



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA**

**“EFECTO DE OBATOCLAX (GX15-070) EN LA INDUCCIÓN
DE APOPTOSIS MEDIADA POR TRAIL EN LÍNEAS
CELULARES DE LINFOMA NO-HODGKIN”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A

M. EN C. MELISA ÁNGELA MARTÍNEZ PANIAGUA

**TUTOR ACADÉMICO
DR. MARIO I. VEGA PAREDES**

MÉXICO, D.F. FEBRERO 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología, Hospital de Infectología “Dr. Daniel Méndez Hernández” del Centro Médico Nacional “La Raza”, y en la Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la tutoría del Dr. Mario I. Vega Paredes y en el Departamento de Microbiología, Inmunología y Genética Molecular de la Escuela de Medicina David Geffen en la Universidad de California Los Ángeles, Estados Unidos, bajo la asesoría del Dr. Benjamin Bonavida. El proyecto fue aprobado por el comité local de investigación del IMSS (R-2010-3502-28) y recibió financiamiento por parte del Fondo de Investigación en Salud IMSS (FIS/IMSS/PROT/G10/819). El autor recibió una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número de registro 165639.

1. AGRADECIMIENTOS

Los ciclos se cumplen y es el momento de llevar a buen término aquello que inicie tiempo atrás, esta gran experiencia me permitió conocer lugares y muchas caras nuevas; agradezco todos los momentos buenos y malos compartidos, las charlas de café y las amistades generadas.

Agradezco a mis tutores

Dr. Mario I Vega Paredes, gracias por haber compartido tu experiencia y tus conocimientos, por su infinita paciencia, sus regaños y buenos consejos, siempre me ayudaron a querer ser mejor cada día como estudiante, investigador y como persona. Gracias por confiar en mí y especialmente gracias por darme el plus de tu AMISTAD.

To Dr. Bonavida, thank you for the opportunity of been part of your group, I had a wonderful experience that make to challenge myself every day.

Agradezco a mi comité tutorial:

Al Dr. Vianney Ortiz Navarrete y a la Dra. Gloria Soldevila Melgarejo, por haberme guiado y compartido todos sus consejos a lo largo de cada evaluación.

Agradezco al jefe de la UIMII, Dr. César González Bonilla por haberme permitido realizar mi tesis doctoral en su ex Unidad de Investigación. Gracias por su amistad, por las tardes de pozole, de café y de buenas charlas.

Agradezco a mi familia, en especial a:

A mis padres, Raúl y Asunción. Siempre cuento con ustedes su apoyo incondicional me da la fortaleza para alcanzar mis metas. Los quiero muchísimo.

A mi hermana Rocío, a mi hermano Raúl, a mí cuñado Ricardo, gracias por todo el apoyo y paciencia, estamos aquí para alcanzar nuestros sueños, solo hay que atrevernos a salir a buscarlos.

A mis queridísimos sobrinos Kaled y Walden quienes siempre están alegrando mi entorno con una gran sonrisa.

A mi Max, quien siempre por más cansada que esté todos los días me recibes con infinita alegría.

A mi tía Isabel por su apoyo y su excelente sazón, usted siempre sorprendiéndome con sus esquicitos guisos.

A todos mis tíos y tías, Tío Roge, Tía Mayi, Tía Dori, Tía Olga, Tía Belli, Tía Lilia, a mi queridísima Tía abue Ene, Tío Carlos, Tío Pedro y a Lucia por todo su cariño y apoyo. A todos mis primos y primas, sobrinos y sobrinas.

A mi padrino Roberto Egusquiza, cuya amistad y cariño, consejos y ayuda a pesar de la lejanía, hizo mucho muy llevadera mi estancia lejos de casa.

A mis muy estimados amigos y hermanitos de laboratorio Yu-Mei, Berenice, Bernard, JC, Guille y Angeles. Hemos recorrido un largo camino, superado todos los malos momentos y compartido muchos buenos, sin ustedes no hubiera sido lo mismo. Gracias por su amistad y cariño, y por permitirme entrar en sus vidas.

Yu-Mei gracias por tu amistad de toda la vida, las tardes de cine, shopping y las buenas pláticas.

Bere gracias siempre por escuchar y por todos tus consejos y por ese “no siempre y no con todos”.

A Gabo por tu amistad y sinceridad, por todas las pláticas interminables y por esos momentos de tráfico compartidos.

To my friend, PhD. Voula Baritaki for all your help and good advises. Thank you for sharing me your knowledge and friendship. We share a lot of very good moments.

To my good LA friend's Aaron, Katherine, Loredana, Angélica, Jetzi and her family you make me feel as I was at home. Thanks to share with me all that good moments and for teaching me that **"it's just life"**.

A mis compañeros Rafa, Alfredo, Esteban, Andrés, Julio, Nancy, Rubén, Clara, Joaquín, Andrea, Dany, Brenda, Adrix, Tamara, Luis por todo su apoyo.

A mis amigas de licenciatura Lili, Cesia y Astrid; a los amigos de maestría Hermes y Gerardo por todo su apoyo incondicional.

Y a Ti, because you rock my world..... now, then and forever. Thank you.

.....

PRINCESA -... Dragón, ¿cómo sabes que hay cosas aterradoras allá afuera?

DRAGÓN - No lo sé... Me han dicho.

PRINCESA -¿Quién te ha dicho?

DRAGÓN -Yo me lo he dicho.

PRINCESA -¿Y por qué te lo has dicho?

DRAGÓN -¿Por costumbre?

PRINCESA -¿Quieres decir que nunca has salido de este castillo?

DRAGÓN -Este... no.

PRINCESA -¿Por qué?

DRAGÓN -¡Porque hay cosas aterradoras!... ¿Qué no me estas entendiendo?

PRINCESA -Pero no puedes saberlo si nunca has salido. Y no solo te puedes sentar a suponerlo y no hacer nada, tenemos que SALIR.

DRAGÓN -¿A dónde?

PRINCESA -A donde sea. Vamos a salir, nada más, vamos a atrevernos.

DRAGÓN -¿Pero y la señal?

PRINCESA -No hay señal.

DRAGÓN -¡Pero necesitamos la señal para poder salir!

PRINCESA -Está bien, está bien, no te pongas así. La señal... la señal es... la señal es ... ¡la vida misma! Tan fácil como eso, si estamos aquí, si vivimos, estoy segura que no es para estar encerrados. La vida misma es la señal de que podemos salir. ¡De que debemos salir! ¿Lo entiendes dragón?

DRAGÓN -Esteeeee... no.

Extracto de: Y colorín colorado este cuento aún no se ha acabado.

Capítulo 1 de Odin Dupeyron.

Brick walls are there for a reason,
They let us prove how badly we want things.

Randy Pausch

2. ÍNDICE

ÍNDICE

1. AGRADECIMIENTOS	iii
2. ÍNDICE	viii
2.1. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	xi
3. RESUMEN	2
4. ABSTRACT	5
5. INTRODUCCIÓN	7
5.1. EI CÁNCER	8
5.2. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER	8
5.3. LA CÉLULA TUMORAL Y SU TRATAMIENTO	9
5.4. ENFERMEDADES HEMATO-ONCOLÓGICAS	13
5.4.1. LINFOMAS	13
5.4.2. LINFOMAS NO HODGKIN	13
5.5. APOPTOSIS	17
5.5.1. PRINCIPALES VÍAS PARA MEDIAR LA APOPTOSIS	18
5.5.2. RESISTENCIA A LA APOPTOSIS MEDIADA POR LA PROTEÍNA TRAIL ..	23
5.5.3. PROTEÍNAS DE LA FAMILIA DE BCL-2	24
5.5.4. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS USANDO COMO BLANCO A LA FAMILIA DE PROTEÍNAS DE BCL-2	27
5.5.4.1. INHIBICIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LA FAMILIA DE BCL-2	28
6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
7. HIPÓTESIS	34
8. OBJETIVO GENERAL	34
8.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
9. MATERIALES Y MÉTODOS	35
9.1. Líneas celulares	36
9.2. Determinación de la viabilidad celular	36
9.3. Determinación de la apoptosis	36
9.4. Análisis por “western blot”	37
9.5. Análisis por “EMSA”	37
9.6. Expresión en membrana de los receptores de la proteína TRAIL	38
9.7. Despolarización de la membrana de la mitocondria	38
9.8. Inmunoprecipitación	39

9.9.	Ensayo de plásmido reportero	39
9.10.	Transfección con “siRNA”	40
9.11.	Análisis estadístico	40
10.	RESULTADOS Y ANÁLISIS	41
10.1	El tratamiento de las células Ramos con el compuesto químico obatoclax inhibe la expresión de las proteínas antiapoptóticas	42
10.2.	El compuesto químico obatoclax inhibe la vía canónica constitutiva de NF- κ B	44
10.3.	Sensibilización de células Ramos por el compuesto químico obatoclax a la apoptosis mediada por la proteína TRAIL y el mecanismo molecular involucrado	46
10.3.1.	El compuesto químico obatoclax sensibiliza a las células tumorales a la apoptosis mediada por la proteína TRAIL afectando la vía de NF- κ B.....	46
10.3.2.	El compuesto químico obatoclax induce la activación de la vía de apoptosis mediado por la mitocondria	49
10.4	El compuesto químico obatoclax activa tanto a la vía dependiente de caspasa 8 como a la vía de la mitocondria	51
10.5.	El compuesto químico obatoclax inhibe a la proteína antiapoptótica Mcl-1 mediando así la sensibilización a la apoptosis por la proteína TRAIL.....	53
10.6.	El compuesto químico obatoclax inhibe al factor de transcripción YY1 y media la sensibilización de la apoptosis por la proteína TRAIL	54
10.6.1.	El compuesto químico obatoclax inhibe la expresión y la actividad del factor de transcripción YY1.....	54
10.6.2.	El compuesto químico obatoclax induce la inhibición del YY1 aumentando la sensibilización de las células Ramos en la apoptosis mediada por la proteína TRAIL	57
10.6.3.	La sensibilización mediada por el compuesto químico obatoclax a la apoptosis por la proteína TRAIL induce un aumento de expresión del receptor DR5, pero no del receptor DR4.....	58
11.	DISCUSIÓN	62
12.	CONCLUSIONES	66
13.	ABREVIATURAS	70
14.	BIBLIOGRAFÍA	73
15.	A N E X O S	86

2.1. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURA 1. FRECUENCIA DE LOS PRINCIPALES TIPOS DE CÁNCER A NIVEL MUNDIAL. 10

FIGURA 2. GRÁFICA MOSTRANDO LA INCIDENCIA Y LA MORTALIDAD DE LOS NUEVE PRINCIPALES TIPOS DE CÁNCER A NIVEL MUNDIAL. 10

FIGURA 3. DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE LAS DEFUNCIONES POR TUMORES MALIGNOS PARA CADA SEXO. INEGI DEFUNCIONES 2008. 12

FIGURA 4. MORTALIDAD MUNDIAL POR ENFERMEDADES HEMATO-ONCOLÓGICAS SEGÚN GÉNERO Y GRUPO DE EDAD 2002. 12

FIGURA 5. ESQUEMA DE LAS VÍAS EXTRÍNSECA O POR RECEPTORES DE MUERTE E INTRÍNSECA O VÍA MITOCONDRIAL DE APOPTOSIS. 20

FIGURA 6. ESQUEMA DE LA APOPTOSIS COORDINADA POR CASPASAS QUE CONDUCEN A LA DEGRADACIÓN DE DIVERSAS ESTRUCTURAS Y ORGANELOS CLAVE DE LA CÉLULA. 22

FIGURA 7. ESQUEMA DE LA FAMILIA DE PROTEÍNAS DE BCL-2. 24

FIGURA 8. ESQUEMA DE LOS ESTÍMULOS PARA ACTIVAR A LAS PROTEÍNAS DE SOLO EL DOMINIO DE BH3. 25

FIGURA 9. INTERACCIONES ENTRE LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA DE BCL-2. 26

FIGURA 10. MECANISMOS DE ACTIVACIÓN DE LA FAMILIA DE PROTEÍNAS DE BCL-2. 27

FIGURA 11. FÓRMULAS QUÍMICAS DE DIFERENTES INHIBIDORES QUÍMICO PEQUEÑOS DE LA FAMILIA DE BCL-2. 31

FIGURA 12. PERFIL DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNA EN LAS CÉLULAS RAMOS TRATADAS CON EL COMPUESTO QUÍMICO OBATOCLAX. 43

FIGURA 13 MCL-1 SE ENCUENTRA SECUESTRANDO A LA PROTEÍNA BAK DE FORMA BASAL EN CÉLULAS DE LNH. 44

FIGURA 14. EL COMPUESTO QUÍMICO OBATOCLAX INHIBE LA ACTIVIDAD DE NF-κB. 47

FIGURA 15. EL COMPUESTO QUÍMICO OBATOCLAX INDUCE LA SENSIBILIZACIÓN DE LAS CÉLULAS RAMOS A LA APOPTOSIS MEDIADA POR LA PROTEÍNA TRAIL. 51

FIGURA 16. EL COMPUESTO QUÍMICO OBATOCLAX DESPOLARIZA LA MEMBRANA DE LA MITOCONDRIA. 52

FIGURA 17. EL COMPUESTO QUÍMICO OBATOCLAX ACTIVA A LA PROCASPASA 8 Y A LA VÍA DE LA MITOCONDRIA. 53

FIGURA 18. LA INHIBICIÓN DE MCL-1 SENSIBILIZA A LAS CÉLULAS RESISTENTES A LA APOPTOSIS MEDIADA POR LA PROTEÍNA TRAIL. 54

FIGURA 19. EL COMPUESTO QUÍMICO OBATOCLAX MEDIA LA INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN Y LA ACTIVIDAD DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN YY1. 56

FIGURA 20. LA INHIBICIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN YY1 SENSIBILIZA A LAS CÉLULAS RESISTENTES A LA APOPTOSIS MEDIADA POR LA PROTEÍNA TRAIL.....57

FIGURA 21. EL COMPUESTO QUÍMICO OBATOCLAX AUMENTA LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DR5.....59

FIGURA 22. LA INHIBICIÓN DEL RECEPTOR DR5, PERO NO DEL DR4, NO PERMITE LA SENSIBILIZACIÓN DE LAS CÉLULAS RESISTENTES A LA APOPTOSIS MEDIADA POR LA PROTEÍNA TRAIL. LAS CÉLULAS RAMOS FUERON TRATADAS CON SIRNA PARA LOS RECEPTORES DR4, DR5 Y CON SIRNA CONTROL COMO SE INDICA EN MATERIALES Y MÉTODOS.....61

FIGURA 23. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DEL COMPUESTO QUÍMICO OBATOCLAX PARA SENSIBILIZAR A LAS CÉLULAS A LA APOPTOSIS MEDIADA POR LA PROTEÍNA TRAIL.....69

➤ Tabla 1. Principales causas de mortalidad a nivel mundial..... 8

3. RESUMEN

El compuesto químico obatoclax, el cual también es conocido como GX15-070, es un antagonista de amplio espectro de las proteínas antiapoptóticas de la familia de Bcl-2, ya que mimetiza el dominio BH3 de las proteínas de solo el dominio BH3. El compuesto químico obatoclax actualmente se encuentra en estudios de fase clínica y ha demostrado ser capaz de sensibilizar a células tumorales resistentes a apoptosis mediada por la proteína TRAIL. Se ha observado que el mecanismo del el compuesto químico obatoclax es vía la liberación de las proteínas Bak y Bim del complejo formado con las proteínas anti-apoptóticas Mcl-1, Bcl-2 o Bcl-XL o por la activación de la proteína Bax, a través de otros mecanismos que no han sido del todo elucidados. En el presente trabajo, nos preguntamos: podría el compuesto químico obatoclax sensibilizar a las células tumorales a la apoptosis mediada por la proteína TRAIL y también alterar las vías de la apoptosis? La línea celular de linfoma no-Hodgkin de linfocitos B, Ramos, la cual es resistente a la proteína TRAIL fue utilizada como modelo. El tratamiento de las células Ramos con el el compuesto químico obatoclax, inhibe significativamente la expresión de varios miembros de la familia de Bcl-2, disocia el complejo Bak-Mcl-1 e inhibe la actividad de NF- κ B. Las células tratadas con RNA de interferencia pequeños (siRNA) dirigidas contra Mcl-1 se hicieron sensibles a la apoptosis mediada por la proteína TRAIL. Nosotros analizamos si las células Ramos se volvían sensibles a la proteína TRAIL por el efecto del compuesto químico obatoclax vía la señalización por los receptores DR4 y/o DR5. La transfección con siRNA para el receptor DR5, pero no con siRNA para el receptor DR4, sensibilizó a las células a la apoptosis después del tratamiento con el compuesto químico obatoclax y la proteína TRAIL. La señalización vía el receptor DR5 correlacionó con la inhibición inducida por el represor del receptor DR5, el factor de transcripción Yin Yang 1 (YY1). La transfección con el siRNA del factor de transcripción YY1 sensibilizó a las células a la apoptosis mediada por la proteína TRAIL después del tratamiento con el compuesto químico obatoclax y la proteína TRAIL. En general, los resultados revelan un nuevo mecanismo por medio del cual el compuesto químico obatoclax sensibiliza a la apoptosis mediada por la proteína TRAIL, además de observar la participación en la inhibición de la actividad del factor de transcripción NF- κ B, la

expresión de la proteína Mcl-1 y de la expresión y actividad del factor de transcripción YY1.

4. ABSTRACT

The pan Bcl-2 family antagonist Obatoclax (GX15-070) is currently in clinical trials, was shown to sensitize TRAIL-resistant tumors to TRAIL-mediated apoptosis via the release of Bak and Bim from Mcl-1 or Bcl-2 / Bcl-x_L complexes or by the activation of Bax, though other mechanisms were not examined. Herein, we hypothesize that Obatoclax mediated sensitization to TRAIL apoptosis may also result from alterations of the apoptotic pathways. The TRAIL-resistant B cell line Ramos was used as a model for investigation. Treatment of Ramos cells with Obatoclax significantly inhibited the expression of several members of the Bcl-2 family, dissociated Bak from Mcl-1 and inhibited the NF- κ B activity. Cells treated with Mcl-1 siRNA were sensitized to TRAIL apoptosis. We examined whether the sensitization of Ramos to TRAIL by Obatoclax resulted from signaling the DR4 and/ or DR5. Transfection with DR5 siRNA, but not with DR4 siRNA, sensitized the cells to apoptosis following treatment with Obatoclax and TRAIL. The signaling via DR5 correlated with Obatoclax-induced inhibition of the DR5 repressor Yin Yang 1 (YY1). Transfection with YY1 siRNA sensitized the cells to TRAIL apoptosis following treatment with Obatoclax and TRAIL. Overall, the present findings reveal a new mechanism of Obatoclax-induced sensitization to TRAIL apoptosis and the involvement of the inhibition of NF- κ B activity and downstream Mcl-1 and YY1 expressions and activities.

5. INTRODUCCIÓN

5.1. EL CÁNCER

De acuerdo a la definición dada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), cáncer es un proceso de crecimiento y de diseminación incontrolados de células anormales que se extienden más allá de sus límites normales y las cuales pueden invadir partes adyacentes del cuerpo y a su vez propagarse a otros órganos, en un proceso conocido como metástasis. Se ha visto que la metástasis es la principal causa de muerte por cáncer. El término cáncer es genérico y designa a un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del cuerpo. (1;2).

5.2. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER

El cáncer constituye la segunda causa de mortalidad a nivel mundial, siendo el responsable de 12.6 % de las muertes totales (**Tabla 1**). A pesar de los esfuerzos y los recursos económicos invertidos para la mejora del tratamiento, el cáncer causa más de 7 millones de muertes al año a nivel mundial (**Tabla 1**).

PRINCIPALES CAUSAS DE MORTALIDAD POR ENFERMEDAD A NIVEL MUNDIAL			
LUGAR	CAUSA DE MUERTE	NÚMERO DE MUERTES*	% TOTAL DE MUERTES
1	ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES	8,953	15.1
2	CÁNCER	7,424	12.6
3	ENFERMEDADES CEREBROVASCULARES	5,712	9.7
4	INFECCIONES RESPIRATORIAS	4,177	7.1
5	CONDICIONES PERINATALES	3,180	5.4
6	ENFERMEDAD RESPIRATORIA OBSTRUCTIVA CRÓNICA	3,025	5.1
7	ENFERMEDADES DIARREICAS	2,163	3.7
8	HIV/SIDA	2,040	3.5
9	TUBERCULOSIS	1,464	2.5
10	OTRAS	20,634	35
	TODAS LAS CAUSAS	58,772	100

Tabla 1. Principales causas de mortalidad a nivel mundial. Los datos fueron extraídos a partir del informe de la Sociedad Americana contra el Cáncer publicado en el 2008. * Número de muertes por 1000.

En hombres las 15 principales causas de cáncer de acuerdo a su incidencia y por su mortalidad son: el cáncer de pulmón, el de próstata, el cáncer colo-rectal, el de estómago,

el de hígado, el de esófago, el de vejiga, el de linfoma no-Hodgkin (LNH), la leucemia, el de labio y cavidad oral, el de riñón, el de páncreas, el de laringe, el de cerebro y sistema nervios y otras faríngeas. Por otro lado, en mujeres las 15 principales causas de a cuerdo a su frecuencia y a su mortalidad por cáncer son debidas a el cáncer de: mama, el cérvico-uterino, el de pulmón, el cáncer de estómago, el de cuello uterino, el de ovario, el de hígado, el de la tiroides, la leucemia, el de LNH, el de esófago, el de páncreas, el de cerebro y sistema nervioso y el de riñón (3) (**Figura 1 y Figura 2**). El LNH se encuentra dentro de las primeras causas de incidencia y mortalidad, ocupando el 12vo lugar a nivel mundial; se presenta con mayor frecuencia en hombres que en mujeres, ocupando el 8vo y el 11vo lugar respectivamente (3).

Más del 72% de las defunciones por cáncer fueron registradas en países de ingresos bajos y medianos. La OMS prevé que entre 2007 y 2030, la mortalidad por cáncer a nivel mundial aumentará en un 45%, ya que se estima que pasará de 7.9 a 11.5 millones de defunciones por año, debido al crecimiento demográfico y a el envejecimiento de la población; además, también se estima que durante el mismo periodo, el número de casos nuevos de cáncer aumentará de 11.3 a 15.5 millones (4).

En México, de acuerdo con las defunciones por tumores malignos en 2008, entre los hombres, el mayor porcentaje de lesiones malignas fue en la próstata (8.1%), seguido por los tumores de tráquea, bronquios y pulmón (7.0%), enfermedad asociada al consumo de tabaco; y entre las mujeres, el cáncer de mama (7.6%), seguido por los tumores malignos de ovarios (6.4 por ciento) (4) **Figura 3**.

5.3. LA CÉLULA TUMORAL Y SU TRATAMIENTO

La división desmesurada de las células tumorales es debida a la adquisición de cambios en su material genético que le aporta una ventaja en la proliferación comparado con las células normales. La célula tumoral en división sufre cambios constantes debido a su inestabilidad genética y a su deficiente capacidad de reparación del daño en el DNA (por el ingles, Desoxiribonucleic acid), adquiriendo mutaciones que le permiten su evolución a célula tumoral (5).

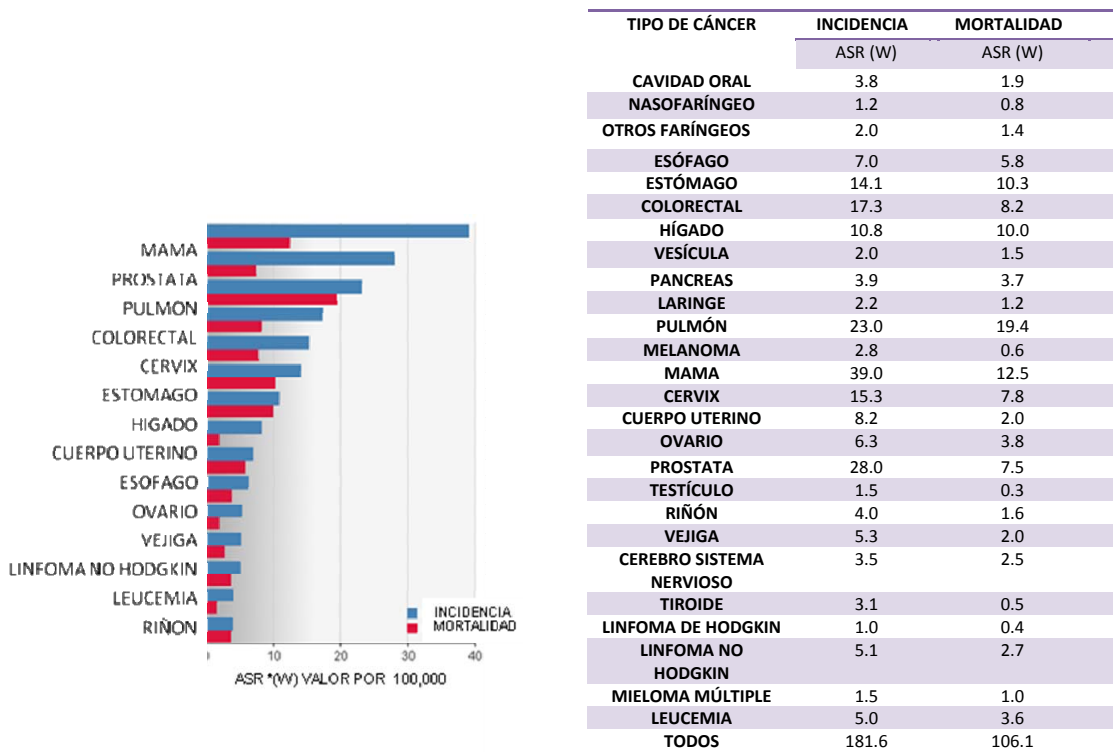


Figura 1. Frecuencia de los principales tipos de cáncer a nivel mundial. Modificado de GLOBOCAN 2011 (3).

