



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



Facultad de Medicina
Departamento de Radiología y Medicina Física,
Oftalmología y Otorrinolaringología

TESIS DOCTORAL

**Relación entre envejecimiento celular y
resistencia adquirida a Cisplatino y Bleomicina
en *Saccharomyces cerevisiae***

Autor

Antonio Manuel Burgos Molina

Director

Miguel José Ruiz Gómez

Málaga, 2017





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Antonio Manuel Burgos Molina

 <http://orcid.org/0000-0001-5663-5134>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



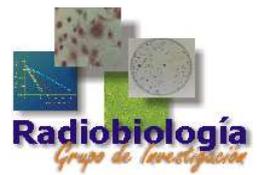
**Relación entre envejecimiento celular y
resistencia adquirida a Cisplatino y Bleomicina
en *Saccharomyces cerevisiae***

Memoria para optar al Grado de Doctor por la Universidad de
Málaga presentada por:

Antonio Manuel Burgos Molina



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



RADIOBIOLOGY LABORATORY UMA

El autor y el director de esta Tesis Doctoral pertenecen al grupo de investigación “Radiobiología” del Plan Andaluz de Investigación, Desarrollo e Innovación (PAIDI) de la Junta de Andalucía (Código CTS-181).

URL: www.radiobiologia.uma.es



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Facultad de Medicina
Dpto. Radiología y Medicina Física,
Oftalmología y Otorrinolaringología

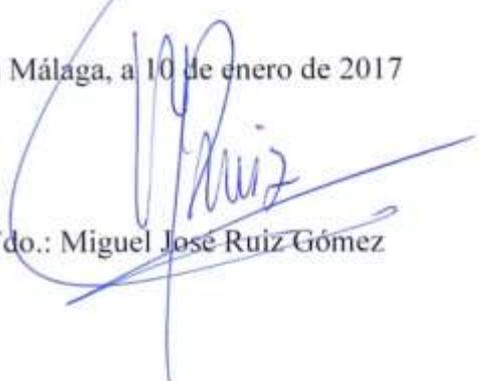
Miguel José Ruiz Gómez, Profesor Contratado Doctor de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Málaga,

INFORMA

Que el trabajo que presenta D. Antonio Manuel Burgos Molina al superior juicio de la Comisión que designe la Universidad de Málaga, sobre el tema titulado "*Relación entre envejecimiento celular y resistencia adquirida a Cisplatino y Bleomicina en Saccharomyces cerevisiae*", realizado bajo mi dirección, presenta los contenidos y el rigor científico suficiente para ser defendido como trabajo de Tesis Doctoral y optar al grado de Doctor.

Por lo que, según lo dispuesto en la legislación vigente, **AUTORIZA** su presentación para ser admitida a trámite de lectura.

En Málaga, a 10 de enero de 2017


Fdo.: Miguel José Ruiz Gómez

**UNIVERSIDAD DE MALAGA
REGISTRO GENERAL**

Entrada

Nº. 201700200000506

12/01/2017 13:03:43





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

A mis padres, Antonio y María del Mar

A mis abuelos, Manuel y Remedios

A mi prometida, María Remedios



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

“La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de vida de todo progreso”

Louis Pasteur

“Lo más incomprensible acerca de este mundo es que es comprensible”

Albert Einstein

“La ciencia es la progresiva aproximación del hombre al mundo real”

Max Planck

“La ciencia tiene una característica maravillosa, y es que aprende de sus errores”

Ruy Perez Tamayo

“La ciencia se compone de errores, que, a su vez, son los pasos hacia la verdad”

Julio Verne

“La ciencia es todo aquello sobre lo cual siempre cabe discusión”

José Ortega y Gasset

“La mayoría de las ideas fundamentales de la ciencia son esencialmente sencillas, y por regla general pueden ser expresadas en un lenguaje comprensible para todos”

Albert Einstein

“La ciencia de hoy en día es la tecnología del mañana”

Edward Teller



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Agradecimientos

Como dice el refrán: “es de bien nacidos ser agradecidos”. Por tanto, al finalizar esta etapa de mi vida, en la cual tanto directa como indirectamente han participado muchísimas personas; quiero expresar mi más profundo y sentido agradecimiento a quienes con su comprensión, ayuda y apoyo hicieron posible esta maravillosa realidad, que no es otra que ver finalizada mi Tesis Doctoral y optar al título de Doctor.

A mis padres, Antonio y María del Mar, por darme la vida, gracias por mostrarme el camino correcto y guiarme por él, porque con vuestra comprensión, paciencia, cariño y todo vuestro amor desinteresado sois mi gran fortaleza, por servirme de apoyo y hacer el papel de mejores amigos, por darme todo sin pedir nada, por vuestra dedicación, por renunciar a todo a cambio de cuidarme, porque siempre buscáis lo mejor para mí y darme lo que necesito, por disfrutar cada momento que pasamos en la vida, por formarme como una persona con carácter sólido, por ser un buen ejemplo, por compartir experiencias y vivencias únicas, porque sin vosotros todo lo que tengo no hubiera sido posible.

A mis abuelos, Manuel y Remedios, puedo tener la alegría y la suerte de haber sido amado, cuidado y mimado por dos padres: los que me dieron la vida y vosotros. Habéis ejercido paralelamente a ellos en convertirme en lo que soy. Sois un ejemplo a seguir y un pilar fundamental en mi vida. Espero que estéis muchos años junto a mí, siempre os llevaré en el corazón y estaréis presentes en mi vida.

A Reme, mi prometida y que en unos meses será mi mujer, por entenderme y ser en todo momento un apoyo incondicional en mi vida. Te agradezco toda la ayuda dada, no sólo en el desarrollo de esta Tesis, sino también en mi vida; eres mi inspiración y mi motivación. La ayuda que me has brindado ha sido sumamente importante, has estado a mi lado en los buenos y malos momentos, siempre ayudándome y apoyándome. No ha sido sencillo culminar este proyecto, sin embargo siempre fuiste esperanzadora y motivadora, animándome a conseguirlo. Me ayudaste hasta donde te era posible, incluso más que eso. Gracias también por estar conmigo en aquellos momentos en los que el estudio y el trabajo ocuparon mi tiempo.

Al Prof. Dr. Miguel José Ruiz Gómez, por aceptarme para realizar esta Tesis Doctoral bajo su dirección y abrirme las puertas a la investigación. Nunca podré agradecerle su apoyo, generosidad y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas, no solamente en el desarrollo de esta Tesis, sino también en mi formación como investigador y como persona.

A D^a Luisa Gil Carmona, Técnico del Laboratorio, por su ayuda y apoyo en el trabajo de Laboratorio.

Al Prof. Dr. Francisco Sendra Portero, por la ayuda y la orientación aportada en los inicios de este camino. Así como por interesarse en mi Tesis y mostrarme su apoyo.

Al Dr. Casimiro Cárdenas de los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Málaga, por la realización de la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas.

Agradezco también a aquellos que me pusieron zancadillas, porque aprendí a esquivar obstáculos. Y a los que intentaron hundirme, porque sin ellos no hubiese descubierto mi verdadera fuerza.

Todos me han ayudado a realizar este trabajo, muchas gracias.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

**Relación entre envejecimiento celular y
resistencia adquirida a Cisplatino y Bleomicina
en *Saccharomyces cerevisiae***



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE

Resumen	29
1. Introducción	33
1.1. Incidencia de cáncer en la sociedad actual	35
1.1.1. Cáncer de mama	37
1.1.2. Cáncer colorrectal	38
1.1.3. Cáncer de pulmón	39
1.1.4. Cáncer de próstata	40
1.1.5. Cáncer de estómago	41
1.1.6. Cáncer de hígado	42
1.1.7. Cáncer de cuello uterino	43
1.2. Tratamiento del cáncer	44
1.2.1. Cirugía	44
1.2.2. Radioterapia	45
1.2.3. Quimioterapia	46
1.2.4. Inmunoterapia	46
1.2.5. Medicina de precisión y terapia dirigida	46
1.2.6. Terapia hormonal	47
1.2.7. Trasplante de células madre	47
1.3. Quimioterapia del cáncer	47
1.3.1. Tipos de quimioterapia	49
1.3.2. Principales fármacos en quimioterapia antineoplásica	49
1.3.2.1. Agentes alquilantes	49
1.3.2.2. Derivados de platino	50
1.3.2.3. Antimetabolitos	50
1.3.2.4. Agentes que interaccionan con las Topoisomerasas	50
1.3.2.5. Agentes que interaccionan con los microtúbulos	51
1.3.2.6. Miscelánea	51
1.3.3. Cisplatino	52
1.3.3.1. Mecanismo de acción	53
a) Vía extrínseca	54
b) Vía intrínseca	55
c) Modulación de la señalización de calcio por Cisplatino	56
d) Cisplatino y proteína quinasa C	56
e) Cisplatino y proteínas quinasas activadas por mitógenos	56
f) Cisplatino y p38-MAPK	57
1.3.4. Bleomicina	58
1.3.4.1. Estructura química de la Bleomicina	59
a) Dominio de unión a metales	59
b) Dominio de unión al ADN	59
c) Carbohidratos	59
1.3.4.2. Mecanismo de acción	60
a) Daños al ADN	60
b) Daños al ARN	60

c) Generación de ROS.....	60
1.4. Resistencia al tratamiento quimioterápico del cáncer.....	61
1.4.1. Mecanismos generales de resistencia tumoral	61
1.4.1.1. Transportadores de salida o bombas extrusoras de fármacos	61
1.4.1.2. Resistencia intrínseca y adquirida	62
1.4.1.3. Detoxificación celular.....	62
1.4.1.4. Captación de fármacos en orgánulos ácidos	63
1.4.1.5. Resistencia al transporte de macromoléculas y transportadores de fármacos	63
1.4.2. Mecanismos específicos de resistencia tumoral.....	63
1.4.2.1. Mecanismo de resistencia a cisplatino.....	64
1.4.2.2. Mecanismo de resistencia a Bleomicina.....	66
a) Alteración de la entrada y salida celular de bleomicina.....	66
b) Mayor capacidad de reparación del daño al ADN inducido por bleomicina.....	68
c) Incremento del metabolismo de inactivación de bleomicina	68
1.5. Envejecimiento	69
1.5.1. Tipos de envejecimiento	69
1.5.1.1. Del individuo	69
a) Cronológico.....	69
b) Biológico.....	69
c) Psicológico	69
d) Social.....	69
e) Fenomenológico.....	70
f) Envejecimiento exitoso	70
1.5.1.2. Celular.....	70
a) Cronológico.....	70
b) Replicativo	70
1.5.2. Factores que afectan al envejecimiento.....	71
1.5.2.1. Componentes genéticos del envejecimiento	71
a) Inestabilidad genómica	71
b) ADN mitocondrial y envejecimiento	72
1.5.2.2. Componentes ambientales del envejecimiento	72
1.5.3. Teorías del envejecimiento	72
1.5.4. Genética del envejecimiento celular	74
1.5.4.1. Genes implicados en el envejecimiento.....	74
a) Genes que influyen en la longitud de los telómeros	74
b) Gen XPD	75
c) Gen p53	75
d) Sir2 y cromatina	75
e) Gen Daf-16 y genes FOXO.....	76
f) Genes Myc	76
1.5.5. Relación entre genes de envejecimiento y genes de resistencia a fármacos antineoplásicos	77
1.6. Marcadores moleculares	78
1.6.1. Marcadores moleculares de envejecimiento celular.....	78
1.6.1.1. Marcadores bioquímicos.....	79

a) Marcadores de estrés oxidativo.....	79
b) Glicación de proteínas.....	80
c) Marcadores hormonales.....	80
1.6.1.2.Marcadores inmunológicos/inflamación.....	81
a) Inmunidad innata celular: fagocitos y actividad NK.....	81
b) Inmunidad adquirida: linfocitos.....	81
c) Citocinas.....	81
1.6.1.3.Marcadores genéticos.....	82
1.6.2. Marcadores moleculares de resistencia a fármacos antineoplásicos...83	
2. Planteamiento y Objetivos.....	87
2.1.Planteamiento.....	89
2.1.1. Planteamiento del problema y justificación.....	89
2.1.2. Justificación del uso de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudio.....	89
2.2.Objetivos.....	90
2.2.1. Objetivos generales.....	90
2.2.2. Objetivos específicos.....	90
3. Material y Métodos.....	93
3.1.Laboratorio de Radiobiología.....	95
3.1.1. Áreas de trabajo.....	95
3.1.2. Equipamiento y material fungible.....	99
3.2.Cepas de levadura.....	100
3.3.Medios de Cultivo.....	100
3.4.Fármacos citostáticos.....	101
3.4.1. Cisplatino.....	101
3.4.2. Bleomicina.....	101
3.5.Ensayos de citotoxicidad.....	102
3.6.Ensayo clonogénico.....	103
3.7.Drop test.....	104
3.8.Cuantificación de la densidad celular.....	105
3.9.Envejecimiento Cronológico.....	105
3.9.1. Fase previa al envejecimiento.....	105
3.9.2. Fase de envejecimiento cronológico.....	106
3.10. Envejecimiento replicativo.....	107



3.11. Control de crecimiento con fármacos antineoplásicos.....	108
3.12. Selección de Resistencia a fármacos.....	108
3.13. Resistencia cruzada	110
3.14. Análisis proteómico	110
a) Descripción del ensayo	110
b) Procedimiento del ensayo	111
c) Instrumentación usada en la realización del ensayo	113
d) Expresión proteica relativa (emPAI)	113
e) Análisis de interacciones y función proteica/génica.....	113
3.15. Análisis estadístico.....	113
4. Resultados	117
4.1. Ensayos de citotoxicidad	119
4.1.1. Ensayo de citotoxicidad con Cisplatino	119
4.1.2. Ensayo de citotoxicidad con Bleomicina	120
4.2. Control de crecimiento con Cisplatino y Bleomicina.....	121
4.2.1. Control de crecimiento con Cisplatino.....	121
4.2.2. Control de crecimiento con Bleomicina.....	122
4.3. Selección de células resistentes a Cisplatino y a Bleomicina.....	123
4.3.1. Selección de células resistentes a Cisplatino	123
4.3.2. Selección de células resistentes a Bleomicina	124
4.4. Citotoxicidad en las cepas resistentes a Cisplatino y a Bleomicina y resistencia cruzada	126
4.4.1. Citotoxicidad a Cisplatino en la cepa WS8105-1C-R300cisPt.....	126
4.4.2. Citotoxicidad a Bleomicina en la cepa WS8105-1C-R 0.158 Bleo ..	128
4.4.3. Resistencia cruzada	130
4.5. Envejecimiento cronológico	134
4.6. Envejecimiento replicativo	139
4.7. Análisis proteómico	141
4.7.1. Análisis proteómico cepa WS8105-1C-R300cisPt vs cepa wt	141
4.7.2. Análisis proteómico cepa WS8105-1C-R 0.158 Bleo vs cepa wt.....	157
4.7.3. Análisis de las proteínas comunes en la cepa Wt, WS8105-1C- R300cisPt y WS8105-1C-R 0.158 Bleo.....	171
5. Discusión.....	181
5.1. Resistencia a Cisplatino y Bleomicina	183

5.2. Selección de cepas resistentes a Cisplatino y a Bleomicina	184
5.3. Envejecimiento y su relación con la resistencia a Cisplatino y a Bleomicina ...	184
5.4. Análisis proteómico cepa WS8105-1C-R300cisPt vs cepa wt	185
5.4.1. Proteínas comunes en la cepa WS8105-1C-R300cisPt y en la Cepa wt.....	186
5.4.2. Proteínas únicamente expresadas en la cepa WS8105-1C- R300cisPt	190
5.5. Análisis proteómico cepa WS8105-1C-R 0.158 Bleo vs cepa wt	190
5.5.1. Proteínas únicamente expresadas en la cepa WS8105-1C-R 0.158 Bleo	192
5.6. Análisis proteómico cepa WS8105-1C-R300cisPt vs WS8105-1C-R 0.158 Bleo vs cepa wt. Relación con el envejecimiento.....	192
5.7. Biomarcadores en la clínica.....	196
6. Conclusiones.....	201
7. Referencias	205
Anexos.....	249
Anexo 1. Producción científica	251



RESUMEN

El cáncer es la principal causa de muerte en muchos países del mundo. En las próximas décadas se convertirá en la principal causa de morbilidad y mortalidad en todas las regiones, indistintamente del nivel de recursos económicos. Pese a los avances en el diagnóstico y la terapia del cáncer, el desarrollo de resistencia frente a fármacos ocasiona recidivas frecuentes ya que las células tumorales evaden la muerte mediante múltiples mecanismos. La resistencia a Cisplatino es el caso más estudiado. Los mecanismos implicados en este proceso incluyen disminución de la entrada del fármaco en la célula y aumento de su extrusión, activación de sistemas de detoxificación, alteración de las dianas del medicamento, incremento de la reparación del ADN, alteración de la apoptosis y alteración de la expresión de oncogenes. Aunque el mecanismo por el que se produce la resistencia a Bleomicina no está del todo claro, es posible que se altere la entrada y salida del fármaco, una mayor capacidad de reparación del daño al ADN y el incremento del metabolismo de inactivación de Bleomicina. La senescencia celular, que tradicionalmente ha sido asociada con el envejecimiento del organismo, ha surgido recientemente como un determinante clave relacionado con la quimioterapia del cáncer. Existen evidencias que sugieren que la deficiencia en la senescencia podría regular los primeros acontecimientos que controlan el desarrollo de resistencia a la quimioterapia. Por tanto, la identificación de genes antisenescencia podría tener una utilidad terapéutica potencial para la predicción y/o prevención de resistencia a fármacos antineoplásicos.

Los objetivos del presente trabajo son por un lado seleccionar dos cepas celulares de *S. cerevisiae* resistentes a Cisplatino y Bleomicina como modelo de estudio de resistencia a fármacos antineoplásicos y de envejecimiento celular; y por otro lado estudiar la relación entre el envejecimiento celular y la resistencia adquirida a estos fármacos.

Se utilizó como modelo de estudio la levadura *S. cerevisiae* tipo salvaje (WS8105-1C) y las cepas resistentes a Cisplatino y Bleomicina seleccionadas por exposición a estos fármacos. La citotoxicidad y el envejecimiento cronológico se evaluaron mediante drop test. El envejecimiento replicativo se evaluó mediante análisis comparativo de parches en placas de cultivo. El análisis proteómico se realizó por espectrometría de masas en tándem mediante un sistema de trampa de iones nano HPLC-ESI-MS/MS.

Los resultados mostraron que la exposición prolongada a Cisplatino y Bleomicina selecciona células resistentes a estos fármacos sin expresión de resistencia cruzada. Se obtuvo un incremento de resistencia relativa de 2,5 veces para la cepa resistente a Cisplatino y de 15,6 para la resistente a Bleomicina, en relación con la cepa salvaje. Se observó un retraso en el envejecimiento cronológico de ambas cepas resistentes, de 3,24 veces para la resistente a Cisplatino y de 8,37 veces para la resistente a Bleomicina. Las cepas resistentes también mostraron un retraso en el envejecimiento replicativo. El análisis proteómico mostró una sobreexpresión proteica en la cepa resistente a Cisplatino, con respecto a la cepa salvaje, de las proteínas QCR2, QCR1, ALDH4, ATPB, ATPA, SCW10, HSP26, ATPG, y PCKA. En la cepa resistente a Bleomicina, con respecto de la cepa salvaje, se sobreexpresaron las proteínas YL179, TPIS, YP225, SODC, HSP77 y HSP60. En ambas cepas resistentes se sobreexpresaron de forma conjunta las proteínas ATPB, ATPG, PCKA, TPIS, HSP77 y HSP60.

