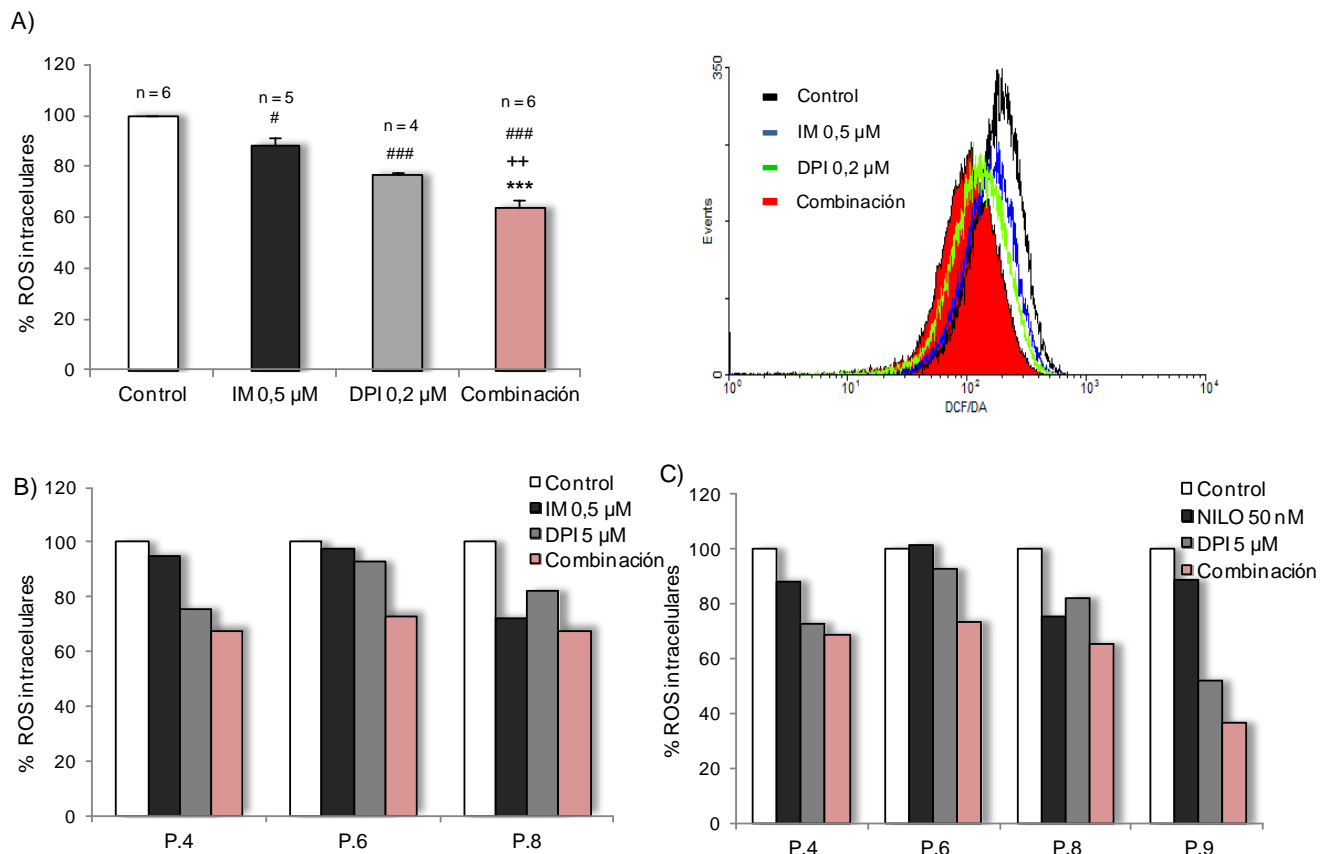


Figura IV-21. La inhibición conjunta de NADPH oxidasas y BCR-ABL provoca una reducción superior de los niveles intracelulares de ROS, tanto en células K562 como en células CMNs de pacientes. (A) Niveles intracelulares de ROS en K562 tras 2 horas de incubación con los tratamientos

imatinib 0,5 μ M (IM), DPI 0,2 μ M o la combinación IM+DPI. A la derecha se muestra un experimento representativo de los histogramas de los distintos tratamientos. Los resultados se muestran como la media \pm ESM. ^{###} $p < 0,001$ y [#] $p < 0,05$ reflejan diferencias significativas respecto a las células no tratadas. ^{***} $p < 0,001$ refleja diferencias significativas respecto a células tratadas únicamente con imatinib. ⁺⁺ $p < 0,01$ reflejaba diferencias significativas respecto a células tratadas únicamente con DPI. Niveles intracelulares de ROS en células mononucleadas de médula osea de pacientes tras 2 horas de incubación con los tratamientos imatinib 0,5 μ M (IM), DPI 5 μ M o la combinación IM+DPI (B) o con los tratamientos nilotinib 50 mM (NILO), DPI 5 μ M o la combinación NILO+DPI.

Los mismos resultados se podían observar en las células CMNs de los pacientes (Figura IV-21B y IV-21C), donde la combinación imatinib + DPI y nilotinib + DPI conseguía también una disminución de los niveles de ROS superior a la que mostraban los tratamientos individuales.

Parece ser por tanto que una disminución en las células de los niveles intracelulares de ROS, inducida por el tratamiento con inhibidores de NADPH oxidasas, se relaciona con una menor tasa de proliferación de estas células leucémicas (Figura IV-5 a figura IV-17), lo que indica que probablemente, el mecanismo de acción de estas drogas sea vía ROS.

Para confirmar esta hipótesis, medimos la proliferación de las células K562 tras la incubación durante 48 horas con dos compuestos antioxidantes diferentes y comúnmente utilizados, que son la NAC (N-acetil-cisteína) y la quercetina. (Abarikwu et al., 2012; Yin and Kufe, 2011; Zhang et al., 2008), observando una disminución significativa del crecimiento de las células en ambos casos, siendo más marcado el efecto de la quercetina (Figura IV-22A y 22B).

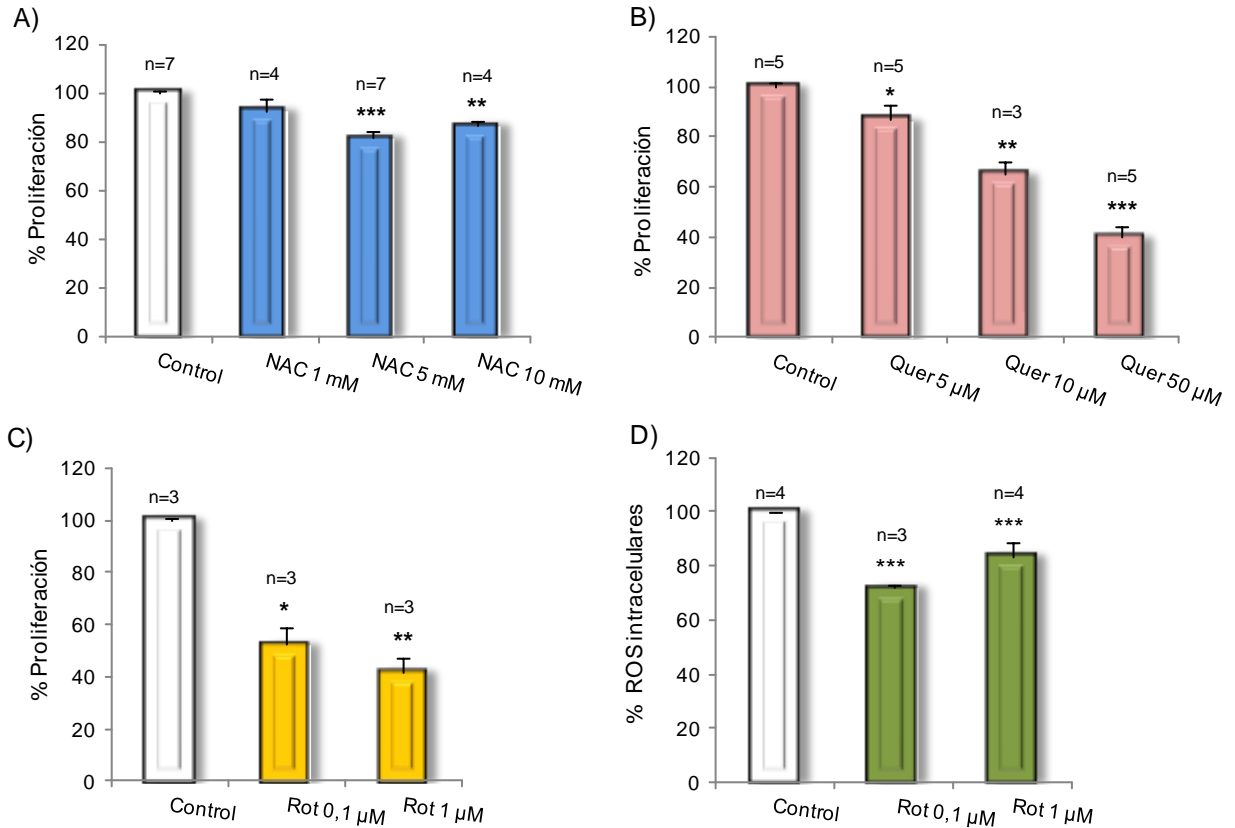


Figura IV-22. El tratamiento con antioxidantes y rotenona dificulta la proliferación de las células K562. Las células se cultivaron a una densidad de 2×10^5 células/mL con diferentes concentraciones de (A) N-Acetil cisteína (NAC) (B) quercetina (Quer) o C) rotenona (Rot). La proliferación fue analizada 48 horas después por el método del MTT. D) Niveles intracelulares de ROS en K562 tras 2 horas de incubación con distintas concentraciones de rotenona. Los resultados se muestran como la media \pm ESM. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ y * $p < 0,05$ reflejan diferencias significativas respecto a las células no tratadas.

Para completar el estudio, y dado que la mitocondria es la mayor fuente de ROS en las células, decidimos utilizar un tercer agente, la rotenona, que es un inhibidor del complejo mitocondrial I de la cadena respiratoria. El tratamiento de las células con este compuesto, como era de suponer, disminuía significativamente los niveles intracelulares de ROS, pero además dificultaba significativamente la proliferación celular (Figura IV-22C).

La unión de los resultados de este conjunto de experimentos indica que el crecimiento de las células LMC se correlaciona con los niveles de ROS intracelulares y sustenta nuestra idea inicial de que disminuir el contenido de ROS, a través de la inhibición de la actividad NADPH

oxidasa, sería una buena estrategia terapéutica para disminuir la proliferación de las células en la leucemia mieloide crónica.

8. IMPLICACIÓN DE LA ACTIVIDAD NADPH OXIDASA EN LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN DE BCR-ABL EN CÉLULAS K562.

Como hemos descrito anteriormente, la proteína quimérica p210/BCR-ABL es la consecuencia molecular de la aparición del cromosoma Philadelphia que caracteriza la leucemia mieloide crónica. La actividad tirosina-quinasa de la proteína oncogénica reside en ABL. Su yuxtaposición con BCR favorece la dimerización o tetramerización de la proteína de fusión, y con esto, su autofosforilación, lo que confiere a la quinasa una activación permanente. Esta autofosforilación incrementa el número de residuos de fosfotirosina en BCR-ABL, y por tanto, los sitios de unión para los dominios SH2 de otras proteínas. Además, la proteína ABL, que en células no tumorales puede trasladarse entre núcleo y citoplasma, pierde esta propiedad cuando se encuentra fusionada con BCR, quedando retenida en el citoplasma, permitiendo así la interacción con la mayoría de proteínas implicadas en las rutas oncogénicas. (Pendergast et al., 1991; Pendergast et al 1993).

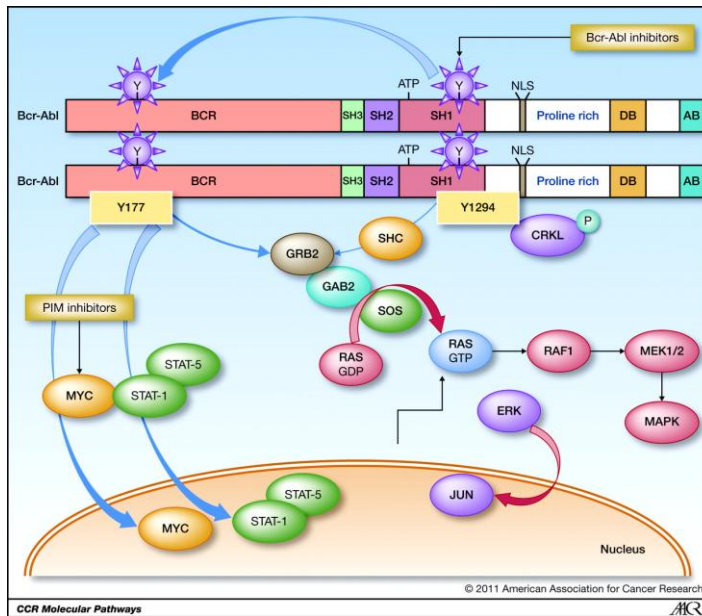
Así, la actividad quinasa constitutivamente activa es la responsable de la ventaja proliferativa de las células que mantiene el fenotipo leucémico.

Una vez establecida una relación entre los niveles de ROS y el tasa de proliferación de las células leucémicas y dada la participación de las ROS en la regulación de la señalización celular (Sardina et al., 2012) para continuar con el examen del mecanismo de acción de los tratamientos, decidimos analizar si la inhibición de las NADPH oxidasas alteraba la activación de las rutas de señalización iniciadas por BCR-ABL en células K562. Para ello utilizamos dos estrategias: la primera fue la utilización de inhibidores químicos de NADPH oxidasas, como es el DPI; y la segunda, el silenciamiento de la actividad NOX mediante la interferencia del ARNm de la proteína reguladora p22^{phox} (Sardina et al., 2010).

8.1. Efecto de la inhibición química de las NADPH oxidasas sobre la señalización de BCR-ABL.

Estudiamos los niveles de las formas fosforiladas, y por lo tanto activas de BCR-ABL, iniciadora de todas las rutas, de dos de sus dianas directas: STAT5 y CRKL y de un sustrato

indirecto, ERK1/2 (Esquema IV-3) tras someter las células a los diferentes tratamientos durante 16 horas.



Esquema IV-3. Rutas de señalización iniciadas por la actividad constitutiva de la oncoquinasa BCR-ABL. Tomado de Cilloni and Saglio, 2012.

Como era de suponer, el imatinib provocaba una fuerte inhibición de la fosforilación de BCR-ABL. El tratamiento únicamente con DPI, curiosamente, también reducía notablemente los niveles de fosfo-BCR-ABL, pero la mayor disminución de la activación de esta quinasa tenía lugar con la combinación de ambos tratamientos (Figura IV-23).

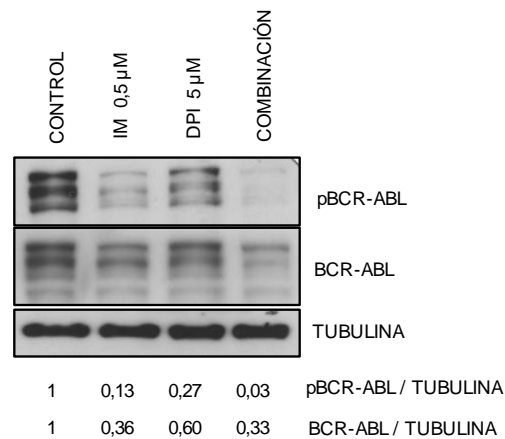


Figura IV-23. Análisis de los niveles de fosfo-BCR-ABL y BCR-ABL mediante transferencia de Western en las células K562. Se analizaron los niveles de pBCR-ABL y BCR-ABL en células K562

cultivadas a una densidad de $3,5 \times 10^5$ células/ml con imatinib $0,5 \mu\text{M}$, DPI $5 \mu\text{M}$ o la combinación de ambos durante 16h, Se cargaron $40 \mu\text{g}$ de proteínas por carril. Como control de carga se analizaron los niveles de β -tubulina. Los números debajo de las cajas indican la cuantificación de las bandas.

El estado de activación de CRKL y STAT5, proteínas directamente fosforiladas por la quinasa oncogénica, también se veía altamente disminuido cuando se inhibía BCR-ABL con imatinib o cuando se inhibían las NADPH oxidasas con DPI (Figura IV-24A), y al igual que observabámos para fosfo-BCR-ABL, la fosforilación de ambas proteínas era significativamente menor cuando se combinaban los dos inhibidores.

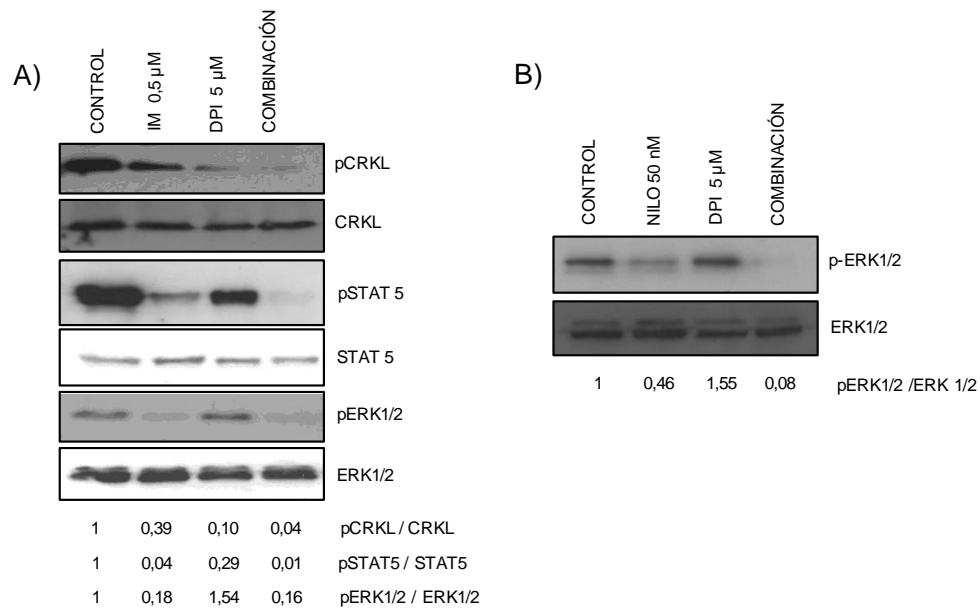


Figura IV-24. Análisis de los niveles de fosforilación de CRKL, STAT5 y ERK mediante transferencia de Western en las células K562. Se analizaron los niveles de las formas fosforiladas de CRKL, STAT5 y ERK1/2 (pCRKL, pSTAT5 y pERK1/2) en células K562 cultivadas a una densidad de $3,5 \times 10^5$ células/mL con imatinib $0,5 \mu\text{M}$, DPI $5 \mu\text{M}$ o la combinación IM+DPI durante 16h (A). También se analizaron los niveles de fosfo-ERK en células K562 tras la incubación con nilotinib 50 nM , DPI $5 \mu\text{M}$ o la combinación NILO+DPI durante 16 horas (B). Se cargaron $40 \mu\text{g}$ de proteínas por carril. Las mismas membranas se emplearon para analizar los niveles totales de dichas proteínas. Los números debajo de las cajas indican la cuantificación de las bandas.

En el caso de ERK1/2 , la combinación imatinib + DPI no parecía producir un descenso de la fosforilación mayor que el tratamiento individual con imatinib (Figura IV-24A), pero la

incubación de las células con nilotinib + DPI sí provocaba una menor activación de ERK1/2 en comparación con los agentes por separado (Figura IV-24B).

La implicación de STAT5 en la transformación leucémica de las células por BCR-ABL se encuentra altamente descrita (Nieborowska-Skorska et al., 1999; Sattler and Salgia, 1997). Hay un artículo que describe como en líneas celulares de leucemia mieloide aguda (LMA) positivas para FLT3-ITD, mutación que da lugar a una actividad tirosina-quinasa constitutiva de FLT3, al igual que ocurre con BCR-ABL en LMC, la producción de ROS es necesaria para la señalización de STAT5, y está mediada por la proteína p22^{phox}, reguladora de la activación de cuatro de los siete complejos (de NOX1 a NOX4) (Woolley et al., 2012). Sin embargo, a parte de nuestro trabajo (Sánchez-Sánchez et al., 2014), no existe ninguna publicación en la actualidad que describa una relación entre NADPH oxidasas y STAT5 en LMC.

Todos estos resultados indican que la producción de ROS dirigida por las NADPH oxidasas es necesaria para mantener la activación de las rutas de señalización de BCR-ABL y explican, al menos en parte, la fuerte inhibición de la proliferación y de la capacidad de formar colonias que provocan estos fármacos en las células LMC.

Tras analizar en profundidad todas las imágenes de western obtenidas, nos dimos cuenta de que, curiosamente, los niveles totales de BCR-ABL también se veían reducidos por los distintos tratamientos (figura IV-23), presentando un patrón muy similar al observado para la proteína fosforilada y, sin embargo, los niveles de tubulina, proteína utilizada como control de carga, no mostraban variación ante los distintos inhibidores. Tampoco se detectó esa disminución en el contenido total de las proteínas CRKL, STAT5 y ERK (figura IV-24A), lo que sugería que era un efecto específico de los tratamientos sobre BCR-ABL, que podría estar relacionado con la estabilidad de la proteína. Esta observación nos llevó a ampliar el estudio del mecanismo de actuación del DPI, y tratar de determinar el nivel de regulación en el que la inhibición de la actividad de NADPH oxidasas provoca la disminución de la expresión de BCR-ABL. Para esto analizamos los niveles de proteína, mediante transferencia de western y del ARN mensajero (ARNm), mediante RT-qPCR, tras someter las células K562 al tratamiento con DPI 5 μ M.

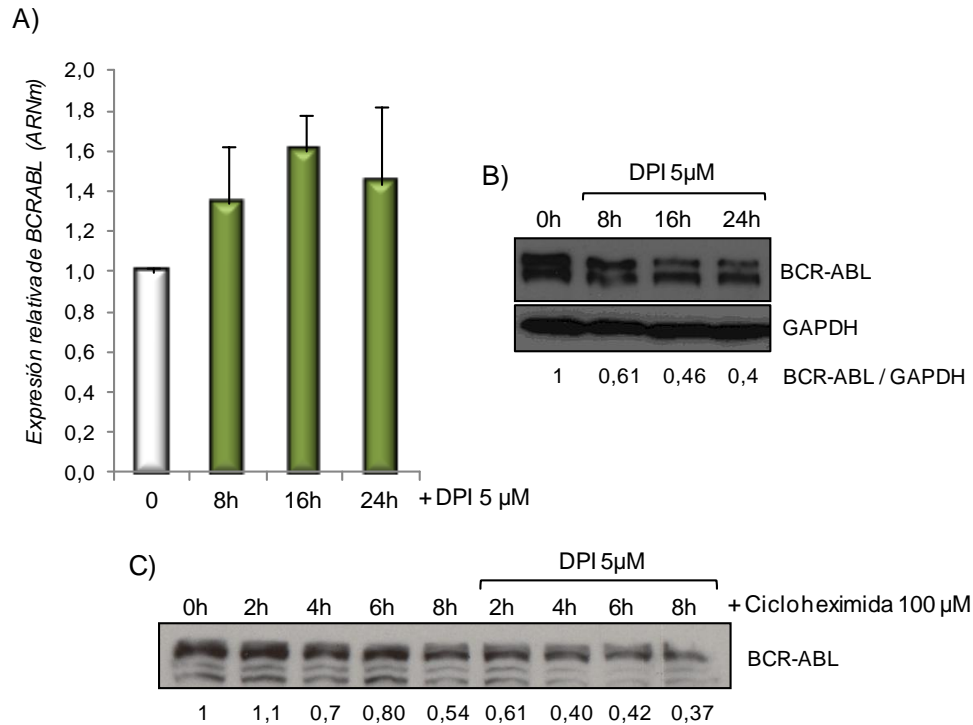


Figura IV-25. El inhibidor de NADPH oxidasas DPI actúa sobre BCR-ABL a nivel de proteína. Las células K562 se cultivaron a una densidad de $3,5 \times 10^5$ cel/mL con DPI 5 μ M. Tras diferentes tiempos, se analizaron los niveles de expresión del ARNm de *BCR-ABL* (A), los niveles de proteína BCR-ABL (B) y el decaimiento de BCR-ABL bajo el tratamiento con Cicloheximida 100 μ M en presencia o ausencia del DPI (C).

Mientras que la expresión del ARNm de BCR-ABL no se veía reducida (Figura IV-25A), los niveles de la proteína total disminuían a medida que aumentaba el tiempo de incubación con DPI (Figura IV-25B). Además, cuando las células se trataron con cicloheximida, agente que se une al sitio-E de la subunidad ribosomal 60S, bloqueando la traducción de proteínas (Schneider-Poetsch et al., 2010), se comprobó como el decaimiento de la proteína BCR-ABL era notablemente más rápido en presencia del inhibidor de DPI (Figura IV-25C), indicando que la vida media de esta quinasa es más corta bajo este tratamiento. De estos experimentos podemos deducir que el DPI actúa sobre la expresión de BCR-ABL a nivel de proteína, y que la actividad NADPH oxidasa parece ser importante en la regulación de la estabilidad de esta tirosina-quinasa.

Landry y colegas han propuesto recientemente que la reducción de los niveles de ROS en las células producida por la inhibición de BCR-ABL se correlaciona con una reducción post-traducciona de la proteína p22^{phox} (componente esencial de los complejos NOX1, NOX2,

NOX3 y NOX4), mediada por la activación de la serina/treonina-quinasa GSK-3 β . En concreto, p22^{phox} parece ser ubiquitinada y degradada vía proteasoma tras el tratamiento de las células K562 con imatinib o nilotinib (Landry et al., 2013).

Respecto a la estabilidad de BCR-ABL, se han descrito dos mecanismos por los que la proteína BCR-ABL desfosforilada puede ser degradada en la célula leucémica, que son el sistema ubiquitina-proteasoma y la autofagia.

El sistema ubiquitina-proteasoma (UPS, del inglés “Ubiquitin-Proteasome System”) es la principal ruta de degradación intracelular de proteínas. Se ha descrito que la desfosforilación de BCR-ABL mediada por fosfatasa como PP2A hace sensibles a las células de LMC a la proteólisis vía UPS (Neviani et al., 2005), aumentando la apoptosis de estas células. Curiosamente, el uso de inhibidores del proteasoma, como son el bortezomir y el PSI (del inglés “Proteasome inhibitor I”), dirigen también estas células a la apoptosis e inhiben su crecimiento y clonogenicidad, y este efecto parece deberse, sorprendentemente, a un aumento en la actividad de la propia fosfatasa PP2A mediada por la inhibición de su regulador negativo SET. Parece además que en combinación con imatinib, tanto el bortezomir como el PSI son capaces de potenciar el efecto de este inhibidor de BCR-ABL (Hu et al., 2009), por lo que el proteasoma se ha considerado también una diana terapéutica a estudiar en distintos tipos de cáncer, incluyendo la leucemia mieloide crónica.