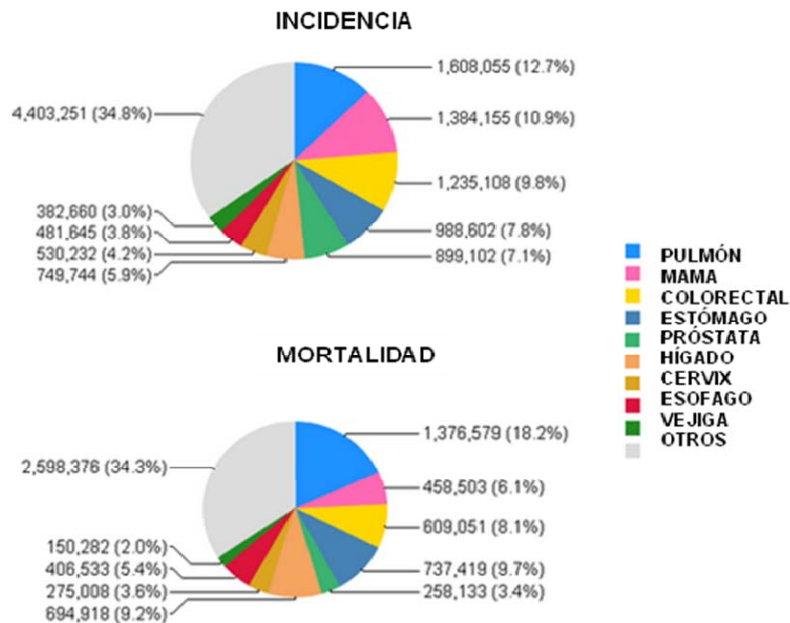


Figura 2. Gráfica mostrando la incidencia y la mortalidad de los nueve principales tipos de cáncer a nivel mundial. Modificado de GLOBOCAN 2011 (3).

El objetivo de las terapias contra el cáncer es la eliminación de todas las células tumorales sin dañar a las células normales o al resto de los tejidos. En el tratamiento de tumores localizados se realiza una extracción total por cirugía antes de que se produzca la metástasis. La radioterapia también se utiliza en la práctica clínica para este tipo de tumores. Una vez que se genera la metástasis la quimioterapia se convierte en la primera línea de tratamiento.

La quimioterapia se basa en utilizar agentes químicos citotóxicos o citostáticos que afectan la maquinaria de replicación de las células en división y su selectividad se basa en la capacidad de la célula normal en división para reparar el daño generado en su material genético. En la mayoría de los casos se utilizan cocteles de quimioterapia para interferir en diferentes vías del ciclo celular y del metabolismo de la célula tumoral permitiendo administrar dosis más bajas de cada una de ellas, comparado con su uso como agente único, y además para prevenir la generación de resistencia (5;6).

La falta en la eficacia de los tratamientos con quimioterapia es debido a la generación de resistencia. Las células que sean sensibles al tratamiento serán eliminadas, pero las células que han adquirido mutaciones o sobre expresión de un gen poseerán una ventaja selectiva, por lo que habrá un enriquecimiento de las células resistentes dentro del tumor y generación de un tumor refractario a la quimioterapia original (5;6). Estas mutaciones generalmente se dan lugar en genes celulares que involucran a los proto-oncogenes o activadores del ciclo celular, los genes supresores de tumores o que son capaces de inhibir el ciclo celular y los genes relacionados con la reparación del DNA (7).



Figura 3. Distribución porcentual de las defunciones por tumores malignos para cada sexo. INEGI defunciones 2008. Modificado de la página del Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI] 2011 (4).

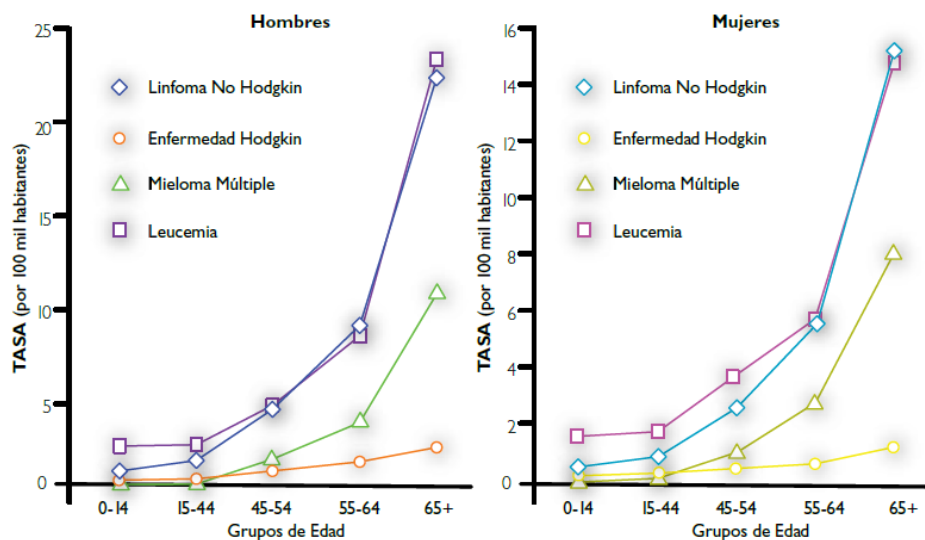


Figura 4. Mortalidad mundial por enfermedades hemato-oncológicas según género y grupo de edad 2002. Modificado de Tirado-Gomez & Mohar 2007 (8).

5.4. ENFERMEDADES HEMATO-ONCOLÓGICAS

Las enfermedades hemato-oncológicas constituyen un grupo de enfermedades de elevada incidencia y mortalidad en población infantil y adulta joven, ocupando el 7° lugar. En relación a la magnitud de las tasas de incidencia por género, se observó que estas fueron mayores en los hombres en las cuatro enfermedades hemato-oncológicas principales (Leucemia, LNH, Mieloma múltiple y Linfoma de Hodgkin (LH)). La incidencia a nivel mundial por grupo de estas enfermedades tanto en hombres como en mujeres mostró que las leucemias y los LNH fueron las enfermedades hemato-oncológicas que se presentan con mayor frecuencia en la población (8). El LNH ocupa el 12° lugar a nivel mundial, 8° para hombres y 11° para mujeres (3). Se presenta con mayor frecuencia en hombres que en mujeres; además la incidencia y la mortalidad presentan un patrón ascendente, es decir, que se presenta con mayor frecuencia en grupos de edad de 65 o más, **Figura 4** (8).

5.4.1. LINFOMAS

El linfoma es la neoplasia primaria del sistema linfo-reticular; la cual ha sido clasificada en LH y LNH, estas enfermedades corresponden a entidades totalmente distintas desde el punto de vista clínico, histológico y en su respuesta a la terapia.

5.4.2. LINFOMAS NO HODGKIN

Los LNH constituyen un grupo de enfermedades hemato-oncológicas muy relacionadas entre sí que se originan en el sistema linfático y habitualmente se diseminan por todo el organismo. Se caracterizan por la proliferación neoplásica de las células linfoides y presentan, al igual que las leucemias, alteraciones cromosómicas características las cuales sirven como apoyo diagnóstico. Los LNH representan un grupo muy heterogéneo de proliferaciones malignas que responden a diferentes mecanismos fisiopatológicos y en gran parte a esto se debe las numerosas clasificaciones que existen. Algunos de estos linfomas son de desarrollo lento, mientras que otros se diseminan rápidamente. El 85% de los LNH corresponden a linfomas de linfocitos B y la variedad más común es la de linfoma difuso de células B grandes (LDCBG), seguido por el linfoma folicular (LF) que representa entre el 35 al 40% de los linfomas adultos. Es especialmente común en gente de edad

mayor, presentándose en un estadio avanzado y curso clínico indolente con un periodo medio de supervivencia de entre 8 a 10 años (9). Al inicio del tratamiento los pacientes responden satisfactoriamente a la terapia convencional (radioterapia y quimioterapia), pero la enfermedad comúnmente se presenta en múltiples episodios de recurrencia lo que al final puede conllevar a la muerte debido a una enfermedad refractaria, transformación en una patología de linfocitos B más agresiva o complicaciones en la terapia. Una vez que ocurre una transformación de la enfermedad la media de supervivencia es de menos de un año (9).

En la búsqueda de ofrecer mejores opciones de tratamiento a los pacientes, en los últimos años se han desarrollado diferentes estrategias terapéuticas con la finalidad de reducir los efectos secundarios y con la finalidad de hacer que los tratamientos sean más específicos. La disponibilidad del desarrollo de anticuerpos marcó la pauta para la búsqueda de blancos moleculares en las células neoplásicas. La tecnología de hibridomas permitió la producción de grandes cantidades de anticuerpos monoclonales específicos para el antígeno tumoral, su aplicación clínica trajo consigo resultados prometedores aunque también algunas decepciones por que las primeras generaciones de anticuerpos fueron de origen murino, y esto al final iniciaba una respuesta inmune en contra de los antígenos extraños del ratón en el humano y por lo tanto en tratamientos consecuentes se observaba una reducción en el tiempo de vida media de estos anticuerpos en el organismo. Posteriormente, el desarrollo de anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos redujo la falta de inmunogenicidad y mejoró la habilidad para reclutar células efectoras (10). De manera general el éxito de la inmunoterapia basada en anticuerpos monoclonales específicos para los antígenos tumorales ha tenido resultados con significancia estadística en lo que se refiere al intervalo libre de enfermedad, la prolongación de la supervivencia así como en la reducción de la masa tumoral con mejorías de aproximadamente 30% con un rango que va desde el 0 al 60% (11).

En 1997 la FDA, aprueba el uso de Rituximab, el cual es un anticuerpo monoclonal cuyo blanco es la molécula CD20 encontrada en la superficie del linfocitos B. La indicación inicial fue para el tratamiento de pacientes con recaídas o refractarios, de bajo grado o folicular, que sean CD20⁺, con LNH de células B. Posteriormente, se expandió su uso como primera línea de tratamiento para LF, CD20⁺ en combinación con la quimioterapia de ciclofosfamida, vincristina y prednisona (CVP), así como para pacientes con LNH de linfocitos B de bajo grado CD20⁺ con enfermedad estable o que hayan alcanzado una

respuesta parcial o completa después del tratamiento con CVP, y también como primer línea de tratamiento en DLBCL CD20⁺ en combinación con quimioterapia de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona (CHOP) o por otra quimioterapia basada en antraciclinas (12).

Otra de las terapias que actualmente ha despertado mucho interés es la relacionada con TRAIL, el cual ha emergido como una prometedora terapia contra el cáncer al tener como blanco los receptores de muerte y resultando ser un inductor de apoptosis selectivo *in vivo* sin causar toxicidad a las células normales. Actualmente se estudia el uso de la proteína TRAIL soluble recombinante así como de anticuerpos dirigidos contra los receptores de la proteína TRAIL para la inducción de apoptosis en células tumorales. En la literatura existe evidencia controversial acerca de que el tratamiento con la proteína TRAIL soluble recombinante pudiera ser tóxico. En cultivos primarios de hepatocitos, queratinocitos, y astrocitos se ha visto inducción de muerte por apoptosis en células humanas normales (13-15). Otros estudios reportan efecto no tóxico en tejido normal de ratones, monos y chimpancés después de un tratamiento repetido el TRAIL recombinante (16;17) y sostienen que probablemente el efecto que observan en los cultivos primarios de células normales sea por la presencia de artefactos relacionados con la especificidad de la proteína recombinante utilizada. Una de las TRAIL recombinantes con más auge por su significativo efecto en el tumor es Apo2L/TRAIL (AMG-951) el cual ha mostrado tener una alta actividad antitumoral *in vivo* (18). Se ha visto toxicidad asociada al tratamiento tanto como agente único o en combinación con quimioterapia o radiación ionizante, en estos últimos con un efecto aditivo o sinérgico (19). En estudios de fase I, se observó que al tratar 71 pacientes con tumores sólidos avanzados (grado 3 y 4) o con metástasis o con LNH con Apo2L/TRAIL, el tratamiento fue seguro y bien tolerado a dosis arriba de 30 mg/kg diario por 5 días cada 3 semanas. Los efectos adversos mostrados (fatiga, náusea, vómito, fiebre, anemia y constipación), fueron abatidos casi en su totalidad con cuidado de soporte o tratamiento para los síntomas (20). Se ha observado que los anticuerpos anti receptor de la proteína TRAIL tienen un tiempo de vida media biológica mayor (aproximadamente de 14 a 21 días) que las formas de recombinantes humanos de la proteína TRAIL (30-60 minutos)(17;17). Esto permitirá mejorar su localización dentro de los sitios del tumor y así prolongar su efecto, aunque también aumenta el riesgo de efectos secundarios tóxicos. Se han generado diferentes anticuerpos anti receptor de la proteína TRAIL, dentro de los más destacados se encuentran mapatumumab (anti-TRAIL-

R1, Human Genome Sciences-HGS), lexatumumab (anti-TRAIL-R2, HGS), AMG-655 (Anti- TRAIL-R2, Amgen) y apomab (anti-TRAIL-R2, Genentech).

Mapatumumab se ha estudiado en pacientes con LNH así como con tumores sólidos (cáncer colo-rectal, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de ovario y de próstata), como agente único (21-24), siendo bien tolerado y con pocos eventos secundarios como fatiga fiebre, hipotensión, mialgias y trombocitopenia. En un estudio de fase 1b/2 con 40 pacientes con LNH refractario o pacientes con enfermedad residual Younes y colaboradores (21) observaron que a una dosis de 3 o 10 mg/kg de mapatumumab cada 21 días es bien tolerada y no hay presencia de hepato-toxicidad. Tres de estos pacientes con LF tuvieron respuesta clínica, dos con respuesta completa y uno con respuesta parcial.

En estudios fase I se ha observado que la administración de lexatumumab en pacientes con tumores sólidos, puede ser segura al administrarlo cada 14 días a 10 mg/kg (25;26). Se ha observado que algunos tumores humanos presentan resistencia a la apoptosis mediada por la proteína TRAIL como agente único, por lo que previamente se debe de caracterizar los tumores de manera individual y determinar si los pacientes son susceptibles o no al tratamiento con la proteína TRAIL. También se ha observado que su uso en combinación con otros tratamientos puede sensibilizar a las células malignas y revertir la resistencia a la proteína TRAIL. Por ejemplo el mapatumumab está siendo combinado con inhibidores de proteínas cinasas como el sorafenib, inhibidores del proteasoma como el bortezomib, la quimioterapia como el carboplatino, inhibidores de la tubulina como el paclitaxel etc. Aunque hasta el momento los resultados aún no han sido publicados, los resultados preliminares son prometedores (27).

El 85% de los LNH tienen anomalías citogenéticas, por tanto los defectos cromosomales clonales son obligatorios en la linfomagénesis. También se han descrito proto-oncogenes y genes supresores involucrados en la patogénesis de los LNH, entre ellos tenemos el gene *bcl-2* (28). El oncogén Bcl-2, fue identificado como un regulador de la apoptosis sobre-expresado en el LF debido a una translocación cromosomal. La oncoproteína actúa incrementando el tiempo de vida de la célula y no debido a un aumento en la proliferación celular como es común en otros oncogenes (29). La acumulación celular preserva células pre-neoplásicas, con mutaciones que les provee de una ventaja selectiva

y conllevando a que rebasen barreras tisulares que facilitan la metástasis, aumentando la progresión de la enfermedad, y confiriendo resistencia a la quimioterapia (5;7;30).

A pesar de los avances en el conocimiento de la biología celular del cáncer y el incremento en la eficacia del tratamiento, la terapia convencional se ha mantenido con pocos cambios por décadas. De manera general el tratamiento involucra radiación y/o cirugía cuando el tumor se encuentra localizado, pero si hay persistencia entonces se utiliza una quimioterapia citotóxica y citostática con el objetivo de eliminar a las células tumorales del paciente y tratando de no dañar a las células normales. La falla a las terapias estándares habla de la importancia de desarrollar nuevas estrategias de tratamiento que van de la mano con el conocimiento de los mecanismos involucrados en el desarrollo de dichas resistencias.

5.5. APOPTOSIS

La apoptosis es la muerte celular programada en la cual se llevan a cabo una serie de eventos que conducirán a la eliminación de las células sin liberar sustancias dañinas a la matriz extracelular. La apoptosis es un proceso vital para la embriogénesis, la homeostasis de los tejidos y para la defensa contra los patógenos; es necesario que esta esté presente y que pase desapercibida de ahí la importancia de que se encuentre regulada. Existe una producción en exceso de células en los diferentes organismos, las cuales sirven para los procesos de desarrollo durante la embriogénesis y el recambio celular continuo de los tejidos. Estas células pasan por estrictos controles de calidad o puntos de chequeo, para posteriormente, permitirles llegar hasta la diferenciación, ejercer una función por un periodo determinado y posteriormente ser removidas habiendo cumplido su ciclo. Aquellas células que no pasen dicho control, así como las células que se dañen durante su proceso de maduración por efectos ya sea químicos, físicos o biológicos también tendrán que ser removidas. La remoción celular se hará de manera silenciosa, dichas células expresarán antígenos en superficie los cuales serán reconocidos por fagocitos de la periferia o reclutados en el sitio de muerte celular programada sin la generación de citocinas al exterior de la célula que pudieran inducir procesos de inflamación (31).

La habilidad de escapar del proceso de apoptosis ha sido relacionada con inflamación no resuelta, algunas condiciones de autoinmunidad y en otros casos llegar hasta la aparición de mutaciones (32). Las células transformadas o malignas desarrollan ventajas sobre las

células normales que recaen sobre las vías de apoptosis, como son la sobre expresión de proteínas antiapoptóticas o de oncogenes, la disminución de receptores o de proteínas de regulación y al posteriormente presentar resistencia a las terapias convencionales, que tiene como mecanismo iniciar la apoptosis en las células malignas (33). El conocer estas enfermedades y elucidar los cambios presentes en las células han permitido el entendimiento de algunos mecanismos de regulación que la célula utiliza para inducir apoptosis. El conocer los mecanismos, en células normales y en células malignas, es importante para entender la etiología de la enfermedad y también ofrece grandes promesas para desarrollar agentes terapéuticos más selectivos y efectivos dirigidos contra blancos específicos.

5.5.1. PRINCIPALES VÍAS PARA MEDIAR LA APOPTOSIS

El inicio de la apoptosis es un proceso heterogéneo, en donde las vías que participan dependen del agente inductor. La muerte celular se caracteriza por la activación de hidrolasas catabólicas (cistein-proteasas llamadas caspasas y nucleasas) (34). Las caspasas son sintetizadas como zimógenos y son activadas por 2 vías principales de apoptosis, la vía intrínseca o mediada por la mitocondria y la vía extrínseca o mediada por receptores de muerte.

5.5.1.1. VÍA INTRÍNSECA O DE LA MITOCONDRIA

La mitocondria es un organelo compuesto por dos membranas: la membrana interna y la membrana externa. La membrana mitocondrial interna rodea a la matriz mitocondrial, se empaqueta en crestas que contienen a los complejos moleculares de la cadena de transporte de electrones y a través de esta que se genera el gradiente de iones hidrógeno necesario para formar adenosín trifosfato (ATP) (35). La membrana mitocondrial externa rodea a la membrana interna creando un espacio inter-membranal donde residen muchas de las proteínas promotoras de la apoptosis, incluyendo el citocromo C, la proteína SMAC/DIABLO, la HtrA2 y el AIF. Diversos tipos de estrés celular causan que la mitocondria libere estas proteínas hacia el citosol. Una vez en el citosol, el citocromo C se une al carboxilo terminal de la proteína Apaf-1, la cual se oligomeriza en un complejo heptamérico capaz de unirse a la pro-caspasa 9 formando una estructura multi-proteica conocida como apoptosoma (36). La unión física de Apaf1 con la pro-caspasa 9 está mediada por sus dominios de reclutamiento de caspasas (CARD), a través de una unión

homotípica CARD-CARD. SMAC/Diablo y HtrA2 contribuyen a la activación de caspasas antagonizando a los inhibidores de las proteínas de la apoptosis (IAP), los cuales son una familia de inhibidores de las caspasas celulares. Endo G y AIF, contribuyen a la degradación del DNA. Esta vía conocida como “*mitocondrial o intrínseca*” es mediada principalmente por la familia de proteínas de Bcl-2 (37).

5.5.1.2. VÍA EXTRÍNSECA MEDIADO POR LOS RECEPTORES DE MUERTE

La “*vía extrínseca*” se induce por los receptores de muerte celular en superficie al asociarse con sus respectivos ligandos, los cuales son miembros de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF). Los receptores contienen dominios citosólicos de muerte que se unen a la proteína adaptadora con dominios de muerte asociada a Fas (FADD), esta proteína contiene tanto el dominio de muerte (DD), como los dominios efectoros de muerte (DED) (38). El DED de FADD se une al DED de las pro-caspasas (caspasas 8 o 10), formando el complejo de señalización inductor de muerte (DISC).

5.5.1.3. APOPTOSIS INDUCIDA POR LA PROTEÍNA TRAIL

TRAIL es una proteína transmembranal que se expresa en células citotóxicas como Linfocitos T citotóxicos, células NK, macrófagos y en algunos tejidos. La proteína TRAIL es un miembro de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF), que ha mostrado inducir apoptosis en células malignas con una mínima toxicidad en tejido normal (17).

La proteína TRAIL reconoce a los receptores de muerte DR4 también denominada TRAIL-R1 y DR5 (TRAIL-DR2). La proteína TRAIL también se une a otros receptores llamados receptores distractores, los cuales no inducen apoptosis debido a que carecen de dominios intracitoplasmáticos para transducir la señal. Estos receptores se expresan en mayor concentración en las células normales compitiendo con los receptores de muerte y protegiendo a las células normales de la inducción de apoptosis (39). Hay tres receptores distractores llamados TRAIL-R3 (DcR1), TRAIL-R4 (DcR2) y el receptor soluble osteoprotegerina (OPG) (TRAIL-R5), aunque este último, se ha visto que participa en la regulación y formación de los huesos, pero también pudiendo actuar como un receptor distractor de la proteína RANKL (40).

Los receptores DR4 y DR5 contienen dominios ricos en cisteína en su dominio extracelular causando la trimerización del receptor al unirse a la proteína TRAIL, algunos

autores han reportado que dicha trimerización puede ser homo o heteromérica. En el dominio intracitoplasmático se encuentran los dominios de muerte (DD) con los cuales interactúa al reclutar a la proteína FADD, esta proteína, actúa como una proteína adaptadora, ya que contiene DD's así como dominios efectores de muerte (DED) con los cuales une a la pro-caspasa 8 o a la pro-caspasa 10 así como también a la proteína inhibidora de la proteasa parecida a ICE/CED-3 homóloga a FADD (FLIP) (41). El complejo multi-proteico resultante se conoce como DISC, con ello se promueve la conversión de las pro-caspasas a su forma activa para la subsecuente activación de las caspasas efectoras 3 y 7. Sin embargo, la proteína FLIP, la cual tiene gran homología en secuencia con las caspasas iniciadoras, tiene una función inhibitoria por lo que compete con su unión a los DED de FADD, impidiendo que haya una transducción de la señal. En la **Figura 5** se esquematiza la inducción de apoptosis mediada por esta vía. El procesamiento autocatalítico de las caspasas 8 o 10 genera la formación de dos subunidades una grande y otra pequeña. Estas subunidades forman heterotetrámeros los cuales activan a las caspasas efectoras como: caspasa 3 y 7.

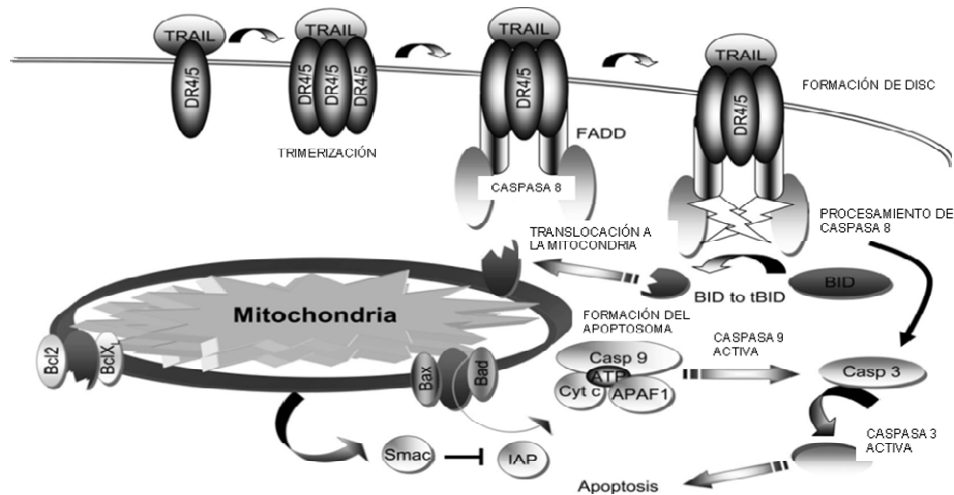


Figura 5. Esquema de las vías extrínseca o por receptores de muerte e intrínseca o vía mitocondrial de apoptosis. Modificada de Henson et. al., 2008 (39).