Como conclusión se deduce que la exposición a Cisplatino y Bleomicina, prolongada en el tiempo, confiere resistencia a estos fármacos en *S. cerevisiae*; obteniéndose una sobreexpresión de proteínas que podrían estar implicadas en los procesos de resistencia. Paralelamente, la resistencia a los fármacos está relacionada con un retraso en el envejecimiento celular, que conlleva a la sobreexpresión de proteínas comunes; las cuales podrían estar relacionadas con el proceso de envejecimiento. Este hecho sugiere la posibilidad de que existan mecanismos celulares y moleculares comunes entre resistencia y envejecimiento, multifactoriales. Las proteínas sobreexpresadas podrían ser buenos candidatos como biomarcadores de quimioresistencia a estos fármacos y de envejecimiento celular, para lo que serán necesarios estudios futuros.

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1 Incidencia de cáncer en la sociedad actual

El cáncer es la principal causa de muerte en muchos países del mundo, y en las próximas décadas se convertirá en la principal causa de morbilidad y mortalidad en todas las regiones, indistintamente del nivel de recursos económicos (Jemal et al., 2011). Supone la principal causa de muerte en los países desarrollados y la segunda en los países en vía de desarrollo (Mathers, Fat, y Boerma, 2008).

En un estudio realizado en 2012, se observó una incidencia de 14,1 millones de nuevos casos de cáncer en el mundo, con 8,2 millones de muertes causadas por esta enfermedad (Fig. 1) (GLOBOCAN 2012). El cáncer de pulmón y de mama son los más frecuentemente diagnosticados y la principal causa de muerte en hombres y mujeres, respectivamente, en los países menos desarrollados. Sin embargo, en los países más desarrollados, el tipo de cáncer más frecuentemente diagnosticado entre los hombres es el de próstata siendo el cáncer de pulmón la principal causa de muerte entre las mujeres. Otros tipos de cáncer frecuentes en el mundo son el de hígado, estómago y colorrectal, entre los hombres; y estómago, cuello uterino y colorrectal entre las mujeres. En los países más desarrollados también son diagnosticados con frecuencia el cáncer de vejiga en los hombres y el cáncer de útero en las mujeres. En los países menos desarrollados, el cáncer de hígado y de estómago son, respectivamente, el segundo y tercer tipo de cáncer más frecuente, y la principal causa de muerte (Torre et al., 2015).

Los países menos desarrollados representan sólo el 57% de los casos y el 65% de las muertes por cáncer en todo el mundo. Esto es debido principalmente al menor consumo de tabaco, a una población joven que no alcanza la vejez y a tipos de cánceres causados por infecciones. Sin embargo, esta enfermedad continuará aumentando en los países menos desarrollados, debido al crecimiento y envejecimiento de la población y al incremento de la prevalencia de factores de riesgo (Bray y Moller, 2006).

Las tasas de incidencia de cáncer de próstata, colorrectal, pulmón y mama pueden ser varias veces mayor en los países más desarrollados que en los países menos desarrollados (Torre et al., 2015). El cáncer de hígado, estómago y de cérvix son más comunes en países menos desarrollados; éstos son atribuibles a infecciones. Representan, respectivamente, el 77%, 75% y 100% de los casos en todo el mundo (De Martel et al., 2012). En general, las tasas de cáncer son más altas en las regiones más desarrolladas.

Aunque las tasas de incidencia de cáncer son dos veces mayores en los países desarrollados que en los países menos desarrollados, las tasas de mortalidad son sólo del 8% al 15% más altas en los países más desarrollados. Estas diferencias representan las diferencias en los perfiles del cáncer y/o la disponibilidad de tratamiento. Además, en los países menos desarrollados, el cáncer es detectado en etapas más tardías de la enfermedad (Torre et al., 2015).

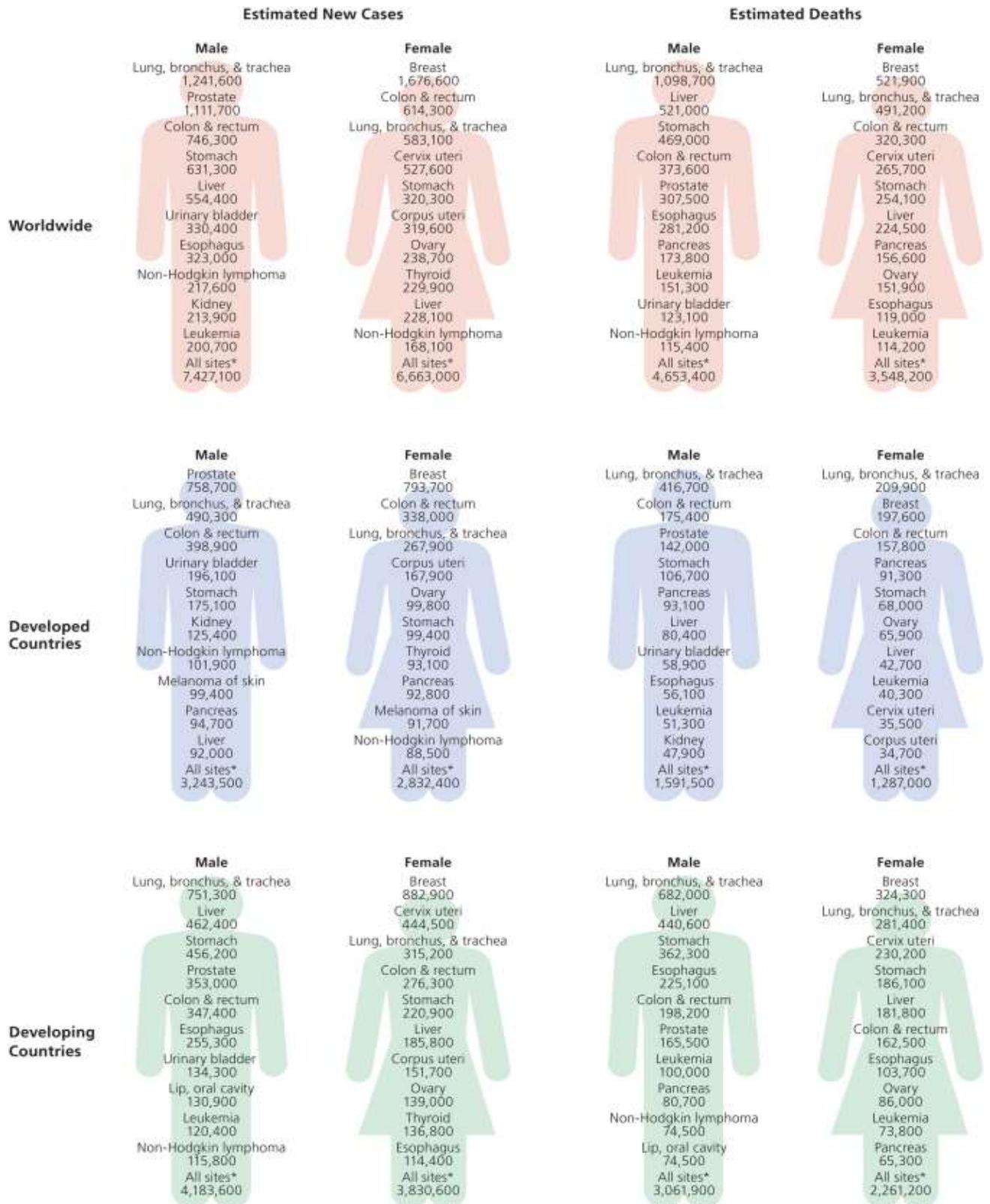


Fig.1 Casos y muertes por cáncer estimados en el mundo en función del sexo y del desarrollo económico.

Los principales factores de riesgo para el cáncer en los países desarrollados son: el tabaquismo, los hábitos en la dieta, inactividad física y los factores reproductivos, todos ellos con diferentes magnitudes y consecuencias entre países y regiones (Martin-Moreno et al., 2008; Soerjomataram et al., 2007). Sin embargo, en la actualidad el impacto del cáncer está aumentado también en los países en vías de desarrollo. Esto es consecuencia de la adquisición de estilos de vida propios de países desarrollados, como los que se han citado anteriormente (Jemal et al., 2011).

En Europa, esta enfermedad supone también una de las causas principales de morbilidad y mortalidad (Mathers et al., 2008). No obstante, las tasas de incidencia y mortalidad de los distintos tipos de cáncer varían ampliamente según la localización geográfica (Ferlay et al., 2013). Así pues, la incidencia es más alta en los países del Oeste de Europa, mientras que la tasa de mortalidad es mayor en los países del Centro y Este (Ferlay et al., 2012). Además, mientras que la mortalidad ha ido decreciendo recientemente en los países del Oeste, esta tendencia no se ha observado en los países del Centro y Este (Bosetti et al., 2013; Karim-Kos et al., 2008; La Vecchia et al., 2015; Znaor et al., 2013). Por otra parte, en los países del Centro y Este de Europa las tasas de incidencia han alcanzado ya los valores de los países nórdicos y los del Oeste de Europa (Ferlay et al., 2013). Una posible explicación para estas diferencias podría ser la diferente prevalencia de los factores de riesgo subyacentes y la susceptibilidad del huésped, las variaciones en la detección del cáncer, la distribución de los distintos tipos de cánceres (tipos de cáncer más mortales en el Centro y Este de Europa), las etapas más avanzadas de la enfermedad, elevada mortalidad por causas no asociadas al cáncer, diferencias en el tratamiento y seguimiento del paciente. Desafortunadamente, la supervivencia frente al cáncer es, en general, menor en los países del Centro y Este que en los países del Oeste (Chino et al., 2014; Colditz et al., 2012; De Angelis et al., 2014; Jemal et al., 2010).

Es motivo de preocupación el aumento de la incidencia de los tipos más comunes de cáncer en Europa, en particular, aquellos que aparecen a edades tempranas como ocurre con el cáncer colorrectal en países de Europa central y oriental, en los que la incidencia es alta y continúa en aumento (Arnold et al., 2015).

1.1.1 Cáncer de mama

El cáncer de mama es el más frecuentemente diagnosticado y la principal causa de muerte en mujeres en el mundo, con un total de 1.7 millones de casos y 521.900 muertes en el año 2012 (Fig. 1). Representa el 25% de todos los casos de cáncer y el 15% de todas las muertes causadas por cáncer entre las mujeres. La tasa de incidencia de este tipo de cáncer es generalmente alta en América del Norte, Australia/Nueva Zelanda, y en Europa Occidental y del Norte; intermedia en el Centro y Este de Europa, América Latina y el Caribe; y baja en la mayor parte de África y Asia (Fig. 2) (Torre et al., 2015).

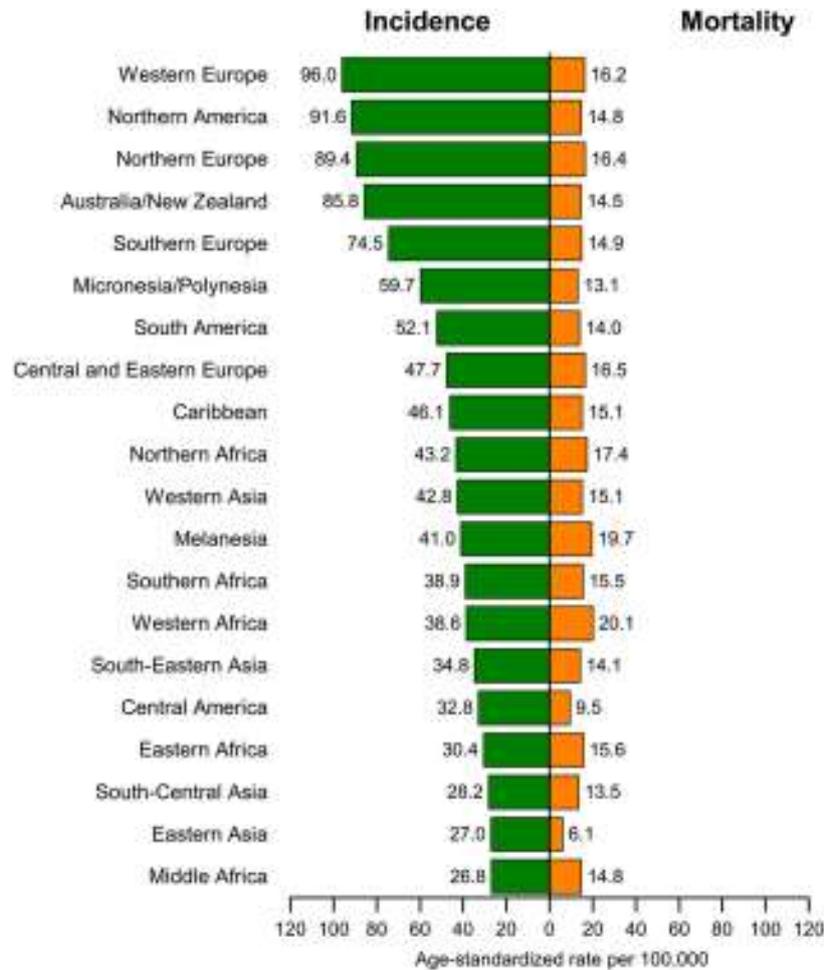


Fig.2 Tasa de incidencia y mortalidad del cáncer de mama en función del área geográfica.

1.1.2 Cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal es el tercer tipo de cáncer más frecuentemente diagnosticado en hombres y el segundo en mujeres, con una estimación de 1.4 millones de casos y 693.900 muertes en el año 2012 (Fig.1). Las tasas de incidencia más altas se encuentran en Australia/Nueva Zelanda, Europa y América del Norte (Fig.3). En cambio, son más bajas en África y en el Centro y Sur de Asia. Las tasas de incidencia son más altas en hombres que en mujeres en la mayor parte del mundo (Torre et al., 2015). La incidencia del cáncer colorrectal está aumentando en ciertos países en los que históricamente ha existido una incidencia y unos factores de riesgos bajos, más notablemente en Asia Occidental (Kuwait e Israel) y en Europa del Este (República Checa y Eslovaquia) (Center et al., 2009).

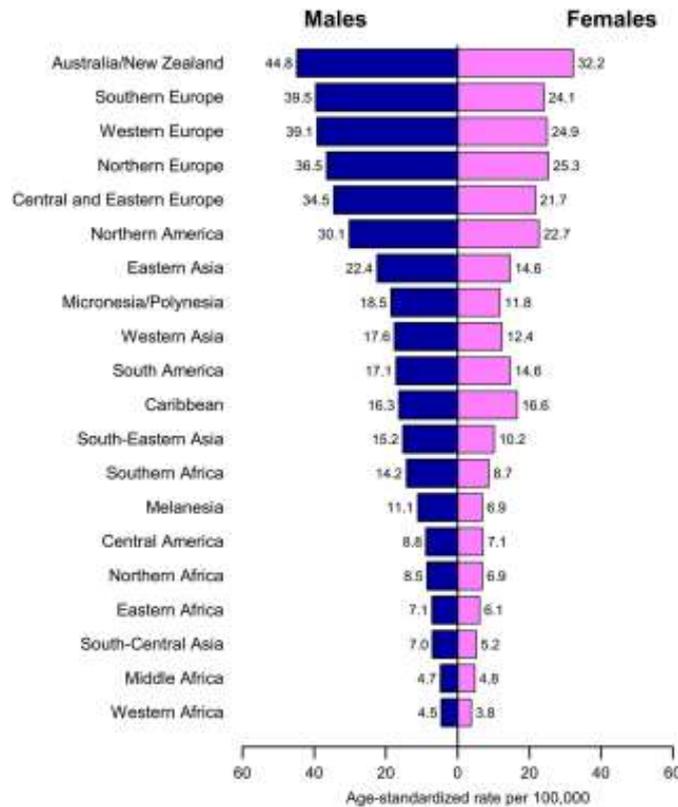


Fig. 3 Tasa de incidencia del cáncer colorrectal por sexo y área geográfica.

1.1.3 Cáncer de pulmón

Se estima que en el año 2012 ocurrieron 1.8 millones de nuevos casos de cáncer de pulmón, lo que representa aproximadamente un 13% del total de los cánceres diagnosticados. Entre los hombres fue el más frecuentemente diagnosticado y la principal causa de muerte (Fig.1). Entre las mujeres fue la principal causa de muerte en los países más desarrollados y la segunda en los países menos desarrollados. En hombres, la tasa más alta de incidencia se produjo en Europa, Este de Asia y América del Norte. Por el contrario, la tasa más baja tuvo lugar en África subsahariana (Fig.4) (Torre et al, 2015). Entre las mujeres, la tasa más alta tuvo lugar en América del Norte, en Europa Occidental y del Norte, Australia/Nueva Zelanda y en el Este de Asia (Fig.4). La tasa de incidencia de cáncer de pulmón en las mujeres chinas fue mayor que en las mujeres de algunos países europeos, a pesar de una menor prevalencia del hábito de fumar. La causa probable podría ser la poca ventilación de habitaciones interiores en las que usan estufas de carbón, provocando por tanto una elevada contaminación del aire. Además, otros factores de riesgo como la exposición a agentes carcinógenos (amianto, arsénico, radón, e hidrocarburos aromáticos y policíclicos) influyen en la mayor incidencia (Fraumeni y Schottenfeld, 2006). Por otro lado hay que sumar la contaminación del aire exterior, la cual también es causante de este tipo de cáncer (Hamra et al., 2014).

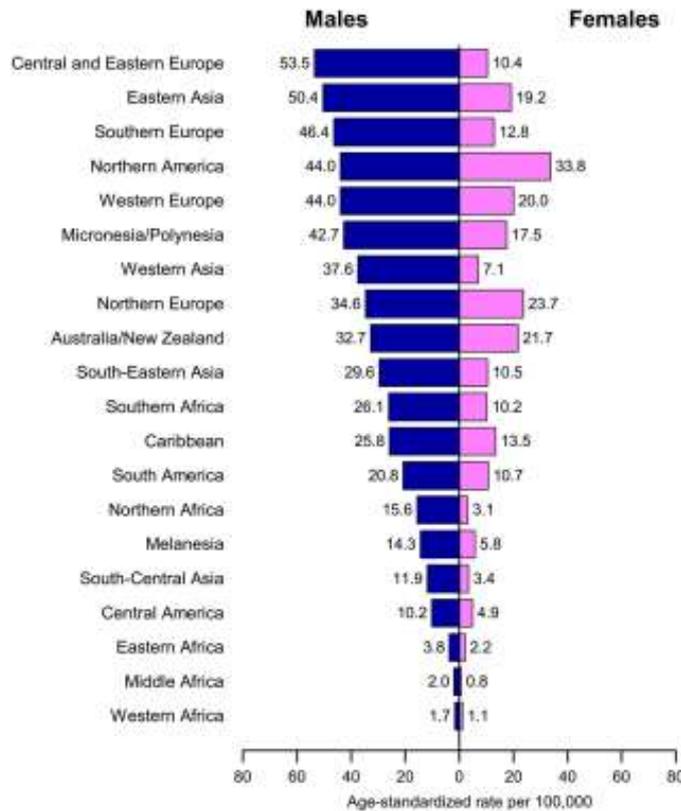


Fig. 4 Tasa de incidencia del cáncer de pulmón por sexo y área geográfica.