El proceso de autofagia, por otro lado, es un sistema degradativo intracelular que juega un papel muy importante en la regulación de la homeostasis proteica, en el que moléculas y orgánulos dañados son digeridos en los lisosomas, siendo esencial para la supervivencia de las células cuando lidian con situaciones de estrés metabólico. Las células que expresan *BCR-ABL* muestran niveles basales bajos de autofagia y sin embargo parecen ser altamente dependientes de ella, ya que cuando se inhibe químicamente este proceso con cloroquina estas células entran rápidamente en apoptosis, viéndose comprometida la supervivencia incluso de las células resistentes a imatinib (Altman et al., 2011). La autofagia en las células LMC es un proceso altamente controvertido, ya que se conoce como algunos agentes terapéuticos, como por ejemplo el imatinib (Elzinga et al., 2013), parecen inducir autofagia en las células LMC, y sin embargo, esta respuesta parece impedir simultáneamente el efecto anticancerígeno de estos fármacos (revisado en Carew et al., 2008).

Con toda esta información en mente, y viendo el decaimiento de BCR-ABL con el DPI (Figura IV-25C), quisimos estudiar si el papel que juegan las NADPH oxidasas en la estabilidad de esta proteína está relacionado con alguna de estas dos vías de degradación. Para eso, en presencia de nuevo del inhibidor de la traducción de proteínas cicloheximida, tratamos las células, durante 2 horas, con DPI 5 μM en combinación bien con un inhibidor del proteasoma (MG132) o bien con un inhibidor de la autofagia (cloroquina) y estudiamos los niveles totales de la quinasa oncogénica.

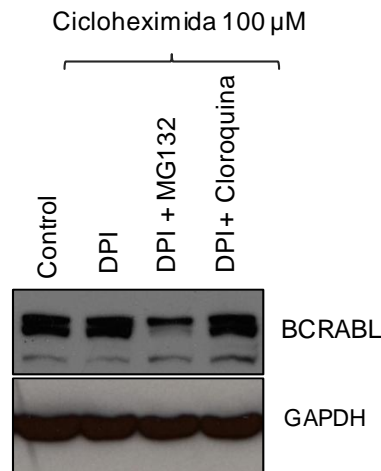


Figura IV-26. Análisis de la estabilidad de BCR-ABL bajo la inhibición de la actividad NADPH oxidasa mediante transferencia de western. Se analizaron los niveles de BCR-ABL en células K562 cultivadas a una densidad de $3,5 \times 10^5$ células/mL durante 2 horas con DPI 5 μM o con su combinación bien con el inhibidor del proteasoma MG132 2,5 μM , bien con el inhibidor de lisosomas cloroquina 10 μM , siempre en presencia de cicloheximida 100 μM .

Cuando inhibíamos la actividad NADPH oxidasa junto con el proteasoma, obteníamos un descenso de BCR-ABL mayor que el producido por el DPI como tratamiento individual (Figura IV-26). Este resultado nos pareció a priori un efecto inesperado, ya que lo lógico era que se produjera una acumulación de la proteína debido al bloqueo de su degradación, sin embargo, se corresponde a la perfección con el efecto descrito anteriormente para la combinación imatinib + bortezomir o imatinib + PSI (Hu et al., 2009). Por el contrario, la inhibición de la autofagia sí reflejaba una retención de la proteína inactiva al tratar las células con el DPI (Figura IV-26), lo que sugiere que la inhibición de las NADPH oxidasas podría dirigir a BCR-ABL hacia la degradación vía autofagia, y no vía proteasoma.

8.2. Efecto del silenciamiento de la proteína reguladora p22^{phox} sobre la señalización de BCR-ABL.

Para corroborar, una vez más, que los efectos que observábamos para el DPI se debían específicamente a la disminución de los niveles de ROS por inhibición de las NADPH oxidasas, nos pareció adecuado estudiar si los efectos sobre la señalización de BCR-ABL, y su reflejo sobre la proliferación celular, eran los mismos cuando la actividad de las NOX era silenciada mediante herramientas moleculares. Para esto utilizamos células K562 en las que se había aplicado la interferencia del RNA mensajero de la proteína citoplasmática p22^{phox} para disminuir la expresión de dicha proteína, generadas previamente en nuestro laboratorio para investigar el papel de las NADPH oxidasas dependientes de p22^{phox} en la diferenciación megacariocítica (Sardina et al., 2010). En concreto utilizamos las K562 76/77, denominadas así por la pareja de oligonucleótidos diseñada para silenciar esta proteína (Esquema IV-4A) y a la que a partir de ahora nos referiremos como p22^{phox} RNAi. Como control del silenciamiento de esta proteína se utilizó una pareja de oligonucleótidos frente a la luciferasa de luciérnaga, generando las células que denominamos K562 Luciferasa (LUC).

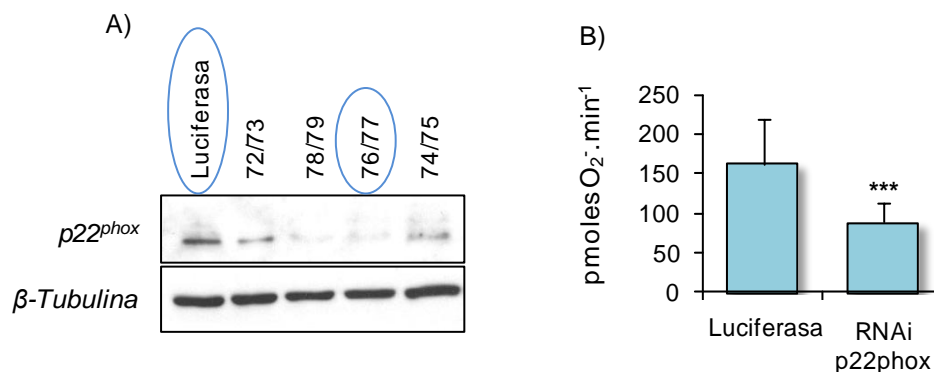


Figura IV-4. Comprobación del silenciamiento de la proteína p22^{phox} mediante interferencia del ARN en células K562. A) Reducción de los niveles de la proteína p22^{phox} de las células K562 respecto a las células control del silenciamiento luciferasa. B) Las células p22^{phox} RNAi presentan una actividad NADPH oxidasa significativamente menor que las células control luciferasa. Tomada de Sardina et al., 2010.

Como hemos descrito en la introducción (véase capítulo I, 2.3), la proteína p22^{phox} da estabilidad al complejo NADPH oxidasa y sirve de anclaje para las subunidades citoplasmáticas reguladoras, de manera que NOX1, NOX2, NOX3 y NOX4 van a ser

dependientes de esta proteína transmembrana para su correcta activación y función. Así, si bloqueamos la síntesis de esta proteína mediante shRNA, estamos inhibiendo la actividad de estos 4 tipos de NADPH oxidasas (Esquema IV-4).

Con estas células ya caracterizadas, analizamos la activación de las rutas de señalización de BCR-ABL. Comenzamos estudiando los niveles de fosforilación de la oncoquinasa, iniciadora de todas las vías. El silenciamiento de $p22^{\text{phox}}$, revelaba una disminución de la activación de BCR-ABL respecto a las células control luciferasa (LUC), coincidiendo con lo que habíamos visto con el DPI (Figura IV-27A).

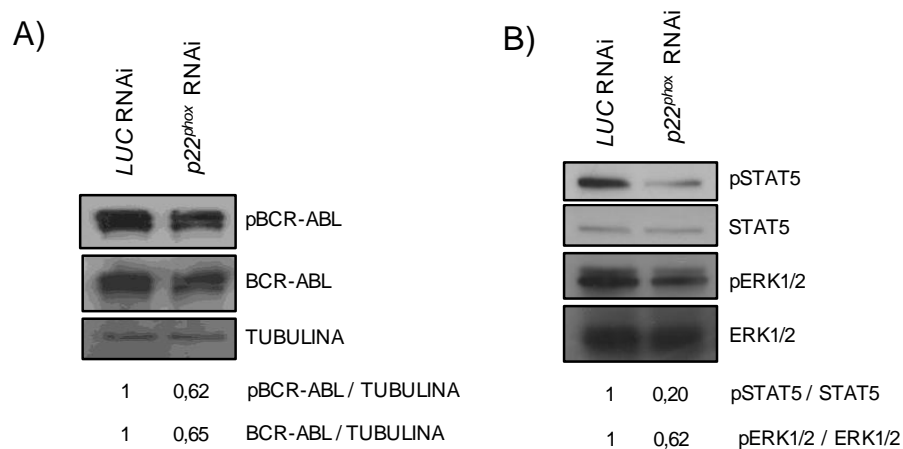


Figura IV-27. Análisis de los niveles de fosforilación de BCR-ABL, STAT5 y ERK mediante transferencia de western en células K562 con la proteína $p22^{\text{phox}}$ silenciada ($p22^{\text{phox}}$ RNAi). Se cultivaron las células K562 Luciferasa y $p22^{\text{phox}}$ RNAi a una densidad de $3,5 \times 10^5$ células/ml durante 24 horas y se analizaron los niveles de fosfo-BCR-ABL y BCR-ABL, utilizando como control de carga los niveles de tubulina (A), y los niveles de las formas fosforiladas de STAT5 y ERK1/2, empleando las mismas membranas para analizar los niveles totales de dichas proteínas (B). Se cargaron 40 μg de proteínas por carril. Los números debajo de las cajas indican la cuantificación de las bandas.

El siguiente paso fue estudiar la activación de una diana directamente fosforilable por la quinasa fusogénica, como es STAT5, y la de una diana indirecta, como es ERK1/2. Tanto los niveles de fosfo-STAT5 (pSTAT5), como los de fosfo-ERK1/2 (pERK1/2), se encontraban reducidos en las células con menor actividad NOX ($p22^{\text{phox}}$ RNAi) respecto a las células control (LUC), es decir, ambas proteínas estaban menos activadas (Figura IV-27B), siendo el efecto más acusado en STAT5.

Además, en las imágenes obtenidas para el RNAi de p22^{phox}, al igual que sucedía cuando tratábamos las células K562 con DPI, se puede observar como los niveles totales de BCR-ABL parecían verse también reducidos, mientras que ni la proteína utilizada como control de carga (Tubulina), ni los niveles totales de STAT5 y ERK se veían afectados por el silenciamiento de las p22^{phox} (Figura IV-27), señalando nuevamente un papel de estos complejos enzimáticos como reguladores de la estabilidad de la quinasa BCR-ABL.

Por último, quisimos comprobar la afectación de la proliferación en estas células en las que la interferencia de la proteína p22^{phox} había reflejado una fuerte inhibición de la señalización. Observamos como tanto su crecimiento (Figura IV-28A), como su capacidad de formar colonias (Figura IV-28B) eran significativamente inferiores a los que presentaban las células K562 control luciferasa.

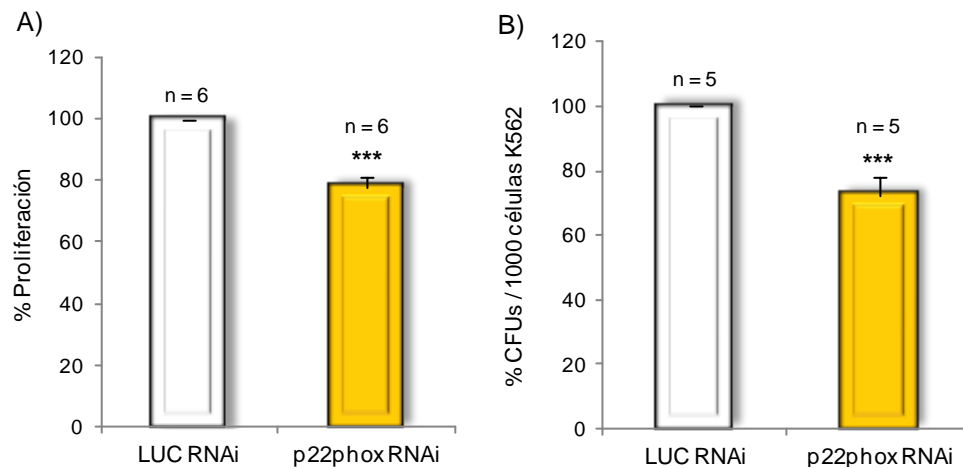


Figura IV-28. El silenciamiento de p22^{phox} disminuye la proliferación y la capacidad de formación de colonias de las células K562. La proliferación de las células K562 luciferasa y p22^{phox} RNAi fue analizada por el método del MTT (A). Se sembraron 1.000 células en medio semisólido de metilcelulosa y se contó el número de unidades formadoras de colonias 7 días después (B). Los resultados se muestran como la media \pm ESM. *** $p < 0,001$ refleja diferencias significativas respecto a las células control del silenciamiento (LUC).

Estos resultados concuerdan en su totalidad con los obtenidos para el DPI, corroborando que, a pesar de ser un inhibidor general de flavoproteínas, sus efectos sobre nuestras células leucémicas se deben a la inhibición específica de las NADPH oxidasas.

La conjunción de esta serie de experimentos demuestra finalmente una implicación directa de las NADPH oxidasas en el mantenimiento de la activación de las rutas de señalización de BCR-ABL, definiendo así una relación entre la producción de ROS por las NADPH oxidasas,

inducida por la quinasa oncogénica BCR-ABL, y la capacidad proliferativa de las células de LMC.

9. ESTUDIO DEL PAPEL DE LAS PTPs COMO REGULADORAS DEL ESTADO ACTIVO DE BCR-ABL: SHP1 Y SHP2

Llegados a este punto, nuestro estudio indicaba que los inhibidores de NADPH oxidasas provocan un descenso en los niveles de ROS que disminuye la activación de las rutas de señalización dirigidas por la oncoproteína BCR-ABL, y como consecuencia, se produce una inhibición significativa de la proliferación de las células leucémicas.

El hecho de que exista un fuerte efecto sinérgico cuando inhibimos al mismo tiempo el inicio de las cascadas de señalización, con los inhibidores de la quinasa BCR-ABL, y la producción de ROS, con inhibidores de la actividad NADPH oxidasas, en las células de leucemia mieloide crónica, sugiere la existencia de una conexión entre estas dos proteínas. Dada la alta sensibilidad de las fosfatasa, en particular de las proteína tirosina fosfatasa (PTPs), a la oxidación de las Cisteínas de su centro activo (véase 1.3 del capítulo I) y teniendo en cuenta su función principal como reguladoras de la fosforilación en tirosina, estas enzimas podrían ser ese punto de unión BCR-ABL/NADPH oxidasas.

En este sentido, ya se han descrito el papel de algunas fosfatasa como supresores tumorales de BCR-ABL, como por ejemplo PP2A (Neviani et al., 2005), PTEN (Peng et al., 2010) o TCPTP (Mitra et al., 2013), cuyas actividades parecen estar inhibidas en LMC, y cuando estas proteínas son activadas, bien molecularmente, bien farmacológicamente, la fosforilación, y por tanto activación de la oncoquinasa BCR-ABL queda suprimida en gran medida, induciendo también su degradación.

Nuestro interés se centro en las PTPs SHP1 y SHP2 (del inglés, “SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase-1 y 2”) por ser dos enzimas altamente expresadas en células hematopoyéticas e implicadas en la regulación de su función y crecimiento (Mizuno et al., 1996; Lechleider et al., 1993; Qu et al., 1998 ; Qu et al., 2001). A pesar de tener secuencias con alto porcentaje de identidad, a menudo muestran funciones biológicamente opuestas, siendo habitualmente SHP1 (también denominada SHPTP1, PTP1C o HCP) un regulador negativo de la señalización y SHP2 (también denominada SHPTP2 o Syp) un regulador positivo (Chong and Masiese, 2007 ; Wang et al., 2006). La actividad de estas proteínas ha

sido también relacionada con la leucemia mieloide crónica. Se ha visto en pacientes que la presencia de niveles de SHP1 significativamente reducidos está asociada a la progresión de la enfermedad a la fase blástica (Amin et al., 2007), y a una mayor resistencia al tratamiento con el inhibidor de BCR-ABL imatinib (Esposito et al., 2011). SHP2 parece formar parte de un complejo proteico asociado a BCR-ABL y ser altamente fosforilada por esta oncoquinasa. Más recientemente se ha encontrado también que la transformación de las células hematopoyéticas por BCR-ABL requiere la presencia de SHP2, asignándole un posible papel en la estabilidad de esta proteína (Chen et al., 2007; Sattler et al., 1997; Tauchi et al., 1994). Si bien, la función exacta de estas fosfatasa en los efectos mediados por BCR-ABL es todavía desconocida.

9.1. Efecto de SHP1 y SHP2 en los niveles de fosforilación de BCR-ABL en células K562.

Lo primero que hicimos fue comprobar que ocurría con los niveles de fosforilación de BCR-ABL en la línea K562 con la proteína SHP1 silenciada, aprovechando que esta línea había sido previamente generada en nuestro laboratorio mediante interferencia del ARN (RNAi), comparándola con las K562 Luciferasa (LUC), línea control del silenciamiento. Observamos como efectivamente, los niveles de fosfo-BCR-ABL (p-BCR-ABL) aumentan significativamente cuando SHP1 se encuentra interferida, incluso aumentan también los niveles totales de la proteína quinasa, indicando una mayor activación y estabilidad de BCR-ABL (Figura IV-29B), probablemente por una menor degradación.

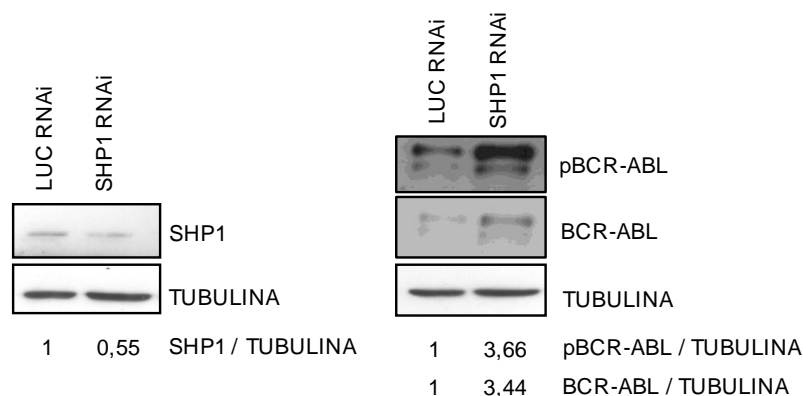


Figura IV-29. Análisis de los niveles de fosforilación de BCR-ABL mediante transferencia de western en células K562 con SHP1 silenciada (SHP1 RNAi). Se cultivaron las células K562 LUC y SHP1 RNAi a una densidad de $3,5 \times 10^5$ células/mL durante 24 horas y se analizaron los niveles totales

de SHP1 para comprobar el silenciamiento de dicha proteína, tomando como control células donde se ha interferido la expresión de luciferasa de luciérnaga (A) y los niveles de pBCR-ABL y BCR-ABL (B). Se cargaron 40 µg de proteínas por carril. Como control de carga los niveles de tubulina. Los números debajo de las cajas indican la cuantificación de las bandas.

Intentamos esta misma aproximación también para SHP2, pero la línea K562 no mostraba un silenciamiento significativo de esta fosfatasa al analizar la efectividad de la interferencia del ARN, por lo que no obtuvimos resultados. Por este motivo, intentamos obtener un mayor silenciamiento de SHP2 en la línea Boff210, utilizando la misma técnica y diseñando nuevos oligonucleótidos de interferencia, en este caso para el ARNm de ratón. Sin embargo, no fuimos capaces de obtener una disminución consistente de los niveles de SHP2.

9.2. Efecto de SHP1 y SHP2 sobre la proliferación de células K562.

Confirmada BCR-ABL como una diana, directa o indirecta, de la actividad de la PTP SHP1, comprobamos si esta menor fosforilación de BCR-ABL se correspondía con un mayor crecimiento de las células K562. Efectivamente, se producía un ligero aumento, aunque significativo, de la proliferación celular al reducir los niveles de SHP1 (Figura IV-30A). Ante la falta de silenciamiento de SHP2 en las líneas celulares K562 y Boff210 generadas, recurrimos al uso de un inhibidor sustrato-competitivo descrito como específico para esta fosfatasa a concentraciones bajas (Hellmuth et al., 2008). La proliferación de K562, al contrario que veíamos para SHP1, no se veía afectada al inhibir SHP2 (Figura IV-30B).

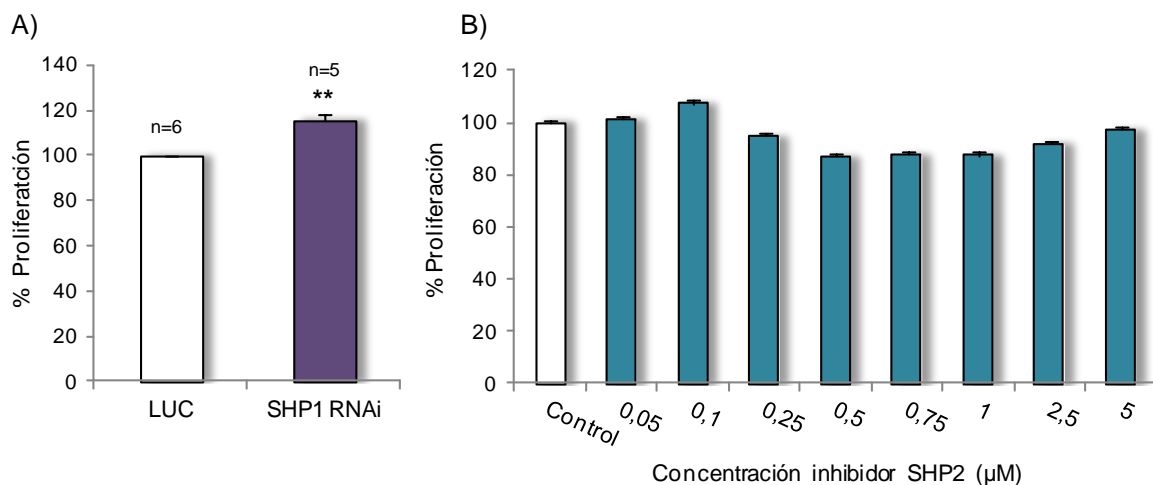


Figura IV-30. Análisis de la proliferación celular de K562 ante el silenciamiento de SHP1 mediante interferencia del ARN y la inhibición de SHP2. La proliferación de las células K562 LUC y SHP1 RNAi fue analizada por el método del MTT (A). Las células K562 se cultivaron a una densidad de 2×10^5 células/mL con el inhibidor de SHP2 PTPV y se analizó la proliferación mediante MTT 48 horas

después (B). Los resultados se muestran como la media \pm ESM de 5 (A) o 3 (B) experimentos. ** $p < 0,01$ refleja diferencias significativas respecto a las células control del silenciamiento (LUC).

9.3. Medida de la actividad de SHP1 y SHP2 en células Boff210 bajo inhibidores de la actividad NADPH oxidasas e inhibidores de BCR-ABL.

Una vez comprobada la implicación de la fosfatasa SHP1 en el estado activo de la quinasa BCR-ABL, quisimos estudiar como afectaban nuestros tratamientos a su actividad fosfatásica. Así, tras 16 horas con los tratamientos imatinib 0,5 μ M, DPI 5 μ M o la combinación de ambos, procedimos a inmunoprecipitar las proteínas SHP1 y SHP2 y medir su actividad específica. Tras la medida de la actividad, los inmunoprecipitados fueron analizados mediante transferencia de western para corroborar que los resultados obtenidos no fueran consecuencia de una diferencia en la concentración de proteína presente en cada reacción.

En primer lugar realizamos estos experimentos en K562, pero la actividad que detectábamos, era realmente baja, no permitía obtener resultados fiables. De hecho, está descrito que las células BCR-ABL positivas presentan una actividad total de PTPs muy reducida (Sattler et al., 2000). Por esto recurrimos una vez más a la línea Boff210. En estas células, tanto la inhibición de BCR-ABL con imatinib, como la de NADPH oxidasas con DPI, como la combinación conjunta de ambas, provocaba un aumento significativo de la actividad de SHP1 (Figura IV-31A).

Sin embargo, la actividad de SHP2, únicamente se veía modificada por la inhibición de BCR-ABL, mostrando, curiosamente, un aumento significativo (Figura IV-31B), en contra de lo que cabría esperar por lo que hay publicado sobre esta proteína en LMC (Chen et al., 2007; Scherr et al., 2012).