5.5.1.4. APOPTOSIS DEPENDIENTE DE CASPASAS

Las vías dependientes de caspasas convergen en un punto al procesar a las caspasas activadoras. Una vez activadas las caspasas conocidas como activadoras, la 9, la 8 o la 10, ya sea por la vía intrínseca o extrínseca, se comenzará una cascada de señalización en donde se procesará a las caspasas efectoras, las caspasas la 3, la 6 y la 7 las cuales llevarán a cabo el desmantelamiento de las estructuras celulares a través del

procesamiento de sus substratos, produciendo los cambios fenotípicos característicos de la apoptosis, como por ejemplo el corte proteolítico de la proteína ICAD (inhibidor de la DNAsa activada por caspasas), la cual liberará a CAD (DNAsa activada por caspasas), y una vez activada se dirigirá hacia el núcleo donde se asociará al DNA para realizar cortes inter nucleosomal. Al mismo tiempo, la lamina nuclear será procesada por las caspasas, debilitándola, permitiendo la fragmentación del núcleo y de las proteínas de la envoltura nuclear. También, se procesará a las proteínas en los sitios de adhesión focal y sitios de adhesión célula a célula dirigiendo hacia la muerte por desprendimiento y retracción. La actividad de las caspasas provocará la exposición del lípido intermembranal, la fosfatidil serina y de otras señales fagocíticas en la superficie celular. El procesamiento de la proteína Rho por ROCK1 permitirá la contracción de la actina del citoesqueleto, la formación de las invaginaciones de la membrana plasmática así como la fragmentación nuclear. Se procesará a la tubulina, de los microtúbulos asociados y a la de las proteínas motoras que conducen a los cambios en el citoesqueleto contribuyendo a la formación de los cuerpos apoptóticos (42). En la **figura 6** se muestra los mecanismos posteriores de degradación celular por apoptosis una vez que se inicia por las caspasas.

Posteriormente habrá un reclutamiento de células fagocíticas, principalmente de los macrófagos, los cuales se encargaran de fagocitar y degradar estos cuerpos apoptóticos. Se ha visto que algunas células no necesitan llegar al paso de la formación de los cuerpos apoptóticos y esto está directamente relacionado con el tamaño celular, ya que las células pequeñas pueden ser perfectamente fagocitadas pero es necesario que las células grandes formen los cuerpos apoptóticos para poder ser fagocitadas (43).

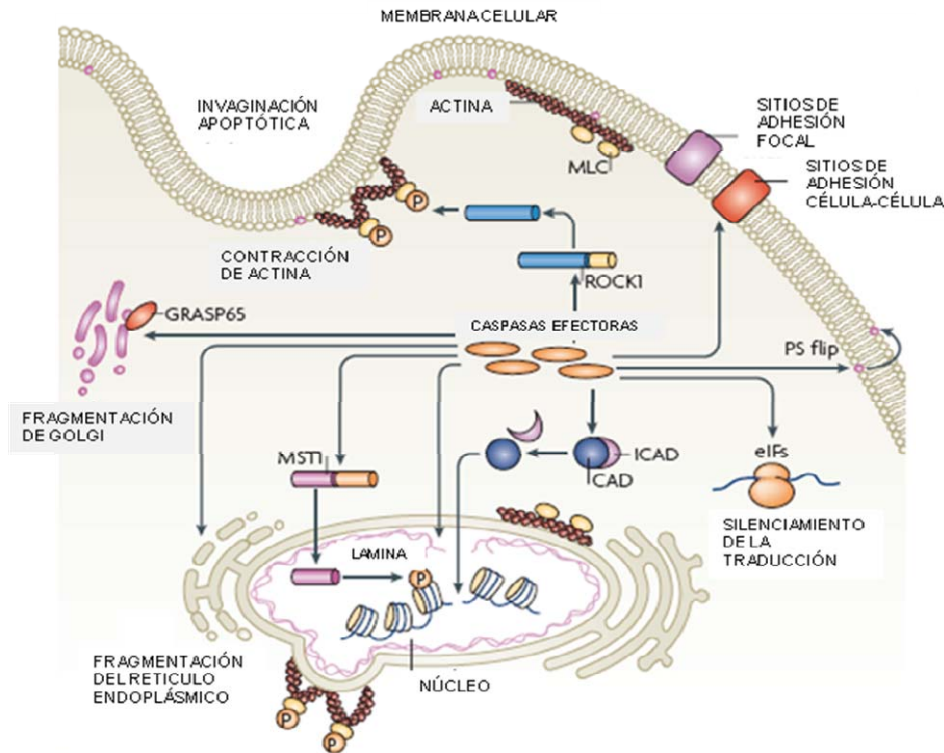


Figura 6. Esquema de la apoptosis coordinada por caspasas que conducen a la degradación de diversas estructuras y organelos clave de la célula. Modificado de Taylos et. al. 2008 (42).

Las dos vías son independientes, pero en ciertos tipos celulares estas pueden activarse al mismo tiempo debido a que la caspasa 8 es capaz de procesar a un miembro de la familia de Bcl-2, a la proteína Bid (proteína Bcl-2 agonista que interactúa con dominios de muerte), a su forma activa truncada tBid (44), que a su vez iniciará la vía mitocondrial. La proteína tBid se unirá a la mitocondria activando a Bak y Bax y desestabilizando a la membrana externa de la mitocondria.

Para evitar muerte fuera de tiempo ambas vías están estrictamente reguladas en cada una de sus etapas, sin embargo, una pérdida del balance entre proteínas pro- y anti-apoptóticas ocurre en escenarios de enfermedad, seleccionando células con ventajas de sobrevivencia que promueven neoplasias. Las células malignas escapan de los estímulos inductores de apoptosis debido a la desregulación en la expresión y/o actividad de los genes involucrados en ella, sin embargo, aún en las células malignas el mecanismo en sí sigue intacto lo que hace que estos genes se vuelvan blanco para la generación de nuevas opciones de tratamiento.

5.5.2. RESISTENCIA A LA APOPTOSIS MEDIADA POR LA PROTEÍNA TRAIL

La adición en el tratamiento de terapias utilizando blancos específicos, ha mejorado el tiempo de supervivencia general de los pacientes así como su calidad de vida. La proteína TRAIL y los anticuerpos monoclonales agonistas anti-DR4/DR5 se encuentran en estudios de fase clínica, como se ha mencionado anteriormente. La proteína TRAIL puede selectivamente inducir apoptosis en enfermedades hematológicas, sin embargo, *in vitro* se ha observado desarrollo de resistencia a la apoptosis mediada por TRAIL, por lo que su papel como único agente terapéutico es limitado (39). El uso de la proteína TRAIL en una terapia combinada incrementa su toxicidad y especificidad contra las células malignas (45-47).

La inestabilidad genética y la falla en la reparación del DNA favorecen a la formación de nuevas mutaciones, las cuales les conferirán ventajas de selección, por lo que en el nicho tumoral, sobrevivirán aquellas células capaces de mostrar resistencia al tratamiento convencional. La proteína TRAIL es tóxica en células malignas sensibles, sin embargo, la mayoría de las líneas celulares y tejido fresco derivado de tumores son resistentes a la apoptosis mediada por la proteína TRAIL. Varios estudios han reportado diversos mecanismos de resistencia y diferentes agentes capaces de revertir dicha resistencia de la célula tumoral. En algunos casos la disminución de la expresión de los receptores en membrana han mostrado ser la causa de dicha resistencia, aunque otros autores señalan la presencia de niveles altos de expresión en membrana lo cual no necesariamente se relaciona con sensibilidad a la muerte inducida por la proteína TRAIL, por lo que debe de existir un mecanismo adicional de escape a esta apoptosis (39;48). En células de cáncer de ovario se ha visto que los bajos niveles de expresión del receptor DR4 son debido a que existe hipermetilación en su promotor, y que el tratamiento con agentes desmetilantes re-establece dicha expresión sensibilizando a las células a la inducción de apoptosis mediada por la proteína TRAIL (49). La resistencia también se ha visto que es mediado por una elevada expresión de la proteína inhibidoras que intervienen de manera importante en el desenlace de la cascada de señalización como la proteína cFLIP (50;51), la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis IAP las cuales actúan como inhibidores competitivos de las caspasas como XIAP (52-56) y la familia de proteínas antiapoptóticas de Bcl-2. Estudios en nuestro grupo de trabajo y otros, han reportado que una elevada expresión de las proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 y Bcl_{-XL} juegan un papel muy

importante para la regulación de la resistencia a la proteína TRAIL por la célula maligna. La importancia de sobre-expresar estas proteínas anti apoptóticas se refleja en el hecho que al inhibir a estos productos génicos pueden revertir la resistencia a la proteína TRAIL (47;57). También se ha visto un papel diferencial en el tipo de proteína anti-apoptótica expresada por la célula maligna, por lo que su expresión puede jugar un papel crítico.

5.5.3. PROTEÍNAS DE LA FAMILIA DE BCL-2

5.5.3.1. CLASIFICACIÓN

La familia de proteínas de Bcl-2 regula la integridad y función de la membrana externa de la mitocondria (58). Debido a que las proteínas comparten de uno a cuatro dominios homólogos de Bcl-2 (BH) **Figura 7**, se clasifican en tres sub-familias y a la vez con esta clasificación también se puede definir la función que tienen. Los miembros con dominios de BH1 a BH4 se conocen como proteínas anti-apoptóticas y están representados por Bcl-2, Bcl-x_L, A1, Bcl-w y Mcl-1 (**Figura 7**). Las otras dos sub-familias tienen una función pro-apoptótica. La sub-familia de múltiples dominios BH (BH1 a BH3) está conformada por Bax, Bak y Bok; y finalmente la sub-familia de solo el dominio BH3 está constituida por Noxa, Puma, Bad, Harakiri (Hrk), Bik, Bim, Bmf y Bid, entre otras (**Figura 7**) (58;59).

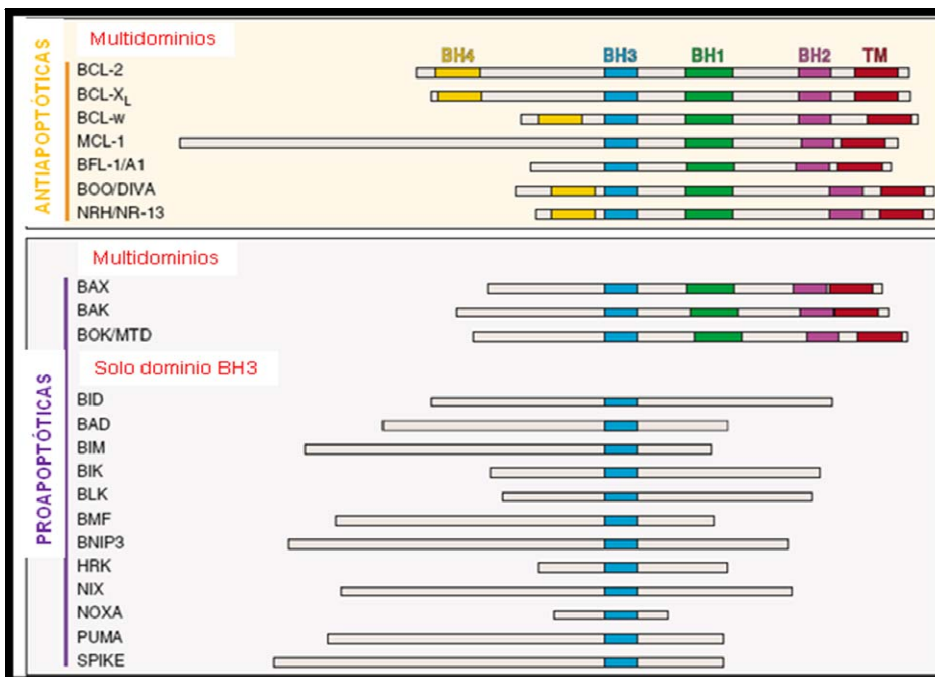


Figura 7. Esquema de la familia de proteínas de Bcl-2. Modificado de Walensky LD et.al. 2006 (59).

5.5.3.2. ACTIVACIÓN E INTERACCIÓN

Anteriormente se pensaba que todas estas proteínas tenían un papel redundante, varias proteínas con la misma función pero ahora se ha determinado que cada una cubre diferentes espectros funcionales en donde parece resaltar que su expresión es célula específica. Algunos de los miembros de esta familia se encuentran ya sea pre-formados en la célula, pero de forma inactiva, secuestradas por otras proteínas y localizadas en los posibles sitios donde recibirán el estímulo para activarse, como Bad que se encuentra en el citoplasma fosforilado y secuestrado por la proteína 14-3-3. Por otro lado, se requiere que haya una síntesis de novo mediada por algún factor de transcripción (58;59), ejemplo la activación del p53 que induce la síntesis de Noxa y de Puma (**Figura 8**). También se ha reportado que las interacciones entre los miembros de solo el dominio de BH3 y las proteínas antiapoptóticas es específica, clasificándose como aquellas proteínas de unión potente o fuerte por tener una capacidad de unión a casi todos los miembros de la familia de antiapoptóticas (Bim, Puma y tBid) y los de capacidad de unión débil en donde su capacidad de unión se ve limitada y tiende a ser más específica es decir que solo se une a algunos miembros de la familia de antiapoptóticas, como es el caso de Noxa que se une a A1 y Mcl-1; Bad y Bmf a Bcl/2, Bcl-xL y Bcl-w (58;59) (**Figura 9**).

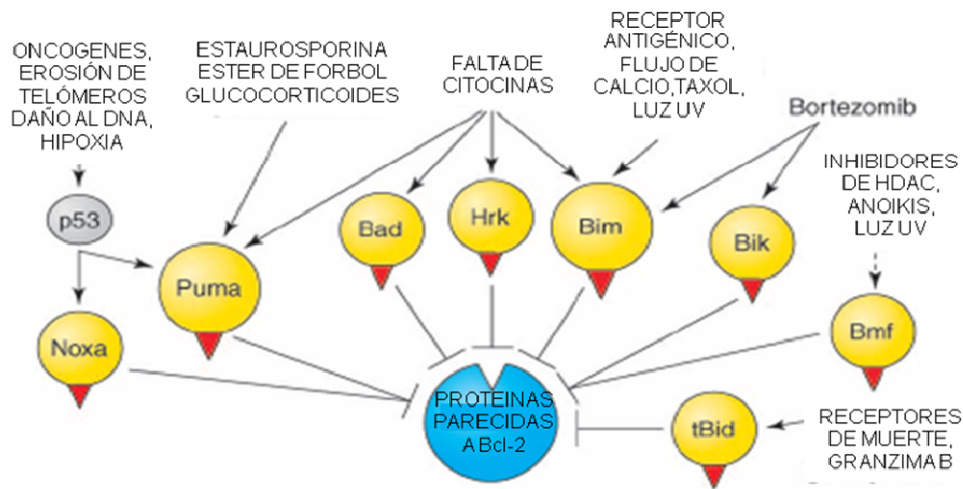


Figura 8. Esquema de los estímulos para activar a las proteínas de solo el dominio de BH3. Modificado de Willis & Adams, 2005.

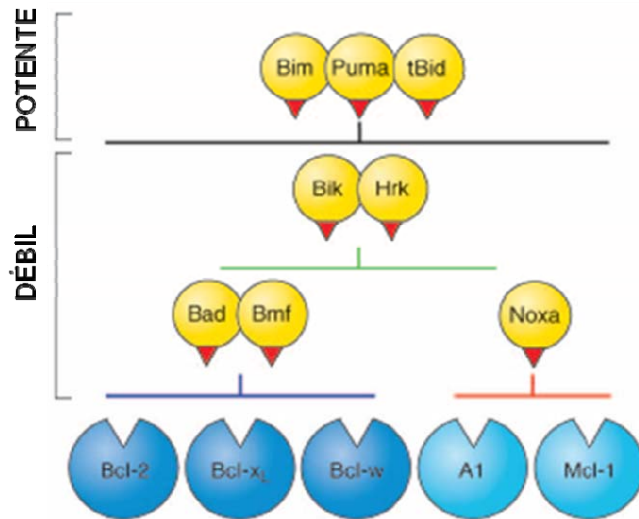


Figura 9. Interacciones entre los miembros de la familia de Bcl-2. Modificado de Willis & Adams, 2005.

5.5.3.2. MECANISMOS DE INTERACCIÓN

Se han descrito dos modelos para el mecanismo de activación de esta familia de proteínas: el modelo directo y el modelo jerárquico (**Figura 10**). El modelo directo consiste en dos pasos, una vez detectado el estímulo específico de muerte, las proteínas de solo el dominio BH3 se activarán sufriendo un cambio conformacional que consistirá en exponer su dominio BH3 y localizarán a las proteínas antiapoptóticas y se unirán a ellas. Dicha unión permitirá que se lleve a cabo el segundo paso, desplazar y liberar a las proapoptóticas que son las encargadas de oligomerizar y formar los poros en la membrana externa de la mitocondria (**Figura 10**) (58;60;61). Por otro lado el modelo jerárquico describe un mecanismo en tres pasos, en donde a diferencia del modelo anterior se describe a los miembros de la familia de solo el dominio BH3 en dos grupos diferentes. Por un lado las proteínas de solo el dominio BH3 se encontrarán en su forma inactiva hasta recibir el estímulo inductor de apoptosis, posteriormente se unirán a las proteínas antiapoptóticas, este grupo se designa como las **inactivadoras**. El otro grupo de proteínas de solo el dominio BH3, conocido como **activadoras** (t-Bid, BIM, PUMA), se encontrará de forma basal secuestradas por las antiapoptóticas, al ser desplazadas por las inactivadoras, sufrirán un cambio conformacional, se activarán y a su vez serán las encargadas de activar a las proteínas multidominios proapoptóticas que formarán los poros en la membrana externa de la mitocondria (**Figura 10**) (58;60;61). Pareciera que estos modelos son dependientes del tipo celular del que se trate ya que en la literatura se puede encontrar información que apoya a uno u otro modelo.

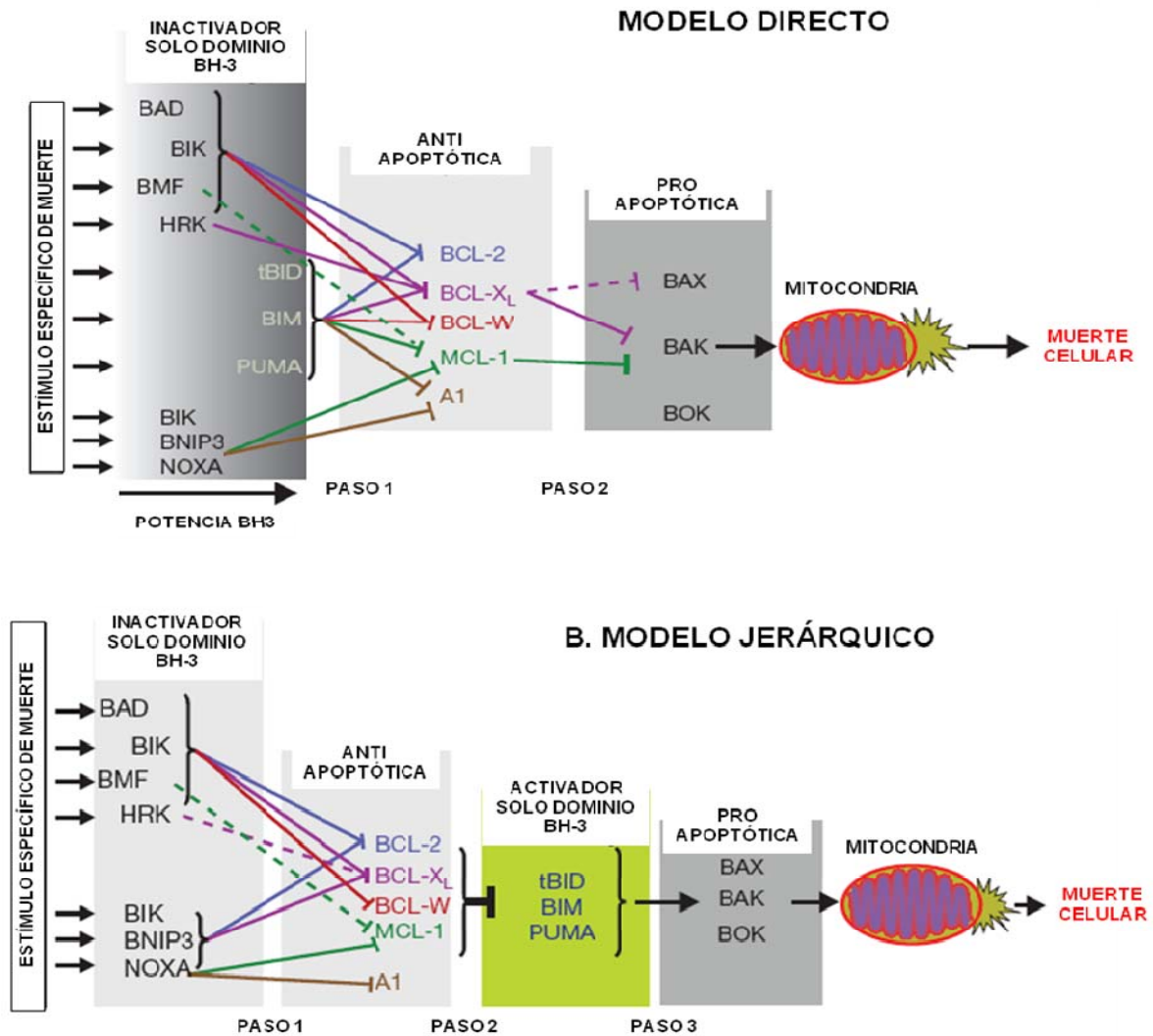


Figura 10. Mecanismos de activación de la familia de proteínas de Bcl-2. A. Modelo directo. B. Modelo jerárquico. Modificado de Galonek HL, 2006 (60).

5.5.4. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS USANDO COMO BLANCO A LA FAMILIA DE PROTEÍNAS DE BCL-2

Se ha reportado que la expresión de proteínas anti-apoptóticas de la familia de Bcl-2 se encuentra incrementada en diferentes tumores sólidos y hematológicos: Bcl-2 en el 70% de cáncer de mama, del 30-60% en cáncer de próstata, 80% en linfomas de linfocitos B, 90% en adenocarcinomas, colo-rectales, y en muchos otros (62). Estas proteínas son capaces de regular la respuesta contra los tratamientos convencionales contra el cáncer, debido al incremento en su resistencia a la muerte (63-67). Por ello se han desarrollado diferentes estrategias dirigidas contra la inhibición de la función de dichas proteínas. Las

estrategias pueden dirigirse a diferentes niveles: en la transcripción del gen, induciendo la degradación del RNA mensajero, o inhibiendo a la proteína.

5.5.4.1. INHIBICIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LA FAMILIA DE BCL-2

Actualmente hay gran interés en el desarrollo de inhibidores químicos que mimeticen el dominio BH3 las proteínas de solo el dominio de BH3, y que sean capaces de unirse ya sea de uno o más miembros de la familia de Bcl-2, y así neutralizando su función (68;69). El interés es debido a que los tumores tienen defectos en la vía de p53 y muchos sobreexpresan Bcl-2 u otra proteína de función parecida, como Bcl-x_L (30;70;71), y la vía apoptótica permanece intacta. Por lo que si una droga es capaz de unirse al surco de las proteínas anti-apoptóticas e inactivarlas sería un agente antitumoral más efectivo que las drogas inespecíficas utilizadas en la quimioterapia. Debido a que el dominio BH3 se une preferentemente a las proteínas anti-apoptóticas aumenta las posibilidades de utilizarlo como un blanco específico para las proteínas parecidas a Bcl-2.(72) Esa especificidad hace que se seleccionen solo las células tumorales y que tengan una cito-toxicidad reducida sobre las células normales.

Los primeros compuestos fueron productos naturales utilizados como agentes con propiedades anti cancerígenas. La semilla de algodón se utiliza en la medicina herbal China (73;74), el compuesto químico aislado recibió el nombre de gossypol. Se ha reportado que este compuesto es capaz de unirse al surco hidrofóbico que se encuentra en la superficie de la familia de proteínas anti-apoptóticas de la Bcl-2, el Bcl-x_L, el Bcl-B y el Bfl-1 inhibiendo su actividad protectora. En estudios *in vitro* se observó que gossypol tiene un efecto citotóxico con las células de crecimiento rápido (75). Algunos autores reportaron que el enantiómero de gossypol tenía una actividad superior, utilizándose actualmente en estudios preclínicos (76). Sin embargo, en estudios de fase I se ha reportado como un compuesto altamente reactivo produciendo toxicidad en los pacientes. Posteriormente se produjo un análogo semi-sintético que retuviera la actividad contra Bcl-2 pero que fuera menos tóxico, al cual llamaron apogossypol (77).