1.1.4 Cáncer de próstata

El cáncer de próstata es el segundo más frecuentemente diagnosticado en hombres de todo el mundo, con 1.1 millones de casos ocurridos en el año 2012 (Fig.1) (Torre et al., 2015). Es el más frecuente entre los hombres de los países desarrollados. Las tasas de incidencia son más altas en Australia/Nueva Zelanda, América del Norte, Europa Occidental y del Norte y algunas zonas del Caribe, y más bajas en Asia (Fig.5) (Torre et al., 2015). Las tasas de mortalidad de este tipo de cáncer han ido disminuyendo en la mayoría de los países desarrollados: América del Norte, Oceanía y Europa Occidental y del Norte (Center et al., 2012).

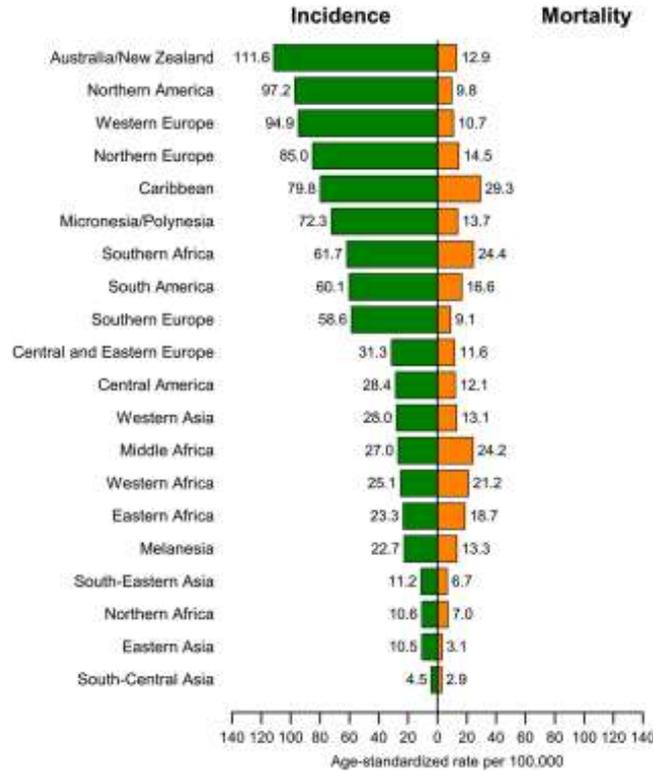


Fig. 5 Tasa de incidencia y mortalidad para el cáncer de próstata según el área geográfica.

1.1.5 Cáncer de estómago

Para el cáncer de estómago se estima que ocurrieron 951.600 nuevos casos y 723.100 muertes en el año 2012 (Fig. 1). Las tasas de incidencia son por lo general el doble de altas en hombres que en mujeres y varían ampliamente entre países. En general, las tasas de incidencia son más altas en Asia Oriental (sobre todo en Mongolia, Corea, Japón y China), en Europa Central y del Este, y en América del Sur. Sin embargo, son más bajas en América del Norte y en la mayor parte de África (Fig. 6) (Torre et al., 2015). Estas variaciones regionales reflejan, de algún modo, las diferencias en los tipos de dietas, la conservación de los alimentos y la disponibilidad existente de productos frescos, así como también, la prevalencia de infección por el patógeno *Helicobacter pylori* (Parkin, 2006). La infección crónica por *H. pylori* es el factor de riesgo más identificado para el cáncer de estómago, con alrededor de un 90% de los nuevos casos de cáncer gástrico no cardial en todo el mundo y que son causados por esta bacteria (Plummer et al., 2015).

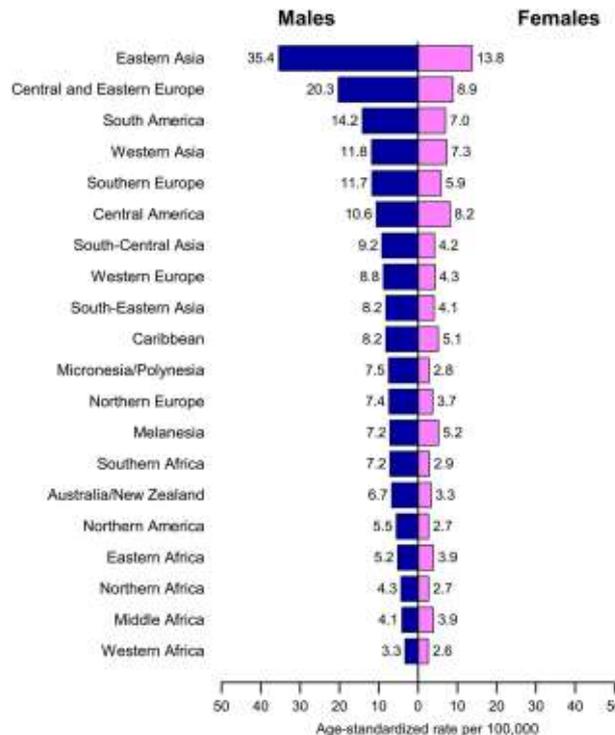


Fig. 6. Tasa de incidencia del cáncer de estómago según el sexo y el área geográfica.

1.1.6 Cáncer de hígado

El cáncer de hígado es mucho más común entre la población masculina que en la femenina. Entre los hombres, supone la segunda causa principal de muerte en todo el mundo y en los países menos desarrollados (Fig. 1). En cambio, en los países más desarrollados es la sexta causa principal de muerte entre los varones. Se estima que en el año 2012 ocurrieron 782.500 casos y 745.000 muertes en todo el mundo. Hay que destacar que China representa el 50% del total de casos y muertes por esta enfermedad. Las tasas de incidencia son más altas en el Este y Sudeste de Asia y en el Norte y Oeste de África. Sin embargo, son más bajas en el Centro-Sur y Centro-Norte de Asia y en el Este de Europa (Fig. 7) (Torre et al., 2015). La mayor parte (70-90%) de los cánceres hepáticos primarios que se producen en el mundo son carcinomas hepatocelulares (London y McGlynn, 1996).

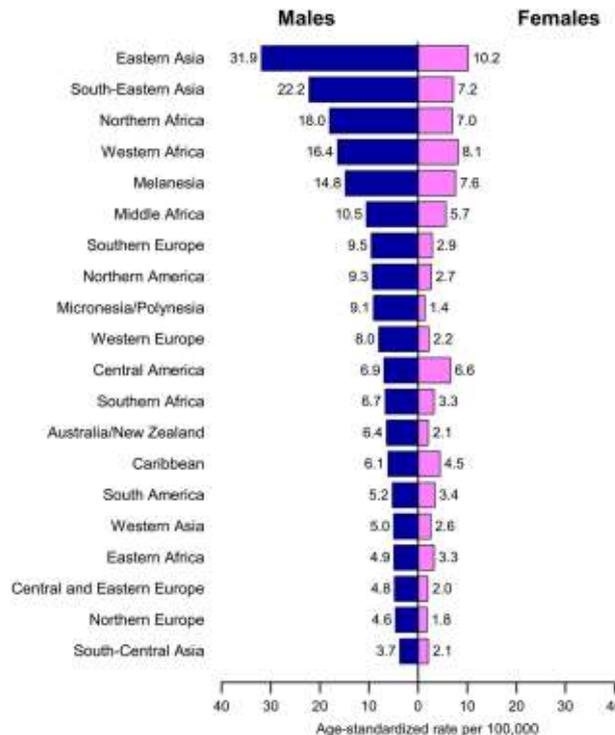


Fig. 7. Tasa de incidencia del cáncer de hígado según el sexo y el área geográfica.

1.1.7 Cáncer de cuello uterino

Se estima que en el año 2012 ocurrieron 527.600 casos de cáncer de cuello uterino y 265.700 muertes en todo el mundo (Fig. 1). Constituye el segundo tipo más frecuentemente diagnosticado y la tercera causa principal de muerte entre las mujeres en los países menos desarrollados. Las tasas de incidencia son más altas en África subsahariana, América Latina y el Caribe, y La Melanesia. Por el contrario, las más bajas se observan en Asia Occidental, Australia/Nueva Zelanda, y América del Norte (Fig. 8) (Torre et al., 2015). Cerca del 90% de las muertes ocurrieron en zonas del mundo en vías de desarrollo: 60.100 en África, 28.600 en América Latina y el Caribe, y 144.400 en Asia. La India, que es el segundo país más poblado del mundo, representó el 25% de las muertes (67.500 muertes). En el Este, Centro y Sur de África, así como en Melanesia, es la principal causa de muerte entre las mujeres. La gran variación de las tasas de incidencia de cáncer de útero entre las distintas regiones geográficas refleja las diferencias en la disponibilidad de prueba médicas, las cuales permiten la detección y eliminación de lesiones precancerosas y la prevalencia de infección por el virus del papiloma humano (VPH) (Bruni et al., 2012; Forman et al., 2012; Vaccarella et al., 2013). La prevalencia del VPH es del 21% en África, del 16% en América Latina y el Caribe, el 9% en Asia y el 5% en América del Norte (Bruni et al., 2012).

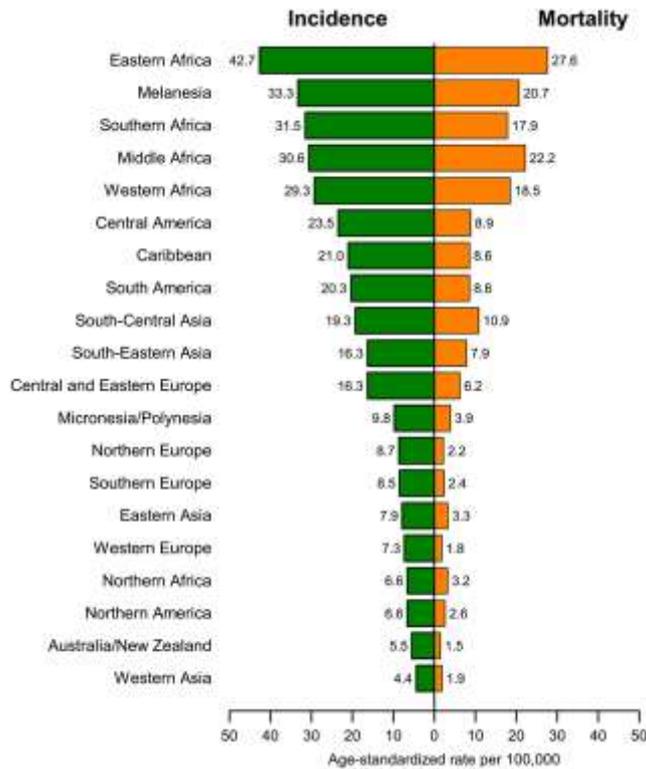


Fig. 8 Tasa de incidencia y mortalidad del cáncer de cuello uterino según el área geográfica.

Una gran cantidad de los cánceres existentes son potencialmente evitables siguiendo un estilo de vida más saludable (de Vries et al., 2010).

1.2 Tratamiento del cáncer

Hoy en día, existen diversos tipos de tratamiento frente al cáncer que pueden salvar la vida de personas que padezcan esta enfermedad.

La detección y tratamiento del cáncer necesita una adecuada coordinación de distintas especialidades, de forma que aporte una visión integrada de la enfermedad. De esta forma, se podrán abordar todos los aspectos del proceso oncológico con una mayor garantía. Es decir, es necesaria la actuación de un equipo multidisciplinar en el que estén incluidos todos los especialistas médicos que actúen en el tratamiento para curar la enfermedad: oncólogos médicos, radioterapeutas, cirujanos, etc.

Los principales tipos de tratamiento para el cáncer son: cirugía, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia, terapia dirigida, terapia hormonal y trasplante de células madre (Fundación para la Excelencia y la Calidad en la Oncología <http://www.fundacioneco.es/>).

1.2.1 Cirugía

Constituye uno de los pilares fundamentales en el tratamiento del cáncer. Ofrece la mayor probabilidad de cura para muchos tipos de cáncer, en especial los que no se han extendido a otras zonas del cuerpo.

La radioterapia y la quimioterapia son otros tratamientos que pueden ser utilizados junto a la cirugía, administrándose antes o después de ésta.

Tipos de cirugía (Fundación para la Excelencia y la Calidad en la Oncología <http://www.fundacioneco.es/>):

- a) Curativa: extirpación completa del tumor primario con márgenes suficientes y linfadenectomía adecuada.
- b) Cirugía de recidivas y metástasis: siempre que haya posibilidad de radicalidad en recidivas locales indicadas. Por otro lado, en pacientes con metástasis puede incrementar la supervivencia y ayudar al control de síntomas, así como mejorar la respuesta a otros tipos de tratamientos complementarios.
- c) Cirugía citorreductora: la reducción del tamaño del tumor es el objetivo primordial con el fin de obtener mayor respuesta a tratamientos complementarios.
- d) Paliativa: el objetivo es prevenir complicaciones y mejorar la calidad de vida de los pacientes.

1.2.2 Radioterapia

De igual forma que la cirugía, la radioterapia es utilizada para el tratamiento del cáncer localizado. Este tratamiento usa la radiación ionizante con el fin de destruir las células cancerígenas y reducir el tamaño de los tumores. La radioterapia lesiona o mata las células en el área donde se aplica el tratamiento. Aunque daña células normales y cancerosas, muchas de las células normales son capaces de recuperarse tras la irradiación. El objetivo de este tratamiento es la destrucción completa del tumor, en otros casos, reducir su tamaño y aliviar los síntomas.

Tipos de tratamiento (Fundación para la Excelencia y la Calidad en la Oncología):

- a) Radical o con intención curativa: fundamentalmente en tumores localizados en estadios iniciales. Posibilita la curación con preservación de órgano y función. Así como, en algunos casos, permite el rescate quirúrgico posterior, si fuese necesario.
- b) Adyuvante: realizada después de la cirugía curativa con el fin de erradicar restos tumorales subclínicos, reduciendo el riesgo de recaída y aumentando la supervivencia global.
- c) Neoadyuvante: con anterioridad al tratamiento quirúrgico definitivo con el objetivo de mejorar la radicalidad quirúrgica y/o cirugía conservadora con preservación de órgano. Combinada con quimioterapia.
- d) Paliativa: el objetivo no es curar el cáncer, sino disminuir los síntomas en un paciente con una enfermedad muy avanzada o en pacientes con un mal estado general.

La radioterapia puede ser aplicada sola, o en combinación con la cirugía o la quimioterapia.

1.2.3 Quimioterapia

La quimioterapia es un tratamiento que consiste en la administración de medicamentos de acción fuerte que por lo general se inyectan a través de una vena o vía oral. En la mayor parte de los casos se usa más de un medicamento. Mediante este tratamiento se puede tratar el cáncer que se ha propagado, ya que estos agentes quimioterapéuticos viajan por el torrente sanguíneo. En el apartado 1.3 se detalla y explica este tratamiento, así como los fármacos empleados.

1.2.4 Inmunoterapia

Según Sociedad Española de Oncología Médica, la inmunoterapia es un tratamiento que a diferencia de los demás no se dirige a destruir las células tumorales, sino que su función es llevar a cabo la estimulación del sistema inmunitario del paciente, con el fin de que sea su propio sistema inmune el que ataque y destruya el tumor.

Ventajas como la especificidad hará que el daño a los tejidos sanos sea mínimo, o la memoria inmunológica que permitirá al sistema inmune ser capaz de seguir reconociendo al tumor y destruirlo. No obstante, existen también inconvenientes. El principal es el tiempo que puede tardar en desarrollar el efecto puesto que el sistema inmune tiene que prepararse.

Pese al evidente avance que supone este tratamiento, no es la solución para todos los tipos de tumores.

Los tratamientos inmunológicos se clasifican en dos grupos (Sociedad Española de Oncología Médica, 2015):

- a) Inmunoterapias específicas: dirigidas a provocar la respuesta contra una célula concreta o un antígeno. En este grupo se encuentran las vacunas y la terapia celular adoptiva.
- b) Inmunoterapias no específicas: estimulan globalmente al sistema inmunológico sin centrarse en un objetivo concreto. En este grupo se encuentran las citoquinas y las proteínas de control inmunológico.

Se dispone además de tratamientos basados en anticuerpos monoclonales, de forma que reconocen las células tumorales o sustancias que son necesarias para su crecimiento. Ésta se denomina inmunoterapia pasiva ya que el paciente recibe el anticuerpo desde fuera y el organismo no tiene que activarse inmunológicamente.

1.2.5 Medicina de precisión y terapia dirigida

La medicina de precisión es aquella que usa la información sobre genes, proteínas y otras características individuales del tumor de un paciente con el fin de precisar el diagnóstico e individualizar el tratamiento.

La terapia dirigida es la base de esta disciplina médica. Con este tratamiento se actúa sobre los cambios que impulsan el crecimiento, división y diseminación de las células cancerígenas (Instituto Nacional del Cáncer EEUU, 2014).

Tipos de terapias dirigidas:

- a) Medicamentos micromoleculares: estos fármacos debido a su pequeño tamaño pueden entrar fácilmente en las células, actuando sobre la diana que se encuentra en el interior celular.
- b) Anticuerpos monoclonales: se unen a blancos específicos en la superficie externa de las células cancerígenas.

Las terapias dirigidas contra el cáncer actúan ayudando al sistema inmune a destruir las células cancerosas, detienen el crecimiento de las células cancerosas, detienen las señales que ayudan a la formación de vasos sanguíneos, llevan sustancias destructoras a las células cancerosas, causan la muerte de las células cancerosas y evitan que el cáncer reciba las hormonas que necesita para crecer (Instituto Nacional del Cáncer EEUU, 2014).

1.2.6 Terapia hormonal

Es aquella que se usa para (Instituto Nacional del Cáncer EEUU, 2015):

- a) Disminuir la probabilidad de recidiva, enlentecer o detener el crecimiento de los tumores hormono-dependientes.
- b) Aliviar de los síntomas del cáncer: se puede usar para disminuir los síntomas o evitarlos en pacientes con tumores a los que no se les puede realizar cirugía ni administrar radioterapia.

Tipos de terapia hormonal:

- Las que obstaculizan la producción de hormonas.
- Las que interfieren en el modo de actuación de las hormonas.

1.2.7 Trasplante de células madre

Este tratamiento consiste en restaurar las células madre sanguíneas en pacientes cuyas células madre fueron destruidas por dosis muy altas de quimioterapia o radioterapia (Instituto Nacional del Cáncer EEUU, 2015).

1.3 Quimioterapia del cáncer

La quimioterapia del cáncer comenzó en la década de 1940 con el uso de un agente citotóxico general llamado mostaza de nitrógeno. Seguidamente, en la década de 1960 se desarrollaron otros fármacos contra el cáncer, de origen natural, llamados alcaloides de la *Vinca* y antraciclina, algunos actualmente en uso (Chabner y Roberts, 2005). Alrededor de 50 tipos de fármacos están actualmente disponibles para el tratamiento de aproximadamente 200 tipos de cánceres. Debido a la falta de eficacia selectiva de los fármacos por los tumores, se producen efectos secundarios severos, lo que produce daños en órganos normales (Peer et al., 2007; Zhang et al., 2008).

Mediante la cirugía y la radioterapia se eliminan los tumores a nivel local. En cambio, la quimioterapia se distribuye de forma sistémica, por lo que actúa tanto localmente como en todas las partes del organismo, pudiendo así destruir células malignas que se encuentren a distancia.