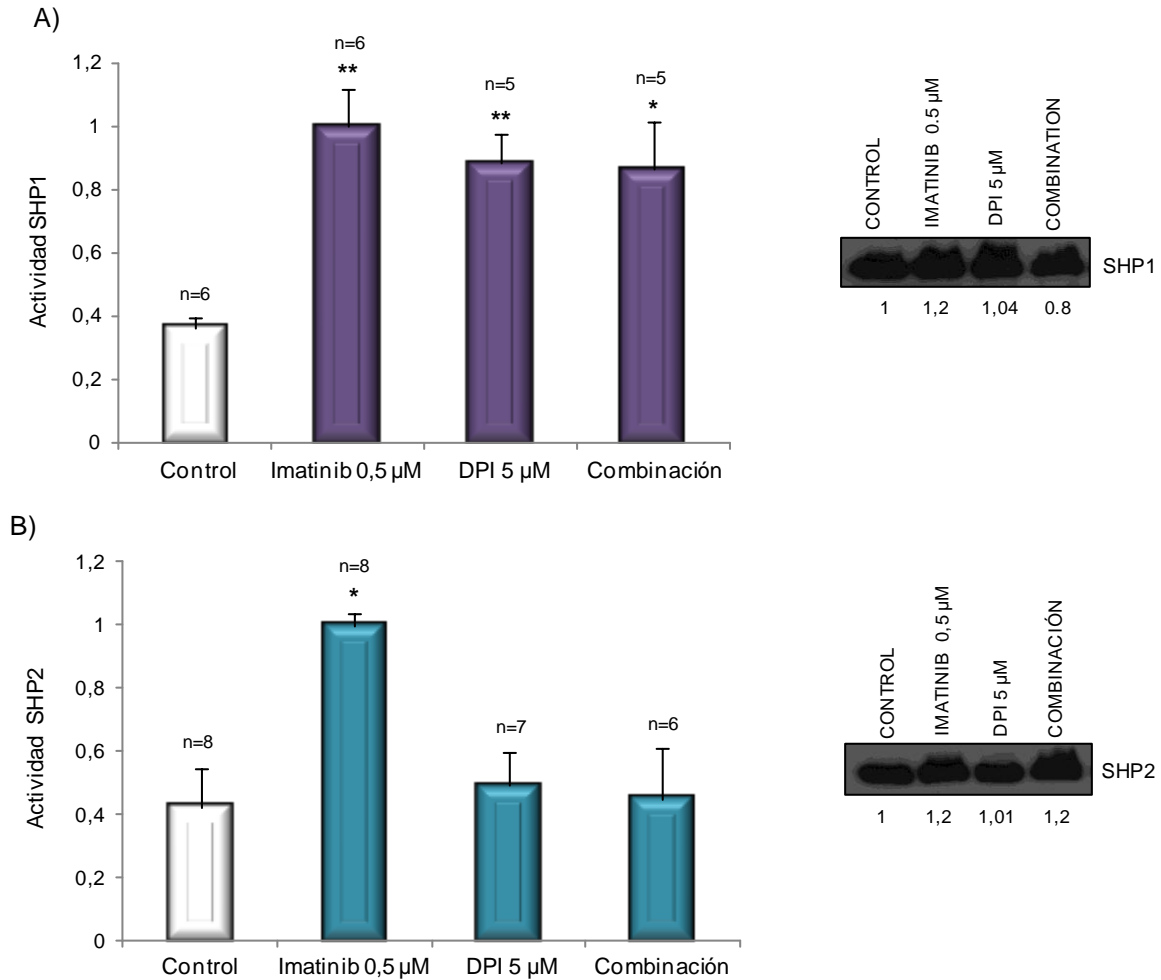


Figura IV-31. Análisis de la actividad específica de las PTPs SHP1 y SHP2 bajo los distintos tratamientos en células Boff210. Las células Boff210 se cultivaron a una densidad de $3,5 \times 10^5$ células/mL con imatinib 0,5 μ M, DPI 5 μ M o la combinación IM+DPI. 16 horas después se analizó la actividad fosfatásica de SHP1 (A) y SHP2 (B). Los resultados se muestran como la media \pm ESM. ** $p < 0,01$ y * $p < 0,05$ reflejan diferencias significativas respecto a las células no tratadas. A la derecha se muestra una imagen representativa de los inmunoprecipitados de SHP1 (A) y SHP2 (B) tras la medida de la actividad, analizados mediante transferencia de western. Los números debajo de las cajas corresponden a la cuantificación de cada banda.

Estos resultados indican que el aumento en la actividad SHP1 debido a la disminución de niveles de ROS, parece estar relacionado con la atenuación de la señalización de BCR-ABL observada con los distintos tratamientos, siendo este efecto específico para SHP1, ya que la actividad de SHP2 no se veía afectada por el tratamiento con DPI (Figura IV-31B) y su inhibición no afectaba tampoco a la proliferación celular (Figura IV-30B).

10. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR EN LAS CÉLULAS LEUCÉMICAS K562.

El ciclo celular es otro de los procesos en el que están altamente implicadas las especies reactivas del oxígeno, ya que varias proteínas reguladoras del ciclo poseen motivos sensibles a oxidación en su sitio activo, como son los residuos de cisteína. Esto indica que cambios en el estado redox intracelular pueden jugar un papel muy importante en la regulación de la progresión del ciclo celular de fase G_0/G_1 a fase S, G_2 y M. (Revisado en Burhans and Heintz, 2009). Parece ser además que varios genes reguladores del ciclo celular participan también en los mecanismos moleculares y celulares de la patogénesis en LMC (Grineva et al., 2012). Por lo tanto, la alteración del ciclo celular puede ser parte del mecanismo de acción de nuestros tratamientos

Estudiamos, mediante tinción de las células con yoduro de propidido (IP) y su posterior adquisición por citometría, la distribución de las fases del ciclo de las células leucémicas K562 tras 24, 32 y 48 horas bajo el tratamiento con imatinib 0,5 μ M, DPI 5 μ M o ambos agentes.

10.1. **Bloqueo de la progresión del ciclo celular por la inhibición de la actividad NADPH oxidasa.**

Comenzamos analizando los perfiles de ciclo celular de células K562 obtenidos en el citómetro. Mientras que las células tratadas únicamente con imatinib presentaban un ciclo bastante similar al de las células control, con un ligero bloqueo en la fase G_0/G_1 , el DPI provocaba un fuerte bloqueo de las células en la fase G_2/M que parecía verse continuado en el tiempo (Figura IV-32). Curiosamente, la combinación de ambos inhibidores (imatinib + DPI) provocaba un bloqueo en el ciclo celular que parecía cambiar a medida que aumentaba el tiempo de tratamiento de las células: a las 24 horas, se manifiesta un bloqueo en la fase G_2/M similar, incluso ligeramente superior, al observado en los perfiles del DPI, sin embargo, a medida que avanzaba el tiempo en presencia de ambos inhibidores, las células van mostrando un perfil mucho más parecido al del imatinib, con el mayor porcentaje de células en fase G_0/G_1 .

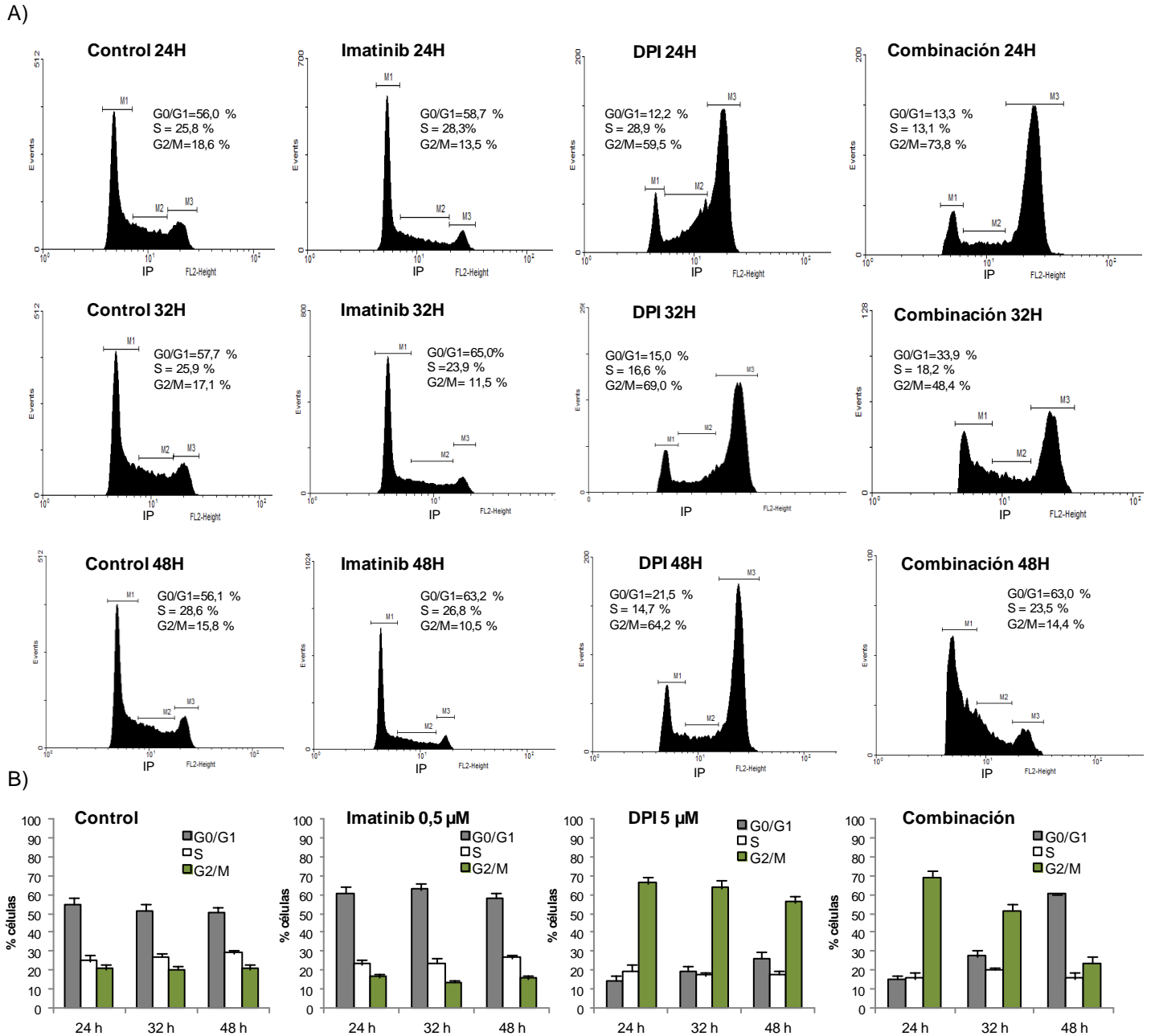


Figura IV-32. Análisis del efecto de los inhibidores de NADPH oxidasas y BCR-ABL sobre la distribución de las células K562 en las fases del ciclo celular. Las células K562 se cultivaron a una densidad de 2×10^5 células/mL con imatinib 0,5 μ M, DPI 5 μ M o la combinación IM+DPI. Tras 24, 32 y 48 horas las células se fijaron con etanol 70 % y se marcaron con una solución de yoduro de propidio. Se analizaron por citometría las células viables. A) Perfiles de citometría (FACS) de la distribución de las células en el ciclo celular. Se muestra un experimento representativo. M1=fase G₀/G₁, M2=fase S, M3=fase G₂/M. B) Porcentaje de células distribuidas en cada fase del ciclo celular. Los resultados se muestran como la media \pm ESM de 5 experimentos diferentes.

Para definir la fase exacta del ciclo celular (fase G₂ o fase M) en la que se estaba produciendo el bloqueo por la inhibición de las NADPH oxidasas, analizamos por transferencia de western el efecto del DPI, solo o en combinación con imatinib, sobre dos de las proteínas clave que caracterizan la entrada en mitosis: i) WEE1: proteína clave en el punto de control (“check point”) G₂ del ciclo. Esta quinasa fosforila e inactiva a Cdk1, impidiendo su unión con la ciclina B, y por tanto, inhibiendo la entrada de las células en mitosis (Squire et al., 2005). La deficiencia de *WEE1* en estadios tardíos del desarrollo provoca desordenes del crecimiento y muerte celular (Tominaga et al., 2006); ii) fosfo-Histona H3: la fosforilación de la Histona H3 (tanto en la Ser10, Ser28 como en la Tyr-3), ocurre al final de la fase G₂, inicio de la profase, y parece tener un papel importante en la condensación de los cromosomas, siendo desfosforilada al final de la mitosis (Wang and Higgins, 2012).

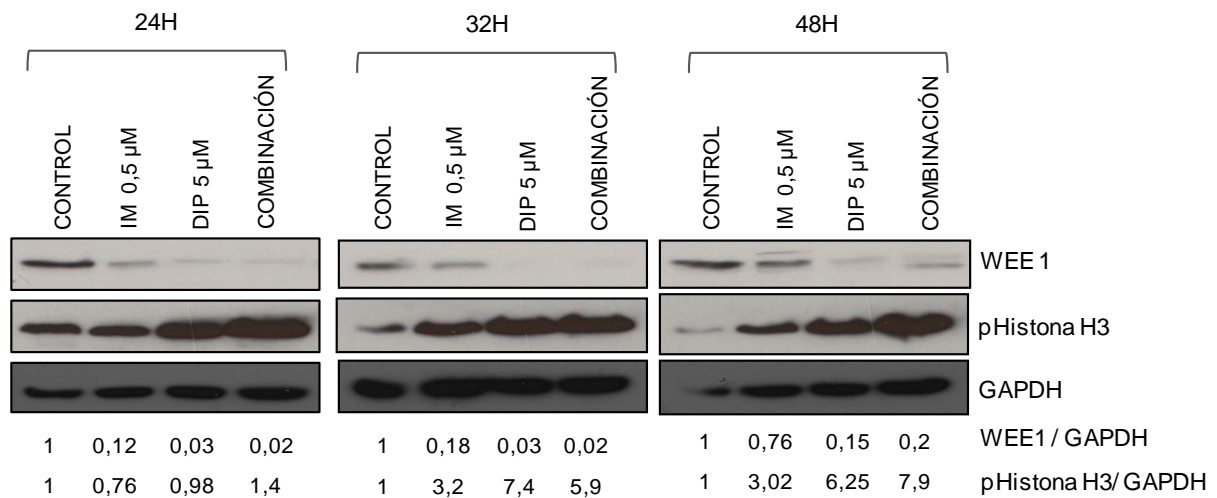


Figura IV-33. Análisis de los niveles de WEE1 y fosfo-HistonaH3 mediante transferencia de Western en las células K562. Las células K562 se cultivaron a una densidad de $3,5 \times 10^5$ células/mL con imatinib 0,5 μM, DPI 5 μM o la combinación IM+DPI. Tras 24h, 32h y 48h se analizaron los niveles de WEE1 y pHistonaH3. Se cargaron 50 μg de proteínas por carril. Como control de carga se analizaron los niveles de la proteína GAPDH. Los números debajo de las cajas indican la cuantificación de las bandas.

Vemos como el tratamiento con DPI o con la combinación de inhibidores (imatinib + DPI) provocaba una disminución de los niveles de WEE1 y un aumento de la forma fosforilada de la Histona H3 (Figura IV-33), manifestándose también, curiosamente, un efecto, aunque bastante menos acusado, con el inhibidor de BCR-ABL imatinib. Estos resultados indican una entrada de las células en mitosis, por lo que el bloqueo observado en los perfiles de ciclo

tiene lugar en la fase M y no en G₂. Este resultado nos resultó curioso, ya que según la bibliografía revisada, el Imatinib parece conducir las células a un estado de quiescencia en la fase G₁ mediante la sobreexpresión de Cdh1, degradación de SKp2 y acumulación de p27 (Wang et al., 2012) y el DPI, sería capaz, según los diferentes autores, bien de bloquear la transición de la fase G₀ / G₁ a la fase S del ciclo (Song et al., 2008); o bien de provocar la parada de las células en la fase G₂, impidiendo la acumulación de la ciclina B1, y por tanto la entrada de las células en mitosis (Scaife, 2004). Pero en ningún caso se había descrito un bloqueo dentro de la fase de mitosis por parte de estos fármacos. Si bien, aunque algunas de las líneas celulares en las que se describían dichos efectos del DPI eran también líneas tumorales (cáncer colorrectal y leucemia promielocítica), no correspondían a líneas celulares de Leucemia mieloide crónica, lo que nos hace pensar, observando nuestros resultados, que el efecto de la inhibición de las NADPH oxidasas por el DPI sobre el ciclo celular podría ser diferente dependiendo del tipo de células que estén siendo tratadas.

10.2. Efecto de los inhibidores de la actividad NADPH oxidasa sobre la Inestabilidad genómica.

Está descrito que la expresión de BCR-ABL inicia un ciclo de inestabilidad genómica, que potencia la creación de otras mutaciones que van a favorecer la progresión de la carcinogénesis. Esta quinasa oncogénica induce específicamente la producción de ROS vía NADPH oxidasas, que van a causar daños en el ADN, especialmente roturas de doble hebra (DSBs, del inglés “Double-stranded breaks”). Habitualmente, el daño en el ADN induce como respuesta cambios transcripcionales, activación de puntos de control del ciclo celular, y, según el daño, bien reparación del ADN o bien apoptosis. Sin embargo, en células de Leucemia mieloide crónica, se ha visto que las dos principales mecanismos de reparación de las DSBs existentes en las células de mamíferos, denominadas HRR (del inglés “Homologous recombination repair”) y NHEJ (del inglés “nonhomologous end-joining”) se encuentran anormalmente estimulados, demostrando una eficiencia de reparación significativamente incrementada respecto a células hematopoyéticas normales, de manera que, aunque las células acumulan gran cantidad de mutaciones, estas son capaces de sobrevivir y la inestabilidad genómica resultante conduce a la progresión de la enfermedad (Nowicki et al., 2004 ; Sallmyr et al., 2008).

A la vista del fuerte bloqueo en mitosis descrito en el punto anterior, nos pareció interesante analizar la aparición de daños en el ADN, en concreto DSBs, tras someter a las células a los distintos inhibidores. Para ello medimos mediante citometría de flujo los niveles de γ H2AX presentes en las células K562.

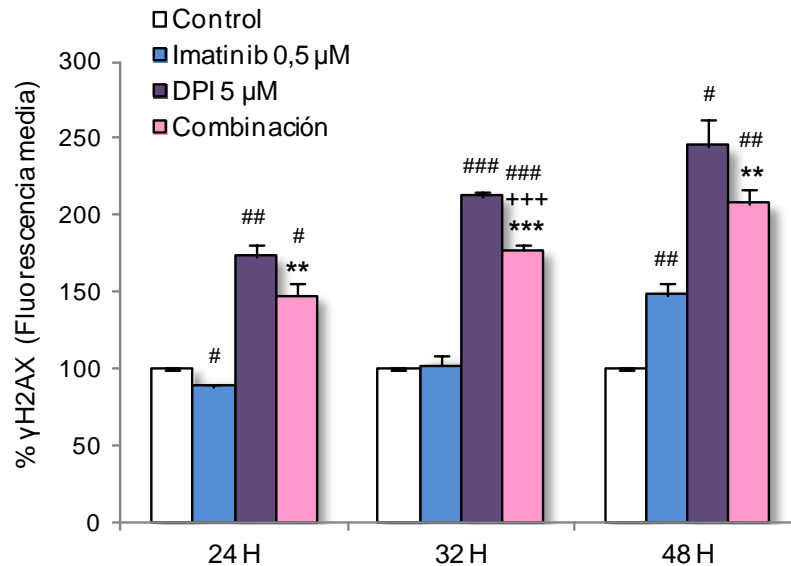


Figura IV-34. Análisis del efecto de los inhibidores de NADPH oxidasas y de BCR-ABL sobre la generación de roturas de doble hebra en el ADN (DSBs) mediante la medida de γ H2AX. Las células K562 se cultivaron a una densidad de 2×10^5 células/mL con imatinib 0,5 μ M, DPI 5 μ M o la combinación IM+DPI. Tras 24, 32 y 48 horas se analizó mediante citometría la presencia de γ H2AX en las células. Los resultados se muestran como la media \pm ESM de 4 experimentos diferentes. ### $p < 0,001$, ## $p < 0,01$ y # $p < 0,05$ reflejaban diferencias significativas respecto a las células no tratadas. *** $p < 0,001$ y ** $p < 0,01$ reflejaban diferencias significativas respecto a células tratadas únicamente con imatinib. +++ $p < 0,001$ reflejaba diferencias significativas respecto a células tratadas únicamente con DPI.

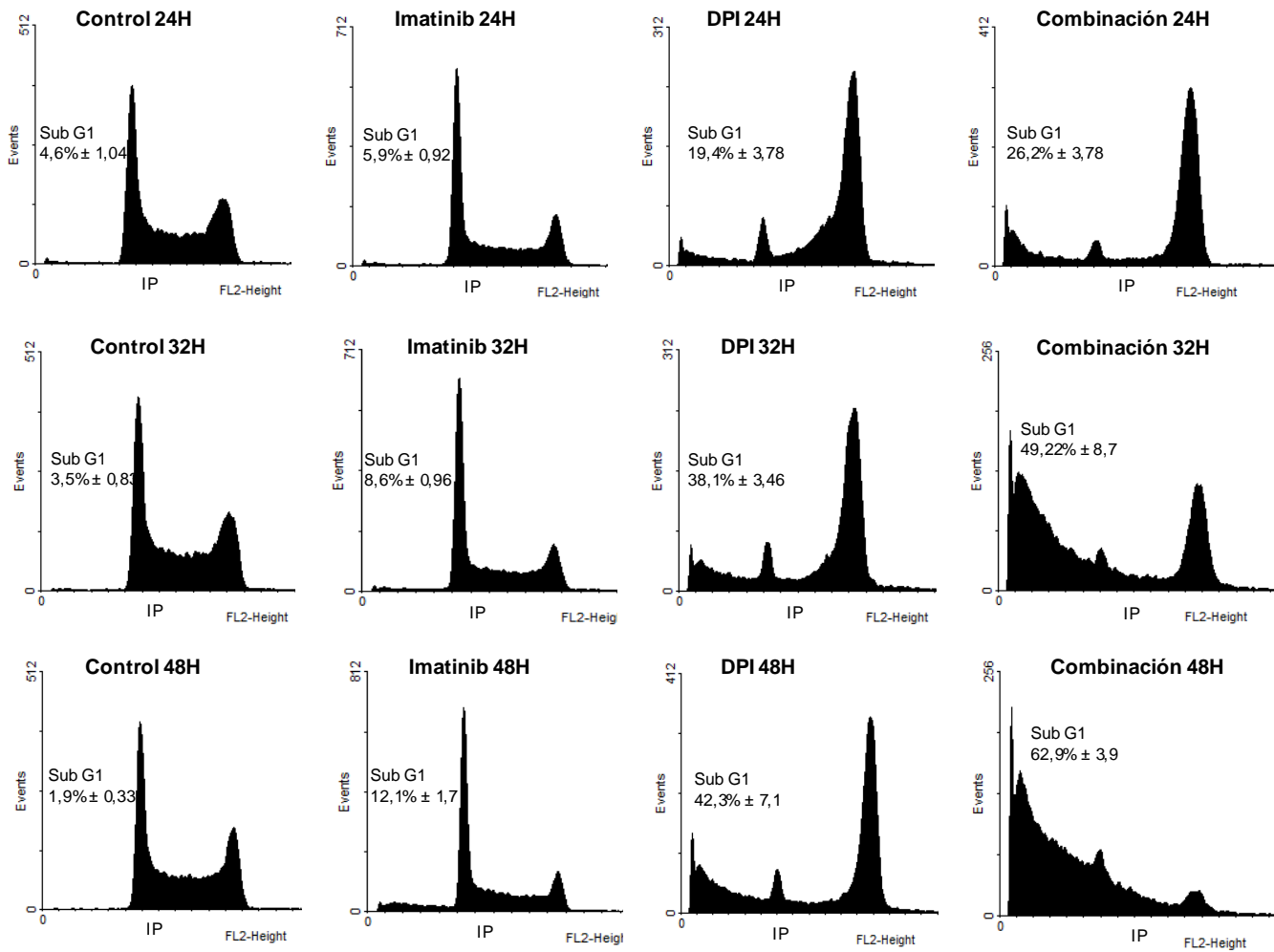
Los resultados mostraban un incremento significativo en los niveles de γ H2AX, especialmente tras el tratamiento de las células con DPI o la combinación imatinib + DPI (Figura IV-34), lo que parece indicar que el bloqueo que provocan estos inhibidores en mitosis, como cabría esperar, daría lugar a una mayor acumulación de roturas en el ADN.

10.3. Efecto de la inhibición de NADPH oxidasas sobre la viabilidad celular.

Por último, y tras observar el daño en el ADN que presentaban las células tras los tratamientos, centramos nuestra atención en la fase Sub G_1 del ciclo celular. Esta fase representa a las células con un reducido contenido en ADN, lo que se corresponde generalmente con células apoptóticas que están sufriendo rotura y pérdida en el ADN. Nos

resultó muy curiosa la aparición de una fase Sub G₁ muy marcada para los distintos tratamientos, especialmente para el DPI y la combinación imatinib+DPI (Figura IV-35). Los perfiles mostraban como el porcentaje de células K562 en esta fase se incrementaba significativamente a medida que aumentaba el tiempo de incubación con los distintos agentes. Se observaba además que, para todos los tratamientos y tiempos estudiados, la mayor cantidad de células distribuidas en esta fase se correspondía siempre con la inhibición conjunta de las NADPH oxidasas y BCR-ABL (Figura IV-35). Es decir, que los tratamientos individuales eran capaces de aumentar la apoptosis de las células, siendo el efecto más significativo para la combinación de tratamientos.

A)



B)

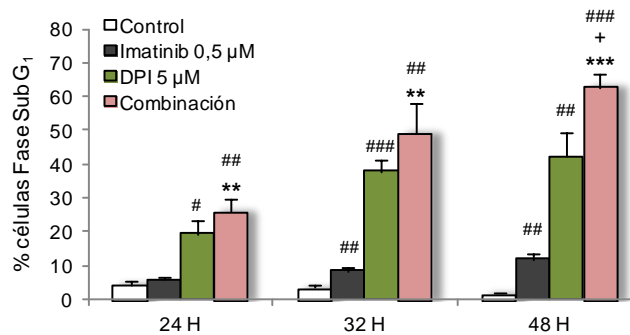


Figura IV-35. Análisis del efecto de los inhibidores de NADPH oxidasas y BCR-ABL sobre la distribución de las células en la fase Sub G₁ del ciclo celular. Las células K562 se cultivaron a una densidad de 2×10^5 células/mL con imatinib 0,5 μM, DPI 5 μM o la combinación IM+DPI. Tras 24, 32 y 48 horas las células se fijaron con etanol 70 % y se marcaron con una solución de yoduro de propidio para ser analizadas por citometría. A) Perfiles de citometría (FACS) de la distribución de las células en la fase Sub G₁. B) Diagrama de barras del porcentaje de células en fase Sub G₁. Los resultados se muestran como la media ± ESM de 5 experimentos diferentes. ###p<0,001, ##p<0,01 y #p<0,05 reflejan

diferencias significativas respecto a las células no tratadas. *** $p < 0,001$ y ** $p < 0,01$ reflejan diferencias significativas respecto a células tratadas únicamente con imatinib. + $p < 0,05$ refleja diferencias significativas respecto a células tratadas únicamente con DPI.

Al obtener estos resultados, decidimos ampliar el estudio llevando a cabo ensayos de viabilidad de las células. Tras 48 horas de incubación con los diferentes inhibidores (imatinib, DPI o ambos), el porcentaje de células viables (células Anexina V⁻/7AAD⁻) se veía claramente disminuído por todos los tratamientos, aumentando el número de células en apoptosis temprana (Anexina V⁺/7AAD⁻), especialmente con la doble combinación de inhibidores (Figura IV-36), lo que concuerda con el incremento de células observado en la fase Sub G1 tras los distintos tratamientos.