A el té verde se le atribuyeron propiedades anti-inflamatorias, anti-cancerígenas, a partir de él se aisló al compuesto epigallocatequinas (EGCG) (78). Se ha utilizado *in vitro* para el tratamiento de cáncer de mama, y en la hepatocarcinogénesis (79) con buenos resultados. En modelos murinos de cáncer humano gástrico, cáncer de vejiga y de

próstata se ha visto que EGCG inhibe el crecimiento tumoral al reducir la producción de VEGF y la angiogénesis, así como la capacidad de migración (80-82). EGCG tiene unión directa con el DNA y el RNA protegiéndolo de la ruptura de las hebras generada por agentes tóxicos (83), existe cierta controversia entre si el papel de EGCG es neuroprotector o si induce la muerte en líneas celulares de neuroblastoma (84;85). Se ha reportado que el resultado con el tratamiento es dosis dependiente, debido a que se observa apoptosis a bajas dosis y necrosis en dosis elevadas (86). La cascada apoptótica involucra la activación de JNK, mayor expresión de Bax, disminución en los niveles de Bcl-2, cambios en el potencial de membrana de la mitocondria y actividad de las caspasas 9 y 3 (86;87). La desventaja de este compuesto es que bajo condiciones fisiológicas es inestable además de tener poca bio-disponibilidad debido a que sufre reacciones de biotransformación que lo metilan, este cambio disminuye su actividad (88;89). La cristalización de varios de los miembros de la familia de Bcl-2 permitió tener acceso a la estructura tridimensional de las proteínas anti-apoptóticas como Bcl-X_L, (62) y de esta manera los inhibidores se empezaron a desarrollar a partir de modelos computacionales que predecían la unión que tendrían con Bcl-2, como es el caso de HA14-1 (ethyl 2-amino-6-bromo-4-(1-cyano-2-ethoxy-2-oxoethyl)-4H-chromene-3-carboxylate) (90). Esta molécula induce apoptosis en líneas celulares de leucemia mieloide, líneas celulares de cáncer de mama (91), en leucemia mielocítica aguda (92), líneas celulares y células de pacientes con leucemia linfocítica crónica, linfomas de células del manto y linfomas de la zona marginal del bazo (93), cáncer de en colon (94), linfoma folicular (95), entre otros. HA14-1 puede inducir la liberación de citocromo C de mitocondrias de células intactas pero no de mitocondrias aisladas siendo necesario la adición de calcio para conseguirlo; esto nos habla de la relación en las señales que tienen el retículo endoplásmico y la mitocondria sugiriendo que ambos organelos son cruciales para la inducción de apoptosis por este compuesto (96). Se ha reportado que el mecanismo por medio del cual HA14-1 induce apoptosis es mediante: liberación de calcio intracelular, la translocación de Bax del citosol a la mitocondria, donde Bax juega un papel importante ya que células deficientes de esta proteína son más resistentes a la apoptosis (97); seguido de disminución del potencial de membrana, generación de especies reactivas de oxígeno ROS, liberación de citocromo C y activación de la caspasa 9 y 3.(90;96), este último paso es controversial ya que se ha reportado que la inducción de apoptosis puede ser por una vía independiente de caspasas (97). El uso de H414-1 en combinación con otros tratamientos, como agentes anti-microtúbulos en células de cáncer de mama (91), con un inhibidor de la MAPK MEK (PD184352) en leucemia mielocítica aguda (92), con quimioterapia en linfoma

folicular (95) o sensibilizando líneas celulares de cáncer de próstata a la radioterapia, potencian la actividad apoptótica. Se ha planteado la exposición secuencial en combinación con HA14-1 para conducir a un efecto sinérgico en donde el orden sí afecta el resultado, en células de mieloma utilizando primero el inhibidor de proteasoma bortezomib y posteriormente de HA14-1 (98) y en células de cáncer de mama en donde la secuencia es contraria, primero HA14-1 y posteriormente trastuzumab anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor Her2 (99). El espectro de inhibición se reduce a aquellos tipos de cáncer que tengan mayor expresión de Bcl-2 y Bcl-xL.

El ABT-737 (Abbot Laboratorios, North Chicago) (100) es una molécula pequeña inhibidora de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-xL y Bcl-w. Este compuesto actúa mimetizando el dominio BH3 de la proteína Bad, por lo que también es capaz de unirse al el surco hidrofóbico de la familia de proteína antiapoptóticas de Bcl-2 (101). El ABT-737 es citotóxico a las líneas celulares de mieloma múltiple e incluso para las líneas de mieloma resistentes a la terapia convencional y para las células de tumores primarios (102;103), líneas de leucemia mielocítica crónica y de carcinoma pulmonar de células pequeñas. Se ha reportado que tiene un efecto sinérgico cuando se combina con la quimioterapia (103;104), o con el inhibidor del proteasoma, bortezomib. En CLL se ha reportado que Bcl-2 secuestra a la proteína de solo el dominio BH3, Bim, la administración del ABT-737 es capaz de desplazar a Bim, y así se permite la activación directa de Bax por Bim, induciendo permeabilización de la mitocondria y rápido compromiso de la células de CLL hacia la apoptosis (105). En estudios *in vivo* se ha observado que el ABT-737 reduce los niveles circulante de plaquetas y esto se mantiene durante el transcurso de la terapia, hay recuperación del nivel plaquetario varios días después de que ha cesado la administración (106). En modelos murinos con tumores humanos causa regresión completa del carcinoma pulmonar de células pequeñas, pero su actividad es limitada debido a que el ABT-737 no es capaz de inhibir la función anti-apoptótica de la proteína Mcl-1 (107). Mcl-1 es el factor principal que causa la resistencia a el ABT-737 en las células malignas derivadas de tumores, por lo que la combinación de agentes que disminuyan la expresión de Mcl-1 con el ABT-737 será un potente agente terapéutico (108).

Posteriormente, se generaron inhibidores que tuvieran un espectro de inhibición más amplio de unión con las proteínas de la familia anti-apoptótica del Bcl-2. El compuesto químico Obatoclax (Gemin X Pharmaceuticals, Inc., Montreal Canadá/ Cephalon) (109),

también conocido como GX15-070, puede inhibir a Bcl-2, Bcl_{-XL}, Bcl-w y Mcl-1. Se ha visto que induce apoptosis en células de pacientes con leucemia linfocítica crónica (CLL) (93), en células no pequeñas de cáncer de pulmón (110), en líneas celulares y células primarias de pacientes con linfoma de células del manto (111), en células de mieloma múltiple (112), tiene efecto sinérgico con la quimioterapia (93;110;112), y con el inhibidor del proteasoma, bortezomib (111;112). En cáncer de mama se ha reportado que un bloqueo simultáneo del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR o Her2) junto con el compuesto químico obatoclax pueden ser beneficioso (113). GX15 es capaz de interferir en la interacción Mcl-1- Bak (110), induciendo cambios conformacionales en Bax y Bak, presentándose una despolarización de la membrana de la mitocondria y activación de caspasa 3 (111). En la **Figura 11** se muestra la estructura de los diferentes inhibidores de la familia de Bcl-2.

Estudios *in vitro* de células de pacientes sanos y en modelos murinos de tumores indican que el uso de estos inhibidores tiene un efecto mínimo a no citotóxico, cuando se utiliza las concentraciones a las cuales es letal para la línea celular (111;114;115)

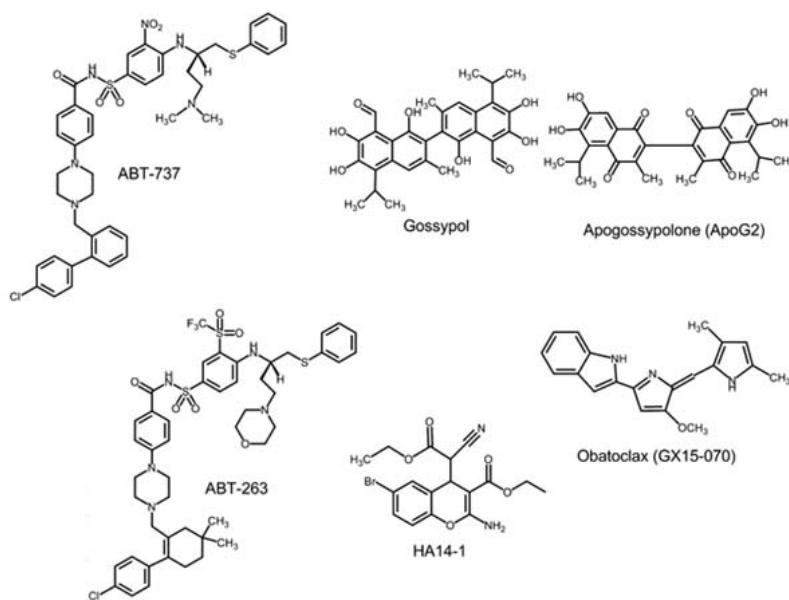


Figura 11. Fórmulas químicas de diferentes inhibidores químicos pequeños de la familia de Bcl-2. Modificado de Vogler et. al. 2009 (116).

6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El régimen estándar de tratamiento para pacientes con LNH es quimioterapia, en donde se presentan diversos problemas secundarios, como son recaídas de los pacientes que se deben a la generación de resistencia al tratamiento. Las nuevas opciones de tratamiento, como la inducción de apoptosis mediada por la proteína TRAIL, han sido de gran interés debido a la alta expresión de sus receptores en células malignas y no en las células normales, lo cual conlleva a contar con un tratamiento selectivo y también específico. A pesar de ello, las células malignas desarrollan mecanismos de evasión y al final generan resistencia al tratamiento. El estudio de estos mecanismos de acción ha permitido elucidar la presencia de una alta expresión de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2 y Bcl-x_L), las cuales juegan un papel importante en la resistencia a terapias contra el cáncer. Aproximadamente el 80% de los LNH expresan cantidades elevadas de estas proteínas, representando un importante blanco molecular para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas (64;109). El compuesto químico obatoclax tiene la capacidad de mimetizar el dominio BH3 y neutralizar la función anti-apoptótica de las proteínas Bcl-2 y Bcl-x_L. Por lo anterior, la finalidad de este estudio fue demostrar que la neutralización de las proteínas antiapoptóticas revertiría la resistencia al tratamiento con la proteína TRAIL y cuál es el mecanismo implicado.

7. HIPÓTESIS

El tratamiento de líneas celulares de LNH resistentes a la proteína TRAIL con el inhibidor obatoclax, sensibilizará a las células tumorales a la apoptosis inducida por la proteína TRAIL.

8. OBJETIVO GENERAL

Determinar el mecanismo por el cual el compuesto químico obatoclax sensibiliza a líneas celulares de LNH a la apoptosis mediada por la proteína TRAIL.

8.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la sensibilización a la apoptosis mediada por la proteína TRAIL a través del tratamiento con el compuesto químico obatoclax en líneas celulares de LNH.

Determinar el mecanismo mediado por el compuesto químico obatoclax en la reversión de la resistencia a la apoptosis mediada por la proteína TRAIL en líneas celulares de LNH.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1. Líneas celulares

Las líneas celulares de Linfoma No-Hodgkin: Ramos, Daudi, Raji, DHL4; de cáncer de próstata PC3; de cáncer de colon SW620 y Jurkat fueron compradas en el American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). La línea de LNH, 2F7 fue amablemente proporcionada por el Dr. Otoniel Martínez-Maza (Jonsson Comprehensive Cancer Center, Los Angeles, CA). Las líneas se mantuvieron en medio RPMI (PAA Laboratories GmbH, Haidmannweg) al 10 % de suero fetal bovino inactivado por calor (PAA Laboratories GmbH), complementado con antibióticos/antimicótico 10,000 U/ml penicilina G, 10 mg/ml streptomina, y 25 µg/ml Fungizone (PAA Laboratories GmbH), además de aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio, hepes, glutamina, y micokill. Las células se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura y dióxido de carbono en incubación (37°C y 5 % de CO₂).

9.2. Determinación de la viabilidad celular

En una placa de 96 pozos 0.060 x 10⁶ células Ramos en 100 µl de medio complementado fueron pre-tratadas a diferentes concentraciones del compuesto químico obatoclax. Después de 24 h se adicionaron diferentes concentraciones de la proteína TRAIL (Pepro-Tech); y después de 48 h, tiempo total, se determinó la viabilidad utilizando el colorante vital, azul tripano bajo el microscopio. La viabilidad de las células no tratadas se tomó como el 100 %. El experimento se realizó por triplicado.

9.3. Determinación de la apoptosis

En una placa de 24 pozos fueron sembradas 0.3 x 10⁶ células Ramos en 500 µl complementado fueron pre-tratadas a diferentes concentraciones del compuesto químico obatoclax. Después de 24 h se adicionaron diferentes concentraciones de la proteína TRAIL. A las 48 h, tiempo total se determinó el porcentaje de apoptosis por medio de una tinción para caspasa 3 activa asociado al fluorocromo ficoeritrina (phycoeritrina PE, BD Pharmingen), por medio de citometría de flujo. Utilizando la herramienta estadística por isoblograma se determinó si el efecto, por el uso de la combinación del tratamiento, fue sinérgico o aditivo. De manera similar, se determinó la apoptosis en células Ramos tratadas o no con el inhibidor de NF-κB, DHMEQ (117) utilizando diferentes concentraciones (1.25-10 µM) por 24 h, posteriormente las células se trataron con la

proteína TRAIL (2.5-20 ng/ml) por 18 h adicionales para finalmente determinar la activación de caspasa 3 presente por citometría.

9.4. Análisis por “western blot”

Las células Ramos a una densidad de 0.6×10^6 fueron tratadas con el compuesto químico obatoclastax a 37°C después de 24 h se adicionó o no la proteína TRAIL. Las células fueron cosechadas a las 24 h con solo el tratamiento del compuesto químico obatoclastax o a las 48 h tiempo total utilizando la combinación, posteriormente fueron lisadas con 100 μl de buffer RIPA frío (1 % NP40, 0.1 % SDS, 0.5 % ácido deoxycólico, y “cocktail” de inhibidores de proteasas (Roche Diagnostic Co.) y 1 X de PBS). Las células lisadas fueron transferidas a tubos de microcentrifuga, con tres pases por nitrógeno líquido y agitación fuerte por 10 segundos entre cada pase. Los lisados se centrifugaron a 12,000 X g a 4°C por 5 min. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford utilizando el kit de marca Bio-Rad para cuantificar proteínas (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA). Se adicionó buffer muestra a los lisados “Gel loading buffer Bio-Rad” (Bio-Rad Laboratories) a una concentración 1:1 en volumen. Las muestras fueron hervidas de 5-10 min y posteriormente cargadas en un minigel al 12 % de SDS-poliacrilamida para su separación, al final fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa Hybond™ ECL™ (Amersham Pharmacia Biotech, Germany). Las membranas fueron bloqueadas con leche baja en calorías al 5% e incubadas con el anticuerpo primario correspondiente toda la noche a 4°C . Los anticuerpos primarios utilizados fueron: Bcl-_{XL}, Mcl-1, p50, p65, fosfo p65 (serina 536), I κ B α , fosfo- I κ B α , IKK, DR4, YY1, caspasa 3, caspasa 8, caspasa 9, c-IAP1/2, Bad, Bim, Bid Bax, Bak (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), XIAP (Cell Signalling, Beverly, MA), Actina (Chemicon, Temecula, CA) y DR5 (ΨScientific, Poway, CA). Las membranas fueron reveladas con el reactivo Luminol y peróxido (Santa Cruz Biotechnology) y expuestas a películas de Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia Biotech).

9.5. Análisis por “EMSA”

Las células Ramos a una densidad de 0.6×10^6 fueron tratadas con el compuesto químico obatoclastax a 37°C por 24 h y posteriormente analizadas en un gel de retardamiento (EMSA). Las células fueron lavadas con solución Dulbecco frío (Invitrogen) y lisadas con el buffer de lisis NP40 (10 mM de Tris-HCl pH 7.5, 10 mM de NaCl, 3 mM de MgCl₂ y 0.5 % de NP40), incubadas por 5 min en hielo y centrifugadas a 300 x g a 4°C por 5 min. Las

pastillas fueron lavadas dos veces con el buffer NP40 para después adicionar una solución de extracción de núcleos (20 mM HEPES pH 7.9, 25 % de glicerol, 0.42 mM de NaCl, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de EDTA, 0.5 mM de Fluoruro de fenilmetil sulfonil, 0.5 mM de DTT y “cocktail” de inhibidores de proteasas). Las muestras fueron pasadas tres veces por nitrógeno líquido y agitadas fuertemente entre cada pase. La concentración de las proteínas fue determinada con el método descrito anteriormente. 10 µg de las proteínas nucleares fueron mezcladas por separado con las sondas marcadas con biotina para cada uno de los siguientes factores de transcripción: NF-κB y YY1, empleando el kit para EMSA de Panomics™, siguiendo las instrucciones del protocolo comercial. 10 µl de las muestras fueron separadas en un minigel al 5 % de poliacrilamida y transferidas a una membrana de Nylon (Hybond-N⁺, de Amersham). Las membranas se expusieron a la luz ultravioleta por 3 min para su entrecruzamiento. La detección de cada uno de los factores de transcripción se realizó de acuerdo a las instrucciones del protocolo comercial. Finalmente las membranas fueron reveladas con el reactivo Luminol y peróxido (Santa Cruz Biotechnology) y expuestas a películas de detección de quimioluminiscencia (Hyperfilm ECL de Amersham Pharmacia Biotech).

9.6. Expresión en membrana de los receptores de la proteína TRAIL

En una placa de 24 pozos fueron sembradas 0.3×10^6 células Ramos en 500 µl de medio complementado fueron pre-tratadas a diferentes concentraciones del compuesto químico obatoclax. Después de 24 h se cosecharon las células y se realizaron tinciones con anticuerpos conjugados a fluoresceína mediante un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson), para detectar la expresión en superficie de los receptores DR5 y DR4. El análisis fenotípico de la población celular fue realizado por medio de la determinación de la intensidad media de fluorescencia.

9.7. Despolarización de la membrana de la mitocondria

En una placa de 24 pozos fueron sembradas 0.3×10^6 células Ramos en 500 µl de medio complementado fueron pre-tratadas a diferentes concentraciones del compuesto químico obatoclax, después de 24 h se cosecharon y se realizaron tinciones utilizando el colorante específico 3,3'-dihexyloxacarbocyanine (DiOC6; Molecular Probes) para posteriormente medir la fluorescencia emitida mediante un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson).

9.8. Inmunoprecipitación

Las células Ramos fueron incubadas a 37 °C por 24 h con el compuesto químico obatoclax. Las células fueron lisadas con buffer RIPA frío (1 % NP40, 0.1 % SDS, 0.5 % ácido deoxycólico, y “cocktail” de inhibidores de proteasas (Roche Diagnostic Co.) y PBS 1 X), lisadas e incubadas con 10 µl de anticuerpo anti Mcl-1 (Santa cruz Biotechnology) durante toda la noche a 4°C en agitación constante. Se adicionaron 100 µl de suspensión conjugada de agarosa y se incubó por 1 h a 4°C en agitación contante. Los complejos inmunoprecipitados fueron colectados por centrifugación a 3000 X g por 2 min a 4°C. La pastilla fue lavado tres veces con 1 ml de Dulbeco frío. Se adicionó buffer de carga “Gel loading buffer Bio-Rad” (Bio-Rad Laboratories) a una concentración 1:1 en volumen. Las muestras fueron hervidas de 5 a 10 min, cargadas en un minigel al 12 % de SDS-poliacrilamida para su separación, y transferidas a membranas de nitrocelulosa Hybond™ ECL™ (Amersham Pharmacia Biotech, Germany). Posteriormente fueron incubadas con anticuerpo anti Mcl-1 y Bak (Santa Cruz Biotechnology) durante toda la noche a 4 °C. Finalmente las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente, reveladas con el reactivo Luminol y peróxido (Santa Cruz Biotechnology) y expuestas a películas de detección de quimioluminiscencia (Hyperfilm ECL de Amersham Pharmacia Biotech, Germany).

9.9. Ensayo de plásmido reportero

Se realizaron transfecciones transitorias con los plásmido reporteros para YY1-Luc o para NF-κB-Luc. La construcción para el plásmido reportero de YY1 asociado a luciferasa contiene la secuencia completa del promotor de YY1 (118). El plásmido pNF-κB-Luc fue comprado en Invitrogen (Carlsbad, CA). La línea celular de cáncer de próstata, PC3, fue sembrada en una placa para cultivo de seis pozos e incubada a 37 °C con 5% de CO₂ hasta alcanzar una confluencia del 80% (118). Las transfecciones fueron llevadas a cabo utilizando el reactivo Transfectol Transfection Kit (Gene Choice) como se describe en el inserto. Se preparó una solución de transfección en 1 ml de medio libre de antibióticos por 5 h, posteriormente se reemplazó el medio por medio fresco complementado conteniendo las diferentes concentraciones del compuesto químico obatoclax y con 10 µg/ml de DHMEQ utilizado como control positivo, incubándose por 20 h adicionales. La actividad de la luciferasa en los extractos de proteína fue cuantificada utilizando un contador de luminiscencia de acuerdo al protocolo (BD Biosciences). Los datos obtenidos fueron

normalizados utilizando los niveles de proteína determinados con el kit de detección de Bio-Rad.

9.10. Transfección con “siRNA”

Las células Ramos fueron pre-incubadas por 24 h en medio complementado sin antibiótico, lavadas con medio OPTIMEM, plaqueadas en pozos de seis a una densidad de 2.5×10^5 en 800 μl . Por otro lado, se prepararon 40 pmol o 4 μl en 100 μl de medio OPTIMEM de los siRNA Scrambled RNA, Mcl-1, DR4, DR5 y YY1 (Santa Cruz Biotechnology) y 6 μl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Invitrogen Life Technology, Carlsbad, CA) en 100 μl de medio OPTIMEM. Ambos fueron mezclados e incubados por 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla pre-incubada se adicionó a las células plaqueadas para tener un volumen final de 1 ml. Las células fueron homogeneizadas e incubadas por 6 h a 37° C y 5 % de CO₂. Después de 24 h de transfección, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de la proteína TRAIL por 18 h adicionales. Las células Ramos fueron colectadas y analizadas por “western blot” o por citometría de flujo como se describe arriba.

9.11. Análisis estadístico

Todos los resultados se expresaron de acuerdo a la media obtenida por el triplicado con su respectiva desviación estándar ($\pm\text{SD}$), de tres experimentos por separados. El análisis estadístico fue llevado a cabo utilizando el Graph Pad Prism-4. Las diferencias estadísticamente significativas entre la media de los grupos fue determinada utilizando ANOVA de una cola para comparar la varianza. Las diferencias significativas fueron consideradas si la probabilidad es $<5\%$ ($p < 0.05$).

10. RESULTADOS Y ANÁLISIS

10.1 El tratamiento de las células Ramos con el compuesto químico obatoclax inhibe la expresión de las proteínas antiapoptóticas

El compuesto químico obatoclax fue creado y producido con la función de mimetizar el dominio BH3, por lo que su principal función fue la de inhibir a las proteínas anti-apoptóticas; se ha reportado que el compuesto químico obatoclax es capaz de inhibir la actividad de los miembros de la familia de Bcl-2, incluyendo a Mcl-1, en tumores sólidos (119;120). Para examinar los efectos del compuesto químico obatoclax en las células de LNH, la línea celular Ramos fue tratada con 14 y 28 nM del compuesto químico obatoclax, por 24 h y mediante “western blot” se evidencio la presencia de las proteínas problema. Al determinar la expresión de algunas de las proteínas anti-apoptóticas en las células Ramos después del tratamiento observamos que la adición del compuesto químico obatoclax tiene un efecto de inhibición concentración dependiente de las proteínas anti-apoptóticas Mcl-1 y Bcl_{-XL} (no se realizó la búsqueda de Bcl-2 porque esta línea celular carece de ella), así como de algunos miembros de la familia de CIAP, XIAP y de CIAP 1 y 2 (**Figura 12 A**), así como lo confirma el análisis densitométrico de las muestras (**Figura 12 A**, panel derecho). Ya se ha reportado anteriormente que El compuesto químico obatoclax es capaz de inhibir la función de las proteínas anti-apoptóticas sin ser necesario que se disminuya la presencia de dichas proteínas, pero nuestros resultados sugieren que el tratamiento con el compuesto químico obatoclax en las células Ramos es capaz de disminuir la presencia de proteínas anti-apoptóticas Mcl-1 y Bcl_{-XL}. Por otro lado, el compuesto químico obatoclax también es capaz de disminuir la presencia de las proteínas inhibitoras de las caspasas, observándose un posible efecto adicional. Además, el efecto sobre las proteínas anti-apoptóticas es capaz de mantenerse hasta por 48 h.

Asimismo era importante determinar si el inhibidor tenía algún efecto sobre algunos de los otros miembros de la familia de proteínas pro-apoptóticas. Esto lo evidenciamos por medio de “western blot” para observar su expresión. Pudimos observar que la adición del inhibidor actúa de diferentes maneras sobre estas proteínas ya que por un lado puede disminuir los niveles de las proteínas como Bax, Bad y Bid, o aumentar de forma no significativa los de Bim y mantener sin cambio alguno, los de Bak al compararlo con las células control (**Figura 12 B**). En el panel derecho se muestra el análisis densitométrico.

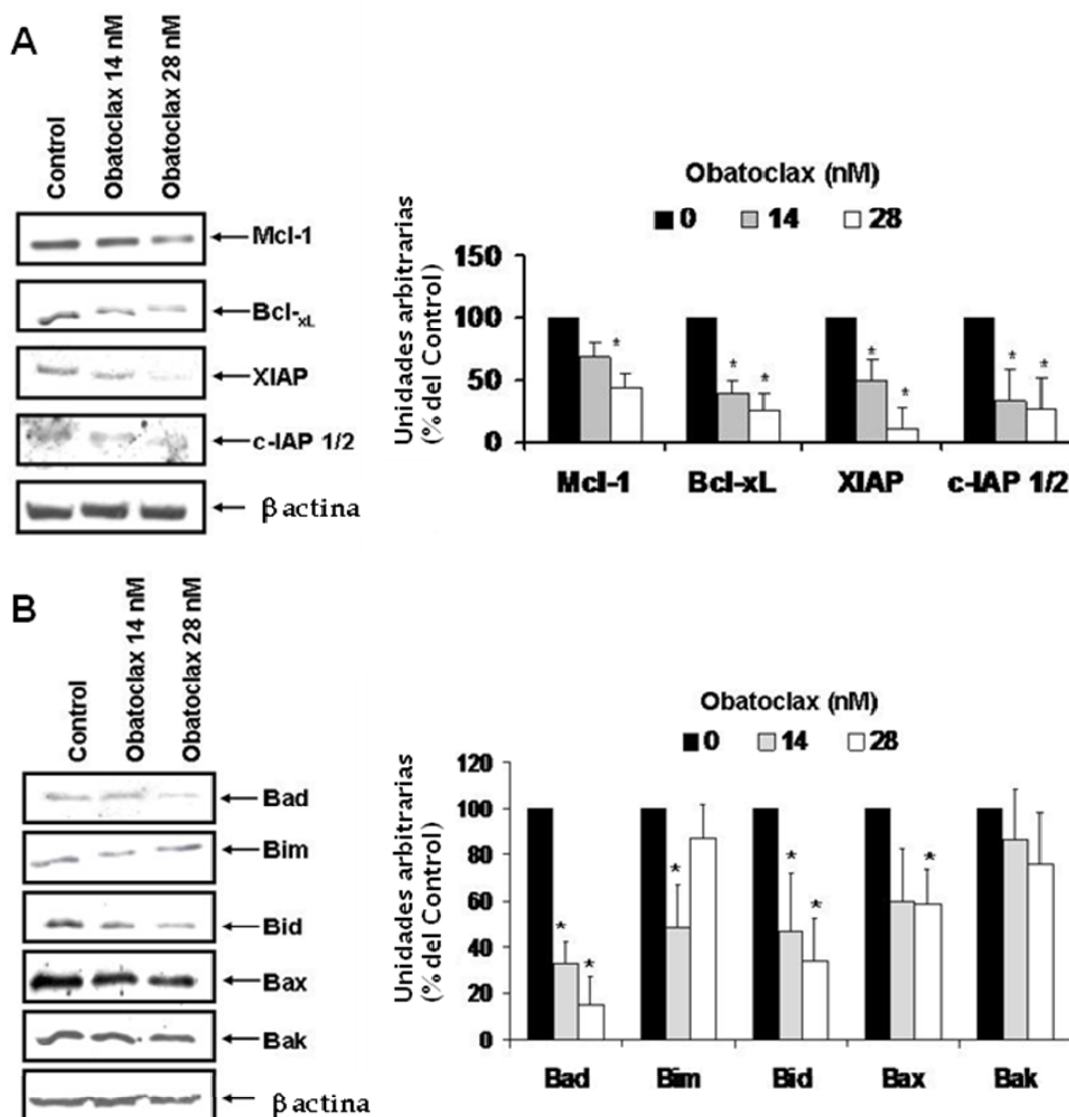


Figura 12. Perfil de expresión de proteína en las células Ramos tratadas con el compuesto químico obatoclox. A) La expresión de proteínas antiapoptóticas fueron determinadas por “western blot” después de 24 h de exposición a diferentes concentraciones del compuesto químico obatoclox. La expresión de actina fue utilizada como control de carga, también se muestra el análisis densitométrico. B) Los productos de los genes antiapoptóticos fueron medidos después de 24 h de exposición a diferentes concentraciones del compuesto químico obatoclox en las células Ramos.