Con la utilización de técnicas moleculares de análisis de ADN se han podido identificar los mecanismos por los que la quimioterapia induce la muerte celular, así como también los genes específicos implicados en la resistencia a los fármacos. Además, los avances tecnológicos han permitido la posibilidad de conocer los cambios que confieren “quimiosensibilidad” a un fármaco determinado. Las nuevas terapias actúan sobre las células malignas de forma más eficaz, protegiendo así a los tejidos sanos del efecto del tratamiento (Sociedad Española de Oncología Médica, 2015).

La inhibición del crecimiento celular puede tener lugar a varios niveles:

- Sobre la síntesis y la función de macromoléculas. Para la gran mayoría de los fármacos antineoplásicos éste es el principal mecanismo de acción. Así pues, en el momento en que se obstaculiza la síntesis de cantidades grandes de macromoléculas en una célula tumoral se produce la muerte de ésta.
- En la organización citoplasmática.
- En la síntesis y función de la membrana celular.
- En el entorno de la célula cancerosa en crecimiento.

Las células cancerosas poseen un ciclo celular similar al de las células normales. Hay que destacar que las células en fase G₀ son relativamente inactivas en lo que se refiere a síntesis de macromoléculas. Por lo que no son sensibles a muchos de los fármacos antineoplásicos, especialmente, a los que interfieren en la síntesis de macromoléculas.

La mayor parte de los agentes antineoplásicos se agrupan en función de si dependen o no de que la célula se encuentre en una fase distinta a G₀, o de si existe mayor actividad en alguna de las otras fases del ciclo celular.

El cisplatino, carboplatino, doxorubicina, dacarbacina y melfalán son los fármacos específicos de ciclo celular más utilizados. En cuanto a fármacos no específicos de ciclo celular destacan la carmustina y la lomustina (Sociedad Española de Oncología Médica, 2015).

En función de la sensibilidad del tumor a la quimioterapia se pueden clasificar en:

- Quimiocurables: aquellos en los que muchos de los pacientes pueden ser sanados con quimioterapia. Es el caso del carcinoma de testículo, los linfomas no Hodgkin de alto grado, carcinoma embrionario de ovario o el linfoma de Hodgkin.
- Quimiosensibles: tumores en los que el tratamiento quimioterápico obtiene respuestas en más del 50% de los casos y respuestas completas en el 15-20% de los enfermos. Es el caso del cáncer de próstata, ovario, mama o el microcítico de pulmón.
- Quimiorresistentes: aquellos en los que en menos de la mitad de los pacientes se consigue una respuesta con la quimioterapia, y no aumenta significativamente la supervivencia con ésta. Es el caso del cáncer riñón, melanoma y hepatocarcinoma. Por tanto, es más útil y eficaz el uso de otros agentes que posean mecanismos de acción distintos a la quimioterapia, como por ejemplo la inmunoterapia o agentes dirigidos a terapias biológicas (terapias anti-diana).

1.3.1 Tipos de quimioterapia

Diversos tipos de cánceres se hace necesario abordarlos mediante un tratamiento multidisciplinar, combinando distintos tratamientos como cirugía, radioterapia, quimioterapia, anticuerpos monoclonales, inmunoterapia, hormonoterapia u otras medidas, para tratar de lograr la curación del paciente.

La Asociación Española Contra el Cáncer (AECC) y la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) indican que dependiendo de la finalidad y el momento en que se administre la quimioterapia respecto a los otros tratamientos, se clasifica en:

- Quimioterapia neoadyuvante o de inducción: es aquella que se administra con anterioridad a cualquier tratamiento local, como radioterapia o cirugía. Los objetivos son, por un lado, reducir el tamaño del tumor permitiendo por tanto tratamientos locales menos agresivos y reducir el riesgo de recaída; y por otro lado, destruir aquellas células tumorales que hayan podido migrar a otras zonas del cuerpo. De esta forma se destruyen de forma temprana esos focos que, debido al reducido tamaño, no se hayan podido detectar. Es utilizada en el tratamiento del cáncer de canal anal, vejiga, mama, esófago, laringe, cáncer de pulmón no microcítico y sarcoma óseo.
- Quimioterapia concomitante o quimioradioterapia: aquella que es aplicada simultáneamente a otro tratamiento, generalmente radioterapia, con el propósito de potenciar el efecto de la radiación o de actuar espacialmente con ella, es decir potenciar el efecto local de la radiación y actuar además de forma sistémica con la quimioterapia.
- Quimioterapia adyuvante o complementaria a otro tratamiento: aquella que es administrada tras otros tratamientos, como por ejemplo la cirugía. El objetivo es disminuir el riesgo de recaída y, por ende, incrementar la tasa de supervivencia e índice de curaciones.
- Quimioterapia paliativa: se aplica en tumores que no pueden ser intervenidos quirúrgicamente por la existencia de metástasis y cuando la finalidad del tratamiento no sea curativa.

1.3.2 Principales fármacos en quimioterapia antineoplásica

Alrededor de 50 tipos de fármacos están actualmente disponibles para el tratamiento de aproximadamente 200 tipos de tumores.

1.3.2.1 Agentes alquilantes

Según García-Mata et al. (2009) son aquellos que actúan directamente sobre la molécula de ADN al incorporar grupos alquilo que producen la formación de puentes inter o intra catenarios. Éstos son responsables de la alteración funcional del ADN y en último caso, de la muerte celular.

Forman parte de este grupo la mecloretamina, ciclofosfosfamida, ifosfamida, melfalán, clorambucilo, alquilsulfonatos (busulfán), aziridinas (tiotepa), mitomicina C, nitrosureas (carmustina, lomustina, fotemustina, etc), hidracinas y derivados de tiazinas (dacarbazina, procarbazona, temozolamida) y agentes alquilantes no clásicos como hexametilmelamina (altretamina).

Se usan en las leucemias crónicas, el cáncer de pulmón, linfomas de Hodgkin y no Hodgkin, mieloma múltiple y cáncer de ovario, entre otros tumores.

Temozolamida es un análogo estructural de la dacarbazina. Se trata de una molécula lipofílica que tiene una rápida absorción gastrointestinal y atraviesa la barrera hematoencefálica. Se indica en el tratamiento de tumores cerebrales y melanoma.

1.3.2.2 Derivados de platino

Según Ponce y Garrido (2013) son aquellos que forman enlaces covalentes con las bases guanina y adenina del ADN. Estas uniones son mayoritariamente intracatenarias, aunque pueden ser también intercatenarias.

Dentro de este grupo los fármacos más importantes son: cisplatino, carboplatino y oxaliplatino.

Se utilizan para tratar el cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, tumores germinales, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de esófago y cáncer de estómago.

Oxaliplatino es un análogo de tercera generación del cisplatino. Posee un mecanismo de acción similar al de éste, pero que además se une a proteínas nucleares y citoplasmáticas. Su principal indicación es para el tratamiento del cáncer colorrectal.

1.3.2.3 Antimetabolitos

Son aquellos fármacos que actúan inhibiendo la acción de enzimas implicadas en la síntesis de purinas y pirimidinas, esto da lugar a la depleción celular de éstas y la alteración de la síntesis de ácidos nucleicos.

Este grupo está formado por: antifolatos (metotrexato, raltitrexed, pemetrexed), análogos de pirimidinas (5-fluorouracilo, fluoropirimidinas orales, arabinósido de citosina, gemcitabina), análogos de las purinas (6-mercaptopurina, tioguanina), análogos de la adenosina (fludarabina, pentostatina, cladribina).

Se usan para tratar el cáncer colorrectal, el cáncer de pulmón no microcítico, el cáncer de páncreas, el cáncer de ovario, el cáncer de cabeza y cuello, el cáncer de vejiga, el cáncer de mama, la enfermedad trofoblástica gestacional, las leucemias, el mesotelioma, los linfomas y el osteosarcoma (Sociedad Española de Oncología Médica, 2015).

1.3.2.4 Agentes que interaccionan con las Topoisomerasas

Las Topoisomerasas son enzimas que juegan un papel esencial en la replicación, transcripción y reparación del ADN. Son enzimas que introducen o eliminan superenrollamientos y determinan el grado de enrollamiento del ADN. Alteran el estado topológico, pero no la estructura covalente.

En este grupo se encuentran los siguientes fármacos: antraciclinas (adriamicina, daunorrubicina, análogos de adriamicina [4-epirrubicina, idarrubicina], doxorubicinas liposomales, mitoxantrona), epipodofilotoxinas (etopósido, tenipósido), derivados de la camptotecina (irinotecan, topotecan), actinomicina D, amsacranina.

Para las antraciclinas existen diversas evidencias que justifican su efecto antitumoral: alteración de las membranas celulares, intercalación entre las bases del ADN, generación de radicales libres e inhibición de la Topoisomerasa II. Se usan en el tratamiento de cáncer de mama, cáncer de tiroides, cáncer de endometrio, tumores pediátricos, cáncer de ovario, cáncer microcítico de pulmón, sarcomas, cáncer gástrico, linfomas y leucemias.

El etopósido se usa en el tratamiento del cáncer de pulmón microcítico y no microcítico, en el cáncer de células germinales, sarcomas pediátricos, cáncer gástrico y linfomas.

Los derivados de la camptotecina (irinotecan y topotecan) inhiben a la Topoisomerasa I. El uso principal de Irinotecan es para el tratamiento del cáncer colorrectal metastásico. No obstante ha sido demostrada también su utilidad en el cáncer de pulmón (microcítico y no microcítico) y en el cáncer gástrico. Topotecan se usa fundamentalmente para el cáncer de cérvix, cáncer de ovario y cáncer microcítico de pulmón (Sociedad Española de Oncología Médica, 2015).

1.3.2.5 Agentes que interaccionan con los microtúbulos

Los microtúbulos son polímeros proteicos que se encuentran en el citoplasma celular. Son esenciales para la viabilidad de la célula puesto que forman parte del huso mitótico, participan en la adhesión, secreción, mantenimiento de la forma, transporte, etc.

Los fármacos que llevan a cabo interacción con los microtúbulos son: alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina), taxanos (paclitaxel, docetaxel y los nuevos taxanos), análogos de las epotilonas.

El mecanismo de acción de los alcaloides de la vinca se caracteriza por la unión de éstos a la tubulina, lo que promueve la ruptura del huso mitótico. Se usan para tratar sarcomas de partes blandas, carcinoma microcítico de pulmón, sarcoma de Kaposi, neoplasias hematológicas, tumor de Wilms, cáncer de testículo, linfomas y mieloma múltiple, neuroblastoma y cáncer de vejiga.

Los taxanos son fármacos de primera categoría en el tratamiento del cáncer. Paclitaxel posee una elevada actividad en el cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de ovario y cáncer de mama. Por otro lado, también posee actividad en el cáncer de testículo, cáncer de endometrio, cáncer de cérvix y de cabeza y cuello. Docetaxel es otro taxano que se usa en el tratamiento de cáncer de pulmón no microcítico, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de próstata y cáncer de cabeza y cuello. Además, está también demostrada su actividad en el cáncer de ovario (Sociedad Española de Oncología Médica, 2015).

1.3.2.6 Miscelánea

Entre estos fármacos se encuentra la bleomicina, L-asparaginasa y la hidroxiurea.

- **Bleomicina:** produce la formación de radicales libres que rompen el ADN. Es un agente radiomimético. Se emplea en regímenes de combinación para el tratamiento de linfomas, tumores germinales, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, cáncer de cérvix, cáncer de vulva y cáncer de pene.
- **L-asparaginasa:** su mecanismo de acción antitumoral se debe a la reducción de los niveles plasmáticos de L-asparagina, el cual es un aminoácido esencial en la síntesis de proteínas esenciales para la viabilidad celular. Se usa en el tratamiento de leucemia linfática aguda en niños.
- **Hidroxiurea:** su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la enzima ribonucleótido reductasa, la cual participa en la conversión de ribonucleótidos en desoxirribonucleótidos, precursores indispensables de la síntesis y reparación del ADN. Se usa en el tratamiento de neoplasias hematológicas. No obstante también posee actividad en el cáncer epitelial de ovario refractario y en el cáncer de cabeza y cuello (Sociedad Española de Oncología Médica, 2015).

1.3.3 Cisplatino

El Cisplatino, también conocido como cis-diaminodicloroplatino, es un compuesto metálico (platino) con estructura geométrica plana (Fig. 9) (Rosemberg, 1973; Dasari y Tchounwou, 2014). Fue descrito por primera vez por Michele Peyrone en 1845, pero la estructura fue determinada en 1893 por Alfred Werner (Trzaska, 2005). Sin embargo, no se llevaron investigaciones científicas hasta la década de 1960, cuando estudios realizados por Rosemberg et al. (1965) mostraron que el platino era capaz de inhibir la división celular en *Escherichia coli*, hecho que creo bastante interés en el posible uso de este producto en quimioterapia. Más tarde fue usado para eliminar células tumorales (Rosemberg, 1973).

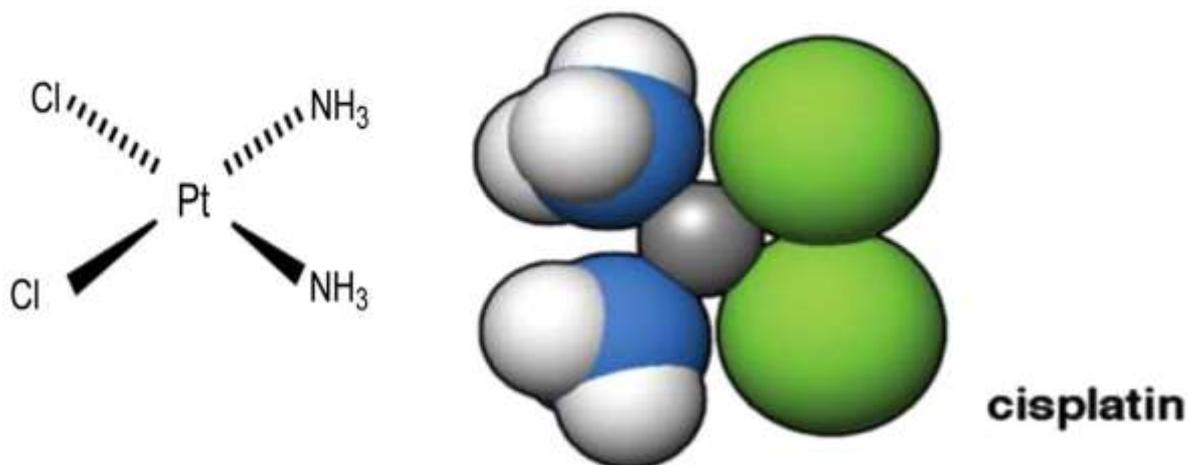


Fig. 9 Estructura química del Cisplatino.

1.3.3.1 Mecanismo de acción

La toxicidad antitumoral de los componentes del platino y su aplicación clínica a finales de la década de 1970 fue un hito en el desarrollo de agentes quimioterapéuticos contra el cáncer. Los compuestos del platino, como son el Cisplatino, Carboplatino y Oxaliplatino son todavía las terapias clínicas de primera línea usadas en quimioterapia y forman parte del tratamiento de muchos pacientes con distintos tipos de cáncer como son el de cabeza y cuello, testículo, ovario, cuello uterino, colorrectal y recidiva del linfoma. Las lesiones citotóxicas causadas por los compuestos del platino son conocidas como aductos de platino-ADN, que forman uniones entre guaninas de la misma cadena de ADN o intracatenarias, así como entre guaninas de distinta cadena de ADN o intercatenarias (Eastman y Barry, 1987; Pérez, 1998). Su toxicidad se asocia mayoritariamente a uniones intracatenarias (Pinto y Lippard, 1985; Siddik, 2003).

El cisplatino es un agente alquilante capaz de formar aductos con macromoléculas, principalmente con los átomos N7 de las purinas. El resultado de esto es la formación de entrecruzamientos inter/intracatenarios en el ADN, lo que induce la detención del ciclo celular en el punto de control G2/M (Yuan et al., 2003). La incapacidad de reparar el ADN dañado conduce a la muerte celular programada.

Por otro lado, la evidencia experimental ha demostrado que otros mecanismos como la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la activación de las vías inflamatorias, pueden también contribuir a la inducción de la apoptosis (Casares et al., 2012). En condiciones fisiológicas normales, las células controlan los niveles de ROS mediante el equilibrio entre la producción de éstas y su eliminación mediante el sistema de reducción de glutatión (-GSH) y la actividad superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). Pero bajo condiciones de estrés oxidativo, las excesivas ROS pueden dañar las proteínas celulares, lípidos y el ADN, lo que conduce a lesiones fatales en las células que contribuyen a la carcinogénesis. Las células cancerosas presentan un mayor estrés por ROS que las células normales, debido en parte a la estimulación oncogénica, el incremento de la actividad metabólica y al mal funcionamiento mitocondrial. El estrés oxidativo es uno de los mecanismos más importantes implicados en la toxicidad del Cisplatino. La mitocondria es el principal objetivo para el estrés oxidativo inducido por el Cisplatino, resultando en la pérdida de grupos sulfhidrilos de las proteínas mitocondriales, inhibición de la absorción de calcio y reducción del potencial de membrana mitocondrial (Saad et al., 2004).

La exposición a estrés oxidativo puede alterar las funciones biológicas normales. El Cisplatino induce la producción de ROS que provocan la muerte celular, además de daños en el ADN. La muerte celular tiene lugar tras la activación inmediata de numerosas vías de señalización. La formación de ROS depende la concentración de Cisplatino y del tiempo de exposición a éste (Brozovic et al., 2010). La homeostasis redox intracelular es mantenida por el grupo tiol (-SH). Bajo ciertas condiciones, un grupo tiol puede conducir a la formación de radicales tiolos que pueden interactuar con oxígeno molecular y por lo tanto formar ROS (Desoize, 2002).

El exceso de ROS puede inducir la apoptosis a través de las vías extrínseca e intrínseca (Ozben, 2007). Existen dos familias de proteínas que participan en la apoptosis a través de estas vías y que además son consideradas el centro de la maquinaria apoptótica. Por un lado las Caspasas, que son principalmente las ejecutoras de la apoptosis (Shi, 2002), y la familia de proteínas Bcl-2, las cuales son las principales reguladoras del proceso (Danial y Korsmeyer, 2004). Ambas vías están relacionadas mediante la proteína Bid. La Caspasa 8 rompe la proteína "BH3-only", y la forma truncada de Bid (tBid) se transloca a la mitocondria desencadenando la activación de los

miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2, Bax y Bak. Este hecho da lugar a la permeabilización de la membrana mitocondrial. En la vía extrínseca, dicha permeabilización de la membrana ejerce como amplificador de la activación de las Caspasas efectoras (Gross et al., 1999b; Li et al., 1998; Luo et al., 1998). No obstante, la Caspasa 8 es capaz de activar directamente a las Caspasas efectoras directamente sin hacerlo a través de la mitocondria. En la figura 10 se describen la dos vías de la apoptosis (Adrain y Martin, 2001).