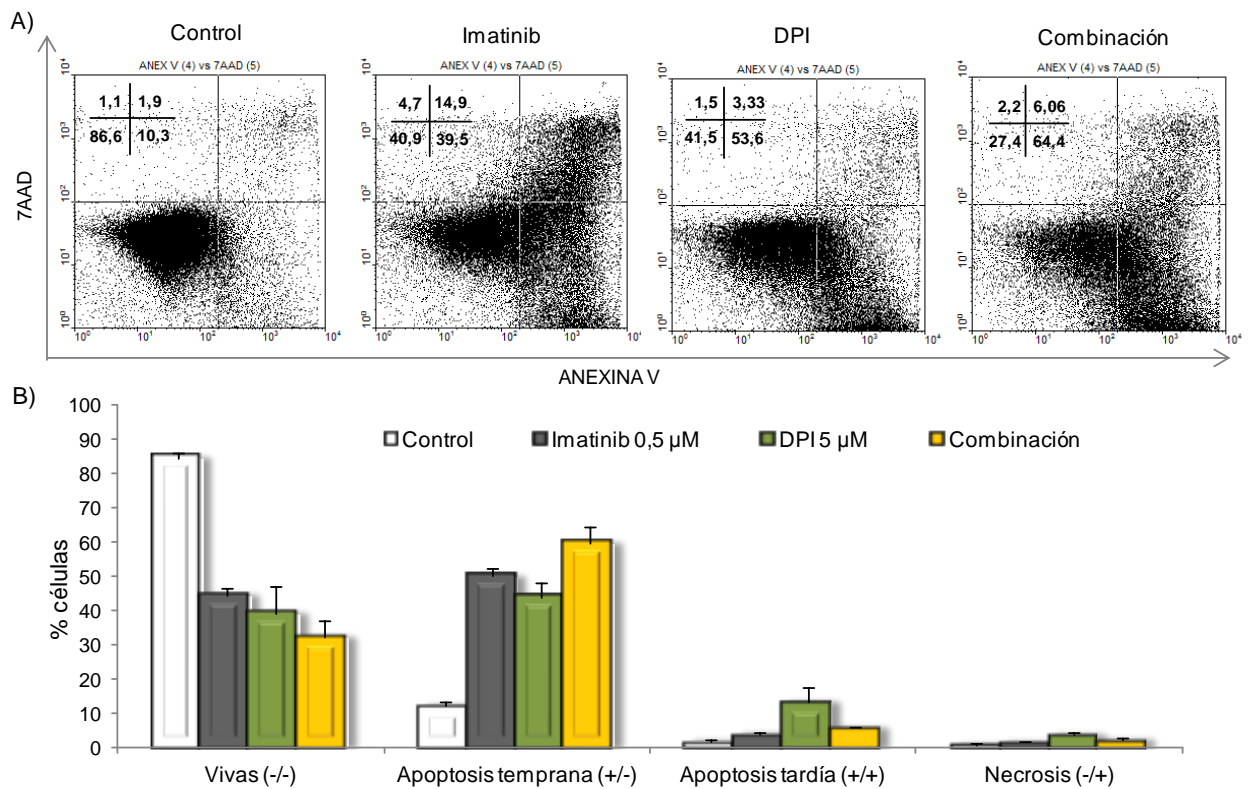


Figura IV-36. Análisis del efecto de los inhibidores de NADPH oxidasas y BCR-ABL sobre la viabilidad celular. Las células K562 se cultivaron a una densidad de 2×10^5 células/mL con imatinib 0,5 μ M, DPI 5 μ M o la combinación IM+DPI. La viabilidad de las células se analizó 48 horas después mediante citometría. A) Gráfica de puntos de un experimento representativo. B) Media \pm ESM del porcentaje de células de 3 experimentos diferentes.

Teniendo en cuenta todos estos resultados, y revisando el efecto que se describe en la literatura de estos inhibidores de BCR-ABL y NADPH oxidasas sobre las células, nuestra hipótesis para explicar el efecto del tratamiento combinado en la distribución de las fases del ciclo a los distintos tiempos y el aumento progresivo de células en fase sub G1 que provoca es la siguiente: cuando combinamos el imatinib con el DPI, el efecto del DPI, es decir, de la inhibición de la producción de ROS vía NADPH oxidasas, prevalecería en un primer ciclo celular (24 horas), provocando una parada de las células en el inicio de la mitosis. Este bloqueo en la fase M se acompañaría de un aumento del daño en el ADN. En un segundo ciclo (32 y 48H), el imatinib, que parece conducir las células a un estado de quiescencia en la fase G₁ (Wang et al., 2012) , superpondría su efecto, empujando a las células a la salida del bloqueo ejercido por el DPI y a la consecución de una mitosis “catastrófica” (Scaife, 2004), donde la gran cantidad de errores y roturas de doble hebra del DNA acumulados superaría la capacidad de reparación que poseen las células leucémicas, abocando estas células cancerosas a la apoptosis.

Por tanto, el bloqueo del ciclo celular, la generación de DSBs y la inducción de la apoptosis como respuesta obtenida a la inhibición de las NADPH oxidasas (con DPI) o a su combinación con la inhibición de BCR-ABL (imatinib+DPI), explicarían, junto con la inactivación de las rutas de señalización por la disminución de la producción de ROS, la fuerte disminución de la proliferación de las líneas celulares y de las CMNs de pacientes ejercida por los distintos tratamientos, descrita al principio de este capítulo.

11. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE NADPH OXIDASAS DE LAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA.

La mayoría de las células expresan varias NADPH oxidasas (revisado en Bedard and Krause, 2007), presentando patrones diferentes según el tipo celular. En base a esto podríamos pensar en dos opciones válidas respecto a esta familia de enzimas, ambas plausibles teniendo en cuenta la alta importancia de los ROS como segundos mensajeros: la primera sería la existencia de una redundancia de isoformas, de manera que si una de ellas no pudiera llevar a cabo su función, el resto fueran capaces de mantener los niveles de ROS intracelulares correspondientes, evitando cambios drásticos en las células, o bien, la segunda opción sería que las distintas isoformas presentaran una especificidad de función dentro de los distintos tipos celulares. Así, nos fijamos como último objetivo tratar de averiguar cuál de

estas dos hipótesis es correcta en nuestras células para evaluar si sería más apropiado utilizar como estrategia terapéutica en Leucemia mieloide crónica inhibidores globales de NADPH oxidasas o inhibidores específicos contra una determinada isoforma.

11.1. Análisis del patrón de expresión de la familia NADPH oxidasas en células K562 y células CMNs de médula osea de pacientes.

Para desarrollar este objetivo, analizamos en primer lugar, mediante PCR a tiempo real o cuantitativa (RT-qPCR) y utilizando oligonucleotidos específicos frente al ARNm de cada isoforma humana, el patrón particular de expresión de la familia NADPH oxidasa en la línea celular K562 y en las células mononucleadas de pacientes. Seguimos el método de la curva estándar (descrito en el capítulo II, 5.14), de manera que, a partir de una concentración de ADNc, obtenido mediante retrotranscripción del ARN, se realizaron diluciones seriadas, teniendo así varias concentraciones diferentes de partida para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con las que obtuvimos la recta patrón indicativa de la expresión de cada isoforma. Los puntos que forman esta recta son los ciclos umbral de amplificación (Ct) obtenidos para cada reacción de PCR, y por tanto para cada dilución, de manera que la pendiente de la recta va a señalar el intervalo de ciclos de PCR transcurridos entre el inicio de la amplificación de una concentración de ADNc y su dilución consecutiva. En nuestro caso, el factor de dilución utilizado es 1:5, por lo tanto, la isoforma que se esté expresando debe poseer una pendiente negativa muy cercana a 3,3, que serían el número de ciclos de amplificación necesarios para que la cantidad de ADN de partida se multiplicara por 5. Las curvas de amplificación, la recta estándar y las curvas de degradación obtenidas durante el estudio de las distintas NADPH oxidasas en la línea K562 quedan reflejadas en la figura IV-37 y IV-38.

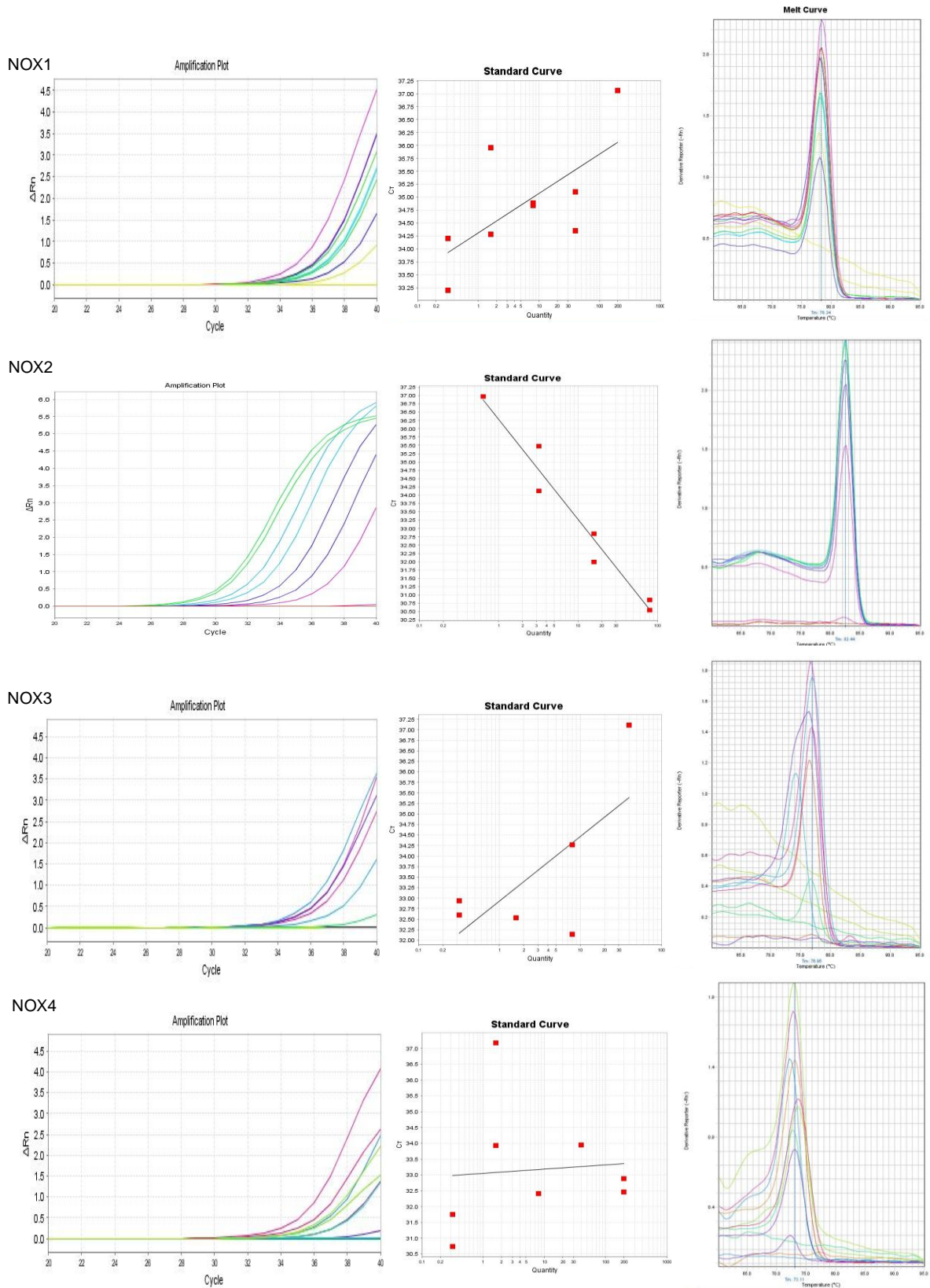


Figura IV-37. Análisis de la expresión de las 4 isoformas de la familia NADPH oxidasa

dependientes de la proteína reguladora $p22^{\text{phox}}$. Se analizó mediante RT-qPCR la expresión del ARNm de los distintos miembros de la familia NADPH oxidasas en la línea celular K562. Se muestra un ejemplo representativo para cada isoforma. De izquierda a derecha: curva de amplificación, recta estándar y curva de desnaturalización (en inglés, Melt curve).

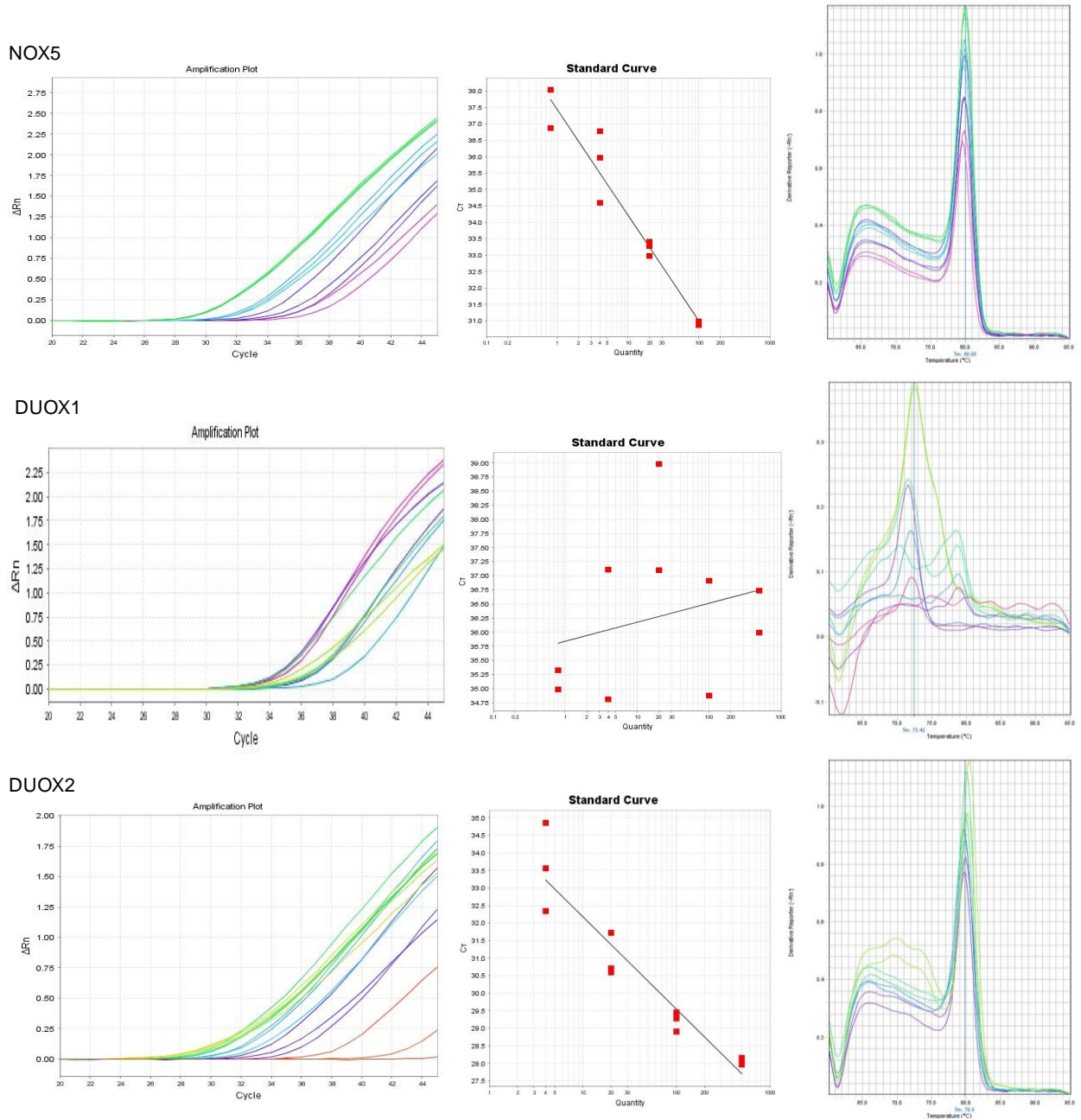


Figura IV-38. Análisis de la expresión de las 3 isoformas de la familia NADPH oxidasa dependientes de Ca^{2+} . Se analizó mediante RT-qPCR la expresión del ARNm de los distintos miembros de la familia NADPH oxidasas en la línea celular K562. Se muestra un ejemplo representativo para cada isoforma. De izquierda a derecha: curva de amplificación, recta estándar y curva de desnaturalización (en inglés, Melt curve).

Este análisis concluyó que las células K562 expresan 3 de los 7 miembros de la familia NADPH oxidasa: *NOX2*, *NOX5* y *DUOX2* (Figura IV-37 y IV-38). Un estudio posterior mediante el método comparativo Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (Schmittgen and Livak, 2008) manifestaba además una expresión diferencial de estas tres isoformas, siendo *NOX2* la más abundante, seguida de la expresión de *NOX5*, y por último, de *DUOX2* (Figura IV-39A). La superior expresión de *NOX2* frente a *NOX5* y *DUOX2* era esperable, ya que recordemos que es también conocida como la “oxidasa de fagocitos” y su presencia en leucocitos está ampliamente descrita (Revisado en Bedard and Krause, 2007) El mismo estudio se desarrollo para las células CMNs de médula osea en cuatro pacientes diferentes, obteniendo gráficas de amplificación muy similares a las mostradas para la línea celular K562 (Figura IV-37 y IV-38). *NOX2* y *NOX5* estaban expresadas en todos los individuos analizados, *DUOX1* o *DUOX2* se expresaban en tres de los cuatro pacientes, y tan solo uno de ellos expresaba *NOX3* (Figura IV-39B), siendo siempre *NOX2* la isoforma predominante.

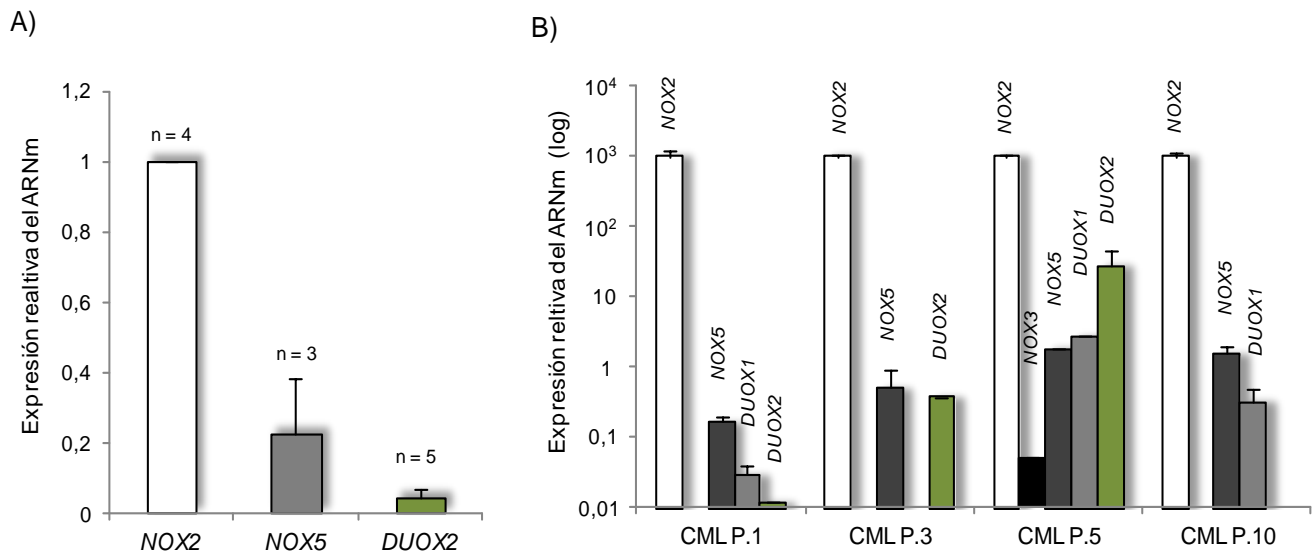


Figura IV-39. Patrón diferencial de expresión de la familia NADPH oxidasa en células K562 y células CMNs de médula osea de paciente. Se analizó mediante RT-qPCR la expresión del ARNm de los distintos miembros de la familia NADPH oxidasas en la línea celular K562 (A) y en CMNs procedentes de médula osea de pacientes con LMC (B). Los resultados se muestran como la media \pm ESM de varias PCRs (A) o como la media \pm ESM de reacciones en triplicado para cada paciente.

Por tanto, el patrón particular de expresión de las células CMNs de pacientes de LMC era muy similar al de la línea celular K562, lo que significa que las células K562 son un modelo

muy adecuado para estudiar la función de las NADPH oxidasas en leucemia mieloide crónica. Sorprendentemente, no se produce la expresión de NOX4 en ningún caso. Este dato nos pareció muy relevante ya que la expresión de esta isoforma ha sido descrita en varios tipos celulares hematopoyéticos (Guida et al., 2014; Zhang et al., 2013). De hecho, existe una publicación que señala directamente a NOX4 como la fuente de la producción de ROS inducida por BCR-ABL (Naughton et al., 2009), donde también nombran la existencia de expresión en células LMC de *NOX1*, si bien estos autores desarrollan su trabajo con una línea celular murina, similar a la línea celular Boff210 que nosotros hemos empleado en algunos experimentos, en lugar de humana. Reddy y colaboradores describen en un trabajo reciente (Reddy et al., 2010) el patrón de expresión de NADPH oxidasas en la línea celular humana KU812, positiva para *BCR-ABL*, donde determinan la expresión de *NOX2*, *NOX4* y *NOX5*. Además silencian cada isoforma mediante la interferencia del ARN y afirman que la inhibición de NOX4 no afecta a los niveles intracelulares de ROS pero si reduce significativamente el crecimiento y migración de estas células leucémicas. Sus resultados difieren en gran medida de los nuestros, ya que nosotros detectamos la expresión de *DUOX2* y no la de *NOX4*. La disparidad de nuestros trabajos podría ser debida a que su línea celular modelo deriva de la sangre periférica de un paciente con LMC, mientras que tanto las células K562 como las células CMNs de paciente proceden de médula osea. Además, a diferencia de estos autores, nosotros hemos analizado el patrón de expresión en pacientes y no hemos detectado *NOX4* en ninguno de los individuos.

11.2. Silenciamiento de las NADPH oxidasas expresadas en K562

Para comprobar como se veía afectada la señalización de BCR-ABL, y por ende la proliferación de las células K562 por las distintas NADPH oxidasas, generamos líneas estables mediante ARN de interferencia (RNAi) donde cada una de las NADPH oxidasas (*NOX2*, *NOX5* o *DUOX2*) estuviera silenciada, utilizando como control la interferencia del ARNm de la luciferasa de luciérnaga (K562 LUC). El silenciamiento fue analizando mediante RT-qPCR, comprobando como la expresión del ARNm de cada enzima había sido reducida en su línea celular correspondiente respecto a las células control LUC (Figura IV-40).

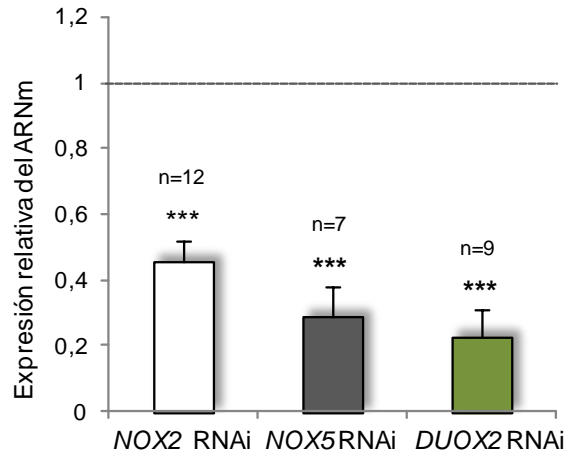


Figura IV-40. Análisis del silenciamiento de la expresión de *NOX2*, *NOX5* y *DUOX2* en células K562. Se analizó mediante RT-qPCR los niveles de expresión del ARNm de *NOX2*, *NOX5* y *DUOX2* en las líneas celulares generadas mediante interferencia del ARN (RNAi). Los resultados se muestran como la media \pm ESM. *** $p < 0,001$ refleja diferencias significativas de expresión respecto a las células control del silenciamiento K562 luciferasa (LUC). La línea discontinua de puntos representa la expresión de las distintas isoformas en dichas células control.

Una vez obtenidas las tres líneas de interferencia, estudiamos su clonogenicidad y observamos como la inhibición de la expresión de cualquiera de las tres NADPH oxidasas provocaba una reducción significativa de la capacidad de las células para formar colonias (Figura IV-41).

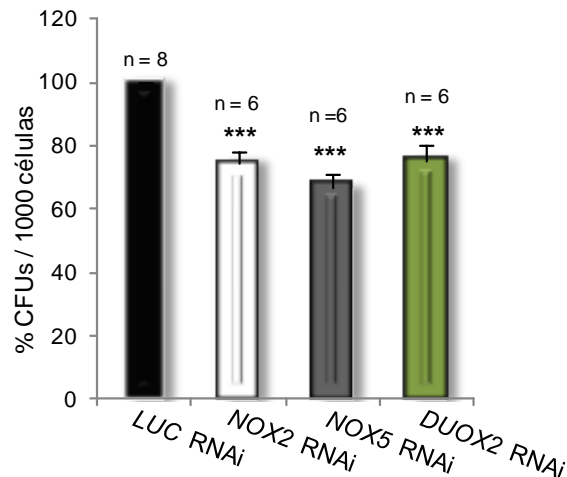


Figura IV-41. El silenciamiento de cualquiera de las NADPH oxidasas expresadas en K562 disminuye la capacidad de formación de colonias de las células. Se sembraron 1000 células de cada línea celular en medio semisólido de metilcelulosa y se contó el número de CFUs formadas después de 7 días. Los resultados se muestran como la media \pm ESM. *** $p < 0,001$ refleja diferencias significativas respecto a las células control del silenciamiento K562 luciferasa.

La señalización también se veía afectada por el silenciamiento de estas enzimas, detectando un descenso en los niveles de fosforilación tanto de BCR-ABL, como de sus dianas STAT5 y ERK1/2, y por tanto una menor activación de dichas proteínas (Figura IV-42).

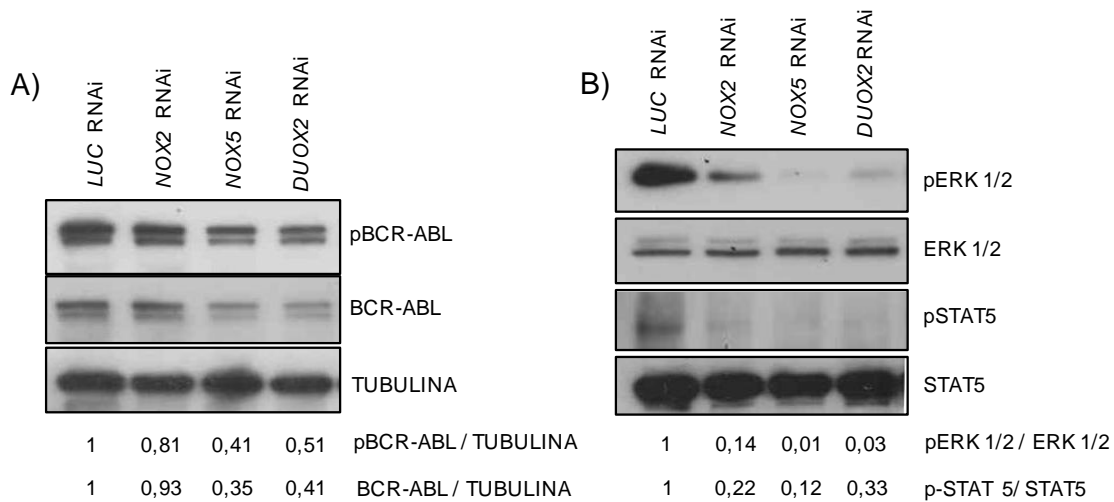


Figura IV-42. Análisis de los niveles de fosforilación de BCR-ABL, STAT5 y ERK1/2 mediante transferencia de western en células K562 con la actividad NADPH oxidasa silenciada mediante interferencia del ARN (RNAi). Se cultivaron las células K562 luciferasa (LUC), NOX2 RNAi, NOX5 RNAi y DUOX2 RNAi a una densidad de $3,5 \times 10^5$ células/mL durante 24 horas y se analizaron los niveles de pBCR-ABL y BCR-ABL, tomando como control de carga los niveles de la proteína tubulina (A) y los niveles de pERK1/2 y p-STAT5, empleando las mismas membranas para analizar los niveles totales de dichas proteínas (B). Se cargaron 40 μ g de proteínas por carril. Los números debajo de las cajas indican la cuantificación de las bandas.