Anteriormente se describió que las proteínas efectoras de la vía de la mitocondria (Bak, Bax, Bok), se encuentran secuestradas por las proteínas anti-apoptóticas, esto no permite

la formación de los poros de la membrana de la mitocondria y la liberación de componentes de la membrana interna de ésta, para continuar con la apoptosis iniciada. Algunos reportes han demostrado que el compuesto químico obatoclax es capaz de interrumpir la asociación del complejo entre las proteínas Mcl-1 y Bak (121). Se realizó un análisis por inmunoprecipitación de las células Ramos tratadas o no con el compuesto químico obatoclax por 24 h. La inmunoprecipitación de la proteína Mcl-1 con un anticuerpo monoclonal evidenció la existencia de una interacción entre la proteína Mcl-1 y Bak en la línea celular Ramos, la cual se ve interrumpida por la adición del compuesto químico obatoclax (**Figura 13**). Esto, resalta la importancia del papel de la proteína Bak, en esta línea celular para la formación de homodímeros que forman los poros en la membrana de la mitocondria (**Figura 13**).

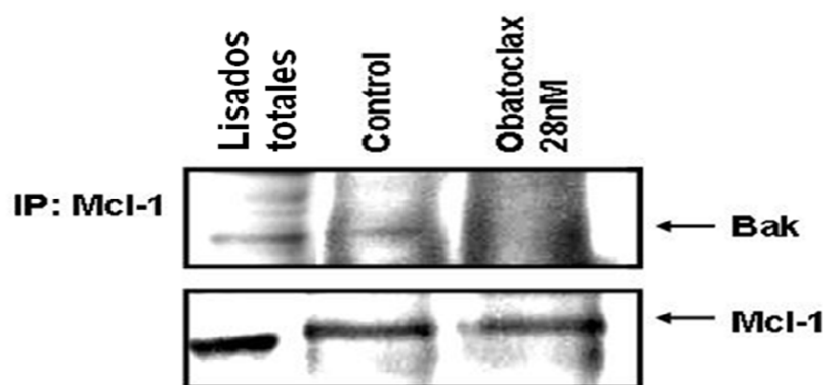


Figura 13 Mcl-1 se encuentra secuestrando a la proteína Bak de forma basal en células de LNH. Las células Ramos fueron tratadas o no con el compuesto químico obatoclax por 24 h, con 14 y 28 nM. Se realizó una inmunoprecipitación utilizando el anticuerpo anti-Mcl-1 y por “western blot” se identificó a la proteína Bak. Los lisados completos fueron utilizados como control.

10.2. El compuesto químico obatoclax inhibe la vía canónica constitutiva de NF- κ B

En la **Figura 1** observamos que el tratamiento de las células de LNH Ramos con el compuesto químico obatoclax induce la inhibición tanto de proteínas antiapoptóticas de la familia de Bcl-2 así como de la familia de los inhibidores de las caspasas, lo cual indica que probablemente hay una vía en común en estas dos familias de proteínas. En diversas publicaciones se ha mostrado que el factor de transcripción NF- κ B tiene sitios de unión en los promotores de estas proteínas regulando, en parte, su síntesis, por lo que

probablemente esta vía podría estar involucrada. (122;123). El análisis por “western blot” de células Ramos tratadas con el compuesto químico obatoclax por 24 h, mostró una disminución en la expresión de la proteína IKK, así como también inhibición en la fosforilación de p65 en la serina 536 y en la fosforilación de la proteína I κ B α , lo cual indica una disminución en la señal para la forma activa del dímero p65-p50, lo cual conlleva a una inhibición de la translocación al núcleo de dicho dímero (**Figura 14 A**). Por lo tanto el tratamiento de células Ramos con el compuesto químico obatoclax afecta la vía de NF- κ B.

Debido a que el tratamiento de las células Ramos con el obatoclax muestra una ausencia de función del factor de transcripción NF- κ B se determinó su actividad utilizando un plásmido reportero basado en luciferasa con sitios de unión en el promotor para el factor de transcripción NF- κ B. Debido a las dificultades para realizar las transfecciones del plásmido reportero en células no adherentes y a que las concentraciones resultaban tóxicas para la línea celular Ramos, se utilizó la línea celular de cáncer de próstata PC3 para realizar el ensayo. Previamente se determinaron las concentraciones óptimas de tratamiento con el compuesto químico obatoclax para que no se produjera muerte por apoptosis significativa, seleccionándose 156, 312.5 y 625 nM para la realización del ensayo. Una vez realizada la transfección se adicionó el obatoclax a las células PC3 a diferentes concentraciones por 24 h. El tratamiento con varias concentraciones del compuesto químico obatoclax mostró una disminución significativa de la actividad de luciferasa la cual fue además, dependiente de la concentración (**Figura 14 B**). La actividad fue comparada utilizando como control positivo el tratamiento con un inhibidor químico de NF- κ B, DHMEQ, el cual inhibe a NF- κ B impidiendo su translocación al núcleo y por tanto no es capaz de unirse a los sitios de reconocimiento en el promotor del plásmido reportero (**Figura 14 B**).

También se analizó la capacidad de unión al DNA del factor de transcripción NF- κ B por medio de ensayos de geles de retardamiento (EMSA). Extractos nucleares de las células Ramos tratadas o no con diferentes concentraciones del obatoclax se hicieron interactuar con sondas marcadas de secuencias consenso para NF- κ B, así como controles con secuencias en desorden para determinar si la unión es específica y finalmente se corrió un gel y se analizó el blot para evidenciar la unión de la proteína al DNA. Se observa que el compuesto químico obatoclax es capaz de disminuir la capacidad de unión al DNA del factor de transcripción NF- κ B (**Figura 14 C**), lo cual indica que este factor disminuye su

activación constitutiva si lo comparamos con el control, afectando a los genes que requieran de la actividad de dicho factor nuclear para su transcripción en la célula, como muy probablemente es el caso de las proteínas anti-apoptóticas e inhibidoras de las caspasas observadas en la **Figura 2 A**.

10.3. Sensibilización de células Ramos por el compuesto químico obatoclax a la apoptosis mediada por la proteína TRAIL y el mecanismo molecular involucrado

10.3.1. El compuesto químico obatoclax sensibiliza a las células tumorales a la apoptosis mediada por la proteína TRAIL afectando la vía de NF- κ B

El tratamiento con el inhibidor químico DHMEQ ha mostrado inhibir los productos regulados por el NF- κ B como son las proteínas antiapoptóticas (124;125). Para confirmar que el efecto observado era debido a la inhibición de la función de NF- κ B se utilizó al inhibidor químico DHMEQ. Las células Ramos fueron tratadas con diferentes concentraciones de DHMEQ (1, 3, 5 y 10 μ g/ml) por 24 h y posteriormente por otras 18 horas adicionales con la proteína TRAIL (2.5, 5, 10 y 20 ng/ml), se determinó la apoptosis midiendo el porcentaje de caspasa 3 activa presente en las diferentes condiciones. En la **Figura 14 D** observamos sensibilización de las células Ramos a la apoptosis mediada por la proteína TRAIL debido a que los niveles de caspasa 3 activa aumentan a medida que se aumenta la concentración del inhibidor químico obatoclax así como la concentración de la proteína TRAIL. Por tanto, los mecanismos por medio del cual las células Ramos se sensibilizan es mediante la inhibición de la actividad de la vía de NF- κ B, la cual es responsable en parte, de la sensibilización de las células Ramos a la apoptosis mediada por la proteína TRAIL.

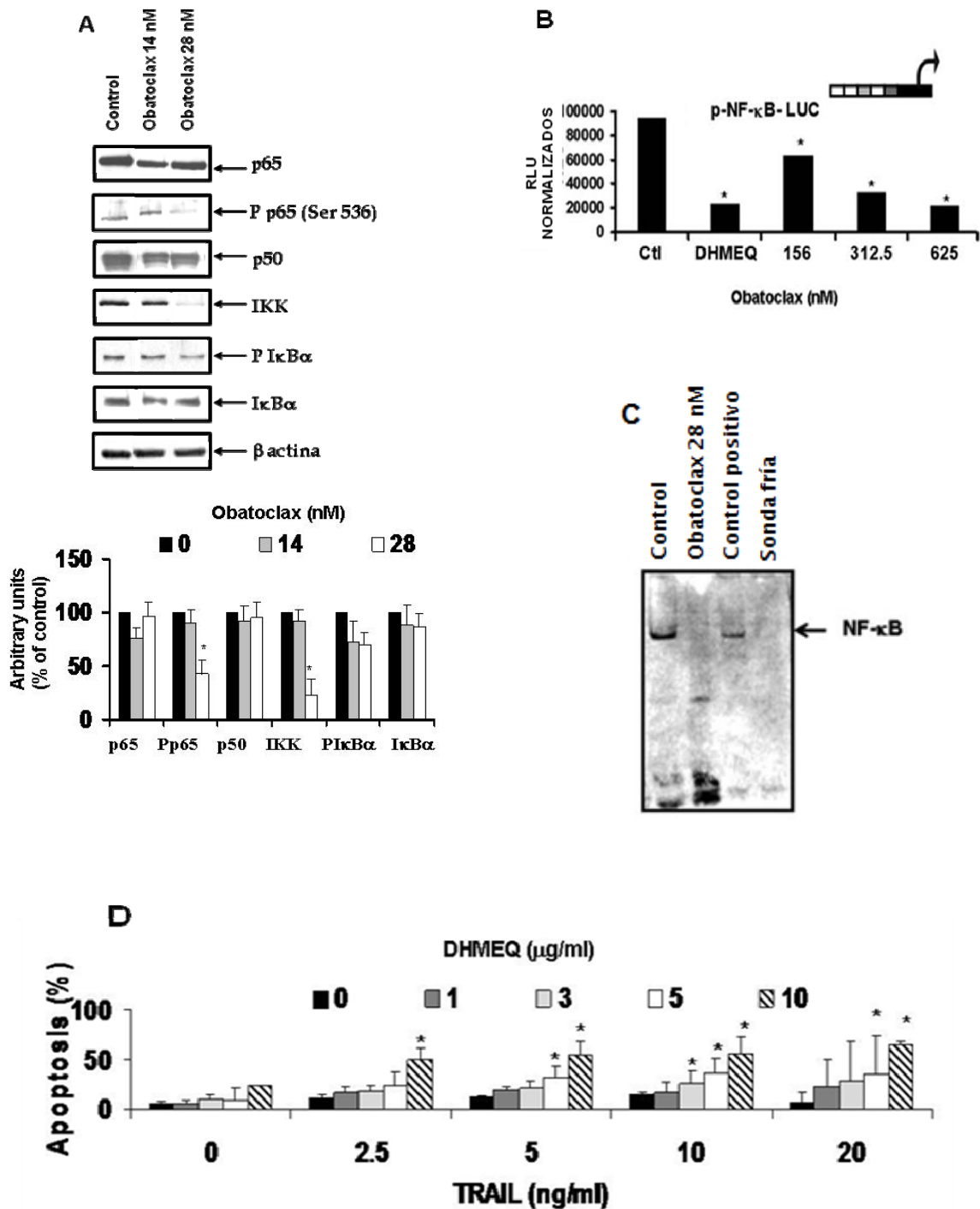


Figura 14. El compuesto químico obatoclax inhibe la actividad de NF-κB. A) Inhibición de la activación de NF-κB por el compuesto químico obatoclax. Las células Ramos fueron tratadas con el compuesto químico obatoclax por 24 h, los lisados totales fueron analizados por “western blot” para determinar la expresión de las siguientes proteínas p50, p65, fosfo p65, IκBα, fosfo IκBα e IKK. La proteína actina fue utilizada como control de carga, se realizó un análisis densitométrico. B) Las células PC3 fueron transfectadas con el plásmido reportero NF-κB-Luc durante 24 h y tratadas con DMSO o con el compuesto químico obatoclax por 24h adicionales. Posteriormente se midió la actividad de la luciferasa como se describe en la metodología. Las células tratadas con 10 μg/ml del inhibidor químico DHMEQ, fueron utilizadas como control positivo. C) El compuesto

químico obatoclax inhibe la actividad de unión del factor nuclear- κ B a el DNA. Los extractos nucleares de las células Ramos tratadas con el compuesto químico obatoclax por 24 horas fueron analizados por "EMSA" para ver la actividad de unión del factor nuclear - κ B al el DNA. D) Las células Ramos fueron tratadas o no con el DHMEQ (1, 3, 5 y 10 μ g/ml) por 24 h y posteriormente con el TRAIL (2.5, 5, 10 y 20 ng/ml) por 18 h más y se analizó el porcentaje de caspasa 3 activa presente por citometría de flujo. Los datos representan la desviación estándar de tres experimentos independientes. * p <0.05, ** p <0.001.

Los inhibidores del factor NF- κ B como el DHMEQ han mostrado ser capaces de sensibilizar a células resistentes a la apoptosis mediada por la proteína TRAIL, como se muestra en la **Figura 14 D**. La inhibición mediada por el compuesto químico obatoclax de la vía del NF- κ B puede sensibilizar a las células Ramos resistentes a la apoptosis mediada por la proteína TRAIL, para investigar esto, primero se determinó si la combinación podría disminuir la viabilidad celular. Las células Ramos fueron tratadas con la combinación del obatoclax y con el TRAIL, y posteriormente se determinó su viabilidad utilizando el ensayo de exclusión con azul tripano. En la **Figura 15 A** podemos observar que la combinación afecta la viabilidad celular y que el efecto observado es dependiente de la concentración.

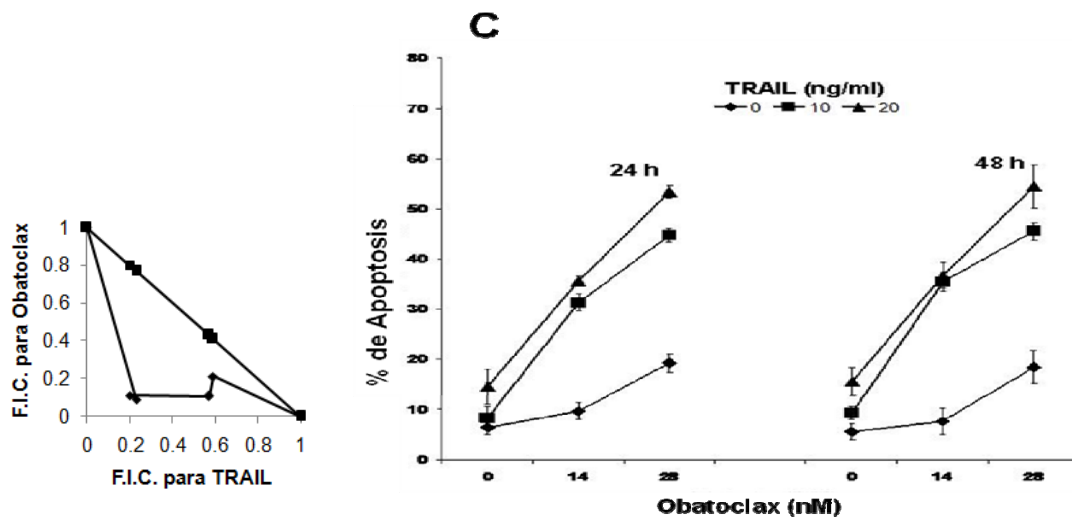
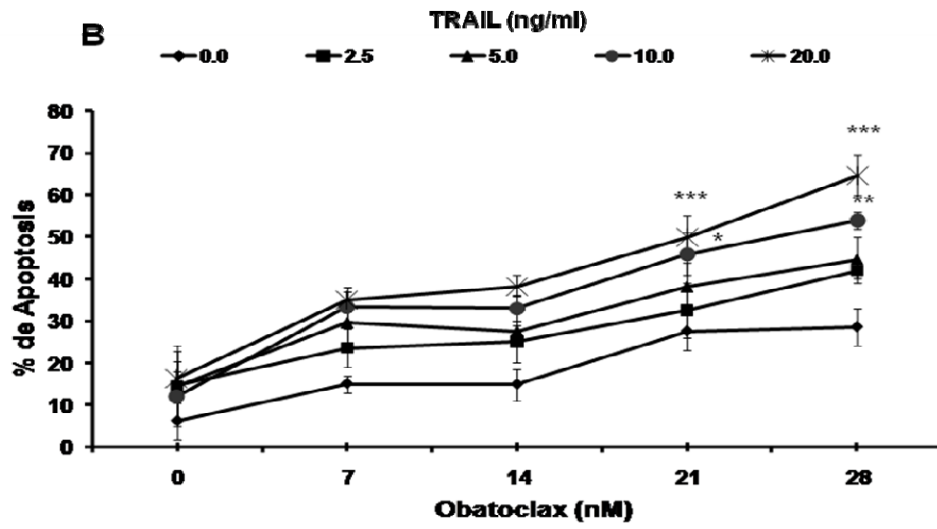
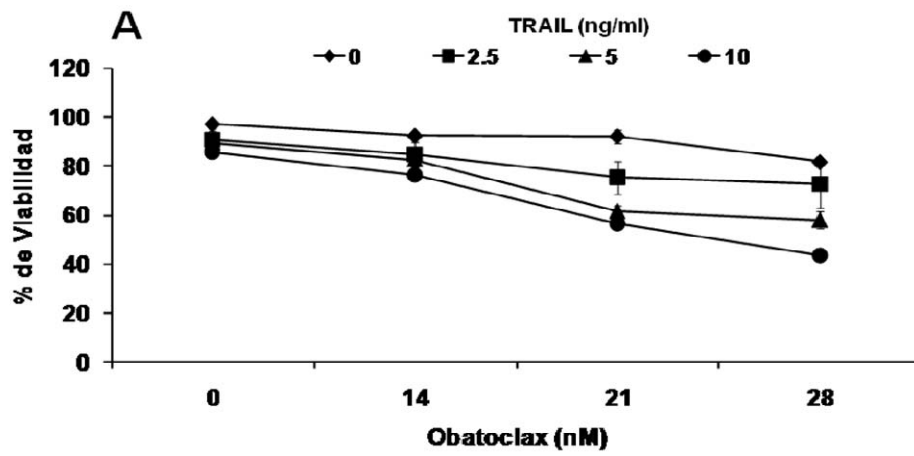
Posteriormente se determinó si la disminución de la viabilidad estaba asociada con inducción de apoptosis, así que se trataron las células utilizando la combinación y se determinó la presencia de caspasa 3 activa por citometría de flujo. En la **Figura 15 B en la parte superior** observamos que hay un aumento en el porcentaje de apoptosis dependiente de la concentración cuando se utiliza la combinación, pero el uso de estos compuesto por separado este efecto no se observa, lo cual nos sugiere que el uso de la combinación del tratamiento el obatoclax y la proteína TRAIL inducen un aumento significativo en la inducción de apoptosis al compararlo con el efecto observado sobre las células control. El análisis estadístico por isoblograma, cuyo método ofrece una evaluación de la interacción entre dos sustancias ya que permite definir una simple adición de los efectos individuales (efecto aditivo), una atenuación (efecto subaditivo o antagónico) o un sinergismo (efecto superaditivo) entre ellas; mostró que la combinación de tratamiento sobre las células Ramos tiene un efecto sinérgico (**Figura 15 B, panel inferior**).

Para determinar si el efecto es duradero se hizo una cinética de tiempo donde se analizó a las células a las 24 y 48 h más de la adición de la combinación del tratamiento y se midió la cantidad de caspasa 3 activa presente en la célula pudiéndose observar un

efecto duradero (**Figura 15 C**). Por otro lado, para determinar si estas mismas concentraciones del compuesto químico obatoclax a las cuales las células tumorales son sensibles, afectaban también a células normales, probamos el efecto del tratamiento sobre leucocitos humanos. Se obtuvieron leucocitos de cuatro donadores sanos y para asegurarnos de que estuvieran proliferando los cultivos primarios se les adicionó IL-4. Estas células fueron tratadas con diferentes concentraciones del compuesto químico obatoclax y a las 24 h se determinó su viabilidad utilizando un ensayo colorimétrico del kit XTT. Se observa que concentraciones más elevadas a las requeridas para la sensibilización de las células de LNH no muestran ningún efecto citotóxico sobre los leucocitos humanos ya que no disminuye su viabilidad (**Figura 15 D**).

10.3.2. El compuesto químico obatoclax induce la activación de la vía de apoptosis mediado por la mitocondria

Para elucidar el mecanismo por medio del cual el compuesto químico obatoclax sensibiliza a las células Ramos a la apoptosis mediada por la proteína TRAIL, se determinaron algunas características esperadas para lo que el inhibidor fue creado. Se trataron las células Ramos por 24 h con el compuesto químico obatoclax a 28 nM y posteriormente se midió por citometría de flujo la despolarización de la membrana de la mitocondria mediante el empleo del colorante DiCO6. En condiciones de inducción de apoptosis cuando se activa la vía intrínseca se espera que haya un aumento en la despolarización de la membrana con paradas con células viables. Se pudo observar que el uso de los agentes por separado no es capaz de inducir una disminución significativa de la despolarización de la membrana de la mitocondria, lo cual indica que la célula se encuentra en buenas condiciones. Sin embargo, la combinación del tratamiento disminuye significativamente la despolarización lo cual nos indica que el tratamiento afecta la estabilidad de la membrana mitocondrial. (**Figura 16 A**). Esta disminución observada por el uso de la combinación del tratamiento incluso llega a disminuir hasta por 46% comparada con el control al determinar la intensidad media de fluorescencia (**Figura 16 B**).



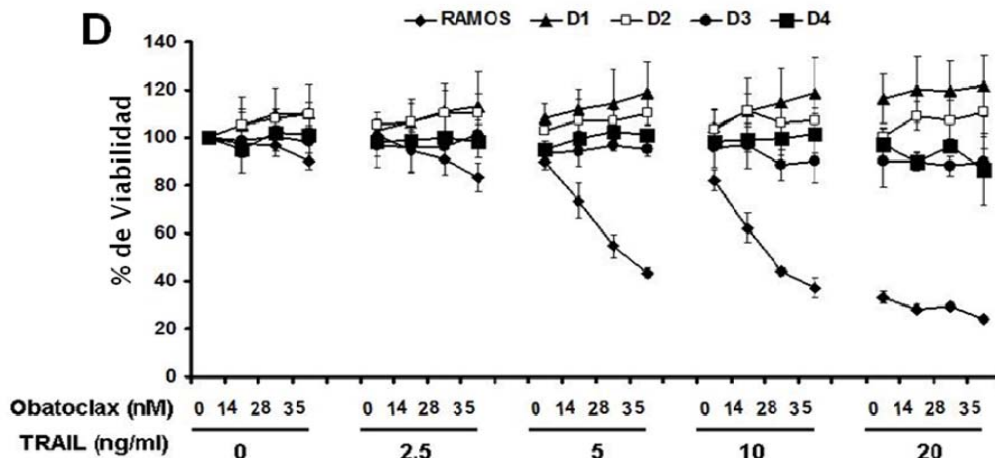


Figura 15. El compuesto químico obatoclastax induce la sensibilización de las células Ramos a la apoptosis mediada por la proteína TRAIL. A) El tratamiento con el compuesto químico obatoclastax induce citotoxicidad en las células Ramos. Las células Ramos fueron tratadas con diferentes concentraciones del compuesto químico obatoclastax por 24 h. La viabilidad fue determinada microscópicamente por exclusión con azul tripano. B) El compuesto químico obatoclastax sensibiliza a las células malignas a la apoptosis mediada por la proteína TRAIL. Las células Ramos fueron pre-tratadas por 24 h con concentraciones crecientes del compuesto químico obatoclastax seguidas de un tratamiento con la proteína TRAIL (2.5, 5, 10 o 20 ng/ml) por 18 h. Posteriormente se determinó la actividad de caspasa 3 como se describe en materiales y métodos. Los datos representan la desviación estándar de tres experimentos independientes $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$. C) El efecto del compuesto químico obatoclastax se mantiene hasta por 48 h. D) El compuesto químico obatoclastax no tiene efecto en células de sangre periférica normales. Cuatro muestras de donadores sanos fueron tratadas con diferentes concentraciones del compuesto químico obatoclastax por 24 h y no tuvieron un efecto citotóxico significativo. Análisis por isoblograma del efecto entre la combinación del compuesto químico obatoclastax y la proteína TRAIL, se observa un efecto sinérgico. F.I.C. Concentración Inhibitoria Fraccional.