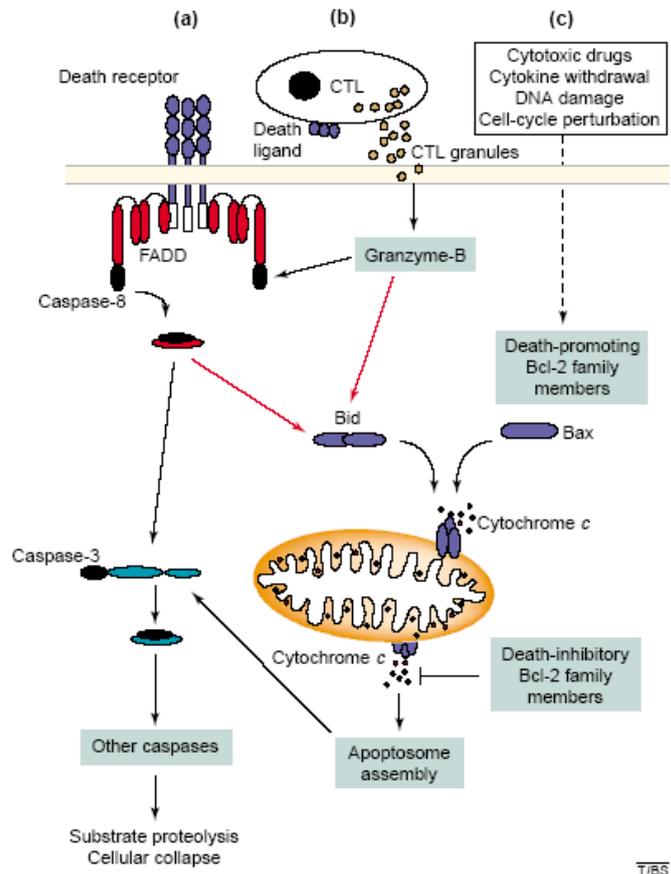


Fig. 10. Vías apoptóticas. A) Ruta extrínseca o mediada por receptores. B) Ruta intrínseca o mitocondrial.

a) Vía extrínseca

La inducción de apoptosis a través de la activación de la vía Fas está asociada con la generación de ROS. En las vías extrínsecas ROS son generadas por el ligando FAS (FasL o CD95L), que es una citoquina que se une al receptor Fas (Figura 10). ROS son requeridas para inducción de apoptosis por la vía Fas (Wang et al., 2008). La reacción FasL-Fas provoca el acoplamiento de la proteína adaptadora FADD (proteína con región de muerte asociada a Fas) y a su vez esta proteína se une a la Caspasa iniciadora Pro-caspasa 8 (Gupta et al., 2012). Después, la Procaspasa-8 es activada proteolíticamente y la Caspasa-8 activa es liberada del DISC al citoplasma formando un heterotetrámero de dos subunidades pequeñas y dos grandes (Muzio, 1996). La Caspasa-8 activa rompe varias proteínas de la célula incluyendo la Procaspasa-3, que resulta en su activación y en la finalización de la muerte celular (Figura 11).

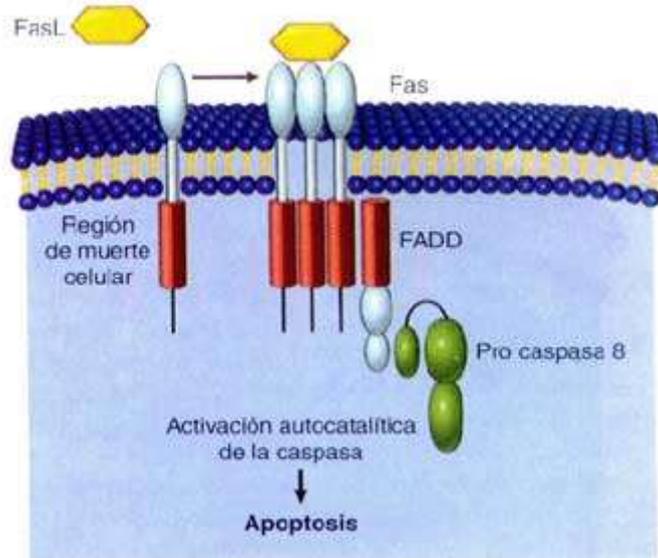


Fig. 11. Modelo de señalización mediado por Fas, activación de caspasas e inducción de la señal de muerte

b) Vía intrínseca

Esta ruta es iniciada mediante la unión de ciertas citoquinas sobre un receptor transmembrana que pertenece a la superfamilia de los receptores para el factor de necrosis tumoral tipo 1, Fas, TNF y TRAIL (Shi, 2004).

En la vía intrínseca, ROS facilitan la liberación de Citocromo C. Por un lado, por la activación de las proteínas estabilizadoras de poros (Bcl-2 y Bcl-xL). La activación de proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2 produce poros en la membrana externa de las mitocondrias, permitiendo la liberación de proteínas del espacio intermembrana, entre las que se encuentra el Citocromo C. Y por otro lado, por la inhibición de proteínas desestabilizadoras de poros (proteína X asociada con Bcl-2 y Bcl-2 asesino) (Martindale y Holbrook, 2002). El Citocromo C se une y activa a la proteína factor 1 activador de la proteasa apoptótica (Apaf-1) en el citoplasma, lo que promueve que esta última se una a ATP/dATP y forme el apoptosoma, que media la activación autocatalítica de Caspasa 9 (Danial y Korsmeyer, 2004; Hengartner, 2000; Taylor et al., 2008), y ésta a su vez activa a la principal caspasa efectora, Caspasa 3 (Gulbins et al, 2003). En la figura 12 se ilustra el modelo para la activación de Apaf-1 y Procaspasa 9 (Adams y Cory, 2002). ROS también puede inducir muerte celular a través de autofagia, que es un proceso catabólico que implica el secuestro del contenido citoplasmático para su posterior degradación en liposomas (Shrivastava et al., 2011).

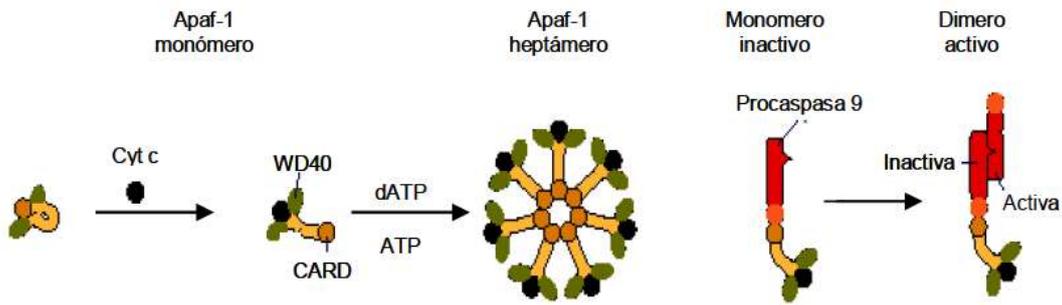


Fig.12. Modelo para la activación de Apaf-1 y Procaspasa 9.

c) Modulación de la señalización de calcio por Cisplatino.

El Cisplatino, ante bajas concentraciones intracelulares de iones cloruro, se hidroliza en $[\text{cis}-(\text{NH})\text{PtCl}(\text{HO})]^+$ y $[\text{cis}-(\text{NH})\text{Pt}(\text{HO})]^{2+}$ (Aggarwal et al., 1980; Jennerwein y Andrews, 1995.). Estas formas hidrolizadas de Cisplatino son 1000 veces más reactivas que el fármaco en estado normal, y actúa a través de la inhibición de la respiración mitocondrial por desacople de la fosforilación oxidativa (Aggarwal, 1993.). Esto conlleva a una salida de calcio de la mitocondria y a un incremento temporal de los niveles de calcio celulares, que juega un papel significativo en la alteración de la homeostasis normal de calcio, y por lo tanto en la función celular.

d) Cisplatino y proteína quinasa C.

Las proteínas quinasas son enzimas reguladoras del estado de fosforilación de proteínas intracelulares. Éstas poseen una amplia diversidad de sustratos: proteínas estructurales, enzimas metabólicas, reguladores del ciclo celular y factores de transcripción. La proteína quinasa C (PKC) juega un papel fundamental en la transducción de señales y en la regulación celular (Basu, 1993; Basu y Sivaprasad, 2007; Newton, 2003; Nishizuka, 1992). El efecto de PKC en la sensibilidad/resistencia a Cisplatino depende del patrón de las isoenzimas de PKC, además del contexto celular (Basu y Krishnamurthy, 2010).

e) Cisplatino y proteínas quinasas activadas por mitógenos.

Las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) son una familia de serintreonin quinasas las cuales determinan el destino de procesos celulares muy importantes como: el crecimiento celular, proliferación, muerte y diferenciación en respuesta a estímulos (Chang y Karin, 2001; Johnson y Lapadat, 2002; Marshall, 1995; Pearson et al., 2001). Se ha demostrado que el Cisplatino causa la activación de quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) en varios tipos celulares, aunque hay controversias de si la activación de ERK evita o contribuye a la muerte celular inducida por Cisplatino (Basu y Tu, 2005; Hayakawa et al., 1999; Nowak, 2002; Persons et al., 1999; Tang et al., 2010; Wang et al., 2000; Yeh et al., 2002). La

activación de ERK puede causar el arresto del ciclo celular dando tiempo para la reparación del daño inducido por Cisplatino a través de la vía p53. La proteína p53 lleva a cabo una regulación negativa de la progresión del ciclo celular a causa del efecto inhibitorio que hacen las proteínas p21 y 14-3-3 sobre diferentes complejos de cdk/ciclina en presencia de un daño en el ADN, produciendo así una detención en la transición G1/S y G2/M (Kastan et al., 1991; Maki y Howley, 1997; Soussi y Beroud, 2001; Van Laar et al., 1994). P53 puede regular la muerte celular inducida por Cisplatino por varios mecanismos como: degradación de la proteína inhibitoria flice-like (FLIP), uniéndose directamente y contrarrestando la función antiapoptótica de Bcl-xl, sobreexpresión del homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) e inhibición de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) (Basu y Krishnamurthy, 2010). Aunque p53 juega un papel importante en la respuesta al daño inducido al ADN por Cisplatino, las células p53- también responden a este tipo de daño. Esto sugiere la existencia de una vía alternativa para este evento.

f) Cisplatino y p38-MAPK

P38-MAPK está relacionada con la transmisión de señales en respuesta a distintos agentes que provocan daños en el ADN, como son los agentes quimioterapéuticos Cisplatino, Taxol y Vincristina (Deacon et al., 2003; Lee et al., 1998), o la exposición a radiación ionizante (Verheij et al., 1998) y ultravioleta (Brancho et al., 2003; Hazzalin et al., 1996; Raingeaud et al., 1995). El culmen de esta señalización es, en muchos casos, la apoptosis. Ésta es mediada en la mayoría de los casos por fosforilación de p38 (Duckett et al., 1999; Huang et al., 1999; Sanchez-Prieto et al., 2000). P73 es otra molécula implicada en el proceso apoptótico. Dicha molécula es capaz de activarse por p38-MAPK como respuesta a distintos estímulos, como el ejercido por el Cisplatino (Sanchez-Prieto et al., 2002).

La entrada en apoptosis como respuesta a agentes de estrés es mediada por el balance entre las rutas p38-MAPK y ERK, lo que determinará que la célula siga viviendo o muera (Berra et al., 1998; Berra et al., 1997; Xia et al., 1995).

Está descrito que la activación del ligando FAS o la ausencia del factor de crecimiento nervioso (NGF) está correlacionado con la activación de p38-MAPK y con un incremento de la apoptosis (Henkart, 1996; Juo et al., 1997; Xia et al., 1995).

En la figura 13 se ilustra un resumen de los diversos mecanismos moleculares de acción del Cisplatino en el tratamiento del cáncer (Dasari y Tchounwou, 2014).

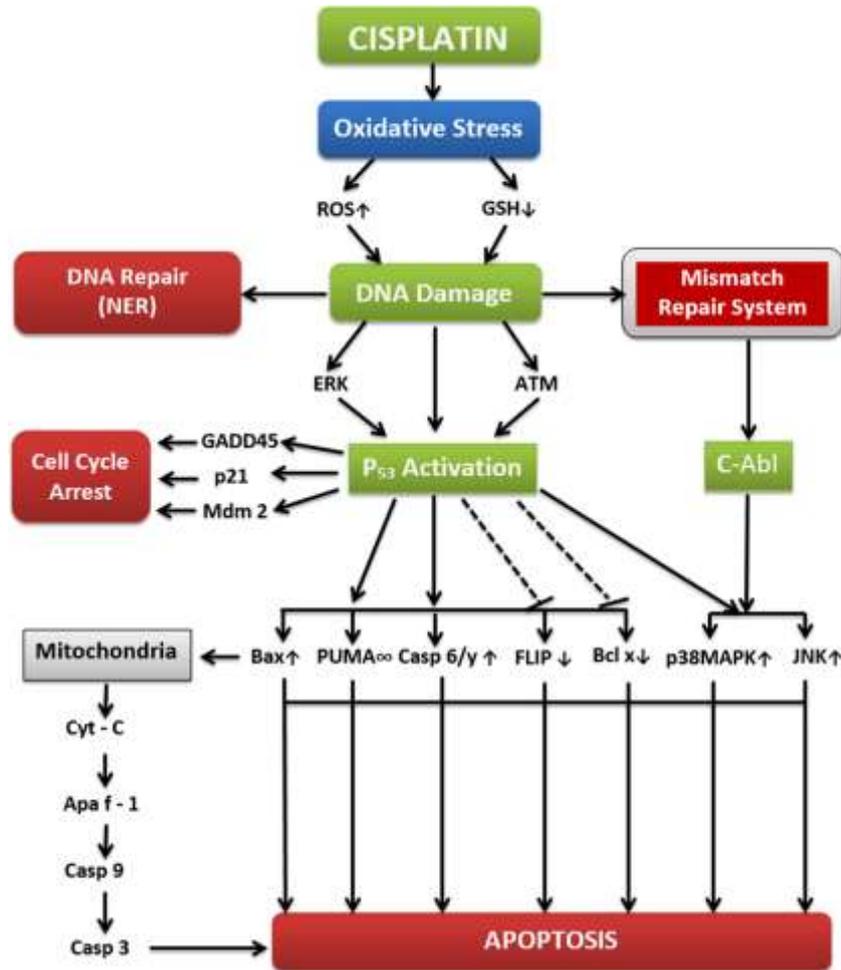


Fig. 13. Resumen de los mecanismos moleculares de acción del Cisplatino en el tratamiento del cáncer.

1.3.4 Bleomicina

La Bleomicina es un agente antineoplásico de tipo glucopeptídico. Es un antibiótico glucopeptídico que se ha empleado en el tratamiento del cáncer, ya que posee la capacidad de retrasar el crecimiento de las células cancerosas. Este fármaco es usado para tratar varios tipos de cánceres, incluyendo linfoma, carcinoma escamoso de cérvix, cabeza, y cuello, y la enfermedad de Hodgkin (Einhorn, 2002; Lazo et al., 1996; Miyaki et al., 1975; Umezawa, 1971). En el caso del cáncer testicular, la combinación de Bleomicina con Cisplatino y Etopósido es especialmente eficaz, produciendo una sorprendente tasa de curación del 70-80% (Einhorn, 2002; Levi et al., 1993). Sin embargo, el resto de pacientes finalmente desarrollan resistencia a la Bleomicina y recaída de la enfermedad (Einhorn, 2002; Nichols et al., 1994). Además, existe una clara evidencia de que individuos afectados con otros tipos de cánceres (linfoma Daudi y cáncer de colon) son altamente resistentes al tratamiento con Bleomicina desde el principio (Jani et al., 1992; Sebti et al., 1991).

En una gran cantidad de trabajos científicos ha sido demostrada su actividad como agente antibiótico. Las primeras que se evaluaron fueron la inhibición de la actividad del carcinoma de Ehrlich y su actividad sobre otros tumores trasplantados en ratón; así como la capacidad de inhibir el crecimiento *in vitro* en células de *Escherichia coli* y

Hela (Clarke, 2009). También hay que hacer mención a su empleo como agente para llevar cabo estudios sobre el daño cromosómico en el ADN (Bala y Mathew, 2001).

1.3.4.1 Estructura química de la Bleomicina

Las Bleomicinas poseen la misma estructura central, pero pueden variar en el tipo de carbohidratos y cadenas cargadas positivamente que tienen (Chen y Stubbe, 2005). Presentan distintos dominios funcionales:

- Dominio de unión a metales:** poseen átomos de nitrógeno los cuales coordinan al metal, formando así un complejo octaédrico con éste. La unión de este fármaco con Fe (II) y Cu (I) y en presencia de oxígeno puede catalizar el corte de la molécula de ADN, tanto de cadena sencilla como de cadena doble. También puede generar ROS (Bukowski et al., 2004; Chen y Stubbe, 2004; Chen y Stubbe, 2005; Galm et al., 2005; Izbicki et al., 2002; Joshi y Grant, 2005; Kaminski et al., 2002; Ramotar y Wang, 2003).
- Dominio de unión al ADN:** la pirimidina de la Bleomicina, junto con el grupo bitiazol, son los causantes de la unión con el ADN. El grupo bitiazol posee cargas positivas las cuales favorecen la unión electrostática de este agente antineoplásico con el ADN (Bukowski et al., 2004; Chen y Stubbe, 2004; Chen y Stubbe, 2005; Galm et al., 2005; Vorobjev et al., 2003)
- Carbohidratos:** este fármaco puede estar glicosilado con α -L-gulosa y α -D-manosa. Aunque no se conoce con exactitud el rol que juegan los carbohidratos, existen algunas evidencias que indican que pueden modular la afinidad de la Bleomicina por el ADN (Chen y Stubbe, 2004; Chen y Stubbe, 2005).

En la figura 14, se puede apreciar la estructura química, la cual es similar al antibiótico que produce de forma natural *Streptomyces verticillus* (Umezawa et al., 1966).

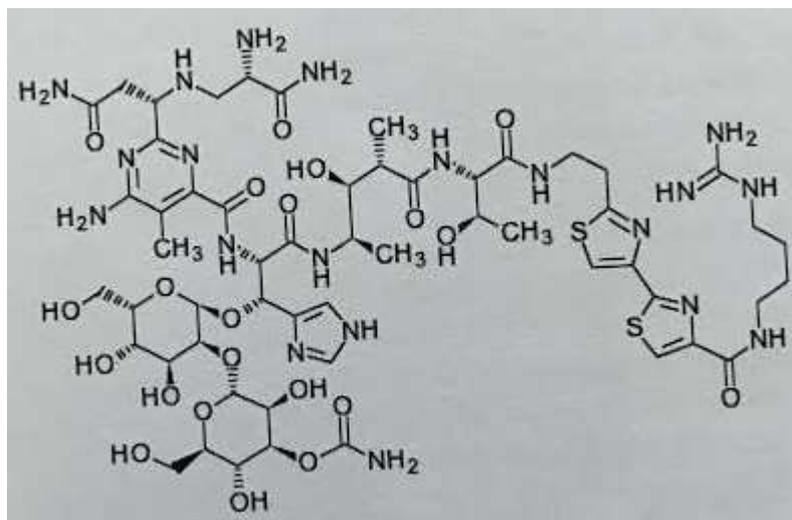


Fig. 14. Estructura química de la molécula de Bleomicina.

1.3.4.2 Mecanismo de acción

Para que se active la molécula de bleomicina necesita la unión con un metal de transición reducido [Fe (II) o Cu (I)], la presencia de oxígeno y un agente reductor. Una vez activa, el efecto citotóxico se ejerce a través de la generación de ROS y por daño directo al ADN y ARN (Abraham et al., 2003; Bukowski et al., 2004; Burger et al., 1981; Galm et al., 2005; Povirk, 1996; Vorobjev et al., 2003).