El efecto del silenciamiento de *NOX2* captó nuestra atención, ya que pese a ser la isoforma más expresada en las células leucémicas, su inhibición tan solo reflejaba un ligero descenso en la activación de la quinasa BCR-ABL (Figura IV-42A), y sin embargo, sí suponía una fuerte disminución de la fosforilación de STAT5 y ERK1/2 (Figura IV-42B) y de la formación de colonias (Figura IV-41). Además, si nos fijamos en la cuantificación de las bandas especificada en la figura IV-42A Y IV-42B, el efecto sobre la activación de las rutas obtenido en la línea celular *NOX2* RNAi parecía menor que el obtenido para las líneas celulares *NOX5* y *DUOX2* RNAi. No obstante, en este caso, no podemos discriminar si esta diferencia cuantitativa observada respondía a una menor implicación de esta isoforma (*NOX2*) en la activación de estas rutas de señalización, o bien era debida a un menor porcentaje de *NOX2*

silenciada (55%) frente a las dos enzimas restantes en sus líneas correspondientes (70% para NOX5 y 75% para DUOX2) (figura IV-40).

En conjunto, estos resultados concordarían con una redundancia de función de las tres NADPH oxidasas expresadas por las células K562, al menos en lo relativo a señalización y clonogenicidad. Para corroborarlo, generamos con la misma metodología nuevas líneas K562 donde interferimos más de una isoforma al mismo tiempo, llevando a cabo todas las combinaciones posibles para las tres isoformas expresadas en LMC. Así obtuvimos cuatro nuevas líneas celulares donde se encontraban silenciadas: i) *NOX2* y *NOX5*; ii) *NOX2* y *DUOX2*; iii) *NOX5* y *DUOX2*; iv) *NOX2*, *NOX5* y *DUOX2* (Figura IV-43).

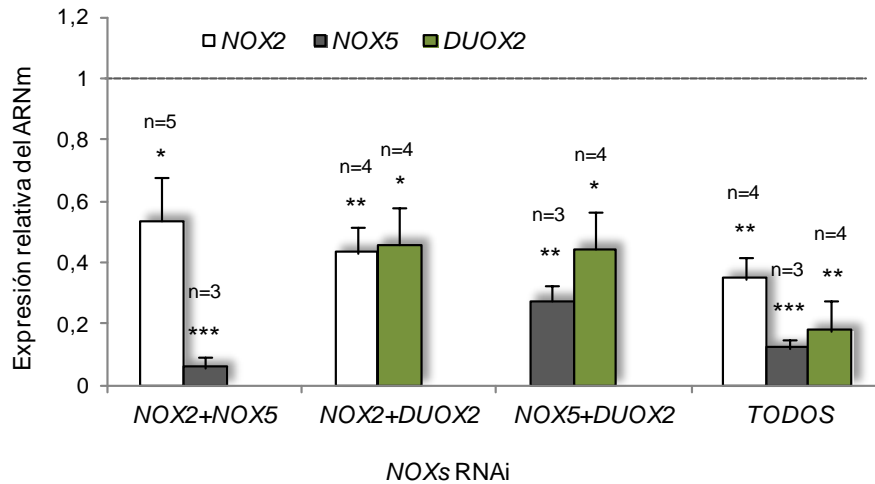


Figura IV-43. Análisis del silenciamiento múltiple de la expresión de *NOX2*, *NOX5* y *DUOX2* en células K562. Se analizaron mediante RT-qPCR los niveles de expresión del ARNm de *NOX2*, *NOX5* y *DUOX2* en las líneas celulares generadas mediante interferencia del ARN (RNAi). Los resultados se muestran como la media \pm ESM. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ reflejan diferencias significativas de expresión respecto a las células control del silenciamiento K562 luciferasa (LUC). La línea discontinua de puntos representa la expresión de las distintas isoformas en dichas células control.

Utilizando nuevamente como control las K562 Luciferasa (LUC), observamos como, efectivamente, la activación de BCR-ABL estaba mucho más comprometida en las células donde más de una isoforma NADPH oxidasa había sido silenciada que en las células que tenían bloqueada la expresión de NADPH oxidasas de manera individual (Figura IV-44A), sucediendo lo mismo con el estado activo de STAT5 (Figura IV-44B). Además, el

silenciamiento global de las tres isoformas expresadas en células K562 reflejaba un efecto ligeramente superior al del silenciamiento por parejas.

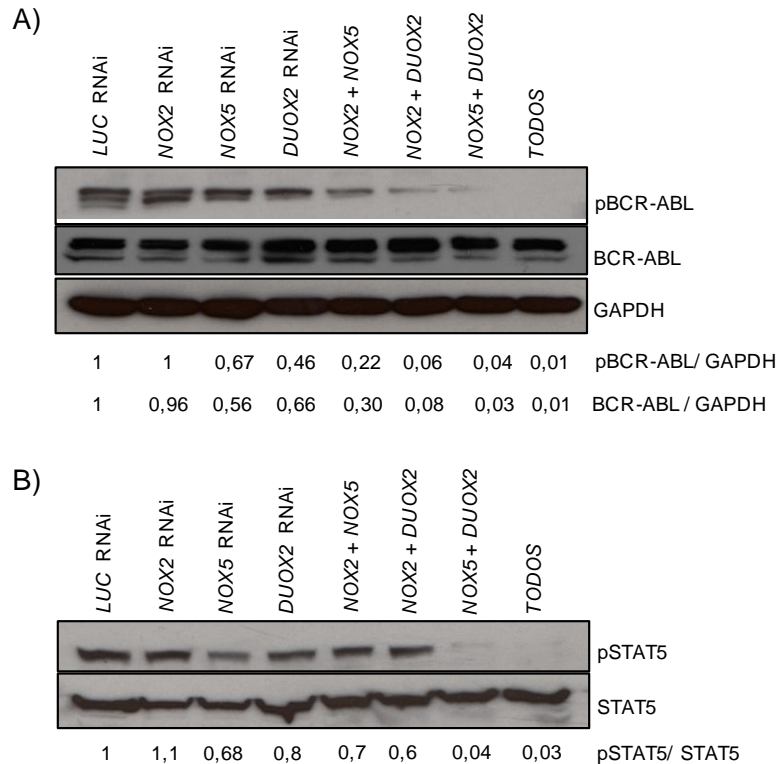


Figura IV-44. Análisis de los niveles de fosforilación de BCR-ABL y STAT5 mediante transferencia de western en células K562 con silenciamiento múltiple de NADPH oxidasas mediante interferencia del ARN (RNAi). Todas las líneas K562 generadas mediante interferencia del ARN para silenciar las distintas isoformas NADPH oxidasa se cultivaron a una densidad de $3,5 \times 10^5$ células/mL durante 24 horas y se analizaron los niveles de pBCR-ABL y BCR-ABL, tomando como control de carga los niveles de tubulina (A). Se analizaron también los niveles de pSTAT5, empleando las mismas membranas para analizar los niveles totales de dicha proteína (B). Se cargaron 40 μ g de proteínas por carril. Los números debajo de las cajas indican la cuantificación de las bandas.

Estos experimentos manifestaban que el mantenimiento de la activación de las rutas de señalización de BCR-ABL no recae en una única isoforma NADPH oxidasa, sino en el conjunto de miembros que las células expresan, lo que significa que, en leucemia mieloide crónica, el uso de inhibidores globales de NADPH oxidasas sería una estrategia terapéutica más adecuada y efectiva que el tratamiento con inhibidores específicos para las distintas isoformas de la familia.

En conjunto, todos los resultados descritos en este trabajo indican que las células leucémicas LMC dependen de la actividad NADPH oxidasa para su crecimiento y supervivencia, y que el

uso de inhibidores específicos para esta familia de enzimas, tanto de manera independiente, como en combinación con inhibidores de la oncoquinasa BCR-ABL, es una estrategia terapéutica efectiva y novedosa para combatir la leucemia mieloide crónica que podría mejorar en el futuro los resultados que se consiguen en los pacientes con la terapia tradicional.

CAPÍTULO V : CONCLUSIONES

1. El crecimiento de las células de leucemia mieloide crónica depende de la actividad NADPH oxidasa.
2. La combinación de la inhibición de las NADPH oxidasas con la inhibición de la oncoquinasa BCR-ABL impide la proliferación de las células leucémicas de manera sinérgica, lo que abre nuevas perspectivas terapéuticas para esta enfermedad.
3. El tratamiento de la leucemia mieloide crónica con inhibidores de NADPH oxidasas, tanto individualmente, como en combinación con inhibidores de la oncoquinasa BCR-ABL, es una estrategia terapéutica efectiva *in vivo*.
4. La tasa de proliferación de las células leucémicas está directamente relacionada con los niveles intracelulares de ROS presentes en dichas células.
5. La producción de ROS vía NADPH oxidasas es necesaria para el mantenimiento de la activación de las rutas de señalización iniciadas por la oncoquinasa BCR-ABL. La inhibición combinada de NADPH oxidasas y BCR-ABL provoca una mayor inactivación de la señalización.
6. Las NADPH oxidasas están implicadas en la estabilidad de BCR-ABL a nivel de proteína.
7. La PTP SHP1 es una de las fosfatasas responsables de la desfosforilación, y por tanto inactivación, de la oncoquinasa BCR-ABL. La disminución de las ROS mediante la inhibición de las NADPH oxidasas provoca un aumento de la actividad de SHP1.
8. La inhibición de las NADPH oxidasas provoca un fuerte bloqueo del ciclo celular en la fase de mitosis, aumentando el daño en el ADN, abocando las células a la apoptosis. El tratamiento combinado con inhibidores de NADPH oxidasas y BCR-ABL potencian el efecto apoptótico de los tratamientos individuales.
9. Los pacientes con leucemia mieloide crónica no expresan las isoformas *NOX1*, *NOX3* y *NOX4* de la familia NADPH oxidasa. La expresión de *NOX2* predomina en estas células.
10. La inhibición específica de cualquiera de las NADPH oxidasas expresadas en las células de leucemia mieloide aguda dificulta su crecimiento y disminuye la activación de las rutas de señalización de BCR-ABL.

11. El tratamiento con inhibidores globales de las NADPH oxidasas sería un tratamiento más eficaz que la inhibición específica de las distintas isoformas.

CAPÍTULO VI : BIBLIOGRAFÍA

- Abarikwu, S.O., Pant, A.B. & Farombi, E.O. 2012, "Dietary antioxidant, quercetin, protects sertoli-germ cell coculture from atrazine-induced oxidative damage", *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, vol. 26, no. 11, pp. 477-485.
- Adachi, T., Pimentel, D.R., Heibeck, T., Hou, X., Lee, Y.J., Jiang, B., Ido, Y. & Cohen, R.A. 2004, "S-glutathiolation of Ras mediates redox-sensitive signaling by angiotensin II in vascular smooth muscle cells", *The Journal of biological chemistry*, vol. 279, no. 28, pp. 29857-29862.
- Aldieri, E., Riganti, C., Polimeni, M., Gazzano, E., Lussiana, C., Campia, I. & Ghigo, D. 2008, "Classical inhibitors of NOX NAD(P)H oxidases are not specific", *Current Drug Metabolism*, vol. 9, no. 8, pp. 686-696.
- Allen, R.G. & Tresini, M. 2000, "Oxidative stress and gene regulation", *Free radical biology & medicine*, vol. 28, no. 3, pp. 463-499.
- Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J. & Mustelin, T. 2004, "Protein tyrosine phosphatases in the human genome", *Cell*, vol. 117, no. 6, pp. 699-711.
- Altenhofer, S., Kleikers, P.W., Radermacher, K.A., Scheurer, P., Rob Hermans, J.J., Schiffers, P., Ho, H., Wingler, K. & Schmidt, H.H. 2012, "The NOX toolbox: validating the role of NADPH oxidases in physiology and disease", *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, vol. 69, no. 14, pp. 2327-2343.
- Altman, B.J., Jacobs, S.R., Mason, E.F., Michalek, R.D., MacIntyre, A.N., Coloff, J.L., Ilkayeva, O., Jia, W., He, Y.W. & Rathmell, J.C. 2011, "Autophagy is essential to suppress cell stress and to allow BCR-Abl-mediated leukemogenesis", *Oncogene*, vol. 30, no. 16, pp. 1855-1867.
- Ameziane-El-Hassani, R., Morand, S., Boucher, J.L., Frapart, Y.M., Apostolou, D., Agnandji, D., Gnidehou, S., Ohayon, R., Noel-Hudson, M.S., Francon, J., Lalaoui, K., Virion, A. & Dupuy, C. 2005, "Dual oxidase-2 has an intrinsic Ca²⁺-dependent H₂O₂-generating activity", *The Journal of biological chemistry*, vol. 280, no. 34, pp. 30046-30054.
- Amin, H.M., Hoshino, K., Yang, H., Lin, Q., Lai, R. & Garcia-Manero, G. 2007, "Decreased expression level of SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase-1 (Shp1) is associated with progression of chronic myeloid leukaemia", *The Journal of pathology*, vol. 212, no. 4, pp. 402-410.
- Anilkumar, N., San Jose, G., Sawyer, I., Santos, C.X., Sand, C., Brewer, A.C., Warren, D. & Shah, A.M. 2013, "A 28-kDa splice variant of NADPH oxidase-4 is nuclear-localized and involved in redox signaling in vascular cells", *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 33, no. 4, pp. e104-112.
- Anrather, J., Racchumi, G. & Iadecola, C. 2006, "NF-kappaB regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91phox", *The Journal of biological chemistry*, vol. 281, no. 9, pp. 5657-5667.
- Apperley, J.F. 2007, "Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia", *The lancet oncology*, vol. 8, no. 11, pp. 1018-1029.
- Arribas, J.R. 2009, "Drugs in traditional drug classes (nucleoside reverse transcriptase inhibitor/nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor/protease inhibitors) with activity against drug-resistant virus (tipranavir, darunavir, etravirine)", *Current opinion in HIV and AIDS*, vol. 4, no. 6, pp. 507-512.

- Babior, B.M., Kipnes, R.S. & Curnutte, J.T. 1973, "Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent", *The Journal of clinical investigation*, vol. 52, no. 3, pp. 741-744.
- Baehner, R.L. & Nathan, D.G. 1967, "Leukocyte oxidase: defective activity in chronic granulomatous disease", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 155, no. 3764, pp. 835-836.
- Banfi, B., Clark, R.A., Steger, K. & Krause, K.H. 2003, "Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1", *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 6, pp. 3510-3513.
- Banfi, B., Malgrange, B., Knisz, J., Steger, K., Dubois-Dauphin, M. & Krause, K.H. 2004, "NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear", *The Journal of biological chemistry*, vol. 279, no. 44, pp. 46065-46072.
- Banfi, B., Maturana, A., Jaconi, S., Arnaudeau, S., Laforge, T., Sinha, B., Ligeti, E., Demaurex, N. & Krause, K.H. 2000, "A mammalian H⁺ channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOH-1", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 287, no. 5450, pp. 138-142.
- Banfi, B., Molnar, G., Maturana, A., Steger, K., Hegedus, B., Demaurex, N. & Krause, K.H. 2001, "A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes", *The Journal of biological chemistry*, vol. 276, no. 40, pp. 37594-37601.
- Bartram, C.R., de Klein, A., Hagemeijer, A., van Agthoven, T., Geurts van Kessel, A., Bootsma, D., Grosveld, G., Ferguson-Smith, M.A., Davies, T. & Stone, M. 1983, "Translocation of c-ab1 oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia", *Nature*, vol. 306, no. 5940, pp. 277-280.
- Beckman, K.B. & Ames, B.N. 1998, "The free radical theory of aging matures", *Physiological Reviews*, vol. 78, no. 2, pp. 547-581.
- Bedard, K. & Krause, K.H. 2007, "The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology", *Physiological Reviews*, vol. 87, no. 1, pp. 245-313.
- Bedi, A., Zehnbauser, B.A., Barber, J.P., Sharkis, S.J. & Jones, R.J. 1994, "Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia", *Blood*, vol. 83, no. 8, pp. 2038-2044.
- Behrend, L., Henderson, G. & Zwacka, R.M. 2003, "Reactive oxygen species in oncogenic transformation", *Biochemical Society transactions*, vol. 31, no. Pt 6, pp. 1441-1444.
- Bei, L., Lu, Y. & Eklund, E.A. 2005, "HOXA9 activates transcription of the gene encoding gp91Phox during myeloid differentiation", *The Journal of biological chemistry*, vol. 280, no. 13, pp. 12359-12370.
- Bender, J.G., Unverzagt, K., Walker, D.E., Lee, W., Smith, S., Williams, S. & Van Epps, D.E. 1994, "Phenotypic analysis and characterization of CD34⁺ cells from normal human bone marrow, cord blood, peripheral blood, and mobilized peripheral blood from patients undergoing autologous stem cell transplantation", *Clinical immunology and immunopathology*, vol. 70, no. 1, pp. 10-18.
- Bernt, K.M. & Hunger, S.P. 2014, "Current Concepts in Pediatric Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia", *Frontiers in oncology*, vol. 4, pp. 54.
- Bhatia, R., Holtz, M., Niu, N., Gray, R., Snyder, D.S., Sawyers, C.L., Arber, D.A., Slovak, M.L. & Forman, S.J. 2003, "Persistence of malignant hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission following imatinib mesylate treatment", *Blood*, vol. 101, no. 12, pp. 4701-4707.

- Bjornstedt, M., Xue, J., Huang, W., Akesson, B. & Holmgren, A. 1994, "The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase", *The Journal of biological chemistry*, vol. 269, no. 47, pp. 29382-29384.
- Bocchia, M., Ippoliti, M., Gozzetti, A., Abruzzese, E., Calabrese, S., Amabile, M., Pirrotta, M.T., Crupi, R., Tozzuoli, D., Trawinska, M.M., Defina, M., Martinelli, G. & Lauria, F. 2008, "CD34+/Ph+ cells are still detectable in chronic myeloid leukemia patients with sustained and prolonged complete cytogenetic remission during treatment with imatinib mesylate", *Leukemia*, vol. 22, no. 2, pp. 426-428.
- Boveris, A., Oshino, N. & Chance, B. 1972, "The cellular production of hydrogen peroxide", *The Biochemical journal*, vol. 128, no. 3, pp. 617-630.
- Bradford, M.M. 1976, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical Biochemistry*, vol. 72, pp. 248-254.
- Brar, S.S., Corbin, Z., Kennedy, T.P., Hemendinger, R., Thornton, L., Bommarius, B., Arnold, R.S., Whorton, A.R., Sturrock, A.B., Huecksteadt, T.P., Quinn, M.T., Krenitsky, K., Ardie, K.G., Lambeth, J.D. & Hoidal, J.R. 2003, "NOX5 NAD(P)H oxidase regulates growth and apoptosis in DU 145 prostate cancer cells", *American journal of physiology. Cell physiology*, vol. 285, no. 2, pp. C353-69.
- Brewer, A.C., Sparks, E.C. & Shah, A.M. 2006, "Transcriptional regulation of the NADPH oxidase isoform, Nox1, in colon epithelial cells: role of GATA-binding factor(s)", *Free radical biology & medicine*, vol. 40, no. 2, pp. 260-274.
- Brown, D.I. & Griending, K.K. 2009, "Nox proteins in signal transduction", *Free radical biology & medicine*, vol. 47, no. 9, pp. 1239-1253.
- Bruns, I., Czibere, A., Fischer, J.C., Roels, F., Cadeddu, R.P., Buest, S., Bruennert, D., Huenerlituerkoglu, A.N., Stoecklein, N.H., Singh, R., Zerbini, L.F., Jager, M., Kobbe, G., Gattermann, N., Kronenwett, R., Brors, B. & Haas, R. 2009, "The hematopoietic stem cell in chronic phase CML is characterized by a transcriptional profile resembling normal myeloid progenitor cells and reflecting loss of quiescence", *Leukemia*, vol. 23, no. 5, pp. 892-899.
- Bubici, C., Papa, S., Dean, K. & Franzoso, G. 2006, "Mutual cross-talk between reactive oxygen species and nuclear factor-kappa B: molecular basis and biological significance", *Oncogene*, vol. 25, no. 51, pp. 6731-6748.
- Buggisch, M., Ateghang, B., Ruhe, C., Strobel, C., Lange, S., Wartenberg, M. & Sauer, H. 2007, "Stimulation of ES-cell-derived cardiomyogenesis and neonatal cardiac cell proliferation by reactive oxygen species and NADPH oxidase", *Journal of cell science*, vol. 120, no. Pt 5, pp. 885-894.
- Burdon, R.H., Gill, V. & Rice-Evans, C. 1989, "Cell proliferation and oxidative stress", *Free radical research communications*, vol. 7, no. 3-6, pp. 149-159.
- Burek, C.L. & Rose, N.R. 2008, "Autoimmune thyroiditis and ROS", *Autoimmunity reviews*, vol. 7, no. 7, pp. 530-537.
- Burhans, W.C. & Heintz, N.H. 2009, "The cell cycle is a redox cycle: linking phase-specific targets to cell fate", *Free radical biology & medicine*, vol. 47, no. 9, pp. 1282-1293.
- Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A. & Chen, D.J. 2001, "ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks", *The Journal of biological chemistry*, vol. 276, no. 45, pp. 42462-42467.

- Buzek, J., Latonen, L., Kurki, S., Peltonen, K. & Laiho, M. 2002, "Redox state of tumor suppressor p53 regulates its sequence-specific DNA binding in DNA-damaged cells by cysteine 277", *Nucleic acids research*, vol. 30, no. 11, pp. 2340-2348.
- Calabretta, B. & Perrotti, D. 2004, "The biology of CML blast crisis", *Blood*, vol. 103, no. 11, pp. 4010-4022.
- Carew, J.S., Nawrocki, S.T., Giles, F.J. & Cleveland, J.L. 2008, "Targeting autophagy: a novel anticancer strategy with therapeutic implications for imatinib resistance", *Biologics : targets & therapy*, vol. 2, no. 2, pp. 201-204.
- Case, A.J., Li, S., Basu, U., Tian, J. & Zimmerman, M.C. 2013, "Mitochondrial-localized NADPH oxidase 4 is a source of superoxide in angiotensin II-stimulated neurons", *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, vol. 305, no. 1, pp. H19-28.
- Champlin, R.E. & Golde, D.W. 1985, "Chronic myelogenous leukemia: recent advances", *Blood*, vol. 65, no. 5, pp. 1039-1047.
- Chen, J., Yu, W.M., Daino, H., Broxmeyer, H.E., Druker, B.J. & Qu, C.K. 2007, "SHP-2 phosphatase is required for hematopoietic cell transformation by Bcr-Abl", *Blood*, vol. 109, no. 2, pp. 778-785.
- Cheng, G., Cao, Z., Xu, X., van Meir, E.G. & Lambeth, J.D. 2001, "Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5", *Gene*, vol. 269, no. 1-2, pp. 131-140.
- Choi, H.K., Kim, T.H., Jhon, G.J. & Lee, S.Y. 2011, "Reactive oxygen species regulate M-CSF-induced monocyte/macrophage proliferation through SHP1 oxidation", *Cellular signalling*, vol. 23, no. 10, pp. 1633-1639.
- Chou, T.C. 2010, "Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method", *Cancer research*, vol. 70, no. 2, pp. 440-446.
- Chou, T.C. 2006, "Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies", *Pharmacological reviews*, vol. 58, no. 3, pp. 621-681.
- Chou, T.C. & Talalay, P. 1984, "Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors", *Advances in Enzyme Regulation*, vol. 22, pp. 27-55.
- Chou, W.C. & Dang, C.V. 2005, "Acute promyelocytic leukemia: recent advances in therapy and molecular basis of response to arsenic therapies", *Current opinion in hematology*, vol. 12, no. 1, pp. 1-6.
- Chou, W.C., Jie, C., Kenedy, A.A., Jones, R.J., Trush, M.A. & Dang, C.V. 2004, "Role of NADPH oxidase in arsenic-induced reactive oxygen species formation and cytotoxicity in myeloid leukemia cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 13, pp. 4578-4583.
- Cilloni, D. & Saglio, G. 2012, "Molecular pathways: BCR-ABL", *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 18, no. 4, pp. 930-937.
- Clark, S.S., Crist, W.M. & Witte, O.N. 1989, "Molecular pathogenesis of Ph-positive leukemias", *Annual Review of Medicine*, vol. 40, pp. 113-122.
- Corbin, A.S., Agarwal, A., Loriaux, M., Cortes, J., Deininger, M.W. & Druker, B.J. 2011, "Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity", *The Journal of clinical investigation*, vol. 121, no. 1, pp. 396-409.