10.4 El compuesto químico obatoclastax activa tanto a la vía dependiente de caspasa 8 como a la vía de la mitocondria

Lo anterior sugiere que el tratamiento con el compuesto químico obatoclastax afecta la vía de la mitocondria conduciendo a la activación de la cascada de las caspasas. Debido a que la combinación del tratamiento empleado activa tanto la vía extrínseca como la vía intrínseca activando la cascada de las caspasas, determinamos la activación de las

caspasas 3, 8 y 9. Observamos que el tratamiento con el compuesto químico obatoclax sobre la línea de LNH Ramos a 14 y 28 nM tienen un efecto muy pobre sobre el zimógenos de las caspasas 8, 9 y 3, aunque sobre esta última caspasa el procesamiento es mayor y en donde incluso se puede observar la aparición de la forma activa. Se observa que no hay ningún efecto de la proteína TRAIL sobre las caspasas cuando es adicionada de manera individual. La combinación del tratamiento nos permite ver que el procesamiento se da en los zimógenos de las caspasas 8, 9 y 3 al compararlas con el control. Los zimógenos de las caspasas 3 y 9 desaparecen casi por completo al utilizar las concentraciones más elevadas (28 nM del obatoclax y 10 ng/ml de TRAIL). El zimógeno de la caspasa 8 se reduce casi por completo al compararlo con el control cuando se utilizan las concentraciones 14 nM del obatoclax y 10 ng/ml de TRAIL, pero pareciera presentar síntesis de novo ya que a las concentraciones más elevadas el zimógeno vuelve a aparecer (28 nM del obatoclax y 10 ng/ml de TRAIL). Por lo tanto, el pre-tratamiento con el compuesto químico obatoclax vuelve sensibles a las células Ramos a la apoptosis dependiente de caspasas, mediada por la proteína TRAIL como se ve por el procesamiento y activación de las caspasas relacionadas con la vía extrínseca e intrínseca (**Figura 17**).

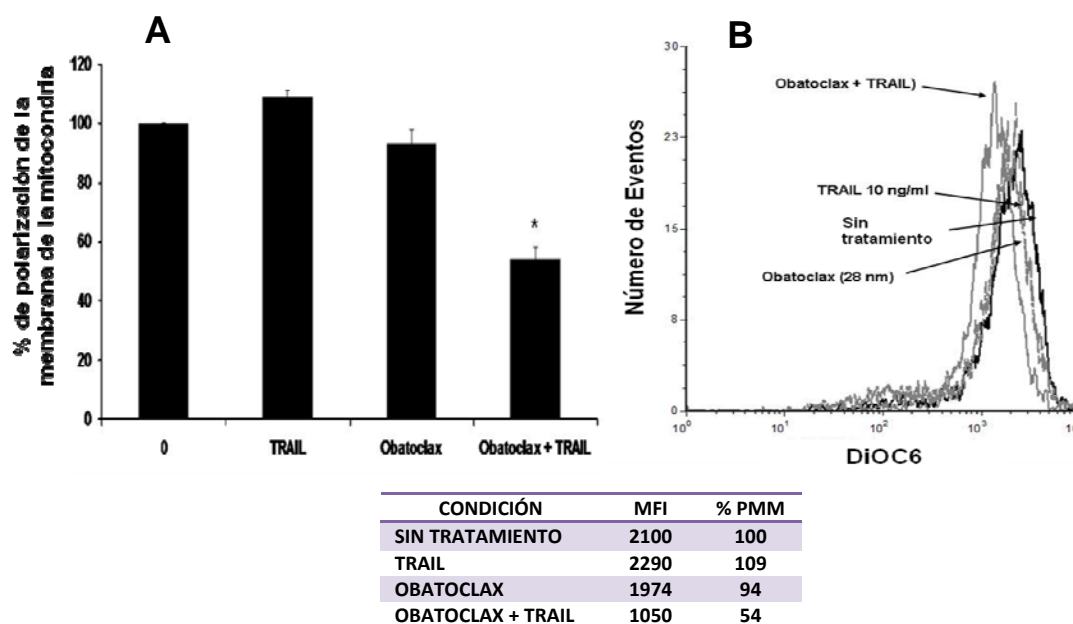


Figura 16. El compuesto químico obatoclax despolariza la membrana de la mitocondria. Las células Ramos fueron o no tratadas por 24 h con el obatoclax, la proteína TRAIL (10 ng/ml), o con la combinación de estos. A) La despolarización de la membrana de la mitocondria fue medida tiñendo con DiOC6 y luego determinado por citometría de flujo. Los datos representan los valores expresados en porcentaje de la despolarización de la membrana de la mitocondria en relación con el control y representa la media +/- la desviación estándar de al menos tres

experimentos independientes donde $*p < 0.05$: células tratadas vs no tratadas. B) Histograma de la despolarización de la membrana de la mitocondria.

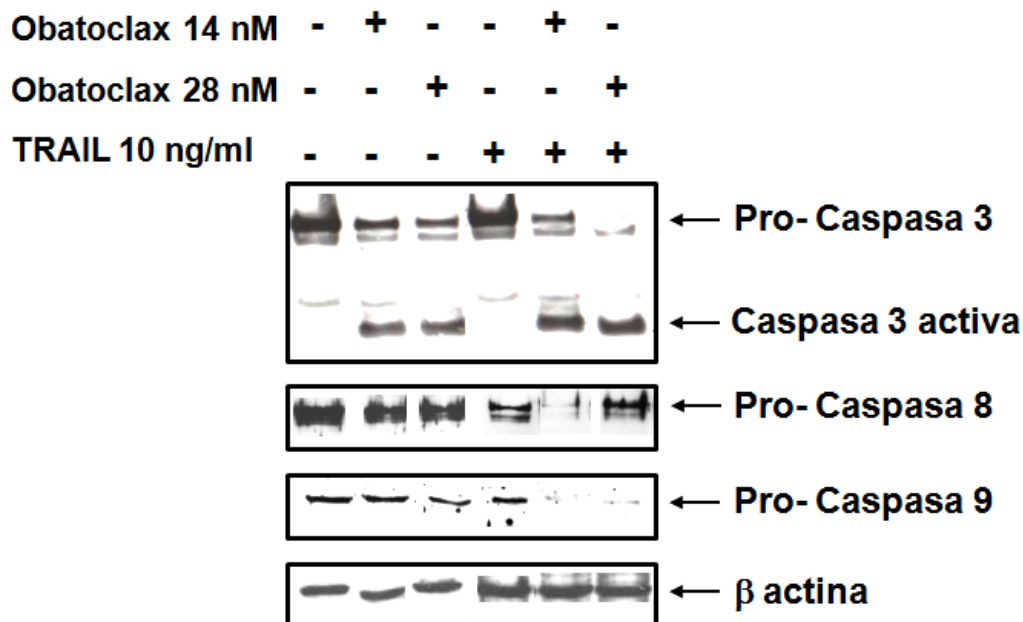


Figura 17. El compuesto químico obatoclox activa a la procaspasa 8 y a la vía de la mitocondria. Los lisados proteicos de células Ramos tratadas con el obatoclox (14 o 28 nM) solas o en combinación con la proteína TRAIL (10 ng/ml) fueron analizados por "western blot" para determinar la presencia de los zimógenos de las caspasa 3, 8 o 9. La proteína actina sirvió como control interno de carga.

10.5. El compuesto químico obatoclox inhibe a la proteína antiapoptótica Mcl-1 mediando así la sensibilización a la apoptosis por la proteína TRAIL

Como observamos en la **Figura 13**, el compuesto químico obatoclox es capaz de desplazar la unión de la proteína efectora Bak con la proteína antiapoptótica Mcl-1 y también disminuye los niveles presentes de la proteína Mcl-1. Para poder elucidar el papel que Mcl-1 juega en la resistencia a la apoptosis mediada por la proteína TRAIL en las células Ramos, se realizaron transfecciones con RNA de interferencia para disminuir los niveles presentes de dicha proteína antiapoptótica esto se realizó por 48 h y posteriormente las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de la proteína TRAIL (2.5-20 ng/ml) por 24 h adicionales. Como se puede observar en la **Figura 18 A**, el uso del siRNA disminuyó de manera significativa los niveles presentes de la proteína Mcl-1 al compararlo con el control. La adición de la proteína TRAIL nos permitió observar que bajo la ausencia casi en su totalidad de la proteína Mcl-1 en las células Ramos hay un aumento dependiente de la concentración de la apoptosis de células de hasta un 50 %, lo

que nos permite concluir que la resistencia a la apoptosis mediada por la proteína TRAIL en las células Ramos en parte se debe a la presencia de la proteína anti-apoptótica Mcl-1 (Figura 18 B).

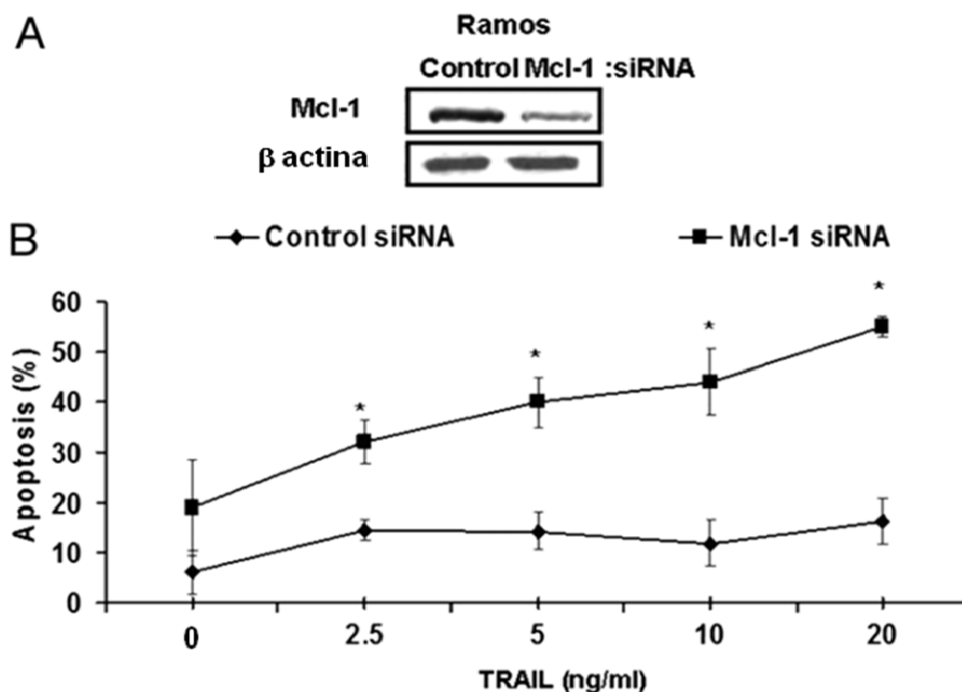


Figura 18. La inhibición de Mcl-1 sensibiliza a las células resistentes a la apoptosis mediada por la proteína TRAIL. Las células Ramos fueron tratadas con siRNA para Mcl-1 y con siRNA control como se indica en materiales y métodos. A) A las 24 h se determinó la expresión de la proteína Mcl-1 por “western blot”, la proteína actina sirvió como control interno de carga. B) Posteriormente las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de la proteína TRAIL (2.5-20 ng/ml) por 24 h adicionales. Se determinó la actividad de caspasa 3 como se describe en materiales y métodos.

10.6. El compuesto químico obatoclax inhibe al factor de transcripción YY1 y media la sensibilización de la apoptosis por la proteína TRAIL

10.6.1. El compuesto químico obatoclax inhibe la expresión y la actividad del factor de transcripción YY1

Previamente en el grupo de trabajo en colaboración con la Universidad de California se ha demostrado que la inhibición de la actividad de NF- κ B disminuye al represión de la transcripción Ying Yang 1 (YY1), el cual es responsable de la inhibición del receptor para

la proteína TRAIL, el DR5, ya que su promotor cuenta con sitios de unión para dicho factor de transcripción y esto a su vez es responsable en gran medida de la reversión de la resistencia a la apoptosis mediada por la proteína TRAIL (45;46). Debido a que la adición del compuesto químico obatoclax a las células Ramos disminuye la actividad y expresión del factor nuclear κ B, determinamos si la adición del obatoclax tenía como resultado algún efecto en el factor YY1 así como en el receptor DR5. Adicionamos el obatoclax a las células Ramos por 24 h a 14 y 28 nM, posteriormente se realizó un análisis por “western blot”. En la **Figura 19 A** se observa que la adición del obatoclax a las células Ramos disminuye los niveles de YY1 presentes en la célula al compararlo con los niveles observados en los lisados de la células control. Posteriormente, se observó si existía correlación con una disminución en la actividad de unión de la proteína al DNA. Utilizando sitios consenso para el YY1 se estimularon a las células por 24 h y se analizaron los extractos nucleares utilizando geles de retardamiento, obteniéndose una disminución en la actividad de unión con el DNA, lo que correspondería a bajos niveles del YY1 translocados al núcleo (**Figura 19 B**). Por otro lado, también se determinó si había una disminución en la actividad de YY1. Utilizando un plásmido reportero se transfectó a las células PC3, se adicionó el obatoclax a 156, 312.5 y 625 nM y después de 24 h, se determinó la actividad de luciferasa. Se utilizó al inhibidor químico DHMEQ como control positivo y se compararon los resultados con respecto al control. Encontramos una disminución dependiente de la concentración en la cantidad de luz producida por las células tratadas con el obatoclax parecida a la que se observa en el control positivo DHMEQ, esto al ser comparado con el control (**Figura 19 C**).

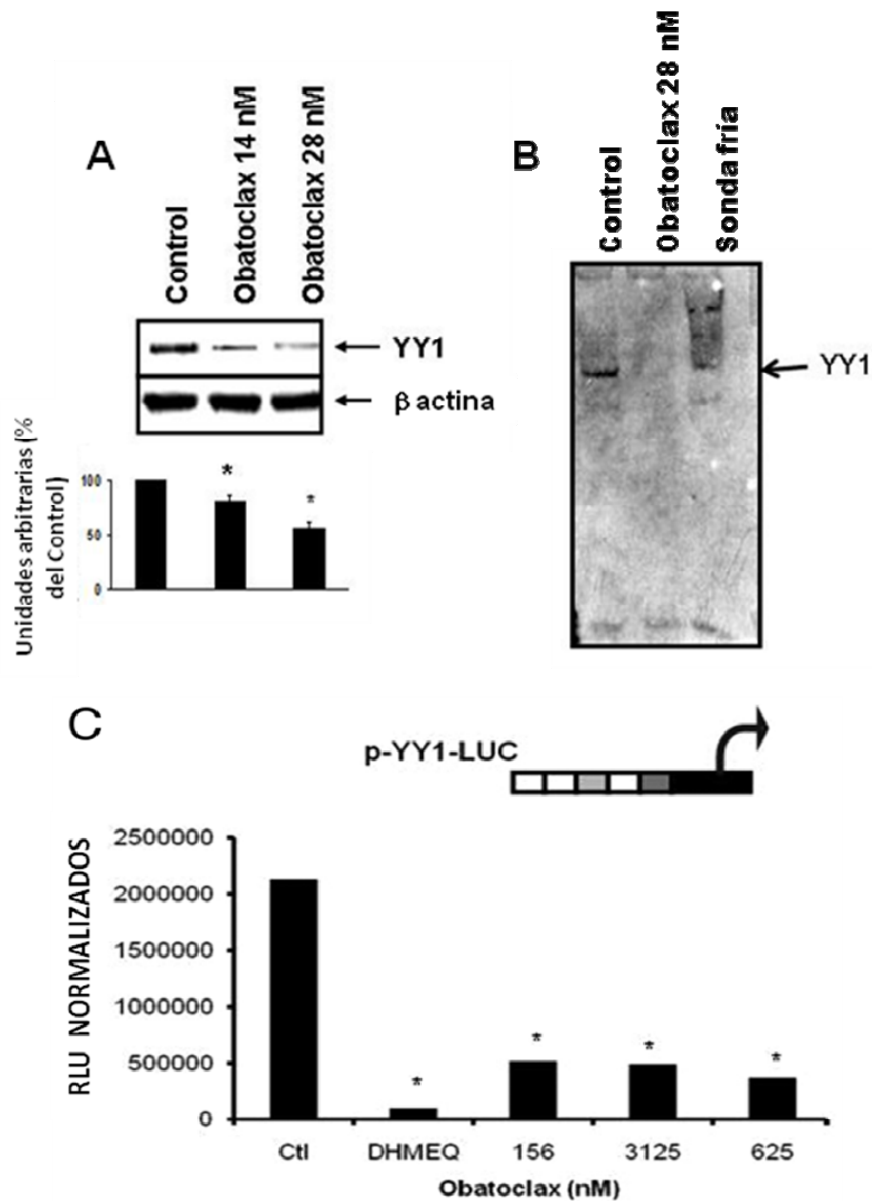


Figura 19. El compuesto químico obatoclax media la inhibición de la expresión y la actividad del factor de transcripción YY1. A) Las células Ramos fueron tratadas con el obatoclax por 24 h los lisados totales fueron analizados por “western blot” para medir la presencia del factor YY1. La proteína actina fue utilizada como un control de carga, y se realizó el análisis densitométrico. B) El obatoclax inhibe la actividad de unión del YY1 al DNA. Los extractos nucleares de células Ramos tratadas con el obatoclax por 24 h fueron analizados por EMSA para ver la actividad de unión del YY1 al DNA. C). Las células PC3 fueron transfectadas con el plásmido reportero NF- κ B-Luc durante 24 h, para luego adicionarles el DMSO o el obatoclax a las concentraciones indicadas por 24 h adicionales. Posteriormente se midió la actividad de luciferasa como se describe en la metodología. Células tratadas con 10 μ g/ml del inhibidor químico DHMEQ, fueron utilizadas como control positivo.

10.6.2. El compuesto químico obatoclax induce la inhibición del YY1 aumentando la sensibilización de las células Ramos en la apoptosis mediada por la proteína TRAIL

Con el objeto de analizar el papel directo de YY1 en la reversión de la apoptosis por el TRAIL, utilizamos RNA de interferencia para apagar la expresión del factor de transcripción. Las células Ramos fueron transfectadas por 48 h con siRNA y por medio de “western blot” observamos si esto inducía cambios en los niveles de ciertas proteínas; podemos observar en la **Figura 20 A** una disminución de la proteína Mcl-1, de la proteína fosforilada p65 y del factor de transcripción YY1. Además, se determinó si había un efecto sobre los niveles de los receptores para la proteína TRAIL, observándose un aumento en los niveles del receptor DR5 pero no del receptor DR4. Además, la adición del TRAIL a estas células transfectadas con el siRNA para YY1 mostró aumento en el porcentaje de muerte celular determinado por la cuantificación de caspasa 3 activa (**Figura 20 B**).

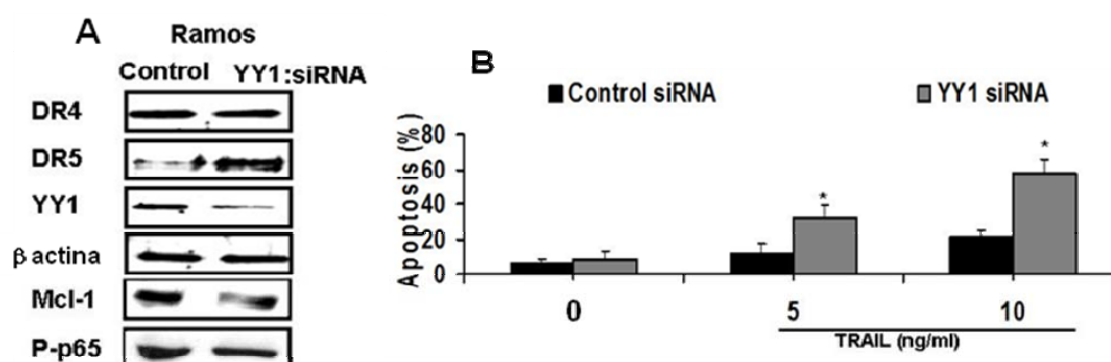


Figura 20. La inhibición del factor de transcripción YY1 sensibiliza a las células resistentes a la apoptosis mediada por la proteína TRAIL. Las células Ramos fueron tratadas con siRNA para el YY1 y con siRNA control como se indica en materiales y métodos. A) A las 24 h se determinó la expresión de las proteínas YY1, DR4, DR5, Mcl-1 y Fosfo p65 por “western blot”, la proteína actina se utilizó como control interno de carga. B) Posteriormente las células fueron tratadas con diferentes concentraciones del TRAIL (5-10 ng/ml) por 24 h adicionales. Se determinó la actividad de caspasa 3 como se describe en materiales y métodos.

El YY1 es un factor nuclear que tiene una función dual, la cual depende del promotor del gen que se trate, ya que en algunas ocasiones puede activar y en otras reprimir la transcripción del gene. De manera interesante, se ha mostrado anteriormente que el

receptor para la proteína TRAIL, el DR5, tiene sitios en su promotor que son regulados de manera negativa por YY1 (45;46).

10.6.3. La sensibilización mediada por el compuesto químico obatoclox a la apoptosis por la proteína TRAIL induce un aumento de expresión del receptor DR5, pero no del receptor DR4

10.6.3.1. El obatoclox inhibe al factor de transcripción YY1 y aumenta la expresión del receptor DR5

La ausencia o disminución del factor de transcripción YY1 permite que el promotor se pueda activar y por tanto que el gene se transcriba, traducándose en un aumento en la concentración de la proteína y aumento de su expresión en superficie. Si la adición del obatoclox a las células Ramos hace que se disminuyan los niveles de expresión y translocación al núcleo de YY1 entonces probablemente habrá un aumento en la transcripción del receptor para DR5. Por estas razones determinamos los niveles de expresión de los receptores del TRAIL, el DR4 y el DR5, por medio de “western blot”. Los resultados indicaron que hay un aumento evidente del receptor DR5 dependiente de la concentración, pero no así de DR4, después de 24 h de haber adicionado el obatoclox a las células Ramos (**Figura 21 A panel superior**). Esos datos también están representados por su respectivo análisis densitométrico (**Figura 21 A panel inferior**). Posteriormente, se determinó la expresión en superficie del receptor DR5 por medio de citometría de flujo, después de estimular a las células por 24 h, en la **Figura 21 B** se presenta un histograma representativo en el cual se observa que el receptor DR5 también presenta un aumento en superficie (**Figura 21 B**). Tanto en el “western blot” como por citometría de flujo se puede observar que el aumento es dependiente de la concentración, observándose mayor cantidad de proteína y expresión en superficie al adicionar 28 nM del obatoclox. Este aumento observado sólo en el receptor de DR5 pero no en el receptor DR4 por el tratamiento con el obatoclox, también se presentó en otras líneas celulares de LNH (2F7 y DHL4) de cáncer de próstata (PC3), cáncer de colon (SW620) y células Jurkat además de las células Ramos (**Figura 21 C**). Por lo anterior, podemos concluir que el mecanismo por medio del cual el obatoclox sensibiliza a las células de LNH a la apoptosis mediada por el TRAIL es debido a que de manera indirecta desreprime al promotor del receptor DR5.

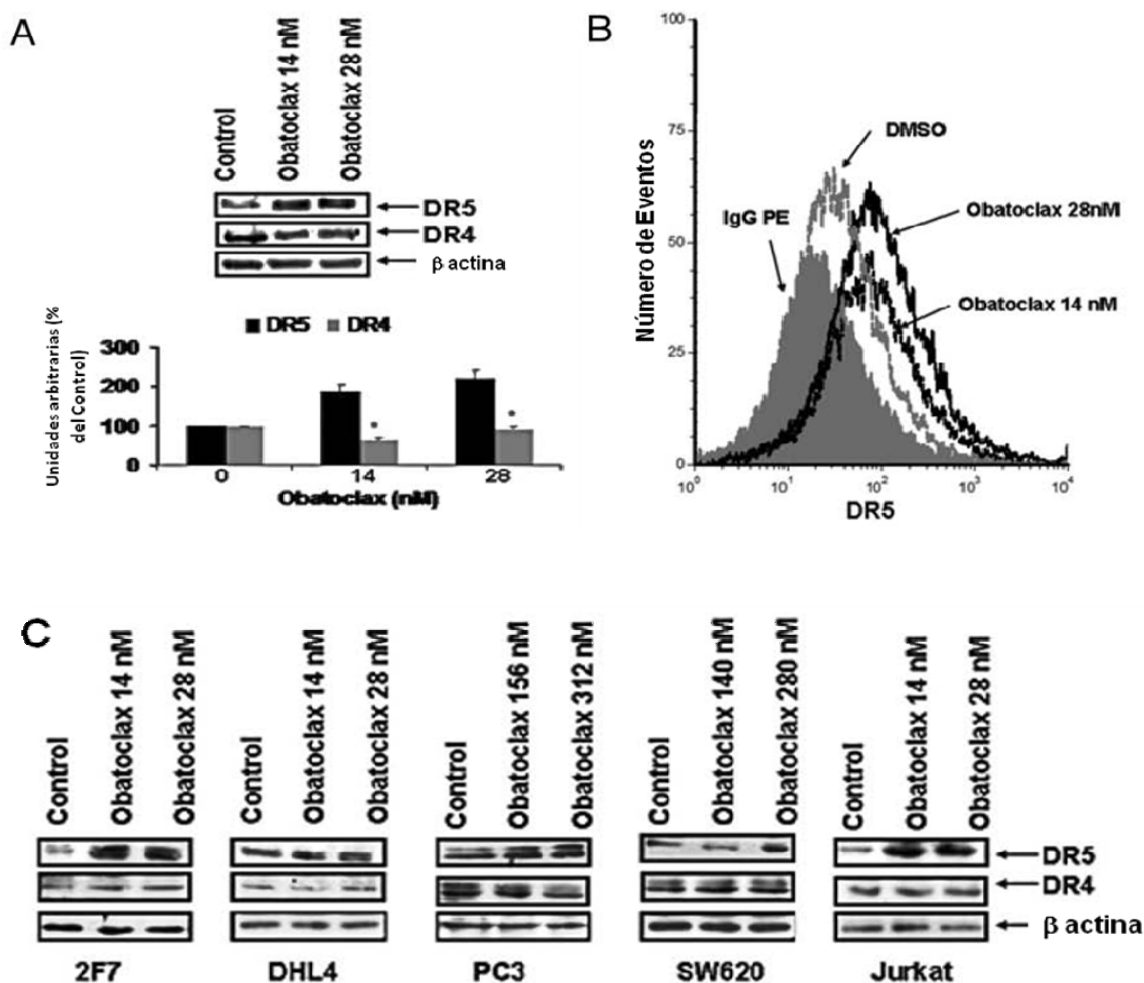


Figura 21. El compuesto químico obatoclox aumenta la expresión del receptor DR5.