- a) Daños al ADN: la bleomicina activa puede intercalarse en la doble hélice de ADN (Sanz et al., 2002). Como resultado de este proceso tiene lugar una rotura simple y/o doble de la hélice de ADN. La bleomicina lleva a cabo la rotura de la molécula de ADN modificando el final de las bases nitrogenadas, ya que se intercala dentro de la doble hélice, lo que provoca la rotura y cambios globales en la morfología de los cromosomas. Se ha demostrado también que el efecto de este fármaco es dependiente del ciclo celular (es mayor en las células que se encuentran en la fase G1 y G2/M del ciclo celular) y del estado de activación transcripcional, siendo más susceptible la eucromatina que la heterocromatina (Joshi y Grant, 2005; Vorobjev et al., 2003).
- b) Daños al ARN: estudios *in vitro* han demostrado que el ARN puede ser degradado por hidrólisis directa o en forma indirecta debido a la producción de radicales libres (Abraham et al., 2003; Carter et al., 1990).
- c) Generación de ROS: la bleomicina activa puede llevar a cabo la producción de radicales hidroxilo, superóxido y peróxido de hidrógeno, los cuales reaccionan rápidamente y de forma inespecífica con moléculas, produciendo la oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Bukowski et al., 2004).

Su mecanismo de acción es similar a la actividad de las radiaciones ionizantes. Es por ello que es considerada como un agente radiomimético (Obe et al., 2010; Pastwa et al., 2001).

Se han descrito diversos mecanismos de reparación que poseen las células para recuperarse de los daños producidos por bleomicina. Uno de ellos fue descrito por Hittelman et al. (1974), estudiando la fase del ciclo celular en la que se producía la reparación del daño causado por este fármaco en células de mamíferos. Así, entre un tercio y la mitad del daño era reparado en la fase G2 en tan sólo una hora. Otros estudios han utilizado elución alcalina para detectar la reparación del daño causado por este agente quimioterapéutico y así determinar el tiempo empleado por la célula para llevar a cabo la reparación. Sognier et al. (1979) emplearon EDTA como agente alcalino, obteniendo como resultado un tiempo medio de reparación de 15 minutos.

En otros trabajos se ha estudiado la combinación de bleomicina con otros fármacos, para así evitar los mecanismos intrínsecos de reparación celular. Sognier et al. (1979) emplearon ciclohexamida, estreptovitacin, hicantone e hidroxurea. Así se comprobó que ciclohexamida y estreptovitacin provocan una mayor inhibición de la reparación que hicantone e hidroxurea.

1.4 Resistencia al tratamiento quimioterápico del cáncer

Pese a los avances en el diagnóstico y la terapia del cáncer, el desarrollo de resistencia frente a fármacos y la recaída del tumor son casos frecuentes (Takebe et al., 2011; Yap et al., 2009).

1.4.1 Mecanismos generales de resistencia tumoral

Las células tumorales evaden la muerte mediante múltiples mecanismos entre los que la sobreexpresión de transportadores de salida es una causa importante de resistencia (Szakács et al., 2006). Los transportadores de salida son capaces de expulsar al exterior celular una amplia variedad de sustratos, lo que resulta en una concentración intracelular subóptima de fármaco y por ende una falta de eficacia del mismo (Harris y Hochhauser, 1992). Por otro lado, hay que hacer mención también a que los tumores se caracterizan por tener un inadecuado suministro de sangre y una elevada presión del líquido intersticial. Como resultado, el transporte en el tumor se encuentra altamente obstaculizado (Jain y Stylianopoulos, 2010).

1.4.1.1 Transportadores de salida o bombas extrusoras de fármacos

La mayoría de los agentes quimioterapéuticos poseen dianas intracelulares. Por lo tanto, para matar a las células tumorales, tienen que acumularse en el interior celular a unas concentraciones suficientes. Un importante obstáculo para que se produzca la acumulación necesaria de fármaco es la presencia, en la membrana de las células tumorales, de transportadores de salida (Fletcher et al., 2010; Kruh y Belinsky, 2003). Las bombas de eflujo de fármacos pertenecen a la familia de transportadores ABC (ATP-binding cassette). Los transportadores ABC son una de las más grandes superfamilias de proteínas. El genoma humano codifica para 48 proteínas ABC. Estas incluyen 20 proteínas de transporte, divididas en 7 subfamilias, ABC A-G (Dean et al., 2001). Algunos de los transportadores más importantes y mejor estudiados incluyen ABCB 1 [Glicoproteína P (P-gp), proteína 1 de multiresistencia a drogas (MDR1)], ABCC 1-3 [proteína de multiresistencia a drogas (MRP) 1-3], y ABCG 2 [proteína de resistencia del cáncer de mama (BCRP)]. P-gp fue el primer transportador de eflujo descubierto (Dano, 1973; Juliano y Ling, 1976). Kartner et al. (1983) demostraron la correlación entre el aumento de la expresión de P-gp en células tumorales y el desarrollo de resistencia a fármacos antineoplásicos (Kartner et al., 1983). Ueda et al. (1987) demostraron que la expresión de ADNc de longitud de completa para el gen MDR1 humano confiere resistencia a fármacos en células tumorales, confirmando el rol que juega el gen MDR1 en la resistencia. Más tarde se descubrió que algunas células tumorales que no poseen regulación de la expresión génica de P-gp podían también activar el eflujo de fármacos. Esto llevó al descubrimiento de MRP1 (McGrath y Center, 1988). Desde entonces, han sido identificados transportadores adicionales y su papel en la expulsión de fármacos ha sido investigado (Dean et al., 2001). De éstos, P-gp es uno de los transportadores más sobreexpresados en tumores resistentes (Gottesman, 2002).

En condiciones fisiológicas normales, los transportadores de salida son ampliamente expresados en el organismo (Leslie et al., 2005). Algunos órganos

muestran una elevada expresión de éstos. Así por ejemplo, P-gp, BCRP y MRP 2 son altamente expresados en la parte apical del pulmón, testículos, placenta y cerebro. Por otro lado, MRP 1 es altamente expresado en la zona basolateral de estos órganos (Chandra y Brouwer, 2004; Cordon-Cardo et al., 1990; Maliepaard et al., 2001; Peng et al., 1999; Scheffer et al., 2002; Szakacs et al., 2006; Wright et al., 1998). Estos transportadores crean una barrera formidable que protege a estos órganos de xenobióticos tóxicos. Como consecuencia, desempeñan también un papel clave en la alteración de la absorción, distribución, metabolismo y excreción de los fármacos antineoplásicos (Roger et al., 2012; Schinkel, 1997; Schinkel et al., 1994).

Existe una evidencia considerable que une la existencia de células resistentes con un mal pronóstico del cáncer (Baldini et al., 1995; Gregorcyk et al., 1996). Evidencias del papel de P-gp en tumores resistentes fueron proporcionadas por primera vez por Trock et al. (1997), quienes demostraron expresión de P-gp en aproximadamente el 40% de muestras de cáncer de mama y su correlación con la disminución de respuesta al tratamiento. Estudios adicionales (Agarwal y Kaye, 2003; Persidis, 1999; Szakács et al., 2006) confirmaron esta observación, y además sugirieron que la expresión de P-gp es un gran predictor de respuesta clínica en quimioterapia (Chintamani et al., 2005). Karaszi et al (2001) examinaron la respuesta a la quimioterapia en 93 pacientes con leucemia aguda. Estos pacientes fueron tratados con diferentes terapias en función del subtipo de enfermedad. Los pacientes fueron clasificados en dos grupos: con células resistentes y con células sensibles. Así, se encontró que el 72% de los pacientes con células sensibles respondió a la terapia, mientras que sólo el 31% de los pacientes con células resistentes lo hizo.

1.4.1.2 Resistencia intrínseca y adquirida

La resistencia intrínseca y adquirida puede ser debida a mecanismos que no implican transportadores de salida. Esto es especialmente evidente con fármacos clasificados como “terapias dirigidas” (Ellis y Hicklin, 2009). Estos medicamentos son dirigidos a vías específicas celulares que son necesarias para la supervivencia de las células tumorales. Por ejemplo, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) está sobreexpresado en múltiples cánceres. La activación de EGFR da lugar a la activación de múltiples quinasas que ayudan al crecimiento y supervivencia del tumor. Por lo tanto, los antagonistas que bloquean la señalización de EGFR son de considerable interés (Ono y Kuwano, 2006). Sin embargo, este interés ha disminuido por la aparición de resistencias adquiridas e intrínsecas (Bianco et al., 2005). Tras la continua exposición a antagonistas de EGFR, las células tumorales recurren a vías alternativas que permiten la supervivencia y proliferación, independientemente de la activación de EGFR (Ware et al., 2010). Así, a pesar de la inhibición de EGFR, no hay ningún efecto sobre la viabilidad de la célula tumoral. Por otro lado, algunos tumores no dependen de la señalización EGFR. Estos tumores son intrínsecamente resistentes a terapias dirigidas EGFR.

1.4.1.3 Detoxificación celular

La detoxificación intracelular es otro mecanismo de resistencia. Este mecanismo permite la eliminación del fármaco del interior celular, reduciendo así la concentración

intracelular (Balendiran et al., 2004). El conjugado de glutatión es un ejemplo de estrategia de detoxificación empleada por las células tumorales (Tew, 1994; Townsend y Tew, 2003). Mellish et al. (1993) mostraron que este mecanismo puede ser aumentado en respuesta a la exposición a agentes quimioterapéuticos (Mellish et al., 1993). Así pues, los autores demostraron que una línea celular resistente a Cisplatino tenía niveles más altos de glutatión y una concentración intracelular de fármaco menor (Mellish et al., 1993).

Numerosos agentes quimioterapéuticos inducen daños en el ADN, lo que produce la muerte celular. Sin embargo, las células tumorales pueden desarrollar mecanismos para incrementar la reparación del ADN y por tanto desarrollar resistencia a estos fármacos (Kaina y Christmann, 2002; Martin et al., 2008; Zamble y Lippard, 1995).

1.4.1.4 Captación de fármacos en orgánulos ácidos

Además de las bombas de expulsión, la captación de fármacos antineoplásicos en orgánulos ácidos puede reducir su disponibilidad en los sitios de acción intracelular. Antraciclinas como la doxorubicina y daunorrubicina se acumulan en el núcleo de las células sensibles, que es su sitio de acción. En las células resistentes, estos fármacos, de carácter básico, son distribuidos principalmente en orgánulos ácidos como son los endosomas tardíos y los lisosomas (Breuninger et al., 1995). La elevada actividad de la bomba vacuolar H^+ -ATPasa en las células resistentes conduce a aumentar el pH ácido de estos orgánulos (Ma y Center, 1992; Martínez-Zaguilan et al., 1999). Los medicamentos básicos son altamente ionizados en estas condiciones. Así pues, estos fármacos quedan atrapados en estos orgánulos y por consiguiente se produce la pérdida de actividad. La expulsión del fármaco se lleva a cabo por mecanismos de exocitosis (Raghunand et al., 1999).

1.4.1.5 Resistencia al transporte de macromoléculas y transportadores de fármacos

Además de las células tumorales, la matriz extracelular del tumor es una causa más de resistencia a la quimioterapia. El transporte de fármaco al interior del tumor es muy ineficiente (Jain, 1998; Tredan et al., 2007). Esto da lugar a regiones con alta y baja concentración de fármaco en el tumor (Primeau et al., 2005). Las regiones que reciben menor concentración de agentes antineoplásicos a menudo albergan las células tumorales más agresivas (Milane et al., 2011). Por tanto, es muy importante conseguir en estas regiones, insuficientemente suministradas, las concentraciones necesarias.

1.4.2 Mecanismos específicos de resistencia tumoral

Los fármacos antineoplásicos son una pieza clave en el tratamiento del cáncer. Sin embargo, con el paso del tiempo las células cancerígenas son capaces de adquirir resistencia a estos medicamentos, siendo capaces de seguir creciendo y propagándose. Dependiendo del fármaco se desarrollarán mecanismos específicos. Se describe a continuación los mecanismos conocidos de resistencia a cisplatino y bleomicina, empleados en este trabajo.

1.4.2.1 Mecanismo de resistencia a cisplatino

Los mecanismos implicados en la resistencia a cisplatino incluyen la disminución de la entrada celular del fármaco y aumento de la extrusión, activación de sistemas de detoxificación, alteración de las dianas celulares, incremento de la reparación del ADN, alteración de la apoptosis y alteración de la expresión de oncogenes (Chao, 1996; Dempke et al., 2000; Siddik, 2003; Stewart 2007). Los cambios provocados por la selección a Cisplatino en las células resistentes implican una complejidad añadida que puede incluir alteraciones en la sensibilidad a los factores de crecimiento y hormonas, transporte de iones, transporte y utilización de nutrientes, y metabolismo del timidilato, vías de señalización de oncogenes y proteína quinasa, estructura cromosómica, y en la expresión génica. Durante la década pasada, se han descrito algunos genes específicos implicados en estas vías, que juegan un papel crucial en la regulación de las células en respuesta a Cisplatino (Fig. 15) (Klein et al., 2001). Así, la entrada de Cisplatino a la célula está regulada por SLC31A1 (CTR1), mientras que la salida por ABCC2 (MRP2), ATP7A, y ATP7B. Una vez que el Cisplatino está dentro de la célula el mecanismo de acción es la formación de aductos Pt-DNA, lo que detiene el ciclo celular y conduce a la apoptosis, como ya se ha descrito anteriormente. Los genes implicados en la reparación del ADN (MSH6 y MLH1 por desapareamiento de bases “mismatch repair”; XRCC1, ERCC1, ERCC2, y XPA para la reparación por excisión de nucleótidos; HMGB1 para el reconocimiento de aductos de Pt-ADN) disminuyen la sensibilidad de las células al Cisplatino. Genes relacionados con la detoxificación [mieloperoxidasa (MPO), superóxido dismutasa 1 (SOD1), glutatión S-transferasa M1 (GSTM1), NAD(P)H: quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), glutatión S-transferasa P1 (GSTP1) y metalotioneínas (MT)] son también responsables de la disminución de la concentración intracelular de este fármaco, y por tanto desempeñan un papel importante en la resistencia. Además, las variantes de la ADN polimerasa POLH y POLB, que normalmente están implicadas en la replicación translesional del ADN, proporcionan tolerancia a medicamentos basados en Cisplatino, y por tanto, son determinantes en la respuesta celular a este fármaco (Klein et al., 2001).

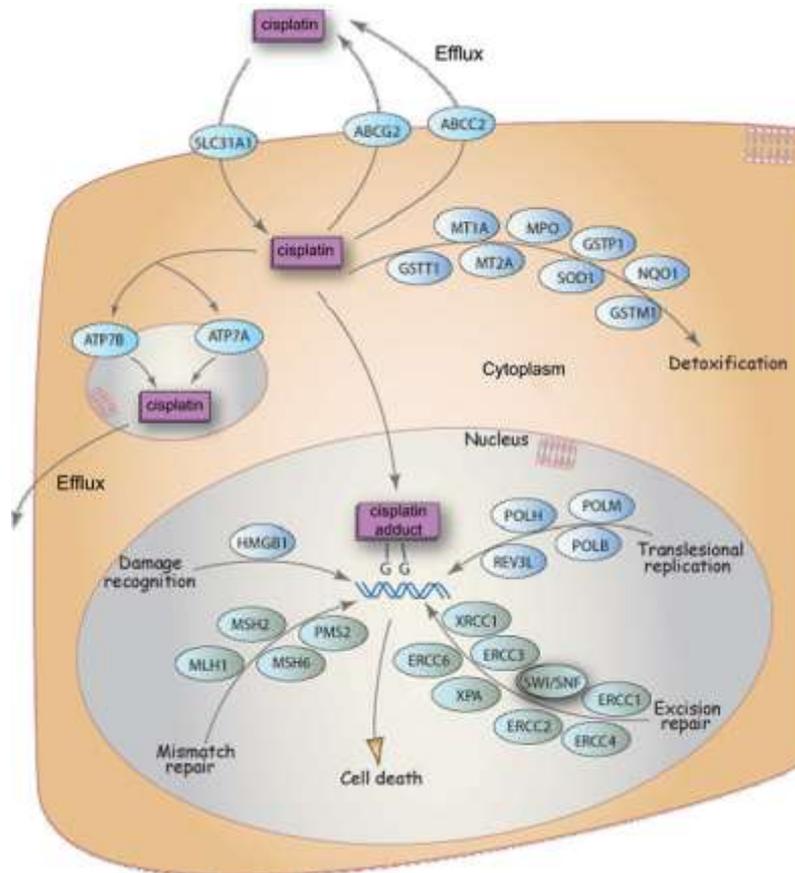


Fig. 15. Vías farmacocinéticas de resistencia a Cisplatino.

Los genes NAPA, CITED2, CABIN1, ADM, HIST-1H1A, EHD1, MARK2, PTPN21 y MVD son genes de resistencia a Cisplatino (CPR) (Tabla 1). Estos genes poseen la capacidad de modificar la respuesta al fármaco en células no tumorales y en células embrionarias de riñón humano HEK293 (Wu et al., 2010). Así pues, células con niveles bajos de expresión de genes CPR se encuentran protegidas frente a la apoptosis inducida por Cisplatino. Lu y Chao (2012) proponen que los genes CPR anteriormente citados pueden ser candidatos potenciales para prevenir la resistencia a cisplatino en los nuevos protocolos específicos de quimioterapia.

Entre los genes CPR anteriormente citados, sólo el ADM es una proteína extracelular, mientras que cinco productos génicos (EHD1, MARK2, MVD, NAPA y PTPN21) son citoplasmáticas y tres (CABIN1, CITED2 y HIST1H1A) son proteínas nucleares. ADM representa un factor antiapoptótico en diferentes líneas celulares así como “*in vivo*” (Kaafarani et al., 2009; Shichiri y Hirata, 2003). ADM disminuye la expresión de p300, que regula muchos factores de transcripción. Esta disminución puede ser una diana terapéutica para contrarrestar la resistencia a cisplatino. Sus resultados también indican que, NAPA y CITED2 pueden desempeñar un papel importante en la resistencia adquirida a este fármaco (Wu et al., 2010; Wu y Chao, 2010). Por otro lado, en la regulación de la resistencia por ambas proteínas está implicada también la proteína p53.

Tabla 1. Niveles de sobreexpresión de genes CPR en células HeLa resistentes a cisplatino evaluados por chips de ADN (microarrays).

Gene Symbol (RefSeq ID)	Function	R1/HeLa	R3/HeLa
NAPA (NM_003827)	Intracellular transport	2.02±0.33*	7.18±3.11*
CITED2 (NM_006079)	Regulation of transcription	2.58±0.11*	4.38±0.53*
CABIN1 (NM_012295)	Calcineurin binding protein	3.75±0.24*	4.66±0.27*
ADM (NM_001124)	C21-steroid hormone biosynthesis	4.81±0.02*	4.16±0.06*
HIST1H1A (NM_005325)	Histone cluster	4.57±2.93*	7.21±6.26*
EHD1 (NM_006795)	EH-domain containing	2.25±0.13*	4.48±0.87†
MARK2 (NM_004945)	Kinase phosphorylation	2.27±0.52*	4.02±1.28*
PTPN21 (NM_007039)	Tyrosine phosphatase	2.32±0.01*	4.07±1.06*
MVD (NM_002461)	Cholesterol metabolism	2.72±0.21*	4.20±0.84†

Abbreviations: *: $p < 0.05$; †: $p < 0.01$; R1: Moderate resistance; R3: High resistance.