- Corcoran, A. & Cotter, T.G. 2013, "Redox regulation of protein kinases", *The FEBS journal*, vol. 280, no. 9, pp. 1944-1965.
- Cortes, J., O'Brien, S. & Kantarjian, H. 2004, "Discontinuation of imatinib therapy after achieving a molecular response", *Blood*, vol. 104, no. 7, pp. 2204-2205.
- Cross, J.V. & Templeton, D.J. 2004, "Oxidative stress inhibits MEKK1 by site-specific glutathionylation in the ATP-binding domain", *The Biochemical journal*, vol. 381, no. Pt 3, pp. 675-683.
- Czech, M.P., Lawrence, J.C., Jr & Lynn, W.S. 1974, "Evidence for the involvement of sulfhydryl oxidation in the regulation of fat cell hexose transport by insulin", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 71, no. 10, pp. 4173-4177.
- Daiyasu, H. & Toh, H. 2000, "Molecular evolution of the myeloperoxidase family", *Journal of Molecular Evolution*, vol. 51, no. 5, pp. 433-445.
- Das, D.K. 2004, "Thioredoxin regulation of ischemic preconditioning", *Antioxidants & redox signaling*, vol. 6, no. 2, pp. 405-412.
- De Deken, X., Wang, D., Dumont, J.E. & Miot, F. 2002, "Characterization of ThOX proteins as components of the thyroid H(2)O(2)-generating system", *Experimental cell research*, vol. 273, no. 2, pp. 187-196.
- De Deken, X., Wang, D., Many, M.C., Costagliola, S., Libert, F., Vassart, G., Dumont, J.E. & Miot, F. 2000, "Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family", *The Journal of biological chemistry*, vol. 275, no. 30, pp. 23227-23233.
- de Groot, R.P., Raaijmakers, J.A., Lammers, J.W. & Koenderman, L. 2000, "STAT5-Dependent CyclinD1 and Bcl-xL expression in Bcr-Abl-transformed cells", *Molecular cell biology research communications : MCBRC*, vol. 3, no. 5, pp. 299-305.
- Deadman, B.J., Hopkin, M.D., Baxendale, I.R. & Ley, S.V. 2013, "The synthesis of Bcr-Abl inhibiting anticancer pharmaceutical agents imatinib, nilotinib and dasatinib", *Organic & biomolecular chemistry*, vol. 11, no. 11, pp. 1766-1800.
- Deininger, M.W., Goldman, J.M. & Melo, J.V. 2000, "The molecular biology of chronic myeloid leukemia", *Blood*, vol. 96, no. 10, pp. 3343-3356.
- Diehl, J.A., Cheng, M., Roussel, M.F. & Sherr, C.J. 1998, "Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization", *Genes & development*, vol. 12, no. 22, pp. 3499-3511.
- Dong, J.M. & Chen, P.J. 2013, "Research on the mechanism and regulation of overtraining-related the function of neutrophils by the inhibitor of NADPH oxidase and glutamine supplementation", *Zhongguo ying yong sheng li xue za zhi = Zhongguo yingyong shenglixue zazhi = Chinese journal of applied physiology*, vol. 29, no. 4, pp. 339-344.
- Doroshov, J.H., Gaur, S., Markel, S., Lu, J., van Balgooy, J., Synold, T.W., Xi, B., Wu, X. & Juhasz, A. 2013, "Effects of iodonium-class flavin dehydrogenase inhibitors on growth, reactive oxygen production, cell cycle progression, NADPH oxidase 1 levels, and gene expression in human colon cancer cells and xenografts", *Free radical biology & medicine*, vol. 57, pp. 162-175.
- Doyle, K. & Fitzpatrick, F.A. 2010, "Redox signaling, alkylation (carbonylation) of conserved cysteines inactivates class I histone deacetylases 1, 2, and 3 and antagonizes their transcriptional repressor function", *The Journal of biological chemistry*, vol. 285, no. 23, pp. 17417-17424.

- Druker, B.J., Guilhot, F., O'Brien, S.G., Gathmann, I., Kantarjian, H., Gattermann, N., Deininger, M.W., Silver, R.T., Goldman, J.M., Stone, R.M., Cervantes, F., Hochhaus, A., Powell, B.L., Gabrilove, J.L., Rousset, P., Reiffers, J., Cornelissen, J.J., Hughes, T., Agis, H., Fischer, T., Verhoef, G., Shepherd, J., Saglio, G., Gratwohl, A., Nielsen, J.L., Radich, J.P., Simonsson, B., Taylor, K., Baccarani, M., So, C., Letvak, L., Larson, R.A. & IRIS Investigators 2006, "Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia", *The New England journal of medicine*, vol. 355, no. 23, pp. 2408-2417.
- Drummond, G.R., Selemidis, S., Griendling, K.K. & Sobey, C.G. 2011, "Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets", *Nature reviews. Drug discovery*, vol. 10, no. 6, pp. 453-471.
- Edens, W.A., Sharling, L., Cheng, G., Shapira, R., Kinkade, J.M., Lee, T., Edens, H.A., Tang, X., Sullards, C., Flaherty, D.B., Benian, G.M. & Lambeth, J.D. 2001, "Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/oxidoreductase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox", *The Journal of cell biology*, vol. 154, no. 4, pp. 879-891.
- Eklund, E.A., Luo, W. & Skalnik, D.G. 1996, "Characterization of three promoter elements and cognate DNA binding protein(s) necessary for IFN-gamma induction of gp91-phox transcription", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 157, no. 6, pp. 2418-2429.
- El Hassani, R.A., Benfares, N., Caillou, B., Talbot, M., Sabourin, J.C., Belotte, V., Morand, S., Gnidehou, S., Agnandji, D., Ohayon, R., Kaniewski, J., Noel-Hudson, M.S., Bidart, J.M., Schlumberger, M., Virion, A. & Dupuy, C. 2005, "Dual oxidase2 is expressed all along the digestive tract", *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, vol. 288, no. 5, pp. G933-42.
- Elzinga, B.M., Nyhan, M.J., Crowley, L.C., O'Donovan, T.R., Cahill, M.R. & McKenna, S.L. 2013, "Induction of autophagy by Imatinib sequesters Bcr-Abl in autophagosomes and down-regulates Bcr-Abl protein", *American Journal of Hematology*, vol. 88, no. 6, pp. 455-462.
- Engler, J.R., Frede, A., Saunders, V.A., Zannettino, A.C., Hughes, T.P. & White, D.L. 2010, "Chronic myeloid leukemia CD34+ cells have reduced uptake of imatinib due to low OCT-1 activity", *Leukemia*, vol. 24, no. 4, pp. 765-770.
- Esposito, N., Colavita, I., Quintarelli, C., Sica, A.R., Peluso, A.L., Luciano, L., Picardi, M., Del Vecchio, L., Buonomo, T., Hughes, T.P., White, D., Radich, J.P., Russo, D., Branford, S., Saglio, G., Melo, J.V., Martinelli, R., Ruoppolo, M., Kalebic, T., Martinelli, G. & Pane, F. 2011, "SHP-1 expression accounts for resistance to imatinib treatment in Philadelphia chromosome-positive cells derived from patients with chronic myeloid leukemia", *Blood*, vol. 118, no. 13, pp. 3634-3644.
- Fan, C.Y., Katsuyama, M. & Yabe-Nishimura, C. 2005, "PKCdelta mediates up-regulation of NOX1, a catalytic subunit of NADPH oxidase, via transactivation of the EGF receptor: possible involvement of PKCdelta in vascular hypertrophy", *The Biochemical journal*, vol. 390, no. Pt 3, pp. 761-767.
- Finch, J.S., Tome, M.E., Kwei, K.A. & Bowden, G.T. 2006, "Catalase reverses tumorigenicity in a malignant cell line by an epidermal growth factor receptor pathway", *Free radical biology & medicine*, vol. 40, no. 5, pp. 863-875.
- Fink, K., Martin, L., Mukawera, E., Chartier, S., De Deken, X., Brochiero, E., Miot, F. & Grandvaux, N. 2013, "IFNbeta/TNFalpha synergism induces a non-canonical STAT2/IRF9-dependent pathway triggering a novel DUOX2 NADPH oxidase-mediated airway antiviral response", *Cell research*, vol. 23, no. 5, pp. 673-690.
- Finnegan, S., Mackey, A.M. & Cotter, T.G. 2010, "A stress survival response in retinal cells mediated through inhibition of the serine/threonine phosphatase PP2A", *The European journal of neuroscience*, vol. 32, no. 3, pp. 322-334.

- Foley, T.D., Petro, L.A., Stredny, C.M. & Coppa, T.M. 2007, "Oxidative inhibition of protein phosphatase 2A activity: role of catalytic subunit disulfides", *Neurochemical research*, vol. 32, no. 11, pp. 1957-1964.
- Foroni, L., Gerrard, G., Nna, E., Khorashad, J.S., Stevens, D., Swale, B., Milojkovic, D., Reid, A., Goldman, J. & Marin, D. 2009, "Technical aspects and clinical applications of measuring BCR-ABL1 transcripts number in chronic myeloid leukemia", *American Journal of Hematology*, vol. 84, no. 8, pp. 517-522.
- Forteza, R., Salathe, M., Miot, F., Forteza, R. & Conner, G.E. 2005, "Regulated hydrogen peroxide production by Duox in human airway epithelial cells", *American journal of respiratory cell and molecular biology*, vol. 32, no. 5, pp. 462-469.
- Fox, G.C., Shafiq, M., Briggs, D.C., Knowles, P.P., Collister, M., Didmon, M.J., Makrantonis, V., Dickinson, R.J., Hanrahan, S., Totty, N., Stark, M.J., Keyse, S.M. & McDonald, N.Q. 2007, "Redox-mediated substrate recognition by Sdp1 defines a new group of tyrosine phosphatases", *Nature*, vol. 447, no. 7143, pp. 487-492.
- Franken, N.A., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J. & van Bree, C. 2006, "Clonogenic assay of cells in vitro", *Nature protocols*, vol. 1, no. 5, pp. 2315-2319.
- Fu, X., Beer, D.G., Behar, J., Wands, J., Lambeth, D. & Cao, W. 2006, "cAMP-response element-binding protein mediates acid-induced NADPH oxidase NOX5-S expression in Barrett esophageal adenocarcinoma cells", *The Journal of biological chemistry*, vol. 281, no. 29, pp. 20368-20382.
- Fukuyama, M., Rokutan, K., Sano, T., Miyake, H., Shimada, M. & Tashiro, S. 2005, "Overexpression of a novel superoxide-producing enzyme, NADPH oxidase 1, in adenoma and well differentiated adenocarcinoma of the human colon", *Cancer letters*, vol. 221, no. 1, pp. 97-104.
- Funato, Y. & Miki, H. 2007, "Nucleoredoxin, a novel thioredoxin family member involved in cell growth and differentiation", *Antioxidants & redox signaling*, vol. 9, no. 8, pp. 1035-1057.
- Gatley, S.J. & Sherratt, S.A. 1976, "The effects of diphenyliodonium on mitochondrial reactions. Relation of binding of diphenylene[125I]iodonium to mitochondria to the extent of inhibition of oxygen uptake", *The Biochemical journal*, vol. 158, no. 2, pp. 307-315.
- Geiszt, M., Kopp, J.B., Varnai, P. & Leto, T.L. 2000, "Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 14, pp. 8010-8014.
- Geiszt, M., Lekstrom, K., Brenner, S., Hewitt, S.M., Dana, R., Malech, H.L. & Leto, T.L. 2003, "NAD(P)H oxidase 1, a product of differentiated colon epithelial cells, can partially replace glycoprotein 91phox in the regulated production of superoxide by phagocytes", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 171, no. 1, pp. 299-306.
- Geiszt, M., Lekstrom, K., Witta, J. & Leto, T.L. 2003, "Proteins homologous to p47phox and p67phox support superoxide production by NAD(P)H oxidase 1 in colon epithelial cells", *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 22, pp. 20006-20012.
- Geiszt, M., Witta, J., Baffi, J., Lekstrom, K. & Leto, T.L. 2003, "Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense", *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 17, no. 11, pp. 1502-1504.
- Genestra, M. 2007, "Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants", *Cellular signalling*, vol. 19, no. 9, pp. 1807-1819.

- Gesbert, F. & Griffin, J.D. 2000, "Bcr/Abl activates transcription of the Bcl-X gene through STAT5", *Blood*, vol. 96, no. 6, pp. 2269-2276.
- Ghaffari, S., Daley, G.Q. & Lodish, H.F. 1999, "Growth factor independence and BCR/ABL transformation: promise and pitfalls of murine model systems and assays", *Leukemia*, vol. 13, no. 8, pp. 1200-1206.
- Giannoni, E., Buricchi, F., Grimaldi, G., Parri, M., Cialdai, F., Taddei, M.L., Raugei, G., Ramponi, G. & Chiarugi, P. 2008, "Redox regulation of anoikis: reactive oxygen species as essential mediators of cell survival", *Cell death and differentiation*, vol. 15, no. 5, pp. 867-878.
- Giannoni, E., Taddei, M.L. & Chiarugi, P. 2010, "Src redox regulation: again in the front line", *Free radical biology & medicine*, vol. 49, no. 4, pp. 516-527.
- Gius, D. & Spitz, D.R. 2006, "Redox signaling in cancer biology", *Antioxidants & redox signaling*, vol. 8, no. 7-8, pp. 1249-1252.
- Glebov, O.K., Rodriguez, L.M., Nakahara, K., Jenkins, J., Cliatt, J., Humbyrd, C.J., DeNobile, J., Soballe, P., Simon, R., Wright, G., Lynch, P., Patterson, S., Lynch, H., Gallinger, S., Buchbinder, A., Gordon, G., Hawk, E. & Kirsch, I.R. 2003, "Distinguishing right from left colon by the pattern of gene expression", *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, vol. 12, no. 8, pp. 755-762.
- Goldstone, S.D., Milligan, A.D. & Hunt, N.H. 1996, "Oxidative signalling and gene expression during lymphocyte activation", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1314, no. 1-2, pp. 175-182.
- Gomez, L.D., Noctor, G., Knight, M.R. & Foyer, C.H. 2004, "Regulation of calcium signalling and gene expression by glutathione", *Journal of experimental botany*, vol. 55, no. 404, pp. 1851-1859.
- Gorre, M.E., Mohammed, M., Ellwood, K., Hsu, N., Paquette, R., Rao, P.N. & Sawyers, C.L. 2001, "Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 293, no. 5531, pp. 876-880.
- Graham, K.A., Kulawiec, M., Owens, K.M., Li, X., Desouki, M.M., Chandra, D. & Singh, K.K. 2010, "NADPH oxidase 4 is an oncoprotein localized to mitochondria", *Cancer biology & therapy*, vol. 10, no. 3, pp. 223-231.
- Grasberger, H. & Refetoff, S. 2006, "Identification of the maturation factor for dual oxidase. Evolution of an eukaryotic operon equivalent", *The Journal of biological chemistry*, vol. 281, no. 27, pp. 18269-18272.
- Grineva, N.I., Duchovensky, E.A., Timofeev, A.M., Akhlylina, T.V., Gerasimova, L.P., Borovkova, T.V., Schmarov, D.A., Sarycheva, N.G., Naydenova, N.M., Gavrichkova, A.R., Kolosova, L.Y., Kolosheynova, T.I. & Kovaleva, L.G. 2012, "Gene Expression upon Proliferation and Differentiation of Hematopoietic Cells with Ph Chromosome ex vivo", *Acta naturae*, vol. 4, no. 3, pp. 95-114.
- Groffen, J., Stephenson, J.R., Heisterkamp, N., de Klein, A., Bartram, C.R. & Grosveld, G. 1984, "Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22", *Cell*, vol. 36, no. 1, pp. 93-99.
- Gutierrez-Berzal, J., Castellano, E., Martin-Encabo, S., Gutierrez-Cianca, N., Hernandez, J.M., Santos, E. & Guerrero, C. 2006, "Characterization of p87C3G, a novel, truncated C3G isoform that is overexpressed in chronic myeloid leukemia and interacts with Bcr-Abl", *Experimental cell research*, vol. 312, no. 6, pp. 938-948.

- Haddad, J.J., Olver, R.E. & Land, S.C. 2000, "Antioxidant/pro-oxidant equilibrium regulates HIF-1 α and NF- κ B redox sensitivity. Evidence for inhibition by glutathione oxidation in alveolar epithelial cells", *The Journal of biological chemistry*, vol. 275, no. 28, pp. 21130-21139.
- Hainaut, P. & Milner, J. 1993, "Redox modulation of p53 conformation and sequence-specific DNA binding in vitro", *Cancer research*, vol. 53, no. 19, pp. 4469-4473.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. & Cross, C.E. 1992, "Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?", *The Journal of laboratory and clinical medicine*, vol. 119, no. 6, pp. 598-620.
- Harper, R.W., Xu, C., Eiserich, J.P., Chen, Y., Kao, C.Y., Thai, P., Setiadi, H. & Wu, R. 2005, "Differential regulation of dual NADPH oxidases/peroxidases, Duox1 and Duox2, by Th1 and Th2 cytokines in respiratory tract epithelium", *FEBS letters*, vol. 579, no. 21, pp. 4911-4917.
- Hayes, P. & Knaus, U.G. 2013, "Balancing reactive oxygen species in the epigenome: NADPH oxidases as target and perpetrator", *Antioxidants & redox signaling*, vol. 18, no. 15, pp. 1937-1945.
- Hazlehurst, L.A., Bewry, N.N., Nair, R.R. & Pinilla-Ibarz, J. 2009, "Signaling networks associated with BCR-ABL-dependent transformation", *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center*, vol. 16, no. 2, pp. 100-107.
- Heisterkamp, N., Jenster, G., ten Hoeve, J., Zovich, D., Pattengale, P.K. & Groffen, J. 1990, "Acute leukaemia in bcr/abl transgenic mice", *Nature*, vol. 344, no. 6263, pp. 251-253.
- Hellmuth, K., Grosskopf, S., Lum, C.T., Wurtele, M., Roder, N., von Kries, J.P., Rosario, M., Rademann, J. & Birchmeier, W. 2008, "Specific inhibitors of the protein tyrosine phosphatase Shp2 identified by high-throughput docking", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 20, pp. 7275-7280.
- Helmcke, I., Heumuller, S., Tikkanen, R., Schroder, K. & Brandes, R.P. 2009, "Identification of structural elements in Nox1 and Nox4 controlling localization and activity", *Antioxidants & redox signaling*, vol. 11, no. 6, pp. 1279-1287.
- Hernandez-Hernandez, A., Garabatos, M.N., Rodriguez, M.C., Vidal, M.L., Lopez-Revuelta, A., Sanchez-Gallego, J.I., Llanillo, M. & Sanchez-Yague, J. 2005, "Structural characteristics of a lipid peroxidation product, trans-2-nonenal, that favour inhibition of membrane-associated phosphotyrosine phosphatase activity", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1726, no. 3, pp. 317-325.
- Hernandez-Hernandez, A., Ray, P., Litos, G., Ciro, M., Ottolenghi, S., Beug, H. & Boyes, J. 2006, "Acetylation and MAPK phosphorylation cooperate to regulate the degradation of active GATA-1", *The EMBO journal*, vol. 25, no. 14, pp. 3264-3274.
- Higashi, M., Shimokawa, H., Hattori, T., Hiroki, J., Mukai, Y., Morikawa, K., Ichiki, T., Takahashi, S. & Takeshita, A. 2003, "Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses angiotensin II-induced cardiovascular hypertrophy in rats in vivo: effect on endothelial NAD(P)H oxidase system", *Circulation research*, vol. 93, no. 8, pp. 767-775.
- Hilenski, L.L., Clempus, R.E., Quinn, M.T., Lambeth, J.D. & Griending, K.K. 2004, "Distinct subcellular localizations of Nox1 and Nox4 in vascular smooth muscle cells", *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 24, no. 4, pp. 677-683.
- Hirakawa, S., Saito, R., Ohara, H., Okuyama, R. & Aiba, S. 2011, "Dual oxidase 1 induced by Th2 cytokines promotes STAT6 phosphorylation via oxidative inactivation of protein tyrosine phosphatase 1B in human epidermal keratinocytes", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 186, no. 8, pp. 4762-4770.

- Hole, P.S., Pearn, L., Tonks, A.J., James, P.E., Burnett, A.K., Darley, R.L. & Tonks, A. 2010, "Ras-induced reactive oxygen species promote growth factor-independent proliferation in human CD34+ hematopoietic progenitor cells", *Blood*, vol. 115, no. 6, pp. 1238-1246.
- Holland, S.M. 2010, "Chronic granulomatous disease", *Clinical reviews in allergy & immunology*, vol. 38, no. 1, pp. 3-10.
- Holmgren, A. 1984, "Enzymatic reduction-oxidation of protein disulfides by thioredoxin", *Methods in enzymology*, vol. 107, pp. 295-300.
- Holmgren, A. 1979, "Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide", *The Journal of biological chemistry*, vol. 254, no. 19, pp. 9627-9632.
- Honda, H. & Hirai, H. 2001, "Model mice for BCR/ABL-positive leukemias", *Blood cells, molecules & diseases*, vol. 27, no. 1, pp. 265-278.
- Honda, H., Oda, H., Suzuki, T., Takahashi, T., Witte, O.N., Ozawa, K., Ishikawa, T., Yazaki, Y. & Hirai, H. 1998, "Development of acute lymphoblastic leukemia and myeloproliferative disorder in transgenic mice expressing p210bcr/abl: a novel transgenic model for human Ph1-positive leukemias", *Blood*, vol. 91, no. 6, pp. 2067-2075.
- Hong, J., Resnick, M., Behar, J., Wang, L.J., Wands, J., DeLellis, R.A., Souza, R.F., Spechler, S.J. & Cao, W. 2010, "Acid-induced p16 hypermethylation contributes to development of esophageal adenocarcinoma via activation of NADPH oxidase NOX5-S", *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, vol. 299, no. 3, pp. G697-706.
- Hu, Z., Pan, X.F., Wu, F.Q., Ma, L.Y., Liu, D.P., Liu, Y., Feng, T.T., Meng, F.Y., Liu, X.L., Jiang, Q.L., Chen, X.Q., Liu, J.L., Liu, P., Chen, Z., Chen, S.J. & Zhou, G.B. 2009, "Synergy between proteasome inhibitors and imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia", *PloS one*, vol. 4, no. 7, pp. e6257.
- Hulur, I., Hermanns, P., Nestoris, C., Heger, S., Refetoff, S., Pohlenz, J. & Grasberger, H. 2011, "A single copy of the recently identified dual oxidase maturation factor (DUOXA) 1 gene produces only mild transient hypothyroidism in a patient with a novel biallelic DUOXA2 mutation and monoallelic DUOXA1 deletion", *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, vol. 96, no. 5, pp. E841-5.
- Humphries, K.M., Deal, M.S. & Taylor, S.S. 2005, "Enhanced dephosphorylation of cAMP-dependent protein kinase by oxidation and thiol modification", *The Journal of biological chemistry*, vol. 280, no. 4, pp. 2750-2758.
- Hunter, T. 1989, "Protein modification: phosphorylation on tyrosine residues", *Current opinion in cell biology*, vol. 1, no. 6, pp. 1168-1181.
- Hwang, J., Ing, M.H., Salazar, A., Lassegue, B., Griending, K., Navab, M., Sevanian, A. & Hsiai, T.K. 2003, "Pulsatile versus oscillatory shear stress regulates NADPH oxidase subunit expression: implication for native LDL oxidation", *Circulation research*, vol. 93, no. 12, pp. 1225-1232.
- Hwang, J., Kleinhenz, D.J., Lassegue, B., Griending, K.K., Dikalov, S. & Hart, C.M. 2005, "Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands regulate endothelial membrane superoxide production", *American journal of physiology. Cell physiology*, vol. 288, no. 4, pp. C899-905.
- Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. 1990, "High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids", *Gene*, vol. 96, no. 1, pp. 23-28.

- Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Takubo, K., Matsuoka, S., Miyamoto, K., Ohmura, M., Naka, K., Hosokawa, K., Ikeda, Y. & Suda, T. 2006, "Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells", *Nature medicine*, vol. 12, no. 4, pp. 446-451.
- Jacobsen, B.M. & Skalnik, D.G. 1999, "YY1 binds five cis-elements and trans-activates the myeloid cell-restricted gp91(phox) promoter", *The Journal of biological chemistry*, vol. 274, no. 42, pp. 29984-29993.
- Jagnandan, D., Church, J.E., Banfi, B., Stuehr, D.J., Marrero, M.B. & Fulton, D.J. 2007, "Novel mechanism of activation of NADPH oxidase 5. calcium sensitization via phosphorylation", *The Journal of biological chemistry*, vol. 282, no. 9, pp. 6494-6507.
- Jang, Y.Y. & Sharkis, S.J. 2007, "A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche", *Blood*, vol. 110, no. 8, pp. 3056-3063.
- Janssen-Heininger, Y.M., Poynter, M.E. & Baeuerle, P.A. 2000, "Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappaB", *Free radical biology & medicine*, vol. 28, no. 9, pp. 1317-1327.
- Juarez, J.C., Manuia, M., Burnett, M.E., Betancourt, O., Boivin, B., Shaw, D.E., Tonks, N.K., Mazar, A.P. & Donate, F. 2008, "Superoxide dismutase 1 (SOD1) is essential for H₂O₂-mediated oxidation and inactivation of phosphatases in growth factor signaling", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 20, pp. 7147-7152.
- Kamata, H., Honda, S., Maeda, S., Chang, L., Hirata, H. & Karin, M. 2005, "Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases", *Cell*, vol. 120, no. 5, pp. 649-661.
- Kamiguti, A.S., Serrander, L., Lin, K., Harris, R.J., Cawley, J.C., Allsup, D.J., Slupsky, J.R., Krause, K.H. & Zuzel, M. 2005, "Expression and activity of NOX5 in the circulating malignant B cells of hairy cell leukemia", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 175, no. 12, pp. 8424-8430.
- Kantarjian, H.M., Talpaz, M., Dhingra, K., Estey, E., Keating, M.J., Ku, S., Trujillo, J., Huh, Y., Stass, S. & Kurzrock, R. 1991, "Significance of the P210 versus P190 molecular abnormalities in adults with Philadelphia chromosome-positive acute leukemia", *Blood*, vol. 78, no. 9, pp. 2411-2418.
- Kase, H., Hashikabe, Y., Uchida, K., Nakanishi, N. & Hattori, Y. 2005, "Supplementation with tetrahydrobiopterin prevents the cardiovascular effects of angiotensin II-induced oxidative and nitrosative stress", *Journal of hypertension*, vol. 23, no. 7, pp. 1375-1382.
- Katsuyama, M., Fan, C. & Yabe-Nishimura, C. 2002, "NADPH oxidase is involved in prostaglandin F₂ α -induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells: induction of NOX1 by PGF₂ α ", *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 16, pp. 13438-13442.
- Kawahara, T., Kohjima, M., Kuwano, Y., Mino, H., Teshima-Kondo, S., Takeya, R., Tsunawaki, S., Wada, A., Sumimoto, H. & Rokutan, K. 2005, "Helicobacter pylori lipopolysaccharide activates Rac1 and transcription of NADPH oxidase Nox1 and its organizer NOXO1 in guinea pig gastric mucosal cells", *American journal of physiology. Cell physiology*, vol. 288, no. 2, pp. C450-7.
- Kawahara, T. & Lambeth, J.D. 2008, "Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate modulates Nox5 localization via an N-terminal polybasic region", *Molecular biology of the cell*, vol. 19, no. 10, pp. 4020-4031.