A) Las células Ramos tratadas con 14 y 28 nM de obatoclox por 24 h fueron analizadas por “western blot” para determinar la expresión de los receptores DR4 y DR5. La proteína actina fue utilizada como un control de carga y se realizó un análisis densitométrico. Los datos representan el promedio \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes * $p < 0.01$. B) La expresión en superficie del receptor DR5 fue analizada. Se muestra un histograma representativo de células Ramos tratadas con el obatoclox al ser analizadas por citometría de flujo. C) La expresión del receptor DR5 se muestra en diferentes líneas celulares. Los lisados totales fueron analizados por “western blot” después de tratar a las células con las concentraciones indicadas de obatoclox por 24 h, se muestra la expresión de los receptores DR4 y DR5. La proteína actina fue utilizada como un control de carga.

10.6.3.2. El compuesto químico obatoclax sensibiliza a las células Ramos a la apoptosis mediada por la proteína TRAIL a través de la activación del receptor DR5 pero no del receptor DR4

Para determinar el papel directo de los receptores DR4 y DR5 en su participación como responsables de la sensibilización de las células a la apoptosis mediada por el TRAIL, las células Ramos fueron transfectadas con siRNA para DR4 y DR5. El siRNA disminuye de manera específica la presencia de la proteína DR4 o de la proteína DR5 sin afectar otras proteínas como se observa por la presencia constante de la proteína actina (**Figura 22 A** análisis por “western blot”). En un histograma representativo que ejemplifica células Ramos tratadas con siRNA, observamos una disminución en la tinción de superficie del receptor DR5 al compararlo con el control, lo cual indica que se disminuye la cantidad de receptor presente en la célula. Posteriormente, las células transfectadas fueron tratadas por 24 h con 14 y 28 nM del obatoclax y luego se adicionó 10 ng/ml del TRAIL por 18 h adicionales. En ellas se determinó el porcentaje de apoptosis presente en la célula midiendo la cantidad de caspasa 3 activa. Como se puede observar, aquellas células con cantidades disminuidas del receptor DR5 pierden la posibilidad de volverse sensibles a la apoptosis mediada por el TRAIL, pero aquellas a las que se les disminuyó el receptor DR4, donde se observa que los niveles de apoptosis son muy parecidos a los niveles de las células control. Lo anterior sugiere que el obatoclax media la sensibilización a la apoptosis por la proteína TRAIL en las células Ramos a través de la activación de la vía de señalización mediada por el receptor DR5 pero no por el receptor DR4 (**Figura 22 B**).

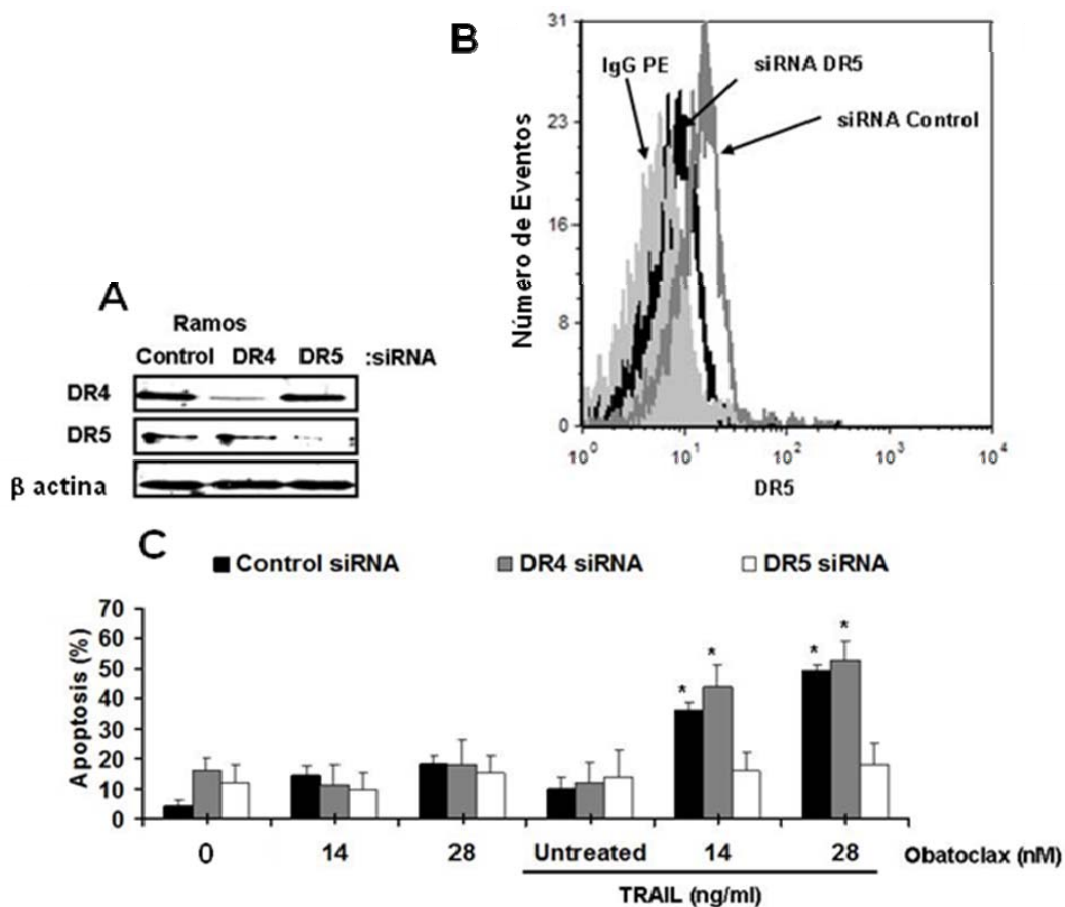


Figura 22. La inhibición del receptor DR5, pero no del DR4, no permite la sensibilización de las células resistentes a la apoptosis mediada por la proteína TRAIL. Las células Ramos fueron tratadas con siRNA para los receptores DR4, DR5 y con siRNA Control como se indica en materiales y métodos. A) A las 24 h se determinó la expresión de la proteína DR4 y DR5 por “western blot”, la expresión de la proteína actina fue utilizada como control interno de carga. B) Muestra el análisis por citometría de flujo de la expresión en superficie del receptor DR5 en las células Ramos tratadas con siRNA para el DR5. C) Células tratadas con 14 y 28 nM de obatoclox por 24 h y posteriormente con la proteína TRAIL (10 ng/ml) por 18 h adicionales. Se determinó la actividad de caspasa 3 como se describe en materiales y métodos.

11. DISCUSIÓN

Las células tumorales desarrollan resistencia al tratamiento convencional. Existen otras opciones de tratamiento como lo es la inmunoterapia, donde el auge de anticuerpos específicos permitió dar una mejor calidad de vida al paciente. Lamentablemente, también este tipo de tratamiento ha encontrado ya problemas en la clínica, también debido al desarrollo de resistencia a la inmunoterapia. Actualmente, se buscan alternativas que permitan su uso en combinación con inmunoterapia e incluso la quimioterapia. El desarrollo de resistencia es variado, pero principalmente la célula maligna utiliza las propiedades propias de la célula para utilizarlo a su conveniencia. Por ejemplo, un aumento en concentración y en función de proteínas antiapoptóticas, lo que evita que la inducción de apoptosis se lleve a cabo aún cuando toda la maquinaria esté presente; también se puede presentar una disminución de receptores de superficie los cuales son esenciales para la comunicación del exterior como es el caso de los receptores de muerte que al estar disminuidos no se activan aunque el ligando esté presente.

Es necesario el desarrollo de otras opciones terapéuticas que puedan utilizarse ya sea solas o en combinación con la posibilidad de volver a sensibilizar a las células al tratamiento convencional. En general estas opciones terapéuticas podrían tener como mecanismo la inhibición específica directa o indirectamente de la presencia de proteínas antiapoptóticas que se encuentren en exceso en la célula maligna, o por otro lado que esta terapia permita el aumento de los receptores blanco.

En esta tesis encontramos que existe un mecanismo de sensibilización de las células tumorales mediado por el uso del compuesto químico obatoclax en la regulación de genes, lo cual conduce en una reversión de la resistencia a la apoptosis mediada por la proteína TRAIL. El mecanismo por medio del cual el obatoclax sensibiliza a estas células es debido a una inhibición en la función y presencia de la proteína antiapoptótica Mcl-1 y adicionalmente por un efecto indirecto del represon de la transcripción YY1, el cual al afectar su presencia en la célula muy probablemente está asociado a que se des-reprima el promotor del receptor de TRAIL, conllevando un incremento en la expresión de DR5 en la superficie celular para, de esta manera, volver sensibles a las células malignas a la apoptosis mediada por el TRAIL, aunque se necesitan realizar más experimentos como es la sobreexpresión de la proteína Mcl-1.

El compuesto químico obatoclax fue diseñado principalmente para mimetizar el dominio BH3 de las proteínas de sólo el dominio de BH3 y de esta manera afectar a las proteínas antiapoptóticas ya que al unirse directamente o por activación directa de las proteínas efectoras, es capaz de inhibir los efectos antiapoptóticos. El obatoclax compite en el mercado con otros compuestos de actividad parecida pero con un efecto mayor en lo que se refiere al espectro de actividad sobre las proteínas antiapoptóticas, siendo una de los principales en inhibir a la proteína Mcl-1, cuya importancia ha destacado en diferentes tipos de cáncer a los cuales confiere resistencia, como en cáncer de cabeza y cuello, y en el de mama (119;120). El efecto de este tipo de compuestos puede afectar la expresión de las proteínas antiapoptóticas, como se observa en las células de linfoma en donde hay una disminución en la expresión de proteínas de la familia de Bcl-2 (**Figura 12A**). Sin embargo, al elucidar el mecanismo de sensibilización mediado por el obatoclax pudimos determinar efectos adicionales. Los resultados obtenidos señalan que el efecto adicional en la actividad del obatoclax involucra a la familia de proteínas CIAPs disminuyendo su expresión. Además, el obatoclax también fue capaz de interrumpir la vía constitutiva de NF- κ B de la cual se ha señalado que en diferentes tipos de cáncer se encuentra activa induciendo proliferación, ya que sus blancos están representados por genes que proporcionan resistencia a la apoptosis y conllevan a la proliferación celular.

El obatoclax, también, tiene un efecto indirecto sobre el represor YY1 en el cual disminuye su presencia y así también su actividad, permitiendo que el promotor del gen se desreprima y permita la transcripción y traducción del receptor DR5. En células malignas de tumores sólidos se ha visto que también hay una sensibilización a la apoptosis mediada por la proteína TRAIL, pero los mecanismos por medio de los cuales ocurre dicha sensibilización son diferentes a los reportados por nosotros. A pesar de que la célula también expresa el receptor DR4, éste no pareciera tener una actividad primordial en la sensibilización de las células tumorales utilizadas aquí en combinación con el obatoclax. Sin embargo, en otros estudios que utilizan al inhibidor ABT-737, el cual también mimetiza el dominio de BH3, en combinación con el TRAIL se observó un papel importante del receptor DR4 en células de cáncer de próstata, lo cual indica que estos compuestos no necesariamente activan el mismo mecanismo para la sensibilización a la apoptosis mediada por el TRAIL o de un posible efecto asociado a la estirpe celular. Anteriormente, en el grupo de trabajo, ya se había demostrado el papel del YY1 revirtiendo la resistencia a la apoptosis mediada por el TRAIL (39 41), pero aquí mostramos que esta inhibición del YY1 por el obatoclax juega un papel clave para permitir

la expresión del receptor DR5, el cual es el responsable de la reversión de la resistencia como se mostró en los ensayos de RNA de interferencia.

Como hemos visto, el obatoclax pareciera tener varias actividades ocurriendo en la célula, que incluyen un efecto directo e indirecto, afectando la vía de sobrevivencia mediada por el NF- κ B y genes que confieren resistencia a la apoptosis. Otros autores han reportado la sensibilización por el obatoclax a la apoptosis mediada por la proteína TRAIL en células de cáncer de páncreas (126). Huang y colaboradores reportaron que el mecanismo de sensibilización era debido a la liberación de la proteína Bak y Bim de Bcl-2, Bcl- χ L o de Mcl-1, pero en su modelo ellos observan que no hay alteraciones en la expresión de Mcl-1. Smoot y colaboradores reportaron que el obatoclax era capaz de incrementar los niveles de Bax al tratar células de colangiocarcinoma y además observan translocación de Bax a la mitocondria para inducir apoptosis (127). Con lo anterior podemos concluir que estos efectos son tumor específico.

Debido a que el obatoclax de forma directa o indirecta es capaz de inhibir la vía constitutivamente activa de NF- κ B, provoca que también haya inhibición de los genes regulados por NF- κ B como lo son Mcl-1, Bcl- χ L, cIAP y XIAP. A pesar de que, se esperaría que se disminuyeran los niveles de la proteína Bax, aquí podemos observar que hay una inhibición modesta de Bax por efecto de el obatoclax, posiblemente, debido a la regulación diferencial de sus promotores por la falta de actividad del factor NF- κ B o a la participación de otros factores de transcripción como p53. Se ha observado que la disminución de los niveles de NF- κ B correlacionan con la estabilización de p53, inhibiendo así la proliferación celular en cáncer oral (128), aunque otros estudios señalan que el uso del obatoclax induce una disminución en los niveles de p53 en líneas celulares de LNH y p53 regula los niveles de expresión de Bax (129).

12. CONCLUSIONES

Nuestros resultados indican que el obatoclax es capaz de inhibir la actividad de NF- κ B por medio de un mecanismo desconocido. Podría tratarse de un mecanismo directo sobre los factores de transcripción o a nivel de los promotores inhibiendo su función y/o transcripción. Algunos autores señalan que existe una interacción entre las proteínas de la familia de Bcl-2 y factores de transcripción como p53 y NF- κ B, por lo que al formar estos complejos pueden inhibir su translocación al núcleo. Dicha unión se ha visto en la región del dominio regulador del asa flexible (FLD) de Bcl-2 conformada por los dominios BH4 y BH3 cuando se encuentra desfosforilada (129-131).

Estas diferentes posibilidades requieren de futuras investigaciones. Además, mostramos que el obatoclax inhibe diferentes miembros de la familia de únicamente el dominio de BH3 como Bid y Bad, los cuales de acuerdo al modelo jerárquico(60;132), pertenecen a subgrupos cuyos mecanismos para inducir apoptosis tienen vías y funciones diferentes para lograr inducir apoptosis; por un lado pueden activar directamente a las proteínas efectoras (Bax y Bak) por lo que son conocidos como activadores, o por el otro lado pueden funcionar como sensibilizadores donde pueden desplazar a la proteína efectora del secuestro mediado por las proteínas antiapoptóticas (133). Sin embargo, no está claro cuál es la vía que el obatoclax utiliza para inducir la inhibición de las proteínas antiapoptóticas, aunque ya se ha visto que algunos miembros son regulados por otros factores de transcripción como es el caso de p53 (134;135). Nuestros resultados sugieren que el obatoclax puede afectar diferentes factores de transcripción implicados en la regulación de estas proteínas.

El obatoclax inhibe varias proteínas antiapoptóticas, tanto en función como en expresión. Originalmente ya se reportó que este inhibidor desplaza a las proteínas efectoras de las proteínas antiapoptóticas Bax y Bim de Mcl-1 o Bcl-_{XL} para permitir su activación. Nuestros resultados confirman que estas proteínas antiapoptóticas están presentes lo que permite la sobrevivencia celular, pero cuando éstas se ven afectadas por el obatoclax a las concentraciones utilizadas, se observa liberación de las proteínas efectoras y también una disminución de las proteínas antiapoptóticas Mcl-1y Bcl-_{XL}, permitiendo su sensibilización a la apoptosis mediada por el TRAIL. Además, se demostró que dicha sensibilización se puede lograr al disminuir la presencia de Mcl-1, utilizando el RNA de interferencia, marcando un papel clave de dicha proteína en la resistencia de estas células. En otros estudios también han mostrado el papel de Mcl-1 en conferir resistencia. Nguyen y colaboradores han reportado que el antagonismo ejercido por el tratamiento con

el obatoclax al inhibir la función de Mcl-1, permite que células de cáncer de mama mueran por apoptosis (121). El uso de ABT 737 se ha visto afectado en la inducción de apoptosis, ya que no puede inhibir la presencia de Mcl-1 en diferentes tipos de cáncer, pero al abatir su presencia, la célula se vuelve sensible al tratamiento, confirmando su papel clave en la resistencia celular.

Nuestros resultados muestran que tanto la proteína YY1 como Mcl-1 juegan un papel importante para poder revertir la resistencia a la apoptosis mediada por la proteína TRAIL después de tratarlo con el obatoclax. El mecanismo por medio del cual el obatoclax inhibe a Mcl-1 ya estaba descrito, ya que fue creado con esa finalidad. Sin embargo, nuestros estudios muestran que además, interfiere con otros factores de transcripción como los de la vía del NF- κ B, y como resultado, también afecta la expresión de Mcl-1 por contener sitios de unión para ese factor de transcripción en su promotor. Los resultados también muestran que la inhibición del YY1 conlleva a una disminución en la activación de NF- κ B, por lo que probablemente existe una relación directa entre estos factores transcripcionales que a su vez involucran la expresión de Mcl-1, aunque se requieren estudios adicionales para poder elucidar la vía. El mecanismo de señalización propuesto en este trabajo, por medio del cual actúa el obatoclax en estas líneas celulares resistentes a la inmunoterapia se ejemplifica en la **Figura 23**.

El compuesto químico obatoclax podría ser utilizado en la clínica en combinación con el TRAIL. Nuestros resultados también muestran que se requiere de concentraciones elevadas para llegar a tener un efecto citotóxico en las células normales, como se observó al tratar leucocitos humanos con las combinación utilizada para las células malignas, por lo que obatoclax se podría considerar como tratamiento potencial en pacientes que presenten resistencia a la inmunoterapia desde el inicio o que la desarrollen durante su tratamiento. En la clínica, el obatoclax se encuentra en estudios de fase II para cáncer de pulmón, fase I para tumores sólidos avanzados y fase II para pacientes con mielo fibrosis, utilizándolo como único tratamiento (136;137). En estos estudios se reporta una toxicidad baja, muy parecidos a los obtenidos con otras drogas terapéuticas.

Este estudio ofrece la posibilidad de utilizar al obatoclax en combinación con el tratamiento con quimioterapia para las enfermedades hematológicas, en aquellos pacientes que presenten resistencia al tratamiento, donde probablemente la vía de NF- κ B se encuentra constitutivamente activa y de esta manera pueda revertir la resistencia.

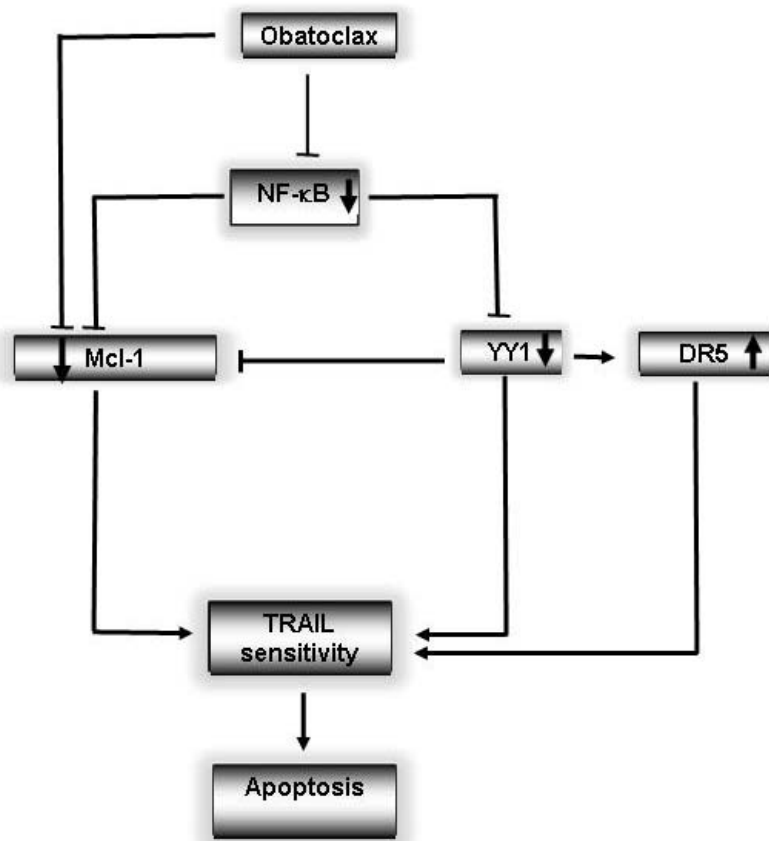


Figura 23. Diagrama esquemático del mecanismo de acción del compuesto químico obatoclax para sensibilizar a las células a la apoptosis mediada por la proteína TRAIL. Las células B de LNH mantienen su resistencia a la apoptosis mediada por el TRAIL a través de la activación constitutiva del factor nuclear κ B y del factor nuclear YY1, este último regula negativamente la expresión del receptor DR5. El tratamiento de las células con el obatoclax inhibe la actividad tanto de NF- κ B como de YY1 permitiendo así, que los niveles del DR5 se incrementen. De forma paralela el obatoclax inhibe la función de la proteína antiapoptótica Mcl-1 y además permite la liberación de la proteína Bak, además induce la activación de las procaspasas 9,3 y 8 resultando en la sensibilización de las células de linfoma a la apoptosis mediada por el TRAIL.

13. ABREVIATURAS

A1	del ingles, Bcl-2 related protein A1
AIF	del ingles, Apoptosis-Inducing Factor
APAF-1	del ingles, Apoptotic Protease Activating Factor
ATP	adenosin trifosfato
Bad	del ingles, Bcl-2-associated death promoter
Bak	del ingles, Bcl-2 antagonist Killer 1
Bax	del ingles, Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	del ingles, B cell CLL/Lymphoma 2
Bcl-w	del ingles, BCL2-like 2
Bcl-XL	del ingles, B-cell lymphoma-extra large
BH	del ingles, Bcl-2 homology
BH3	del ingles, Bcl-2 homology region 3
Bid	del ingles, BH3 interacting domain death agonist
Bik	del ingles, Bcl-2 interacting killer
Bim	del ingles, Bcl-2 interacting mediator of cell death
Bmf	del ingles, Bcl-2 modified factor
Bok	del ingles, Bcl-2 related ovarian killer
CAD	del ingles, DNAsa activada por caspasas
caspasas	del ingles, Cysteine Aspartyl-specific Proteases
CLL	del ingles, chronic lymphocytic leukemia
DD	del ingles, Death Domain
DED	del ingles, Death Effector Domain
DIABLO	del ingles, Direct IAP-binding protein with low pl
DISC	del ingles, Death Inducing Signaling Complex
DLBCL	del ingles, Diffuse Large B-cell Lymphoma
DNA	del ingles, Deoxyribonucleic Acid
DR4	del ingles, Death Receptor 4
DR5	del ingles, Death Receptor 5
EGCG	epigalecatequinas
EGFR	del ingles, epidermal growth factor receptor
FADD	del ingles, Fas-associated death domain
FDA	del ingles, Food and Drug Administration
FLIP	del ingles, FLICE-like inhibitory protein
HA14-1	ethyl 2-amino-6-bromo-4-(1-cyano-2-ethoxy-2-oxoethyl)-4H-chromene-3-carboxylate
Hrk	Harakiri
HtrA2	del ingles, High temperature requirement protein A2
IAP	del ingles, Inhibitor of Apoptosis
ICAD	inhibidor de la DNAsa activada por caspasas
ICE	del ingles, interleukin-1 β -converting enzyme
LDCGB	Linfoma Difuso de Células B Grandes
LF	Linfoma Folicular
LH	Linfoma de Hodgkin

LNH	Linfoma No Hodgkin
Mcl-1	del ingles, Myeloid Cell Leukemia sequence 1
NF-κB	del ingles, Nuclear Factor kappa B
Noxa	Latin for damage
OBATOCLAX	O GX15-070 , 2-[5[(3,5-Dimethyl-1H-pyrrol-2-ylmethylene)-4-methoxy-5H-pyrrol-2-yl]-1H-indole
OMS	Organización Mundial para la Salud
Puma	del ingles, p53 upregulated modulator of apoptosis
RNA	del ingles, Ribonucleic Acid
Smac	del ingles, Second Mitochondria-Derived Activator of Caspases
TNF	del ingles, Tumor Necrosis Factor
TRAIL	del ingles, Tumor Necrosis Factor related apoptosis inducing ligand
XIAP	del ingles, X-linked IAP
YY1	Ying Yang 1

14. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP. Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(3):776-781.
- (2) Organización Mundial de la Salud [OMS]. Cancer. Nota descriptiva No. 297. 2011.
Ref Type: Internet Communication
- (3) GLOBOCAN 2008. FAST STATS . 30-11-2011.
Ref Type: Report
- (4) Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI]. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. 4-2-2011.
Ref Type: Report
- (5) Glen CD, Dubrova YE. Exposure to anticancer drugs can result in transgenerational genomic instability in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012.
- (6) Martinez-Quintanilla J, Cascallo M, Fillat C, Alemany R. Antitumor therapy based on cellular competition. *Hum Gene Ther* 2009; 20(7):728-738.
- (7) Williams GH, Stoeber K. The cell cycle and cancer. *J Pathol* 2012; 226(2):352-364.
- (8) Tirado-Gómez L, Mohar A. Epidemiología de las Neoplasias Hemato-Oncológicas. *Cancerología, Revista del Instituto Nacional de Cancerología* 2007; 2(2):109-120.
- (9) Rao AV, Akabani G, Rizzieri DA. Radioimmunotherapy for Non-Hodgkin's Lymphoma. *Clin Med Res* 2005; 3(3):157-165.
- (10) Campoli M, Ferris R, Ferrone S, Wang X. Immunotherapy of malignant disease with tumor antigen-specific monoclonal antibodies. *Clin Cancer Res* 2010; 16(1):11-20.
- (11) Reichert JM, Rosensweig CJ, Faden LB, Dewitz MC. Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nat Biotechnol* 2005; 23(9):1073-1078.
- (12) Link BK, Friedberg JW. Monoclonal antibodies in lymphoma: the first decade. *Semin Hematol* 2008; 45(2):71-74.
- (13) Leverkus M, Sprick MR, Wachter T et al. Proteasome inhibition results in TRAIL sensitization of primary keratinocytes by removing the resistance-mediating block of effector caspase maturation. *Mol Cell Biol* 2003; 23(3):777-790.