1.4.2.2 Mecanismo de resistencia a Bleomicina

La resistencia a bleomicina constituye una gran preocupación en la clínica. Normalmente ocurre en la recidiva de tumores de células germinales, donde es más comúnmente usado. Aunque el mecanismo por el que se produce la resistencia no está del todo claro, existen diversas posibilidades por las que se puede producir este fenómeno: a) alteración de la entrada y salida celular de bleomicina (Bokemeyer, 2008; Pron et al., 1994); b) mayor capacidad de reparación del daño del ADN inducido por Bleomicina (Bokemeyer, 2008; Pron et al., 1999; Tuimala et al., 2002); c) incremento del metabolismo de inactivación de bleomicina (Tuimala et al., 2002; Robertson et al., 2001; Liu et al., 2011).

a) Alteración de la entrada y salida celular de bleomicina.

Existen evidencias de que los transportadores multifármacos son un mecanismo de resistencia a la Bleomicina. En las células de mamíferos, el elevado número de transportadores de membrana ABC, tales como MDR1 y MRP1, son conocidos por incrementar el flujo de salida celular de los agentes quimioterapéuticos. De esta forma permiten que las células tumorales y también las células normales evadan la citotoxicidad inducida por el fármaco (Dean et al., 2001; Gottesman et al., 1995). Hasta ahora, no existen evidencias convincentes de la participación de las bombas de eflujo MDR1 y MRP en la resistencia a Bleomicina (Chen et al., 1994). Asimismo en levaduras, varios transportadores ABC bien estudiados no muestran participación en el eflujo de bleomicina (Decottignies y Goffeau, 1997; Ramotar y Masson, 1996). Así pues, es poco probable que estas bombas de eflujo de fármaco jueguen un rol importante en la resistencia a este agente antineoplásico, aunque no se descarta la existencia de otro mecanismo similar.

El transportador de cobre, Ctr1, es el responsable del transporte de Cisplatino al interior de células de levaduras y células de mamíferos (Ishida et al., 2002). Sin embargo, ni Ctr1 ni otros transportadores de iones metálicos en levaduras están implicados en el transporte de Bleomicina (Aouida y Ramotar, 2006).

Los mecanismos de entrada de bleomicina en la célula no están del todo determinados. Aouida et al., (2004a) muestran que la bleomicina entra al interior de la célula proporcionalmente a la concentración y al tiempo, y que este proceso necesita la síntesis de nuevas proteínas.

El gen *Agp2* codifica un transportador de membrana de L-carnitina (van Roermund et al., 1999). Aouida et al. (2004b) han demostrado que mutantes de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en los que se suprime este gen son deficientes en el transporte de Bleomicina. Además, la sobreexpresión de *Agp2* incrementa la entrada del fármaco, resultando en un daño severo al genoma y conduciendo a la muerte celular de forma rápida. Así pues, *Agp2* muestra especificidad de sustrato por bleomicina, y la modulación de su actividad afecta a la resistencia a este fármaco.

Por otro lado, está demostrado que las proteínas quinasas *Ptk2* y *Sky1* controlan la actividad transportadora (Schmidt et al., 1998; Goossens et al., 2000). De hecho, *Ptk2* es un regulador de la bomba de protones *Pma1* en levaduras (Goossens et al., 2000). Además, *Ptk2* y *Sky1* están involucrados independientemente en el transporte de poliaminas en levaduras (Erez y Kahana, 2001; Kaouass et al., 1997). Como tal, es claramente posible que *Ptk2* y/o *Sky1* puedan también regular la actividad de *Agp2*.

Aouida et al., (2004a) muestran que el transporte de bleomicina se reduce considerablemente en mutantes en los que se ha suprimido el gen *Ptk2*, el cual codifica una quinasa que regula positivamente el transporte de poliaminas. Sus resultados sugieren que la bleomicina y la espermina puedan utilizar un mecanismo de transporte común. Por otro lado, sus estudios muestran que la bleomicina se acumula en vacuolas, y que esta distribución se altera en mutantes deficientes en la vía endocítica, causando hipersensibilidad al fármaco en estos mutantes. Eso es así ya que al interrumpir la vía endocítica el fármaco se acumula en el citoplasma pudiendo difundir rápidamente al núcleo y atacar al ADN. Así pues, estos resultados indican que la Bleomicina es transportada activamente a través de la membrana plásmica de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y dirigida a la vacuola, dónde podría servir como primera línea de defensa al almacenar el fármaco para su detoxificación, previniendo así su citotoxicidad.

Están identificados en humanos dos transportadores L-carnitina de alta afinidad, CT2 y OCTN2 (Enomoto et al., 2002; Tamai et al., 1998). Por tanto, es posible que CT2 y/o OCTN2 también puedan actuar como transportadores de bleomicina. Es interesante que CT2 se expresa exclusivamente en testículo humano, mientras que OCTN2 se expresa fuertemente en riñón, músculo esquelético, corazón y próstata (Enomoto et al., 2002; Tamai et al., 1998). El hecho de que CT2 se exprese exclusivamente en testículo y que el cáncer testicular tenga una elevada tasa de curación con bleomicina es notable y llamativo; ofreciendo un fuerte apoyo a que CT2 podría ser un transportador de bleomicina en humanos. Debido a que la resistencia a fármacos antineoplásicos depende de los transportadores, siendo un problema frecuente en la terapia clínica, es posible que pacientes que desarrollan resistencia a bleomicina puedan tener defectos en CT2. Investigaciones realizadas por Sanz et al. (2002) demuestran que una forma dominante negativa del homólogo de *Sky1* en mamíferos (*SRPK1*) confiere resistencia a bleomicina en fibroblastos de pulmón de ratones chinos y en células HeLa, pero no a otros agentes que dañan al ADN, como por ejemplo el Cisplatino. Así, La inactivación de *SRPK1* induce resistencia a Cisplatino en una línea celular cancerígena de ovario humano (Schenk et al., 2001). La interrupción de *SKY1* por lo tanto, daría lugar a la desregulación de los mecanismos de reparación y/o tolerancia a Cisplatino y, en consecuencia, conducir a la alteración de la sensibilidad al fármaco.

Esta explicación de genes homólogos de resistencia a bleomicina en humanos podría revelar nuevos mecanismos moleculares para mejorar las propiedades antitumorales de este fármaco (Aouida et al., 2004b).

b) Mayor capacidad de reparación del daño al ADN inducido por bleomicina.

Los organismos expuestos a bleomicina deben reclutar proteínas para reparar las lesiones producidas en el ADN con el fin de evitar los efectos mutagénicos del fármaco (Ramotar y Wang, 2003). Por tanto, es probable que un incremento de los niveles de enzimas reparadoras del ADN pueda contribuir a la resistencia tumoral a bleomicina. De hecho, hay estudios que demuestran que la sobreproducción de hApe/ref-1, que pertenece a la familia de enzimas que pueden reparar directamente las lesiones producidas en el ADN por bleomicina (Demple y Harrison, 1994; Johnson et al., 1998; Ramotar et al., 1991; Vance y Wilson, 2001), genera un incremento de 2-3 veces en la protección contra bleomicina en cáncer de testículo (Robertson et al., 2001).

El organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae* posee enormes ventajas para el estudio de estas enzimas, entre las que destacan: (i) un potente sistema genético que permite la rápida creación de genes nulos; (ii) una amplia base de datos de información disponible; y (iii) la capacidad de aislar genes humanos de enfermedades clínicamente relevantes mediante la complementación cruzada entre especies (Andrade et al., 1998; Bassett et al., 1996; Lashkari et al., 1997; Neff et al., 1999; Pereira, 1998; Phizicky y Fields, 1995; Steinmetz y Davis, 2000; Steinmetz et al., 2002).

Las enzimas Apn1, Apn2 y Tpp1 claramente actúan *in vitro* en procesar las lesiones inducidas por bleomicina (Aouida y Ramotar, 2006; Jilani y Ramotar, 2002; Jilani et al., 1999; Ramotar, 1997; Ramotar et al., 1991; Sander y Ramotar, 1997; Vance y Wilson, 2001). Estudios genéticos revelaron que mutantes que carecían de estas tres enzimas presentaban hipersensibilidad severa al fármaco (Ramotar, 1997; Vance y Wilson, 2001). Estos hallazgos muestran claramente que más de una de estas enzimas puede competir por reparar las lesiones inducidas por bleomicina *in vivo*. (Jilani y Ramotar, 2002; Jilani et al., 1999; Ramotar, 1997; Ramotar et al., 1991; Sander y Ramotar, 1997; Vance y Wilson, 2001).

c) Incremento del metabolismo de inactivación de bleomicina.

La hidrolasa de bleomicina (enzima inactivadora de este fármaco) es una proteasa de cisteína de la familia de la papaína. Se expresa en levaduras, bacterias, reptiles, aves y mamíferos. El mecanismo de acción de esta enzima se basa en la desaminación de la bleomicina con la consecuente inactivación del fármaco. Por tanto, carece de citotoxicidad siendo incapaz de actuar en el ADN. Se han observado elevados niveles de esta enzima en líneas celulares derivadas de tumores resistentes a bleomicina. Sin embargo, cuando estas líneas se tratan con el inhibidor específico de proteasas de cisteína E-64 (tras-epoxisuccinil-L-leucilamido-4-guanidino-butano), se sensibilizan al daño. Esto sugiere que la hidrolasa de bleomicina participa en el metabolismo y desarrollo de resistencia a este fármaco (Nuver et al., 2005; O'Farrell et al., 1999; Ramotar y Wang, 2003; Schwartz et al., 1999).

1.5 Envejecimiento

Se define como la pérdida gradual de función en los tejidos y órganos que componen un organismo, a consecuencia de la degradación de sus componentes a nivel molecular. Esto lleva asociado una menor fertilidad, mayor vulnerabilidad y susceptibilidad a enfermedades, tales como alteraciones del sistema inmune o tumores derivados de la desregulación de la proliferación celular, procesos degenerativos de carácter nervioso o muscular, y mayor mortalidad (Kirkwood, 2005). Es un proceso que incrementa la entropía como consecuencia de la interacción de la genética del individuo y su medio ambiente.

La evolución sigue un patrón que favorece la reproducción frente a la inmortalidad, por lo que los seres vivos se reproducen y posteriormente mueren. Así pues, una vez superado el umbral del periodo fértil, el deterioro prevalece sobre la síntesis y por tanto el organismo envejece.

No todos los individuos dentro de una misma especie envejecen por igual, lo que indica la existencia de condicionamientos genéticos con un fuerte componente ambiental. Esto pone de manifiesto la gran complejidad que posee el proceso de envejecimiento.

Algunos autores consideran que en humanos el envejecimiento se empieza a manifestar en torno a los 30 años, que es el momento de máxima vitalidad (Rodes Texidor y Guardia Massó, 1997).

El envejecimiento es un proceso irreversible equiparable a la segunda ley de la termodinámica, que hace referencia a la entropía. Es un proceso en el que va aumentando la entropía interior y por ende el desorden, lo que lleva a la alteración de la homeostasis. Esto da lugar a una disminución del bienestar, a la enfermedad, y tiene su fin en la muerte.

1.5.1 Tipos de envejecimiento

1.5.1.1 Del individuo

- a) **Cronológico:** entendido como el tiempo transcurrido desde el nacimiento (Austad, 2009).
- b) **Biológico:** es diferencial, es decir de órganos y funciones; también es multiforme ya que tiene lugar a distintos niveles: celular, molecular, tisular y sistémico, y a la vez es estructural y funcional. La edad biológica se corresponde a etapas en el proceso de envejecimiento biológico (Perls et al., 2002).
- c) **Psicológico:** conjunto de modificaciones que son resultado de acontecimientos vitales. Existen diferencias entre jóvenes y ancianos. Por un lado, a nivel cognoscitivo, que afecta en la forma de pensar y en las capacidades. Por otro lado, la psicoafectiva que actúa sobre la personalidad y el afecto (Finkel, 2000).
- d) **Social:** algunas variables sociales progresan con la edad, aunque sin seguir estrictamente la edad cronológica. Un ejemplo podría ser el ciclo de dependencia e independencia que afecta a individuos de avanzada edad (Christensen et al., 2009).

- e) **Fenomenológico:** se refiere a la percepción subjetiva de la propia edad, es decir, el sentimiento de haber sufrido cambios con la edad a la vez que se permanece en lo esencial (Sierra, 2009).
- f) **Funcional:** el estado funcional de las distintas edades es el resultado de la interacción de los elementos sociales, biológicos y psicológicos. Es seguramente el reflejo más seguro de la integridad del individuo a lo largo del envejecimiento (Martin y Oshima, 2000).
- g) **Envejecimiento exitoso:** se define como aquel con buena calidad de vida y que está libre de discapacidad. Únicamente es observada la disminución funcional asociada a la edad y donde ni la enfermedad ni los factores adversos o ambientales del estilo de vida complican o incrementan el deterioro. Así pues, hay una mayor reserva fisiológica y menor riesgo de enfermedad (Hildt, 2009).

1.5.1.2 Celular

- a) **Cronológico:** el envejecimiento cronológico se define como la capacidad que posee una línea celular de conservar su viabilidad en el transcurso del tiempo. Debido a sus características se usa como modelo biológico de estudio sencillo del envejecimiento en tejidos post-mitóticos (Fig. 16) (Austad, 2009).
- b) **Replicativo:** se define como el número de células hijas que una progenitora puede generar durante su vida. Debido a sus características se usa como modelo biológico de estudio del envejecimiento en tejidos mitóticamente activos (Fig. 16) (Nyström, 2007).

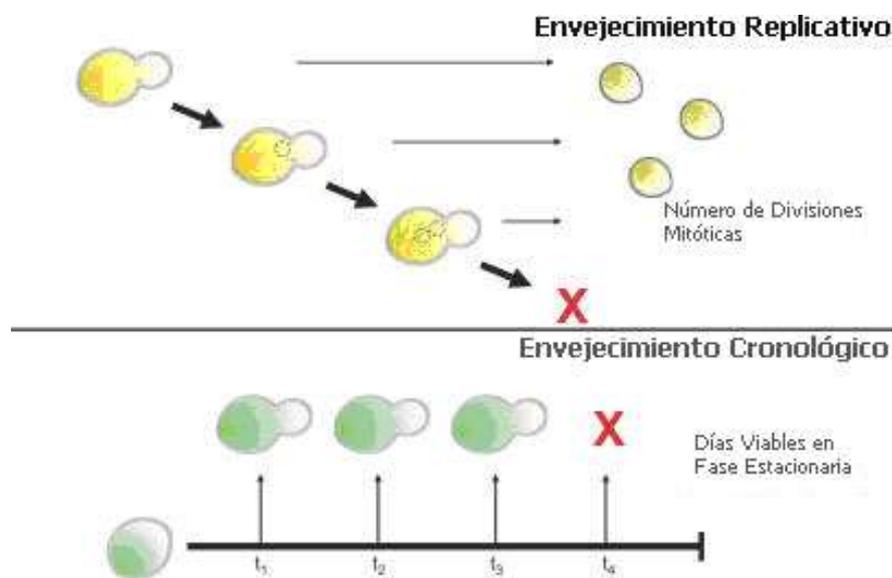


Fig. 16. Envejecimiento replicativo y cronológico.

1.5.2 Factores que afectan al envejecimiento

Las investigaciones realizadas indican que la longevidad alcanzada por un individuo depende en un 35% de la genética y en un 65% de los factores ambientales (estrés, modo de vida, hábitos, etc) (McGue et al., 1993) (Fig. 17).

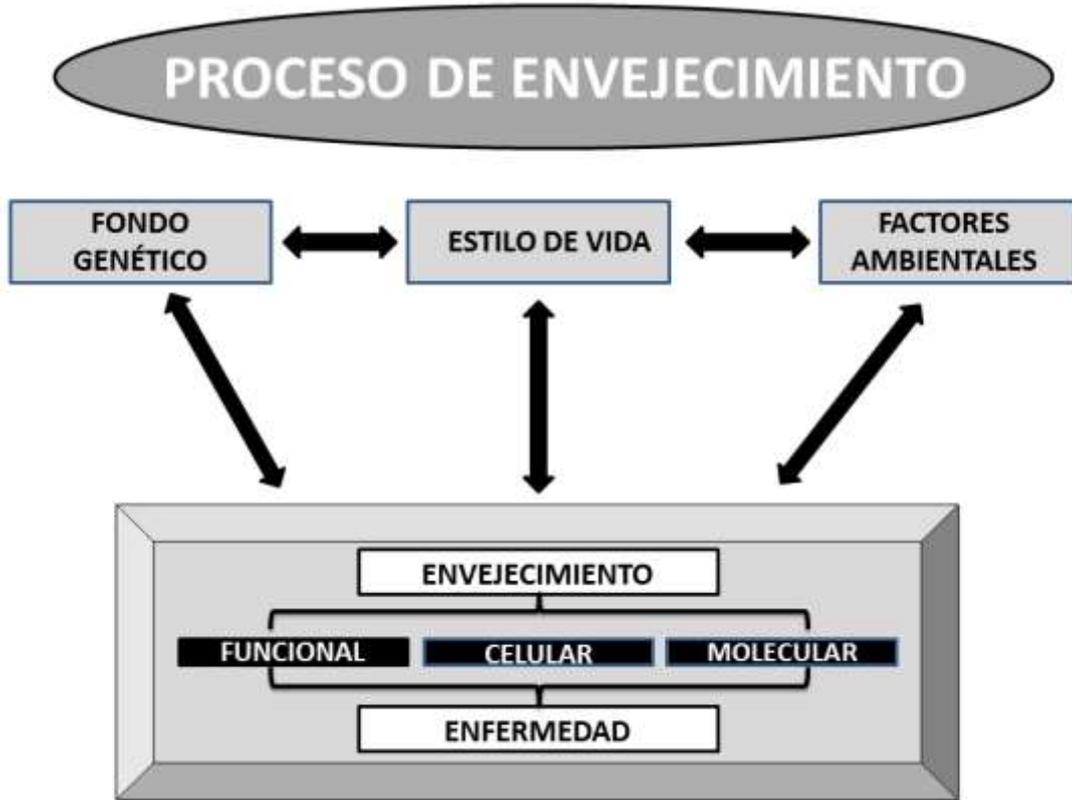


Fig. 17 Esquema del proceso de envejecimiento.

Según Bengtson y Schaie (1998), las teorías más importantes sobre las causas del envejecimiento se clasifican en dos grandes grupos en función de sus componentes ambientales o genéticos.