- Kelliher, M.A., McLaughlin, J., Witte, O.N. & Rosenberg, N. 1990, "Induction of a chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with v-abl and BCR/ABL", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 87, no. 17, pp. 6649-6653.
- Kharas, M.G., Deane, J.A., Wong, S., O'Bosky, K.R., Rosenberg, N., Witte, O.N. & Fruman, D.A. 2004, "Phosphoinositide 3-kinase signaling is essential for ABL oncogene-mediated transformation of B-lineage cells", *Blood*, vol. 103, no. 11, pp. 4268-4275.
- Kikuchi, H., Hikage, M., Miyashita, H. & Fukumoto, M. 2000, "NADPH oxidase subunit, gp91(phox) homologue, preferentially expressed in human colon epithelial cells", *Gene*, vol. 254, no. 1-2, pp. 237-243.
- Kim, E.Y., Seo, J.M., Cho, K.J. & Kim, J.H. 2010, "Ras-induced invasion and metastasis are regulated by a leukotriene B4 receptor BLT2-linked pathway", *Oncogene*, vol. 29, no. 8, pp. 1167-1178.
- Koptyra, M., Falinski, R., Nowicki, M.O., Stoklosa, T., Majsterek, I., Nieborowska-Skorska, M., Blasiak, J. & Skorski, T. 2006, "BCR/ABL kinase induces self-mutagenesis via reactive oxygen species to encode imatinib resistance", *Blood*, vol. 108, no. 1, pp. 319-327.
- Kozlov, G., Cheng, J., Ziomek, E., Banville, D., Gehring, K. & Ekiel, I. 2004, "Structural insights into molecular function of the metastasis-associated phosphatase PRL-3", *The Journal of biological chemistry*, vol. 279, no. 12, pp. 11882-11889.
- Krause, K.H. 2004, "Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases", *Japanese journal of infectious diseases*, vol. 57, no. 5, pp. S28-9.
- Kuroda, J., Nakagawa, K., Yamasaki, T., Nakamura, K., Takeya, R., Kuribayashi, F., Imajoh-Ohmi, S., Igarashi, K., Shibata, Y., Sueishi, K. & Sumimoto, H. 2005, "The superoxide-producing NAD(P)H oxidase Nox4 in the nucleus of human vascular endothelial cells", *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, vol. 10, no. 12, pp. 1139-1151.
- Kuwano, Y., Kawahara, T., Yamamoto, H., Teshima-Kondo, S., Tominaga, K., Masuda, K., Kishi, K., Morita, K. & Rokutan, K. 2006, "Interferon-gamma activates transcription of NADPH oxidase 1 gene and upregulates production of superoxide anion by human large intestinal epithelial cells", *American journal of physiology. Cell physiology*, vol. 290, no. 2, pp. C433-43.
- Kwon, J., Lee, S.R., Yang, K.S., Ahn, Y., Kim, Y.J., Stadtman, E.R. & Rhee, S.G. 2004, "Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 47, pp. 16419-16424.
- Kyaw, M., Yoshizumi, M., Tsuchiya, K., Izawa, Y., Kanematsu, Y. & Tamaki, T. 2004, "Atheroprotective effects of antioxidants through inhibition of mitogen-activated protein kinases", *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 25, no. 8, pp. 977-985.
- Laemmli, U.K. 1970, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, vol. 227, no. 5259, pp. 680-685.
- Lambeth, J.D., Kawahara, T. & Diebold, B. 2007, "Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression", *Free radical biology & medicine*, vol. 43, no. 3, pp. 319-331.
- Landry, W.D., Woolley, J.F. & Cotter, T.G. 2013, "Imatinib and Nilotinib inhibit Bcr-Abl-induced ROS through targeted degradation of the NADPH oxidase subunit p22phox", *Leukemia research*, vol. 37, no. 2, pp. 183-189.

- Lassegue, B. & Griendling, K.K. 2010, "NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature", *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 30, no. 4, pp. 653-661.
- Lassegue, B., Sorescu, D., Szocs, K., Yin, Q., Akers, M., Zhang, Y., Grant, S.L., Lambeth, J.D. & Griendling, K.K. 2001, "Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways", *Circulation research*, vol. 88, no. 9, pp. 888-894.
- Laurent, E., McCoy, J.W., 3rd, Macina, R.A., Liu, W., Cheng, G., Robine, S., Papkoff, J. & Lambeth, J.D. 2008, "Nox1 is over-expressed in human colon cancers and correlates with activating mutations in K-Ras", *International journal of cancer. Journal internationale du cancer*, vol. 123, no. 1, pp. 100-107.
- Lechleider, R.J., Sugimoto, S., Bennett, A.M., Kashishian, A.S., Cooper, J.A., Shoelson, S.E., Walsh, C.T. & Neel, B.G. 1993, "Activation of the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SH-PTP2 by its binding site, phosphotyrosine 1009, on the human platelet-derived growth factor receptor", *The Journal of biological chemistry*, vol. 268, no. 29, pp. 21478-21481.
- Lee, S.R., Kwon, K.S., Kim, S.R. & Rhee, S.G. 1998, "Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor", *The Journal of biological chemistry*, vol. 273, no. 25, pp. 15366-15372.
- Lee, S.R., Yang, K.S., Kwon, J., Lee, C., Jeong, W. & Rhee, S.G. 2002, "Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂", *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 23, pp. 20336-20342.
- Leonberg, A.K. & Chai, Y.C. 2007, "The functional role of cysteine residues for c-Abl kinase activity", *Molecular and cellular biochemistry*, vol. 304, no. 1-2, pp. 207-212.
- Leslie, N.R., Bennett, D., Lindsay, Y.E., Stewart, H., Gray, A. & Downes, C.P. 2003, "Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN", *The EMBO journal*, vol. 22, no. 20, pp. 5501-5510.
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S.I., Puc, J., Miliareis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S.H., Giovanella, B.C., Ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M.H. & Parsons, R. 1997, "PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 275, no. 5308, pp. 1943-1947.
- Li, J.M. & Shah, A.M. 2002, "Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells", *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 22, pp. 19952-19960.
- Lim, S.D., Sun, C., Lambeth, J.D., Marshall, F., Amin, M., Chung, L., Petros, J.A. & Arnold, R.S. 2005, "Increased Nox1 and hydrogen peroxide in prostate cancer", *The Prostate*, vol. 62, no. 2, pp. 200-207.
- Liu, Y. & Min, W. 2002, "Thioredoxin promotes ASK1 ubiquitination and degradation to inhibit ASK1-mediated apoptosis in a redox activity-independent manner", *Circulation research*, vol. 90, no. 12, pp. 1259-1266.
- Luo, W. & Skalnik, D.G. 1996, "CCAAT displacement protein competes with multiple transcriptional activators for binding to four sites in the proximal gp91phox promoter", *The Journal of biological chemistry*, vol. 271, no. 30, pp. 18203-18210.
- Lyle, A.N., Deshpande, N.N., Taniyama, Y., Seidel-Rogol, B., Pounkova, L., Du, P., Papaharalambus, C., Lassegue, B. & Griendling, K.K. 2009, "Poldip2, a novel regulator of Nox4 and cytoskeletal integrity in vascular smooth muscle cells", *Circulation research*, vol. 105, no. 3, pp. 249-259.

- Maghzal, G.J., Krause, K.H., Stocker, R. & Jaquet, V. 2012, "Detection of reactive oxygen species derived from the family of NOX NADPH oxidases", *Free radical biology & medicine*, vol. 53, no. 10, pp. 1903-1918.
- Maher, J. & Yamamoto, M. 2010, "The rise of antioxidant signaling--the evolution and hormetic actions of Nrf2", *Toxicology and applied pharmacology*, vol. 244, no. 1, pp. 4-15.
- Manea, A., Manea, S.A., Florea, I.C., Luca, C.M. & Raicu, M. 2012, "Positive regulation of NADPH oxidase 5 by proinflammatory-related mechanisms in human aortic smooth muscle cells", *Free radical biology & medicine*, vol. 52, no. 9, pp. 1497-1507.
- Manea, S.A., Todirita, A., Raicu, M. & Manea, A. 2014, "C/EBP transcription factors regulate NADPH oxidase in human aortic smooth muscle cells", *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, .
- Manley, P.W., Breitenstein, W., Bruggen, J., Cowan-Jacob, S.W., Furet, P., Mestan, J. & Meyer, T. 2004, "Urea derivatives of STI571 as inhibitors of Bcr-Abl and PDGFR kinases", *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, vol. 14, no. 23, pp. 5793-5797.
- Maranchie, J.K. & Zhan, Y. 2005, "Nox4 is critical for hypoxia-inducible factor 2-alpha transcriptional activity in von Hippel-Lindau-deficient renal cell carcinoma", *Cancer research*, vol. 65, no. 20, pp. 9190-9193.
- Martiat, P., Mecucci, C., Nizet, Y., Stul, M., Philippe, M., Cassiman, J.J., Michaux, J.L., Van den Berghe, H. & Sokal, G. 1990, "P190 BCR/ABL transcript in a case of Philadelphia-positive multiple myeloma", *Leukemia*, vol. 4, no. 11, pp. 751-754.
- McGahon, A., Bissonnette, R., Schmitt, M., Cotter, K.M., Green, D.R. & Cotter, T.G. 1994, "BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death", *Blood*, vol. 83, no. 5, pp. 1179-1187.
- Meister, A. 1988, "Glutathione metabolism and its selective modification", *The Journal of biological chemistry*, vol. 263, no. 33, pp. 17205-17208.
- Meitzler, J.L., Antony, S., Wu, Y., Juhasz, A., Liu, H., Jiang, G., Lu, J., Roy, K. & Doroshow, J.H. 2013, "NADPH Oxidases: A Perspective on Reactive Oxygen Species Production in Tumor Biology", *Antioxidants & redox signaling*, .
- Melo, J.V. 1996, "The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype", *Blood*, vol. 88, no. 7, pp. 2375-2384.
- Melo, J.V. & Barnes, D.J. 2007, "Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer", *Nature reviews.Cancer*, vol. 7, no. 6, pp. 441-453.
- Melo, J.V., Myint, H., Galton, D.A. & Goldman, J.M. 1994, "P190BCR-ABL chronic myeloid leukaemia: the missing link with chronic myelomonocytic leukaemia?", *Leukemia*, vol. 8, no. 1, pp. 208-211.
- Meng, T.C., Fukada, T. & Tonks, N.K. 2002, "Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo", *Molecular cell*, vol. 9, no. 2, pp. 387-399.
- Michor, F., Hughes, T.P., Iwasa, Y., Branford, S., Shah, N.P., Sawyers, C.L. & Nowak, M.A. 2005, "Dynamics of chronic myeloid leukaemia", *Nature*, vol. 435, no. 7046, pp. 1267-1270.
- Miki, H. & Funato, Y. 2012, "Regulation of intracellular signalling through cysteine oxidation by reactive oxygen species", *Journal of Biochemistry*, vol. 151, no. 3, pp. 255-261.

- Mitra, A., Sasikumar, K., Parthasaradhi, B.V. & Radha, V. 2013, "The tyrosine phosphatase TC48 interacts with and inactivates the oncogenic fusion protein BCR-Abl but not cellular Abl", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1832, no. 1, pp. 275-284.
- Mizuno, K., Katagiri, T., Hasegawa, K., Ogimoto, M. & Yakura, H. 1996, "Hematopoietic cell phosphatase, SHP-1, is constitutively associated with the SH2 domain-containing leukocyte protein, SLP-76, in B cells", *The Journal of experimental medicine*, vol. 184, no. 2, pp. 457-463.
- Modur, V., Nagarajan, R., Evers, B.M. & Milbrandt, J. 2002, "FOXO proteins regulate tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand expression. Implications for PTEN mutation in prostate cancer", *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 49, pp. 47928-47937.
- Moe, K.T., Aulia, S., Jiang, F., Chua, Y.L., Koh, T.H., Wong, M.C. & Dusting, G.J. 2006, "Differential upregulation of Nox homologues of NADPH oxidase by tumor necrosis factor-alpha in human aortic smooth muscle and embryonic kidney cells", *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 10, no. 1, pp. 231-239.
- Monticelli, A., Lewi, D., Salomon, H., Pampuro, S., Libonatti, O., Jauregui Rueda, H. & Hodara, V. 2000, "Regression of AIDS-related Kaposi's sarcoma following combined antiretroviral treatment", *Revista Argentina de microbiologia*, vol. 32, no. 4, pp. 206-208.
- Morand, S., Chaaraoui, M., Kaniewski, J., Deme, D., Ohayon, R., Noel-Hudson, M.S., Virion, A. & Dupuy, C. 2003, "Effect of iodide on nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity and Duox2 protein expression in isolated porcine thyroid follicles", *Endocrinology*, vol. 144, no. 4, pp. 1241-1248.
- Morton, C.L. & Houghton, P.J. 2007, "Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice", *Nature protocols*, vol. 2, no. 2, pp. 247-250.
- Mosmann, T. 1983, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays", *Journal of immunological methods*, vol. 65, no. 1-2, pp. 55-63.
- Mumbengegwi, D.R., Li, Q., Li, C., Bear, C.E. & Engelhardt, J.F. 2008, "Evidence for a superoxide permeability pathway in endosomal membranes", *Molecular and cellular biology*, vol. 28, no. 11, pp. 3700-3712.
- Murata, H., Ihara, Y., Nakamura, H., Yodoi, J., Sumikawa, K. & Kondo, T. 2003, "Glutaredoxin exerts an antiapoptotic effect by regulating the redox state of Akt", *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 50, pp. 50226-50233.
- Murr, R. 2010, "Interplay between different epigenetic modifications and mechanisms", *Advances in Genetics*, vol. 70, pp. 101-141.
- Mustelin, T., Abraham, R.T., Rudd, C.E., Alonso, A. & Merlo, J.J. 2002, "Protein tyrosine phosphorylation in T cell signaling", *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, vol. 7, pp. d918-69.
- Nakamura, H., Nakamura, K. & Yodoi, J. 1997, "Redox regulation of cellular activation", *Annual Review of Immunology*, vol. 15, pp. 351-369.
- Nakano, Y., Banfi, B., Jesaitis, A.J., Dinauer, M.C., Allen, L.A. & Nauseef, W.M. 2007, "Critical roles for p22phox in the structural maturation and subcellular targeting of Nox3", *The Biochemical journal*, vol. 403, no. 1, pp. 97-108.

- Nakashima, I., Kato, M., Akhand, A.A., Suzuki, H., Takeda, K., Hossain, K. & Kawamoto, Y. 2002, "Redox-linked signal transduction pathways for protein tyrosine kinase activation", *Antioxidants & redox signaling*, vol. 4, no. 3, pp. 517-531.
- Naughton, R., Quiney, C., Turner, S.D. & Cotter, T.G. 2009, "Bcr-Abl-mediated redox regulation of the PI3K/AKT pathway", *Leukemia*, vol. 23, no. 8, pp. 1432-1440.
- Nauseef, W.M. 2008, "Biological roles for the NOX family NADPH oxidases", *The Journal of biological chemistry*, vol. 283, no. 25, pp. 16961-16965.
- Neshat, M.S., Raitano, A.B., Wang, H.G., Reed, J.C. & Sawyers, C.L. 2000, "The survival function of the Bcr-Abl oncogene is mediated by Bad-dependent and -independent pathways: roles for phosphatidylinositol 3-kinase and Raf", *Molecular and cellular biology*, vol. 20, no. 4, pp. 1179-1186.
- Neviani, P., Santhanam, R., Trotta, R., Notari, M., Blaser, B.W., Liu, S., Mao, H., Chang, J.S., Galletta, A., Uttam, A., Roy, D.C., Valtieri, M., Bruner-Klisovic, R., Caligiuri, M.A., Bloomfield, C.D., Marcucci, G. & Perrotti, D. 2005, "The tumor suppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABL-regulated SET protein", *Cancer cell*, vol. 8, no. 5, pp. 355-368.
- Nieborowska-Skorska, M., Wasik, M.A., Slupianek, A., Salomoni, P., Kitamura, T., Calabretta, B. & Skorski, T. 1999, "Signal transducer and activator of transcription (STAT)5 activation by BCR/ABL is dependent on intact Src homology (SH)3 and SH2 domains of BCR/ABL and is required for leukemogenesis", *The Journal of experimental medicine*, vol. 189, no. 8, pp. 1229-1242.
- Nowicki, M.O., Falinski, R., Koptyra, M., Slupianek, A., Stoklosa, T., Gloc, E., Nieborowska-Skorska, M., Blasiak, J. & Skorski, T. 2004, "BCR/ABL oncogenic kinase promotes unfaithful repair of the reactive oxygen species-dependent DNA double-strand breaks", *Blood*, vol. 104, no. 12, pp. 3746-3753.
- Oberley, L.W. 2005, "Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression", *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, vol. 59, no. 4, pp. 143-148.
- Oberley, L.W. & Buettner, G.R. 1979, "Role of superoxide dismutase in cancer: a review", *Cancer research*, vol. 39, no. 4, pp. 1141-1149.
- O'Hare, T., Deininger, M.W., Eide, C.A., Clackson, T. & Druker, B.J. 2011, "Targeting the BCR-ABL signaling pathway in therapy-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemia", *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 17, no. 2, pp. 212-221.
- O'Hare, T., Walters, D.K., Stoffregen, E.P., Jia, T., Manley, P.W., Mestan, J., Cowan-Jacob, S.W., Lee, F.Y., Heinrich, M.C., Deininger, M.W. & Druker, B.J. 2005, "In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants", *Cancer research*, vol. 65, no. 11, pp. 4500-4505.
- Ostman, A., Frijhoff, J., Sandin, A. & Bohmer, F.D. 2011, "Regulation of protein tyrosine phosphatases by reversible oxidation", *Journal of Biochemistry*, vol. 150, no. 4, pp. 345-356.
- Paffenholz, R., Bergstrom, R.A., Pasutto, F., Wabnitz, P., Munroe, R.J., Jagla, W., Heinzmann, U., Marquardt, A., Bareiss, A., Laufs, J., Russ, A., Stumm, G., Schimenti, J.C. & Bergstrom, D.E. 2004, "Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding an NADPH oxidase", *Genes & development*, vol. 18, no. 5, pp. 486-491.

- Pane, F., Frigeri, F., Sindona, M., Luciano, L., Ferrara, F., Cimino, R., Meloni, G., Saglio, G., Salvatore, F. & Rotoli, B. 1996, "Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction)", *Blood*, vol. 88, no. 7, pp. 2410-2414.
- Parker, M.D., Chambers, P.A., Lodge, J.P. & Pratt, J.R. 2008, "Ischemia- reperfusion injury and its influence on the epigenetic modification of the donor kidney genome", *Transplantation*, vol. 86, no. 12, pp. 1818-1823.
- Pedruzzi, E., Guichard, C., Ollivier, V., Driss, F., Fay, M., Prunet, C., Marie, J.C., Pouzet, C., Samadi, M., Elbim, C., O'dowd, Y., Bens, M., Vandewalle, A., Gougerot-Pocidallo, M.A., Lizard, G. & Ogier-Denis, E. 2004, "NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells", *Molecular and cellular biology*, vol. 24, no. 24, pp. 10703-10717.
- Pelicano, H., Feng, L., Zhou, Y., Carew, J.S., Hileman, E.O., Plunkett, W., Keating, M.J. & Huang, P. 2003, "Inhibition of mitochondrial respiration: a novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism", *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 39, pp. 37832-37839.
- Pendergast, A.M., Muller, A.J., Havlik, M.H., Maru, Y. & Witte, O.N. 1991, "BCR sequences essential for transformation by the BCR-ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner", *Cell*, vol. 66, no. 1, pp. 161-171.
- Pendergast, A.M., Quilliam, L.A., Cripe, L.D., Bassing, C.H., Dai, Z., Li, N., Batzer, A., Rabun, K.M., Der, C.J. & Schlessinger, J. 1993, "BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein", *Cell*, vol. 75, no. 1, pp. 175-185.
- Peng, C., Chen, Y., Yang, Z., Zhang, H., Osterby, L., Rosmarin, A.G. & Li, S. 2010, "PTEN is a tumor suppressor in CML stem cells and BCR-ABL-induced leukemias in mice", *Blood*, vol. 115, no. 3, pp. 626-635.
- Perez-Molina, J.A., Perez Nr, R., Miralles, P., Cosin, J., Padilla, B., Berenguer, J. & Bouza, E. 2001, "Nelfinavir plus nevirapine plus two NRTIS as salvage therapy for HIV-infected patients receiving long-term antiretroviral treatment", *HIV clinical trials*, vol. 2, no. 1, pp. 1-5.
- Perrotti, D., Jamieson, C., Goldman, J. & Skorski, T. 2010, "Chronic myeloid leukemia: mechanisms of blastic transformation", *The Journal of clinical investigation*, vol. 120, no. 7, pp. 2254-2264.
- Peshavariya, H., Dusting, G.J., Jiang, F., Halmos, L.R., Sobey, C.G., Drummond, G.R. & Selemidis, S. 2009, "NADPH oxidase isoform selective regulation of endothelial cell proliferation and survival", *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, vol. 380, no. 2, pp. 193-204.
- Pietersma, A., de Jong, N., de Wit, L.E., Kraak-Slee, R.G., Koster, J.F. & Sluiter, W. 1998, "Evidence against the involvement of multiple radical generating sites in the expression of the vascular cell adhesion molecule-1", *Free radical research*, vol. 28, no. 2, pp. 137-150.
- Poyton, R.O., Ball, K.A. & Castello, P.R. 2009, "Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling", *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, vol. 20, no. 7, pp. 332-340.
- Puca, R., Nardinocchi, L., Starace, G., Rechavi, G., Sacchi, A., Givol, D. & D'Orazi, G. 2010, "Nox1 is involved in p53 deacetylation and suppression of its transcriptional activity and apoptosis", *Free radical biology & medicine*, vol. 48, no. 10, pp. 1338-1346.
- Qu, C.K., Nguyen, S., Chen, J. & Feng, G.S. 2001, "Requirement of Shp-2 tyrosine phosphatase in lymphoid and hematopoietic cell development", *Blood*, vol. 97, no. 4, pp. 911-914.

- Qu, C.K., Yu, W.M., Azzarelli, B., Cooper, S., Broxmeyer, H.E. & Feng, G.S. 1998, "Biased suppression of hematopoiesis and multiple developmental defects in chimeric mice containing Shp-2 mutant cells", *Molecular and cellular biology*, vol. 18, no. 10, pp. 6075-6082.
- Raad, H., Eskalli, Z., Corvilain, B., Miot, F. & De Deken, X. 2013, "Thyroid hydrogen peroxide production is enhanced by the Th2 cytokines, IL-4 and IL-13, through increased expression of the dual oxidase 2 and its maturation factor DUOXA2", *Free radical biology & medicine*, vol. 56, pp. 216-225.
- Rada, B., Hably, C., Meczner, A., Timar, C., Lakatos, G., Enyedi, P. & Ligeti, E. 2008, "Role of Nox2 in elimination of microorganisms", *Seminars in immunopathology*, vol. 30, no. 3, pp. 237-253.
- Rakshit, S., Mandal, L., Pal, B.C., Bagchi, J., Biswas, N., Chaudhuri, J., Chowdhury, A.A., Manna, A., Chaudhuri, U., Konar, A., Mukherjee, T., Jaisankar, P. & Bandyopadhyay, S. 2010, "Involvement of ROS in chlorogenic acid-induced apoptosis of Bcr-Abl+ CML cells", *Biochemical pharmacology*, vol. 80, no. 11, pp. 1662-1675.
- Rakshit, S., Mandal, L., Pal, B.C., Bagchi, J., Biswas, N., Chaudhuri, J., Chowdhury, A.A., Manna, A., Chaudhuri, U., Konar, A., Mukherjee, T., Jaisankar, P. & Bandyopadhyay, S. 2010, "Involvement of ROS in chlorogenic acid-induced apoptosis of Bcr-Abl+ CML cells", *Biochemical pharmacology*, vol. 80, no. 11, pp. 1662-1675.
- Rassool, F.V., Gaymes, T.J., Omidvar, N., Brady, N., Beurlet, S., Pla, M., Reboul, M., Lea, N., Chomienne, C., Thomas, N.S., Mufti, G.J. & Padua, R.A. 2007, "Reactive oxygen species, DNA damage, and error-prone repair: a model for genomic instability with progression in myeloid leukemia?", *Cancer research*, vol. 67, no. 18, pp. 8762-8771.
- Reddy, M.M., Fernandes, M.S., Salgia, R., Levine, R.L., Griffin, J.D. & Sattler, M. 2011, "NADPH oxidases regulate cell growth and migration in myeloid cells transformed by oncogenic tyrosine kinases", *Leukemia*, vol. 25, no. 2, pp. 281-289.
- Ridnour, L.A., Oberley, T.D. & Oberley, L.W. 2004, "Tumor suppressive effects of MnSOD overexpression may involve imbalance in peroxide generation versus peroxide removal", *Antioxidants & redox signaling*, vol. 6, no. 3, pp. 501-512.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S. & Bonner, W.M. 1998, "DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139", *The Journal of biological chemistry*, vol. 273, no. 10, pp. 5858-5868.
- Rokutan, K., Kawahara, T., Kuwano, Y., Tominaga, K., Nishida, K. & Teshima-Kondo, S. 2008, "Nox enzymes and oxidative stress in the immunopathology of the gastrointestinal tract", *Seminars in immunopathology*, vol. 30, no. 3, pp. 315-327.
- Rokutan, K., Kawahara, T., Kuwano, Y., Tominaga, K., Sekiyama, A. & Teshima-Kondo, S. 2006, "NADPH oxidases in the gastrointestinal tract: a potential role of Nox1 in innate immune response and carcinogenesis", *Antioxidants & redox signaling*, vol. 8, no. 9-10, pp. 1573-1582.
- Rossary, A., Arab, K. & Steghens, J.P. 2007, "Polyunsaturated fatty acids modulate NOX 4 anion superoxide production in human fibroblasts", *The Biochemical journal*, vol. 406, no. 1, pp. 77-83.
- Rossi, F. & Zatti, M. 1964, "Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells", *Experientia*, vol. 20, no. 1, pp. 21-23.
- Rousselot, P., Hugué, F., Rea, D., Legros, L., Cayuela, J.M., Maarek, O., Blanchet, O., Marit, G., Gluckman, E., Reiffers, J., Gardembas, M. & Mahon, F.X. 2007, "Imatinib mesylate discontinuation in

- patients with chronic myelogenous leukemia in complete molecular remission for more than 2 years", *Blood*, vol. 109, no. 1, pp. 58-60.
- Salles, N., Szanto, I., Herrmann, F., Armenian, B., Stumm, M., Stauffer, E., Michel, J.P. & Krause, K.H. 2005, "Expression of mRNA for ROS-generating NADPH oxidases in the aging stomach", *Experimental gerontology*, vol. 40, no. 4, pp. 353-357.
- Sallmyr, A., Fan, J., Datta, K., Kim, K.T., Grosu, D., Shapiro, P., Small, D. & Rassool, F. 2008, "Internal tandem duplication of FLT3 (FLT3/ITD) induces increased ROS production, DNA damage, and misrepair: implications for poor prognosis in AML", *Blood*, vol. 111, no. 6, pp. 3173-3182.
- Sallmyr, A., Fan, J. & Rassool, F.V. 2008, "Genomic instability in myeloid malignancies: increased reactive oxygen species (ROS), DNA double strand breaks (DSBs) and error-prone repair", *Cancer letters*, vol. 270, no. 1, pp. 1-9.
- Salmeen, A., Andersen, J.N., Myers, M.P., Meng, T.C., Hinks, J.A., Tonks, N.K. & Barford, D. 2003, "Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate", *Nature*, vol. 423, no. 6941, pp. 769-773.
- Sanchez-Sanchez, B., Gutierrez-Herrero, S., Lopez-Ruano, G., Prieto-Bermejo, R., Romo-Gonzalez, M., Llanillo, M., Pandiella, A., Guerrero, C., San Miguel, J.F., Sanchez-Guijo, F., Del Canizo, M.C. & Hernandez-Hernandez, A. 2014, "NADPH oxidases as therapeutic targets in chronic myeloid leukemia", *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, .
- Sardina, J.L., Lopez-Ruano, G., Sanchez-Abarca, L.I., Perez-Simon, J.A., Gaztelumendi, A., Trigueros, C., Llanillo, M., Sanchez-Yague, J. & Hernandez-Hernandez, A. 2010, "p22phox-dependent NADPH oxidase activity is required for megakaryocytic differentiation", *Cell death and differentiation*, vol. 17, no. 12, pp. 1842-1854.
- Sardina, J.L., Lopez-Ruano, G., Sanchez-Sanchez, B., Llanillo, M. & Hernandez-Hernandez, A. 2012, "Reactive oxygen species: are they important for haematopoiesis?", *Critical reviews in oncology/hematology*, vol. 81, no. 3, pp. 257-274.
- Sattler, M., Mohi, M.G., Pride, Y.B., Quinnan, L.R., Malouf, N.A., Podar, K., Gesbert, F., Iwasaki, H., Li, S., Van Etten, R.A., Gu, H., Griffin, J.D. & Neel, B.G. 2002, "Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL", *Cancer cell*, vol. 1, no. 5, pp. 479-492.
- Sattler, M. & Salgia, R. 1997, "Activation of hematopoietic growth factor signal transduction pathways by the human oncogene BCR/ABL", *Cytokine & growth factor reviews*, vol. 8, no. 1, pp. 63-79.
- Sattler, M., Salgia, R., Okuda, K., Uemura, N., Durstin, M.A., Pisick, E., Xu, G., Li, J.L., Prasad, K.V. & Griffin, J.D. 1996, "The proto-oncogene product p120CBL and the adaptor proteins CRKL and c-CRKL link c-ABL, p190BCR/ABL and p210BCR/ABL to the phosphatidylinositol-3' kinase pathway", *Oncogene*, vol. 12, no. 4, pp. 839-846.
- Sattler, M., Salgia, R., Shrikhande, G., Verma, S., Choi, J.L., Rohrschneider, L.R. & Griffin, J.D. 1997, "The phosphatidylinositol polyphosphate 5-phosphatase SHIP and the protein tyrosine phosphatase SHP-2 form a complex in hematopoietic cells which can be regulated by BCR/ABL and growth factors", *Oncogene*, vol. 15, no. 19, pp. 2379-2384.
- Sattler, M., Verma, S., Shrikhande, G., Byrne, C.H., Pride, Y.B., Winkler, T., Greenfield, E.A., Salgia, R. & Griffin, J.D. 2000, "The BCR/ABL tyrosine kinase induces production of reactive oxygen species in hematopoietic cells", *The Journal of biological chemistry*, vol. 275, no. 32, pp. 24273-24278.