- (14) Koschny R, Walczak H, Ganten TM. The promise of TRAIL--potential and risks of a novel anticancer therapy. *J Mol Med (Berl)* 2007; 85(9):923-935.
- (15) Lawrence D, Shahrokh Z, Marsters S et al. Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat Med* 2001; 7(4):383-385.
- (16) Ashkenazi A, Pai RC, Fong S et al. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* 1999; 104(2):155-162.
- (17) Walczak H, Miller RE, Ariail K et al. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med* 1999; 5(2):157-163.
- (18) Kelley SK, Ashkenazi A. Targeting death receptors in cancer with Apo2L/TRAIL. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4(4):333-339.
- (19) Chinnaiyan AM, Prasad U, Shankar S et al. Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(4):1754-1759.
- (20) Herbst RS, Eckhardt SG, Kurzrock R et al. Phase I dose-escalation study of recombinant human Apo2L/TRAIL, a dual proapoptotic receptor agonist, in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28(17):2839-2846.
- (21) Younes A, Vose JM, Zelenetz AD et al. A Phase 1b/2 trial of mapatumumab in patients with relapsed/refractory non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Cancer* 2010; 103(12):1783-1787.
- (22) Tolcher AW, Mita M, Meropol NJ et al. Phase I pharmacokinetic and biologic correlative study of mapatumumab, a fully human monoclonal antibody with agonist activity to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor-1. *J Clin Oncol* 2007; 25(11):1390-1395.
- (23) Hotte SJ, Hirte HW, Chen EX et al. A phase 1 study of mapatumumab (fully human monoclonal antibody to TRAIL-R1) in patients with advanced solid malignancies. *Clin Cancer Res* 2008; 14(11):3450-3455.
- (24) Greco FA, Bonomi P, Crawford J et al. Phase 2 study of mapatumumab, a fully human agonistic monoclonal antibody which targets and activates the TRAIL receptor-1, in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2008; 61(1):82-90.
- (25) Plummer R, Attard G, Pacey S et al. Phase 1 and pharmacokinetic study of lexatumumab in patients with advanced cancers. *Clin Cancer Res* 2007; 13(20):6187-6194.
- (26) Wakelee HA, Patnaik A, Sikic BI et al. Phase I and pharmacokinetic study of lexatumumab (HGS-ETR2) given every 2 weeks in patients with advanced solid tumors. *Ann Oncol* 2010; 21(2):376-381.

- (27) Newsom-Davis T, Prieske S, Walczak H. Is TRAIL the holy grail of cancer therapy? *Apoptosis* 2009; 14(4):607-623.
- (28) Iqbal J, Joshi S, Patel KN et al. Clinical implication of genome-wide profiling in diffuse large B-cell lymphoma and other subtypes of B-cell lymphoma. *Indian J Cancer* 2007; 44(2):72-86.
- (29) Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988; 335(6189):440-442.
- (30) Amundson SA, Myers TG, Scudiero D, Kitada S, Reed JC, Fornace AJ, Jr. An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines. *Cancer Res* 2000; 60(21):6101-6110.
- (31) Ravichandran KS. Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. *Immunity* 2011; 35(4):445-455.
- (32) Nathan C, Ding A. Nonresolving inflammation. *Cell* 2010; 140(6):871-882.
- (33) Reed JC. Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. *Curr Opin Oncol* 1995; 7(6):541-546.
- (34) Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2005; 37(11):719-727.
- (35) Mannella CA. The 'ins' and 'outs' of mitochondrial membrane channels. *Trends Biochem Sci* 1992; 17(8):315-320.
- (36) Salvesen GS, Renatus M. Apoptosome: the seven-spoked death machine. *Dev Cell* 2002; 2(3):256-257.
- (37) Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281(5381):1309-1312.
- (38) Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:331-367.
- (39) Henson ES, Johnston JB, Gibson SB. The role of TRAIL death receptors in the treatment of hematological malignancies. *Leuk Lymphoma* 2008; 49(1):27-35.
- (40) Vitovski S, Phillips JS, Sayers J, Croucher PI. Investigating the interaction between osteoprotegerin and receptor activator of NF-kappaB or tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: evidence for a pivotal role for osteoprotegerin in regulating two distinct pathways. *J Biol Chem* 2007; 282(43):31601-31609.

- (41) Di Pietro R, Zauli G. Emerging non-apoptotic functions of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/Apo2L. *J Cell Physiol* 2004; 201(3):331-340.
- (42) Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(3):231-241.
- (43) Orlando KA, Stone NL, Pittman RN. Rho kinase regulates fragmentation and phagocytosis of apoptotic cells. *Exp Cell Res* 2006; 312(1):5-15.
- (44) Leist M, Jaattela M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2(8):589-598.
- (45) Baritaki S, Huerta-Yeppez S, Sakai T, Spandidos DA, Bonavida B. Chemotherapeutic drugs sensitize cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis: up-regulation of DR5 and inhibition of Yin Yang 1. *Mol Cancer Ther* 2007; 6(4):1387-1399.
- (46) Baritaki S, Katsman A, Chatterjee D, Yeung KC, Spandidos DA, Bonavida B. Regulation of tumor cell sensitivity to TRAIL-induced apoptosis by the metastatic suppressor Raf kinase inhibitor protein via Yin Yang 1 inhibition and death receptor 5 up-regulation. *J Immunol* 2007; 179(8):5441-5453.
- (47) Baritaki S, Suzuki E, Umezawa K et al. Inhibition of Yin Yang 1-dependent repressor activity of DR5 transcription and expression by the novel proteasome inhibitor NPI-0052 contributes to its TRAIL-enhanced apoptosis in cancer cells. *J Immunol* 2008; 180(9):6199-6210.
- (48) Hetschko H, Voss V, Horn S, Seifert V, Prehn JH, Kogel D. Pharmacological inhibition of Bcl-2 family members reactivates TRAIL-induced apoptosis in malignant glioma. *J Neurooncol* 2008; 86(3):265-272.
- (49) Horak P, Pils D, Haller G et al. Contribution of epigenetic silencing of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand receptor 1 (DR4) to TRAIL resistance and ovarian cancer. *Mol Cancer Res* 2005; 3(6):335-343.
- (50) Horak P, Pils D, Kaider A et al. Perturbation of the tumor necrosis factor--related apoptosis-inducing ligand cascade in ovarian cancer: overexpression of FLIPL and deregulation of the functional receptors DR4 and DR5. *Clin Cancer Res* 2005; 11(24 Pt 1):8585-8591.
- (51) Wilson TR, McLaughlin KM, McEwan M et al. c-FLIP: a key regulator of colorectal cancer cell death. *Cancer Res* 2007; 67(12):5754-5762.
- (52) Huang Y, Lu M, Wu H. Antagonizing XIAP-mediated caspase-3 inhibition. Achilles' heel of cancers? *Cancer Cell* 2004; 5(1):1-2.

- (53) Schimmer AD, Dalili S. Targeting the IAP family of caspase inhibitors as an emerging therapeutic strategy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005;215-219.
- (54) Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13(3):239-252.
- (55) LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 1998; 17(25):3247-3259.
- (56) Vogler M, Walczak H, Stadel D et al. Small molecule XIAP inhibitors enhance TRAIL-induced apoptosis and antitumor activity in preclinical models of pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 2009; 69(6):2425-2434.
- (57) Huerta-Yepez S, Vega M, Jazirehi A et al. Nitric oxide sensitizes prostate carcinoma cell lines to TRAIL-mediated apoptosis via inactivation of NF-kappa B and inhibition of Bcl-xl expression. *Oncogene* 2004; 23(29):4993-5003.
- (58) Willis SN, Adams JM. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17(6):617-625.
- (59) Walensky LD. BCL-2 in the crosshairs: tipping the balance of life and death. *Cell Death Differ* 2006; 13(8):1339-1350.
- (60) Galonek HL, Hardwick JM. Upgrading the BCL-2 network. *Nat Cell Biol* 2006; 8(12):1317-1319.
- (61) Kim H, Rafiuddin-Shah M, Tu HC et al. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol* 2006; 8(12):1348-1358.
- (62) Liu W, Bulgaru A, Haigentz M, Stein CA, Perez-Soler R, Mani S. The BCL2-family of protein ligands as cancer drugs: the next generation of therapeutics. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2003; 3(3):217-223.
- (63) Walensky LD, Kung AL, Escher I et al. Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix. *Science* 2004; 305(5689):1466-1470.
- (64) Kitada S, Pedersen IM, Schimmer AD, Reed JC. Dysregulation of apoptosis genes in hematopoietic malignancies. *Oncogene* 2002; 21(21):3459-3474.
- (65) Kitada S, Reed JC. MCL-1 promoter insertions dial-up aggressiveness of chronic leukemia. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(9):642-643.
- (66) Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1993; 82(6):1820-1828.

- (67) Moshynska O, Sankaran K, Pahwa P, Saxena A. Prognostic significance of a short sequence insertion in the MCL-1 promoter in chronic lymphocytic leukemia. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(9):673-682.
- (68) Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 2003; 22(53):8590-8607.
- (69) Fesik SW. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer* 2005; 5(11):876-885.
- (70) Amundson SA, Myers TG, Scudiero D, Kitada S, Reed JC, Fornace AJ, Jr. An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines. *Cancer Res* 2000; 60(21):6101-6110.
- (71) Amundson SA, Myers TG, Scudiero D, Kitada S, Reed JC, Fornace AJ, Jr. An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines. *Cancer Res* 2000; 60(21):6101-6110.
- (72) Chen L, Willis SN, Wei A et al. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* 2005; 17(3):393-403.
- (73) Fesik SW. Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell* 2000; 103(2):273-282.
- (74) Wang JL, Zhang ZJ, Choksi S et al. Cell permeable Bcl-2 binding peptides: a chemical approach to apoptosis induction in tumor cells. *Cancer Res* 2000; 60(6):1498-1502.
- (75) Tuszynski GP, Cossu G. Differential cytotoxic effect of gossypol on human melanoma, colon carcinoma, and other tissue culture cell lines. *Cancer Res* 1984; 44(2):768-771.
- (76) Qiu J, Levin LR, Buck J, Reidenberg MM. Different pathways of cell killing by gossypol enantiomers. *Exp Biol Med (Maywood)* 2002; 227(6):398-401.
- (77) Becattini B, Kitada S, Leone M et al. Rational design and real time, in-cell detection of the proapoptotic activity of a novel compound targeting Bcl-X(L). *Chem Biol* 2004; 11(3):389-395.
- (78) Leone M, Zhai D, Sareth S, Kitada S, Reed JC, Pellecchia M. Cancer prevention by tea polyphenols is linked to their direct inhibition of antiapoptotic Bcl-2-family proteins. *Cancer Res* 2003; 63(23):8118-8121.
- (79) Lee SJ, Lee KW, Hur HJ, Chun JY, Kim SY, Lee HJ. Phenolic phytochemicals derived from red pine (*Pinus densiflora*) inhibit the invasion and migration of SK-Hep-1 human hepatocellular carcinoma cells. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1095:536-544.

- (80) Zhu BH, Zhan WH, Li ZR et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits growth of gastric cancer by reducing VEGF production and angiogenesis. *World J Gastroenterol* 2007; 13(8):1162-1169.
- (81) Rieger-Christ KM, Hanley R, Lodowsky C et al. The green tea compound, (-)-epigallocatechin-3-gallate downregulates N-cadherin and suppresses migration of bladder carcinoma cells. *J Cell Biochem* 2007.
- (82) Adhami VM, Malik A, Zaman N et al. Combined inhibitory effects of green tea polyphenols and selective cyclooxygenase-2 inhibitors on the growth of human prostate cancer cells both in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 2007; 13(5):1611-1619.
- (83) Kuzuhara T, Tanabe A, Sei Y, Yamaguchi K, Suganuma M, Fujiki H. Synergistic effects of multiple treatments, and both DNA and RNA direct bindings on, green tea catechins. *Mol Carcinog* 2007.
- (84) Kalfon L, Youdim MB, Mandel SA. Green tea polyphenol (-) - epigallocatechin-3-gallate promotes the rapid protein kinase C- and proteasome-mediated degradation of Bad: implications for neuroprotection. *J Neurochem* 2007; 100(4):992-1002.
- (85) Das A, Banik NL, Ray SK. Mechanism of apoptosis with the involvement of calpain and caspase cascades in human malignant neuroblastoma SH-SY5Y cells exposed to flavonoids. *Int J Cancer* 2006; 119(11):2575-2585.
- (86) Hsuuw YD, Chan WH. Epigallocatechin gallate dose-dependently induces apoptosis or necrosis in human MCF-7 cells. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1095:428-440.
- (87) Qin J, Xie LP, Zheng XY et al. A component of green tea, (-)-epigallocatechin-3-gallate, promotes apoptosis in T24 human bladder cancer cells via modulation of the PI3K/Akt pathway and Bcl-2 family proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 354(4):852-857.
- (88) Landis-Piowar KR, Huo C, Chen D et al. A novel prodrug of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate as a potential anticancer agent. *Cancer Res* 2007; 67(9):4303-4310.
- (89) Landis-Piowar KR, Wan SB, Wiegand RA, Kuhn DJ, Chan TH, Dou QP. Methylation suppresses the proteasome-inhibitory function of green tea polyphenols. *J Cell Physiol* 2007.
- (90) Wang JL, Liu D, Zhang ZJ et al. Structure-based discovery of an organic compound that binds Bcl-2 protein and induces apoptosis of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(13):7124-7129.
- (91) Yamaguchi H, Paranawithana SR, Lee MW, Huang Z, Bhalla KN, Wang HG. Epothilone B analogue (BMS-247550)-mediated cytotoxicity through

- induction of Bax conformational change in human breast cancer cells. *Cancer Res* 2002; 62(2):466-471.
- (92) Milella M, Estrov Z, Kornblau SM et al. Synergistic induction of apoptosis by simultaneous disruption of the Bcl-2 and MEK/MAPK pathways in acute myelogenous leukemia. *Blood* 2002; 99(9):3461-3464.
- (93) Campas C, Cosiáls AM, Barragan M et al. Bcl-2 inhibitors induce apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Exp Hematol* 2006; 34(12):1663-1669.
- (94) Sinicrope FA, Penington RC, Tang XM. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis is inhibited by Bcl-2 but restored by the small molecule Bcl-2 inhibitor, HA 14-1, in human colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2004; 10(24):8284-8292.
- (95) Skommer J, Wlodkowic D, Matto M, Eray M, Pelkonen J. HA14-1, a small molecule Bcl-2 antagonist, induces apoptosis and modulates action of selected anticancer drugs in follicular lymphoma B cells. *Leuk Res* 2006; 30(3):322-331.
- (96) An J, Chen Y, Huang Z. Critical upstream signals of cytochrome C release induced by a novel Bcl-2 inhibitor. *J Biol Chem* 2004; 279(18):19133-19140.
- (97) Chen J, Freeman A, Liu J, Dai Q, Lee RM. The apoptotic effect of HA14-1, a Bcl-2-interacting small molecular compound, requires Bax translocation and is enhanced by PK11195. *Mol Cancer Ther* 2002; 1(12):961-967.
- (98) Pei XY, Dai Y, Grant S. The proteasome inhibitor bortezomib promotes mitochondrial injury and apoptosis induced by the small molecule Bcl-2 inhibitor HA14-1 in multiple myeloma cells. *Leukemia* 2003; 17(10):2036-2045.
- (99) Milella M, Trisciuglio D, Bruno T et al. Trastuzumab down-regulates Bcl-2 expression and potentiates apoptosis induction by Bcl-2/Bcl-XL bispecific antisense oligonucleotides in HER-2 gene--amplified breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 2004; 10(22):7747-7756.
- (100) Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 2005; 435(7042):677-681.
- (101) Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 2005; 435(7042):677-681.
- (102) Kline MP, Rajkumar SV, Timm MM et al. ABT-737, an inhibitor of Bcl-2 family proteins, is a potent inducer of apoptosis in multiple myeloma cells. *Leukemia* 2007.

- (103) Trudel S, Stewart AK, Li Z et al. The Bcl-2 family protein inhibitor, ABT-737, has substantial antimyeloma activity and shows synergistic effect with dexamethasone and melphalan. *Clin Cancer Res* 2007; 13(2 Pt 1):621-629.
- (104) Chauhan D, Velankar M, Brahmandam M et al. A novel Bcl-2/Bcl-X(L)/Bcl-w inhibitor ABT-737 as therapy in multiple myeloma. *Oncogene* 2007; 26(16):2374-2380.
- (105) Del GM, V, Brown JR, Certo M, Love TM, Novina CD, Letai A. Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737. *J Clin Invest* 2007; 117(1):112-121.
- (106) Zhang H, Nimmer PM, Tahir SK et al. Bcl-2 family proteins are essential for platelet survival. *Cell Death Differ* 2007; 14(5):943-951.
- (107) Dai Y, Grant S. Targeting multiple arms of the apoptotic regulatory machinery. *Cancer Res* 2007; 67(7):2908-2911.
- (108) Lin X, Morgan-Lappe S, Huang X et al. 'Seed' analysis of off-target siRNAs reveals an essential role of Mcl-1 in resistance to the small-molecule Bcl-2/Bcl-X(L) inhibitor ABT-737. *Oncogene* 2006.
- (109) Pellecchia M, Reed JC. Inhibition of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins by natural polyphenols: new avenues for cancer chemoprevention and chemotherapy. *Curr Pharm Des* 2004; 10(12):1387-1398.
- (110) Li J, Viallet J, Haura EB. A small molecule pan-Bcl-2 family inhibitor, GX15-070, induces apoptosis and enhances cisplatin-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007.
- (111) Perez-Galan P, Roue G, Villamor N, Campo E, Colomer D. The BH3-mimetic GX15-070 synergizes with bortezomib in mantle cell lymphoma by enhancing Noxa-mediated activation of Bak. *Blood* 2007; 109(10):4441-4449.
- (112) Trudel S, Li ZH, Rauw J, Tiedemann RE, Wen XY, Stewart AK. Pre-clinical studies of the pan-Bcl inhibitor obatoclax (GX015-070) in multiple myeloma. *Blood* 2007.
- (113) Witters LM, Witkoski A, Planas-Silva MD, Berger M, Viallet J, Lipton A. Synergistic inhibition of breast cancer cell lines with a dual inhibitor of EGFR-HER-2/neu and a Bcl-2 inhibitor. *Oncol Rep* 2007; 17(2):465-469.
- (114) Goldsmith KC, Liu X, Dam V et al. BH3 peptidomimetics potently activate apoptosis and demonstrate single agent efficacy in neuroblastoma. *Oncogene* 2006; 25(33):4525-4533.

- (115) Shoemaker AR, Oleksijew A, Bauch J et al. A Small-Molecule Inhibitor of Bcl-XL Potentiates the Activity of Cytotoxic Drugs In vitro and In vivo. *Cancer Res* 2006; 66(17):8731-8739.
- (116) Vogler M, Dinsdale D, Dyer MJ, Cohen GM. Bcl-2 inhibitors: small molecules with a big impact on cancer therapy. *Cell Death Differ* 2009; 16(3):360-367.
- (117) Umezawa K, Chaicharoenpong C. Molecular design and biological activities of NF-kappaB inhibitors. *Mol Cells* 2002; 14(2):163-167.
- (118) Huerta-Yepe S, Vega M, Garban H, Bonavida B. Involvement of the TNF-alpha autocrine-paracrine loop, via NF-kappaB and YY1, in the regulation of tumor cell resistance to Fas-induced apoptosis. *Clin Immunol* 2006; 120(3):297-309.
- (119) Mitchell C, Yacoub A, Hossein H et al. Inhibition of MCL-1 in breast cancer cells promotes cell death in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther* 2010; 10(9):903-917.
- (120) Martin AP, Mitchell C, Rahmani M, Nephew KP, Grant S, Dent P. Inhibition of MCL-1 enhances lapatinib toxicity and overcomes lapatinib resistance via BAK-dependent autophagy. *Cancer Biol Ther* 2009; 8(21):2084-2096.
- (121) Nguyen M, Marcellus RC, Roulston A et al. Small molecule obatoclax (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(49):19512-19517.
- (122) Tamatani M, Mitsuda N, Matsuzaki H et al. A pathway of neuronal apoptosis induced by hypoxia/reoxygenation: roles of nuclear factor-kappaB and Bcl-2. *J Neurochem* 2000; 75(2):683-693.
- (123) Kirito K, Watanabe T, Sawada K, Endo H, Ozawa K, Komatsu N. Thrombopoietin regulates Bcl-xL gene expression through Stat5 and phosphatidylinositol 3-kinase activation pathways. *J Biol Chem* 2002; 277(10):8329-8337.
- (124) Vega MI, Baritaki S, Huerta-Yepe S, Martinez-Paniagua MA, Bonavida B. A potential mechanism of rituximab-induced inhibition of tumor growth through its sensitization to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-expressing host cytotoxic cells. *Leuk Lymphoma* 2011; 52(1):108-121.
- (125) Vega MI, Jazirehi AR, Huerta-Yepe S, Bonavida B. Rituximab-induced inhibition of YY1 and Bcl-xL expression in Ramos non-Hodgkin's lymphoma cell line via inhibition of NF-kappa B activity: role of YY1 and Bcl-xL in Fas resistance and chemoresistance, respectively. *J Immunol* 2005; 175(4):2174-2183.

- (126) Huang S, Okumura K, Sinicrope FA. BH3 mimetic obatoclax enhances TRAIL-mediated apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 2009; 15(1):150-159.
- (127) Smoot RL, Blechacz BR, Werneburg NW et al. A Bax-mediated mechanism for obatoclax-induced apoptosis of cholangiocarcinoma cells. *Cancer Res* 2010; 70(5):1960-1969.
- (128) Takata H, Tomizawa K, Matsushita M, Matsui H. 2-methoxyestradiol enhances p53 protein transduction therapy-associated inhibition of the proliferation of oral cancer cells through the suppression of NF-kappaB activity. *Acta Med Okayama* 2004; 58(4):181-187.
- (129) Deng X, Gao F, Flagg T, Anderson J, May WS. Bcl2's flexible loop domain regulates p53 binding and survival. *Mol Cell Biol* 2006; 26(12):4421-4434.
- (130) Grimm S, Bauer MK, Baeuerle PA, Schulze-Osthoff K. Bcl-2 down-regulates the activity of transcription factor NF-kappaB induced upon apoptosis. *J Cell Biol* 1996; 134(1):13-23.
- (131) Hour TC, Chen L, Lin JK. Suppression of transcription factor NF-kappaB activity by Bcl-2 protein in NIH3T3 cells: implication of a novel NF-kappaB p50-Bcl-2 complex for the anti-apoptotic function of Bcl-2. *Eur J Cell Biol* 2000; 79(2):121-129.
- (132) Kim H, Rafiuddin-Shah M, Tu HC et al. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol* 2006; 8(12):1348-1358.
- (133) Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE et al. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* 2005; 17(4):525-535.
- (134) Jiang P, Du W, Heese K, Wu M. The Bad guy cooperates with good cop p53: Bad is transcriptionally up-regulated by p53 and forms a Bad/p53 complex at the mitochondria to induce apoptosis. *Mol Cell Biol* 2006; 26(23):9071-9082.
- (135) Sax JK, Fei P, Murphy ME, Bernhard E, Korsmeyer SJ, El-Deiry WS. BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat Cell Biol* 2002; 4(11):842-849.
- (136) Hwang JJ, Kuruvilla J, Mendelson D et al. Phase I dose finding studies of obatoclax (GX15-070), a small molecule pan-BCL-2 family antagonist, in patients with advanced solid tumors or lymphoma. *Clin Cancer Res* 2010; 16(15):4038-4045.
- (137) Parikh SA, Kantarjian H, Schimmer A et al. Phase II study of obatoclax mesylate (GX15-070), a small-molecule BCL-2 family antagonist, for

patients with myelofibrosis. Clin Lymphoma Myeloma Leuk 2010;
10(4):285-289.

15. ANEXOS