- Scaife, R.M. 2004, "G2 cell cycle arrest, down-regulation of cyclin B, and induction of mitotic catastrophe by the flavoprotein inhibitor diphenyleneiodonium", *Molecular cancer therapeutics*, vol. 3, no. 10, pp. 1229-1237.
- Scherr, M., Chaturvedi, A., Battmer, K., Dallmann, I., Schultheis, B., Ganser, A. & Eder, M. 2006, "Enhanced sensitivity to inhibition of SHP2, STAT5, and Gab2 expression in chronic myeloid leukemia (CML)", *Blood*, vol. 107, no. 8, pp. 3279-3287.
- Schindler, T., Bornmann, W., Pellicena, P., Miller, W.T., Clarkson, B. & Kuriyan, J. 2000, "Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 289, no. 5486, pp. 1938-1942.
- Schmittgen, T.D. & Livak, K.J. 2008, "Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method", *Nature protocols*, vol. 3, no. 6, pp. 1101-1108.
- Schneider-Poetsch, T., Ju, J., Eyler, D.E., Dang, Y., Bhat, S., Merrick, W.C., Green, R., Shen, B. & Liu, J.O. 2010, "Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin", *Nature chemical biology*, vol. 6, no. 3, pp. 209-217.
- Schwarzer, C., Machen, T.E., Illek, B. & Fischer, H. 2004, "NADPH oxidase-dependent acid production in airway epithelial cells", *The Journal of biological chemistry*, vol. 279, no. 35, pp. 36454-36461.
- Seo, J.M., Park, S. & Kim, J.H. 2012, "Leukotriene B4 receptor-2 promotes invasiveness and metastasis of ovarian cancer cells through signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)-dependent up-regulation of matrix metalloproteinase 2", *The Journal of biological chemistry*, vol. 287, no. 17, pp. 13840-13849.
- Serrander, L., Cartier, L., Bedard, K., Banfi, B., Lardy, B., Plastre, O., Sienkiewicz, A., Forro, L., Schlegel, W. & Krause, K.H. 2007, "NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation", *The Biochemical journal*, vol. 406, no. 1, pp. 105-114.
- Shiose, A., Kuroda, J., Tsuruya, K., Hirai, M., Hirakata, H., Naito, S., Hattori, M., Sakaki, Y. & Sumimoto, H. 2001, "A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney", *The Journal of biological chemistry*, vol. 276, no. 2, pp. 1417-1423.
- Shono, T., Yokoyama, N., Uesaka, T., Kuroda, J., Takeya, R., Yamasaki, T., Amano, T., Mizoguchi, M., Suzuki, S.O., Niino, H., Miyamoto, K., Akashi, K., Iwaki, T., Sumimoto, H. & Sasaki, T. 2008, "Enhanced expression of NADPH oxidase Nox4 in human gliomas and its roles in cell proliferation and survival", *International journal of cancer. Journal international du cancer*, vol. 123, no. 4, pp. 787-792.
- Silva, A., Yunes, J.A., Cardoso, B.A., Martins, L.R., Jotta, P.Y., Abecasis, M., Nowill, A.E., Leslie, N.R., Cardoso, A.A. & Barata, J.T. 2008, "PTEN posttranslational inactivation and hyperactivation of the PI3K/Akt pathway sustain primary T cell leukemia viability", *The Journal of clinical investigation*, vol. 118, no. 11, pp. 3762-3774.
- Singh, D.K., Kumar, D., Siddiqui, Z., Basu, S.K., Kumar, V. & Rao, K.V. 2005, "The strength of receptor signaling is centrally controlled through a cooperative loop between Ca²⁺ and an oxidant signal", *Cell*, vol. 121, no. 2, pp. 281-293.
- Sirard, C., Laneuville, P. & Dick, J.E. 1994, "Expression of bcr-abl abrogates factor-dependent growth of human hematopoietic M07E cells by an autocrine mechanism", *Blood*, vol. 83, no. 6, pp. 1575-1585.

- Skalnik, D.G., Strauss, E.C. & Orkin, S.H. 1991, "CCAAT displacement protein as a repressor of the myelomonocytic-specific gp91-phox gene promoter", *The Journal of biological chemistry*, vol. 266, no. 25, pp. 16736-16744.
- Skorski, T. 2008, "BCR/ABL, DNA damage and DNA repair: implications for new treatment concepts", *Leukemia & lymphoma*, vol. 49, no. 4, pp. 610-614.
- Skorski, T., Bellacosa, A., Nieborowska-Skorska, M., Majewski, M., Martinez, R., Choi, J.K., Trotta, R., Wlodarski, P., Perrotti, D., Chan, T.O., Wasik, M.A., Tschlis, P.N. & Calabretta, B. 1997, "Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway", *The EMBO journal*, vol. 16, no. 20, pp. 6151-6161.
- Song, J.D., Kim, K.M., Kim, K.H., Kim, C.D., Kim, J.M., Yoo, Y.H. & Park, Y.C. 2008, "Differential role of diphenyleneiodonium, a flavoenzyme inhibitor, on p53-dependent and -independent cell cycle progression", *International journal of oncology*, vol. 33, no. 6, pp. 1299-1306.
- Sorescu, G.P., Song, H., Tressel, S.L., Hwang, J., Dikalov, S., Smith, D.A., Boyd, N.L., Platt, M.O., Lassegue, B., Griending, K.K. & Jo, H. 2004, "Bone morphogenic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress induces monocyte adhesion by stimulating reactive oxygen species production from a nox1-based NADPH oxidase", *Circulation research*, vol. 95, no. 8, pp. 773-779.
- Spitz, D.R., Sim, J.E., Ridnour, L.A., Galoforo, S.S. & Lee, Y.J. 2000, "Glucose deprivation-induced oxidative stress in human tumor cells. A fundamental defect in metabolism?", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 899, pp. 349-362.
- Squire, C.J., Dickson, J.M., Ivanovic, I. & Baker, E.N. 2005, "Structure and inhibition of the human cell cycle checkpoint kinase, Wee1A kinase: an atypical tyrosine kinase with a key role in CDK1 regulation", *Structure (London, England : 1993)*, vol. 13, no. 4, pp. 541-550.
- Stahl, M., Dijkers, P.F., Kops, G.J., Lens, S.M., Coffey, P.J., Burgering, B.M. & Medema, R.H. 2002, "The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 168, no. 10, pp. 5024-5031.
- Stasi, R. 2008, "Gemtuzumab ozogamicin: an anti-CD33 immunoconjugate for the treatment of acute myeloid leukaemia", *Expert opinion on biological therapy*, vol. 8, no. 4, pp. 527-540.
- Stolk, J., Hiltermann, T.J., Dijkman, J.H. & Verhoeven, A.J. 1994, "Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol", *American journal of respiratory cell and molecular biology*, vol. 11, no. 1, pp. 95-102.
- Sturrock, A., Cahill, B., Norman, K., Huecksteadt, T.P., Hill, K., Sanders, K., Karwande, S.V., Stringham, J.C., Bull, D.A., Gleich, M., Kennedy, T.P. & Hoidal, J.R. 2006, "Transforming growth factor-beta1 induces Nox4 NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species-dependent proliferation in human pulmonary artery smooth muscle cells", *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, vol. 290, no. 4, pp. L661-L673.
- Suliman, H.B., Ali, M. & Piantadosi, C.A. 2004, "Superoxide dismutase-3 promotes full expression of the EPO response to hypoxia", *Blood*, vol. 104, no. 1, pp. 43-50.
- Suzuki, S., Kumatori, A., Haagen, I.A., Fujii, Y., Sadat, M.A., Jun, H.L., Tsuji, Y., Roos, D. & Nakamura, M. 1998, "PU.1 as an essential activator for the expression of gp91(phox) gene in human peripheral neutrophils, monocytes, and B lymphocytes", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 11, pp. 6085-6090.

- Szatrowski, T.P. & Nathan, C.F. 1991, "Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells", *Cancer research*, vol. 51, no. 3, pp. 794-798.
- Takac, I., Schroder, K., Zhang, L., Lardy, B., Anilkumar, N., Lambeth, J.D., Shah, A.M., Morel, F. & Brandes, R.P. 2011, "The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase Nox4", *The Journal of biological chemistry*, vol. 286, no. 15, pp. 13304-13313.
- Tauchi, T., Feng, G.S., Shen, R., Song, H.Y., Donner, D., Pawson, T. & Broxmeyer, H.E. 1994, "SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp is a target of p210bcr-abl tyrosine kinase", *The Journal of biological chemistry*, vol. 269, no. 21, pp. 15381-15387.
- Tejada-Simon, M.V., Serrano, F., Villasana, L.E., Kanterewicz, B.I., Wu, G.Y., Quinn, M.T. & Klann, E. 2005, "Synaptic localization of a functional NADPH oxidase in the mouse hippocampus", *Molecular and cellular neurosciences*, vol. 29, no. 1, pp. 97-106.
- Tell, G., Quadrifoglio, F., Tiribelli, C. & Kelley, M.R. 2009, "The many functions of APE1/Ref-1: not only a DNA repair enzyme", *Antioxidants & redox signaling*, vol. 11, no. 3, pp. 601-620.
- Terada, L.S. & Nwariaku, F.E. 2011, "Escaping Anoikis through ROS: ANGPTL4 controls integrin signaling through Nox1", *Cancer cell*, vol. 19, no. 3, pp. 297-299.
- Thannickal, V.J. & Fanburg, B.L. 2000, "Reactive oxygen species in cell signaling", *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, vol. 279, no. 6, pp. L1005-28.
- Tirone, F. & Cox, J.A. 2007, "NADPH oxidase 5 (NOX5) interacts with and is regulated by calmodulin", *FEBS letters*, vol. 581, no. 6, pp. 1202-1208.
- Tirone, F., Radu, L., Craescu, C.T. & Cox, J.A. 2010, "Identification of the binding site for the regulatory calcium-binding domain in the catalytic domain of NOX5", *Biochemistry*, vol. 49, no. 4, pp. 761-771.
- Tominaga, K., Kawahara, T., Sano, T., Toida, K., Kuwano, Y., Sasaki, H., Kawai, T., Teshima-Kondo, S. & Rokutan, K. 2007, "Evidence for cancer-associated expression of NADPH oxidase 1 (Nox1)-based oxidase system in the human stomach", *Free radical biology & medicine*, vol. 43, no. 12, pp. 1627-1638.
- Tominaga, Y., Li, C., Wang, R.H. & Deng, C.X. 2006, "Murine Wee1 plays a critical role in cell cycle regulation and pre-implantation stages of embryonic development", *International journal of biological sciences*, vol. 2, no. 4, pp. 161-170.
- Torres-Torronteras, J., Gomez, A., Eixarch, H., Palenzuela, L., Pizzorno, G., Hirano, M., Andreu, A.L., Barquinero, J. & Marti, R. 2011, "Hematopoietic gene therapy restores thymidine phosphorylase activity in a cell culture and a murine model of MNGIE", *Gene therapy*, vol. 18, no. 8, pp. 795-806.
- Touyz, R.M. 2005, "Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology", *Antioxidants & redox signaling*, vol. 7, no. 9-10, pp. 1302-1314.
- Touyz, R.M., Yao, G., Viel, E., Amiri, F. & Schiffrin, E.L. 2004, "Angiotensin II and endothelin-1 regulate MAP kinases through different redox-dependent mechanisms in human vascular smooth muscle cells", *Journal of hypertension*, vol. 22, no. 6, pp. 1141-1149.
- Toyokuni, S., Okamoto, K., Yodoi, J. & Hiai, H. 1995, "Persistent oxidative stress in cancer", *FEBS letters*, vol. 358, no. 1, pp. 1-3.

- Trachootham, D., Alexandre, J. & Huang, P. 2009, "Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?", *Nature reviews.Drug discovery*, vol. 8, no. 7, pp. 579-591.
- Turk, P.W., Laayoun, A., Smith, S.S. & Weitzman, S.A. 1995, "DNA adduct 8-hydroxyl-2'-deoxyguanosine (8-hydroxyguanine) affects function of human DNA methyltransferase", *Carcinogenesis*, vol. 16, no. 5, pp. 1253-1255.
- Turrens, J.F. 2003, "Mitochondrial formation of reactive oxygen species", *The Journal of physiology*, vol. 552, no. Pt 2, pp. 335-344.
- Ushio-Fukai, M. 2006, "Localizing NADPH oxidase-derived ROS", *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, vol. 2006, no. 349, pp. re8.
- Ushio-Fukai, M. & Nakamura, Y. 2008, "Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy", *Cancer letters*, vol. 266, no. 1, pp. 37-52.
- Valinluck, V., Tsai, H.H., Rogstad, D.K., Burdzy, A., Bird, A. & Sowers, L.C. 2004, "Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2)", *Nucleic acids research*, vol. 32, no. 14, pp. 4100-4108.
- Vallet, P., Charnay, Y., Steger, K., Ogier-Denis, E., Kovari, E., Herrmann, F., Michel, J.P. & Szanto, I. 2005, "Neuronal expression of the NADPH oxidase NOX4, and its regulation in mouse experimental brain ischemia", *Neuroscience*, vol. 132, no. 2, pp. 233-238.
- Van Buul, J.D., Fernandez-Borja, M., Anthony, E.C. & Hordijk, P.L. 2005, "Expression and localization of NOX2 and NOX4 in primary human endothelial cells", *Antioxidants & redox signaling*, vol. 7, no. 3-4, pp. 308-317.
- van Montfort, R.L., Congreve, M., Tisi, D., Carr, R. & Jhoti, H. 2003, "Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B", *Nature*, vol. 423, no. 6941, pp. 773-777.
- Vaquero, E.C., Edderkaoui, M., Pandol, S.J., Gukovsky, I. & Gukovskaya, A.S. 2004, "Reactive oxygen species produced by NAD(P)H oxidase inhibit apoptosis in pancreatic cancer cells", *The Journal of biological chemistry*, vol. 279, no. 33, pp. 34643-34654.
- Vejrazka, M., Micek, R. & Stipek, S. 2005, "Apocynin inhibits NADPH oxidase in phagocytes but stimulates ROS production in non-phagocytic cells", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1722, no. 2, pp. 143-147.
- Venditti, P., Di Stefano, L. & Di Meo, S. 2013, "Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species", *Mitochondrion*, vol. 13, no. 2, pp. 71-82.
- von Lohneysen, K., Noack, D., Wood, M.R., Friedman, J.S. & Knaus, U.G. 2010, "Structural insights into Nox4 and Nox2: motifs involved in function and cellular localization", *Molecular and cellular biology*, vol. 30, no. 4, pp. 961-975.
- Voo, K.S. & Skalnik, D.G. 1999, "Elf-1 and PU.1 induce expression of gp91(phox) via a promoter element mutated in a subset of chronic granulomatous disease patients", *Blood*, vol. 93, no. 10, pp. 3512-3520.
- Wang, F. & Higgins, J.M. 2013, "Histone modifications and mitosis: countermarks, landmarks, and bookmarks", *Trends in cell biology*, vol. 23, no. 4, pp. 175-184.
- Wang, Q., Zhou, H.S., Huang, K.K., Jiang, X.J., Wu, F.Q., Cao, R., Yin, C.X., Liao, L.B., Zheng, Z.X., He, H., Lin, R., Yi, Z.S., Xu, D., Yang, M. & Meng, F.Y. 2012, "Imatinib and bortezomib induce the

- expression and distribution of anaphase-promoting complex adaptor protein Cdh1 in blast crisis of chronic myeloid leukemia", *International journal of oncology*, vol. 40, no. 2, pp. 418-426.
- Wani, R., Qian, J., Yin, L., Bechtold, E., King, S.B., Poole, L.B., Paek, E., Tsang, A.W. & Furdui, C.M. 2011, "Isoform-specific regulation of Akt by PDGF-induced reactive oxygen species", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, no. 26, pp. 10550-10555.
- Webb, J.D., Coleman, M.L. & Pugh, C.W. 2009, "Hypoxia, hypoxia-inducible factors (HIF), HIF hydroxylases and oxygen sensing", *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, vol. 66, no. 22, pp. 3539-3554.
- Wei, C.C., Motl, N., Levek, K., Chen, L.Q., Yang, Y.P., Johnson, T., Hamilton, L. & Stuehr, D.J. 2010, "Conformational States and kinetics of the calcium binding domain of NADPH oxidase 5", *The open biochemistry journal*, vol. 4, pp. 59-67.
- Wei, C.C., Reynolds, N., Palka, C., Wetherell, K., Boyle, T., Yang, Y.P., Wang, Z.Q. & Stuehr, D.J. 2012, "Characterization of the 1st and 2nd EF-hands of NADPH oxidase 5 by fluorescence, isothermal titration calorimetry, and circular dichroism", *Chemistry Central journal*, vol. 6, no. 1, pp. 29-153X-6-29.
- Weisberg, E., Manley, P.W., Breitenstein, W., Bruggen, J., Cowan-Jacob, S.W., Ray, A., Huntly, B., Fabbro, D., Fendrich, G., Hall-Meyers, E., Kung, A.L., Mestan, J., Daley, G.Q., Callahan, L., Catley, L., Cavazza, C., Azam, M., Neubergh, D., Wright, R.D., Gilliland, D.G. & Griffin, J.D. 2005, "Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl", *Cancer cell*, vol. 7, no. 2, pp. 129-141.
- Weitzman, S.A., Turk, P.W., Milkowski, D.H. & Kozlowski, K. 1994, "Free radical adducts induce alterations in DNA cytosine methylation", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, no. 4, pp. 1261-1264.
- Wingler, K., Wunsch, S., Kreutz, R., Rothermund, L., Paul, M. & Schmidt, H.H. 2001, "Upregulation of the vascular NAD(P)H-oxidase isoforms Nox1 and Nox4 by the renin-angiotensin system in vitro and in vivo", *Free radical biology & medicine*, vol. 31, no. 11, pp. 1456-1464.
- Wondrak, G.T. 2009, "Redox-directed cancer therapeutics: molecular mechanisms and opportunities", *Antioxidants & redox signaling*, vol. 11, no. 12, pp. 3013-3069.
- Wong, M.L. & Medrano, J.F. 2005, "Real-time PCR for mRNA quantitation", *BioTechniques*, vol. 39, no. 1, pp. 75-85.
- Wong, S. & Witte, O.N. 2001, "Modeling Philadelphia chromosome positive leukemias", *Oncogene*, vol. 20, no. 40, pp. 5644-5659.
- Woolley, J.F., Naughton, R., Stanicka, J., Gough, D.R., Bhatt, L., Dickinson, B.C., Chang, C.J. & Cotter, T.G. 2012, "H₂O₂ production downstream of FLT3 is mediated by p22phox in the endoplasmic reticulum and is required for STAT5 signalling", *PLoS one*, vol. 7, no. 7, pp. e34050.
- Wu, G., Fang, Y.Z., Yang, S., Lupton, J.R. & Turner, N.D. 2004, "Glutathione metabolism and its implications for health", *The Journal of nutrition*, vol. 134, no. 3, pp. 489-492.
- Wu, J.Y., Yang, D.J., Angelo, L.S., Kohanim, S. & Kurzrock, R. 2009, "Molecular imaging of Bcr-Abl phosphokinase in a xenograft model", *Molecular cancer therapeutics*, vol. 8, no. 3, pp. 703-710.

- Wu, W.S. 2006, "The signaling mechanism of ROS in tumor progression", *Cancer metastasis reviews*, vol. 25, no. 4, pp. 695-705.
- Wu, Y., Antony, S., Juhasz, A., Lu, J., Ge, Y., Jiang, G., Roy, K. & Doroshow, J.H. 2011, "Up-regulation and sustained activation of Stat1 are essential for interferon-gamma (IFN-gamma)-induced dual oxidase 2 (Duox2) and dual oxidase A2 (DuoxA2) expression in human pancreatic cancer cell lines", *The Journal of biological chemistry*, vol. 286, no. 14, pp. 12245-12256.
- Yamamoto, T., Suzuki, T., Kobayashi, A., Wakabayashi, J., Maher, J., Motohashi, H. & Yamamoto, M. 2008, "Physiological significance of reactive cysteine residues of Keap1 in determining Nrf2 activity", *Molecular and cellular biology*, vol. 28, no. 8, pp. 2758-2770.
- Yamaura, M., Mitsushita, J., Furuta, S., Kiniwa, Y., Ashida, A., Goto, Y., Shang, W.H., Kubodera, M., Kato, M., Takata, M., Saida, T. & Kamata, T. 2009, "NADPH oxidase 4 contributes to transformation phenotype of melanoma cells by regulating G2-M cell cycle progression", *Cancer research*, vol. 69, no. 6, pp. 2647-2654.
- Yan, Y., Wei, C.L., Zhang, W.R., Cheng, H.P. & Liu, J. 2006, "Cross-talk between calcium and reactive oxygen species signaling", *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 27, no. 7, pp. 821-826.
- Yin, L. & Kufe, D. 2011, "MUC1-C Oncoprotein Blocks Terminal Differentiation of Chronic Myelogenous Leukemia Cells by a ROS-Mediated Mechanism", *Genes & cancer*, vol. 2, no. 1, pp. 56-64.
- Zhang, F., Cui, Y. & Cao, P. 2007, "Effect of quercetin on proliferation and apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma HEN1 cells", *Lin chuang er bi yan hou tou jing wai ke za zhi = Journal of clinical otorhinolaryngology, head, and neck surgery*, vol. 21, no. 24, pp. 1136-1139.
- Zhang, H., Wang, Y.A., Meng, A., Yan, H., Wang, X., Niu, J., Li, J. & Wang, H. 2013, "Inhibiting TGFbeta1 has a protective effect on mouse bone marrow suppression following ionizing radiation exposure in vitro", *Journal of radiation research*, vol. 54, no. 4, pp. 630-636.
- Zhang, Z.Y., Wang, Y. & Dixon, J.E. 1994, "Dissecting the catalytic mechanism of protein-tyrosine phosphatases", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, no. 5, pp. 1624-1627.
- Zhao, T., Li, Y., Liu, B., Halaweish, I., Mazitschek, R. & Alam, H.B. 2014, "Selective inhibition of histone deacetylase 6 alters the composition of circulating blood cells in a lethal septic model", *The Journal of surgical research*, .
- Zhao, T., Li, Y., Liu, B., Halaweish, I., Mazitschek, R. & Alam, H.B. 2014, "Selective inhibition of histone deacetylase 6 alters the composition of circulating blood cells in a lethal septic model", *The Journal of surgical research*, .
- Zhu, C., Yu, Z.B., Chen, X.H., Ji, C.B., Qian, L.M. & Han, S.P. 2011, "DNA hypermethylation of the NOX5 gene in fetal ventricular septal defect", *Experimental and therapeutic medicine*, vol. 2, no. 5, pp. 1011-1015.
- Zhu, Q.S., Xia, L., Mills, G.B., Lowell, C.A., Touw, I.P. & Corey, S.J. 2006, "G-CSF induced reactive oxygen species involves Lyn-PI3-kinase-Akt and contributes to myeloid cell growth", *Blood*, vol. 107, no. 5, pp. 1847-1856.