1.5.2.1 Componentes genéticos del envejecimiento

Todas las células poseen un sistema complejo que le permite sintetizar las moléculas necesarias para poder llevar a cabo su desarrollo. En los ácidos nucleicos (ADN y ARN) y en las proteínas está codificada toda la información y los mecanismos necesarios para lograrlo (Bengtson y Schaie, 1998).

a) Inestabilidad genómica

La acumulación de cambios en el genoma (cambios en el número de cromosomas, mutaciones puntuales, reordenamientos y pérdida de secuencias repetidas de ADN) son propuestos desde hace mucho tiempo como causas del envejecimiento. En modelos de ratas transgénicas se ha observado acumulación de mutaciones con la edad (Schachter,

1998). Estas variaciones se han observado también en hígado, que posee capacidad mitótica, pero no en cerebro, que es un órgano post-mitótico.

b) ADN mitocondrial y envejecimiento

La inestabilidad génica fuera del genoma nuclear también puede contribuir al proceso de envejecimiento (Salgado y Guillen, 1990). El ADN mitocondrial posee una tasa de mutación de 10-20 veces mayor que el ADN nuclear. Así pues, las mutaciones del genoma mitocondrial comprometen la función mitocondrial de distintas formas:

- Fallos en la cadena transportadora de electrones y en la fosforilación oxidativa pueden desencadenar una disminución de los niveles de ATP y de NAD/NADH; lo que desencadenará la pérdida de función fisiológica, efecto más aparente del envejecimiento (Salgado y Guillen, 1990).
- Fallos en el transporte electrónico pueden incrementar la producción de radicales libres por la mitocondria.
- Fallos mitocondriales asociados al envejecimiento podrían inducir apoptosis (Johnson, 1999).

Aunque las mutaciones en el genoma mitocondrial se acumulan y contribuyen al envejecimiento, no está del todo claro que sea su principal causa (Johnson, 1999).

1.5.2.2 Componentes ambientales del envejecimiento

En el envejecimiento juegan un rol importante los factores ambientales, y pueden definir procesos de envejecimiento muy distintos en individuos de una misma población. Los factores que más afectan son: tabaquismo, contaminación ambiental, excesiva exposición a la radiación solar o productos químicos, estrés, dieta, estilo de vida, ejercicio físico y enfermedades crónicas. Muchos de éstos llevan a cabo su efecto mediante el estrés oxidativo (DiGiovanna, 2000). Por otra parte, factores ambientales como la altura, el estrés físico o mental, el trabajo pesado, la falta de sueño y la alteración de los ritmos circadianos como consecuencia del trabajo podrían modular el envejecimiento.

1.5.3 Teorías del envejecimiento

Existen diversas teorías que explican el proceso de envejecimiento. En la tabla 2 se exponen, de forma breve las más relevantes. Cabe de destacar que no son excluyentes entre sí, sino que explican diferentes partes de un proceso multifactorial y además se complementan.

Tabla 2. Teorías sobre el envejecimiento.

TEORÍA	CONCEPTO
Teoría del desgaste	El cuerpo y sus células son dañadas por el uso excesivo y el abuso que ello provoca en el organismo (Warner et al., 1987).
Teoría neuroendocrina	Basada en la teoría del desgaste, pero focalizada hacía el sistema endocrino (Gavrilov y Gavrilova, 2006).
Teoría del control genético	La herencia genética es la responsable del envejecimiento y de la esperanza de vida (Bengtson y Schaie, 1998).
Teoría de acumulación de desechos	El exceso de desechos puede interferir en el funcionamiento normal de la célula, produciendo en última instancia la muerte celular (Gavrilov y Gavrilova, 2006).
Teoría de número limitado de divisiones celulares	El número de divisiones celulares se ve directamente afectado por la acumulación de productos de desecho de la célula (Bengtson y Schaie, 1998).
Teoría del límite de Hayflick	Las células humanas tienen una esperanza de vida limitada (Hayflick y Moorehead, 1980).
Teoría de la hormona de la muerte (DECO)	Envejecemos porque la pituitaria comienza a generar DECO que incrementa la tasa de metabolismo, acelerando el proceso de envejecimiento (Bengtson y Schaie, 1998).
Teoría de la estimulación del timo	La desaparición del timo contribuye al proceso de envejecimiento, al afectarse el sistema inmunitario (Goldberg et al., 2007).
Teoría mitocondrial	Las mitocondrias son dañadas fácilmente por los radicales libres (Wiley, 2007).
Teoría del error y la reparación	El sistema es incapaz de crear y reparar. La acumulación de moléculas defectuosas causa enfermedades y otros cambios con la edad (Warner et al., 1987).
Teoría del ADN redundante	Los errores acumulados en los genes son la causa del envejecimiento (Bengtson y Schaie, 1998).
Teoría de entrecruzamiento de enlaces.	Un sistema inmune viejo es incapaz de limpiar el exceso de glucosa en sangre. La glucosa causa enlaces cruzados y radicales libres (Warner et al., 1987).
Teoría autoinmune	Con la edad, desciende la capacidad del sistema para producir anticuerpos y distinguir entre anticuerpos y proteínas (Bengtson y Schaie, 1998).
Teoría de la restricción calórica	Una dieta baja en calorías pero alta en nutrientes, minerales y vitaminas retrasa el proceso de envejecimiento (Turner, 2003).
Teoría del índice de vida.	Nacemos con un límite de energía. Si usamos la energía lentamente, nuestro índice de envejecimiento es bajo. Si la energía se gasta rápidamente, envejecemos rápidamente (Bengtson y Schaie, 1998).
Teoría de la mutación genética	Las mutaciones aceleran el proceso de envejecimiento (Warner et al., 1987).
Teoría de la acumulación de mutaciones	La influencia de la selección natural disminuye con la edad (Sozou and Seymour, 2004).
Teoría de genes antagonistas	La selección natural ha favorecido a genes que confieren ventajas a corto plazo a costa del deterioro a lo largo de la vida (Sozou y Seymour, 2004).
Teoría del soma desechable	Mantener las células es costoso. Usar energía extra en incrementar la capacidad reproductiva resulta más rentable (Sozou y Seymour, 2004).
Teoría del orden y el desorden	Tras la maduración sexual, el sistema que mantiene el orden interno comienza a disminuir su eficacia, siendo el desorden o entropía la causa del envejecimiento (Bengtson y Schaie, 1998).
Teoría de la telomerasa	En cada proceso de división celular se produce un acortamiento de los telómeros que conlleva un daño celular y finalmente a la muerte celular asociada al envejecimiento (Bryan et al., 1998).
Teoría de los radicales libres	El sistema de defensa antioxidativo para atenuar los daños de los radicales libres, contribuye al proceso de envejecimiento (Yokozawa et al., 2004).

1.5.4 Genética del envejecimiento celular

Igual que para cualquier otra función del organismo, el envejecimiento está producido por la interacción de mecanismo moleculares, los cuales actúan simultáneamente (Pardue, 1999). Entre estos destacan:

- Acortamiento de telómeros como consecuencia de la supresión de la enzima telomerasa en las primeras etapas de la embriogénesis.
- Mediante la activación de un mecanismo relacionado con la edad se estimula la síntesis de proteínas de shock térmico.
- Supresión incompleta de la producción de enzimas que participan en la eliminación de ROS.
- Acumulación de mutaciones en el genoma de células somáticas. Hecho que conlleva a la formación de neoplasias, atrofia de tejidos y disminución funcional de órganos (Weng et al., 1997).

En la evolución humana, las alteraciones producidas en los sistemas como consecuencia del envejecimiento se desarrollan según la siguiente cronología: acortamiento de los telómeros, envejecimiento de mitocondrias, acumulación de mutaciones, expresión genética de la senescencia, atrofia apoptótica de los tejidos somáticos diana y atrofia apoptótica de los tejidos reproductivos femeninos (Bowles, 1998).

1.5.4.1 Genes implicados en el envejecimiento

En la década de los 90, se identificaron genes cuyas mutaciones tenían un efecto notable en la longevidad de organismos modelos como *Caenorhabditis elegans* y *Saccharomyces cerevisiae* (Hekimi et al., 2001; Kenyon, 1993). A partir de ahí, se han identificado en diversas especies decenas de genes, estudiando las funciones de las proteínas que codifican y relacionándolas con mecanismos que aceleran el envejecimiento; los cuales incrementan la longevidad o provocan enfermedades que, a su vez, afectan al envejecimiento o a la duración del ciclo vital.

a) Genes que influyen en la longitud de los telómeros

Los telómeros realizan una función de vital importancia en el mantenimiento de la estabilidad genómica. Los efectos de su mal funcionamiento producen un impacto importante en procesos vitales acelerando el envejecimiento o contribuyendo a la carcinogénesis (Blasco, 2005).

Los genes implicados en el acortamiento de los telómeros tienen un claro efecto en el envejecimiento. Personas que presentan enfermedades relacionadas con la edad como Alzheimer, aterosclerosis, demencia vascular y diversos tipos de cáncer poseen telómeros más cortos (Von Zglinicki et al., 2000; Wu et al., 2003). La longitud de los telómeros sigue un patrón hereditario (Slagboom, 1994). Las mutaciones que afecten a la longitud pueden tener efecto sobre la esperanza de vida.

hTR es el gen que codifica el componente ARN de la telomerasa. Si está mutado puede causar disqueratosis congénita. Sigue un patrón autosómico dominante que lleva a un acortamiento de los telómeros. También se transmite por un patrón de herencia recesivo ligado al cromosoma X y se produce por una mutación (gen DKC1) en una

ribonucleoproteína nuclear pequeña asociada con la telomerasa llamada “disquerina” (Hoareau-Aveilla et al., 2008; Kirwan y Dokal, 2009; Walne y Dokal, 2009), que interviene en la biosíntesis del ARN ribosomal y en el ensamblaje de las subunidades de los ribosomas; la alteración de este proceso fisiológico ocasiona insuficiencia regenerativa de la piel, uñas y médula ósea y aumenta el riesgo de padecer cáncer.

b) Gen XPD

Este gen codifica una enzima ADN helicasa que está implicada en la transcripción y en procesos de reparación del ADN.

Una mutación en este gen produce una considerable disminución en la esperanza de vida de ratones y también aparición de efectos fenotípicos característicos de una vejez precoz como puede ser prematura pérdida de pelo, osteoporosis y pérdida de fertilidad femenina (De Boer et al., 2002).

c) Gen p53

Este gen codifica a la proteína p53, la cual está implada en la supresión tumoral. P53 juega un rol muy importante en la regulación de la división celular, en los procesos de apoptosis y en la respuesta al estrés medioambiental. Algo más del 50% de los cánceres humanos se encuentran asociados a mutaciones en este gen (Tyner et al., 2002).

Wei et al. (2006) muestran en estudios realizados en ratones que aquellos que poseen una copia buena del gen y otra mutada presentan elevada resistencia al cáncer; sin embargo, muestran signos de envejecimiento prematuro como son: pérdida de pelo y tejido adiposo subcutáneo, atrofia muscular y de diversos órganos, osteoporosis y reducción de un 25% en la esperanza de vida.

Así pues, la explicación según Hasty y Vijg (2002) podría ser por pérdida celular causada por apoptosis en los órganos de los individuos mutados. Siendo la pérdida mayor que los procesos de regeneración, lo que conduce a la degeneración de los órganos y a la pérdida de la homeostasis.

d) Sir2 y cromatina

El gen Sir2 se encuentra en casi todos los seres vivos. A mayores niveles de expresión de Sir2 mayor longevidad (Guarente, 2005; Guarente y Picard, 2005; Lin, 2002; Starai et al., 2002). El homólogo en humanos es Sirt1, que codifica para la proteína sirtuina 1. Está demostrado que el incremento de expresión de esta proteína reduce los efectos del envejecimiento e incrementa el ciclo de vida (Wang, 2014).

Las sirtuinas (proteínas del gen Sir) se encuentran relacionadas con el proceso de envejecimiento. Cuando son estimuladas con Resveratrol o por restricción calórica en la dieta, pueden ocasionar efectos positivos en la salud y en el proceso de envejecimiento (Sinclair y Guarente, 2006). Estas proteínas regulan los genes que deben permanecer desactivados (Fig. 18), por lo que ayudan a preservar la cromatina, favoreciendo que esos genes permanezcan desactivados y no se transcriban (Gallo et al., 2004).

Por otro lado, cuando el ADN se daña por luz ultravioleta o radicales libres, estas proteínas dejan su función de “guardianas” y ayudan a reparar el daño. Durante este tiempo, la cromatina puede empezar a desenredarse y los genes que estaban silenciados a transcribirse (Bitterman et al., 2003).

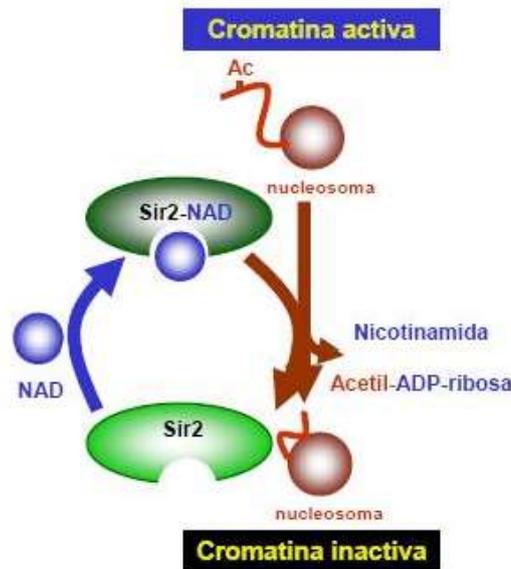


Fig. 18. Inactivación de la cromatina por Sir2.

Normalmente, estas proteínas retoman su función inicial antes de que se produzcan daños permanentes. No obstante, conforme el organismo va envejeciendo, el daño en el ADN va aumentando, por lo que las sirtuinas se alejan con mucha más frecuencia de sus principales dianas. Esto conlleva a la desregulación de la expresión genética, la cual se hace crónica (Warner, 2005). Conforme va pasando el tiempo se van acumulando daños en el ADN y estas proteínas poseen menos capacidad de regulación de la actividad genética, por tanto aparecen las características del envejecimiento.

e) Gen Daf-16 y genes FOXO

Daf-16 es uno de los genes implicados en el envejecimiento, la inmunidad y la resistencia al estrés. Este gen se encuentra activo en la mayoría de células del cuerpo y pertenece a un grupo de genes humanos llamados FOXO, que están relacionados con el envejecimiento (Amrit y May, 2010; Hsu et al., 2003).

Los individuos que poseen el genotipo GG del gen FOXO3A poseen fenotipos que los hacen más propensos a una vida longeva que los individuos con otros genotipos diferentes (Brunet, 2007).

Estudios realizados por Willcox et al. (2008) muestran que el genotipo FOXO3A está ligado a la longevidad, incrementando la probabilidad de que el individuo llegue sano a los 90 años. Está demostrado que la posición determinada de unas pocas pares de bases codifican un fenotipo más resistente.

f) Genes Myc

La familia de genes MYC está formada por los protooncogenes c-Myc, N-Myc y L-Myc, que se relacionan con diferentes neoplasias en humanos. Estos genes actúan como factores de transcripción y reguladores del ciclo celular e intervienen en la proliferación, apoptosis y diferenciación celular y en la inmortalización (Gustafson y Weiss, 2010). La actividad transcripcional de MYC está estrechamente ligada a la progresión del ciclo celular y la maquinaria metabólica necesaria para la proliferación celular (Dang, 2013; Meyer y Penn, 2008; Tansey, 2014). Myc también incrementa la síntesis de proteínas

(Brown et al., 2008) a través de genes como NLC (que codifica la nucleolina) la cual controla el ensamblaje de los ribosomas (Iritani y Eisenman, 1999).

Basado en el estricto control que Myc ejerce sobre los procesos celulares más relevantes en el envejecimiento y la reciente publicación que vincula directamente a Myc con la longevidad (Hofmann et al., 2015), las proteínas que regulan a Myc representan los moduladores potenciales del proceso de envejecimiento. Mtbp, cofactor transcripcional de Myc (Grieb et al., 2014), juega un rol importante en el envejecimiento.

Brian et al. (2016) han demostrado que la heterigocidad de Myc aumenta el ciclo de vida en ratones y retrasa el desarrollo de cáncer.

1.5.5 Relación entre genes de envejecimiento y genes de resistencia a fármacos antineoplásicos

La senescencia celular, que tradicionalmente ha sido asociada con el envejecimiento del organismo, ha surgido recientemente como un determinante clave relacionado con la quimioterapia del cáncer (Berns, 2002; Kahlem et al., 2004; Lowe et al., 2004; Schmitt et al., 2002; Shay y Roninson, 2004). Estudios realizados muestran que el nivel de estrés requerido para la inducción de senescencia es significativamente menor que aquel necesario para otras respuestas celulares, como la apoptosis o la necrosis (Chang et al., 2002; Rebbaa et al., 2003; Schmitt, 2003). De hecho, forzar a las células tumorales a la senescencia ha sido suficiente para la reversión de su fenotipo resistente (Zheng et al., 2004). Estos resultados sugieren que la deficiencia en la senescencia podría regular los primeros acontecimientos que controlan el desarrollo de resistencia a la quimioterapia. Por tanto, la identificación de genes antisenescencia podría tener una utilidad terapéutica potencial para la predicción y/o prevención de resistencia a fármacos antineoplásicos.

La actividad mejorada del gen regulador de información silente (Sir2) permitió descubrir que estaba asociado a un incremento de la longevidad en levaduras (Imai et al., 2000; Kaeberlein et al., 1999), gusanos (Hekimi y Guarente, 2003), moscas (Rogina y Helfand, 2004), y roedores (Cohen et al., 2004). El homólogo humano, Sirt1, también se ha descrito estar implicado en la longevidad, mediante la inhibición de la senescencia celular (Brunet et al., 2004; Cheng et al., 2003; Smith, 2002; Vaziri et al., 2001; Yeung et al., 2004).

Estudios realizados por Chu et al. (2005), en células tumorales de neuroblastoma, osteosarcoma, mama y ovario, resistentes y sensibles a fármacos antineoplásicos, sugieren que el aumento de la expresión de Sirt1 puede representar un fenómeno general asociado con la resistencia a la quimioterapia, independientemente del tipo celular o del fármaco usado para inducir resistencia. Además, tras analizar biopsias de tumores después de haber tratado a los pacientes con quimioterapia se han observado elevadas cantidades de Sirt1.

Sirt1 pertenece a la familia de las sirtuinas, que está compuesta por 7 miembros (Sirt1-Sirt7) (Frye, 2000). Chu et al. (2005) investigaron la posibilidad de que otras sirtuinas estuviesen implicadas en la resistencia. Así pues analizaron, mediante RT-PCR, células resistentes a cisplatino. Sus resultados muestran que la única sirtuina afectada es Sirt1 y no se observa variación en las demás. Por tanto, estos hallazgos sugieren que Sirt1 puede representar una molécula de respuesta al estrés, y tener relación con la quimioterapia.

Con el objetivo de determinar el nivel de estrés requerido para la expresión de Sirt1. Chu et al. (2005) trataron células de neuroblastoma con Doxorubicina, así pues sus resultados mostraron que el incremento de Sirt1 se producía sólo a bajas concentraciones del fármaco, lo que sugiere que solo el estrés leve podría activar la vía Sirt1. La respuesta celular fue bastante rápida ya que el incremento de Sirt1 se observó a las 24 horas del tratamiento con Doxorubicina. Otro hallazgo de interés fue la correlación de la expresión de Sirt1 con la del inhibidor del ciclo celular p21/WAF1 pero no con la activación de la Caspasa-3, lo que sugiere que Sirt1 puede ejercer su función protectora sólo en respuesta a niveles de estrés subletales. Por otro lado, una respuesta similar fue encontrada en células tumorales de ovario tratadas con Cisplatino. Estos hallazgos, le hicieron plantear la hipótesis de que Sirt1 puede ser un sustrato de la Caspasa-3. De hecho, observaron que al incubar Sirt1 recombinante con Caspasa 3 purificada, se detecta degradación a los 30 minutos. En conjunto, estos resultados muestran que Sirt1 se expresa en respuesta a niveles de estrés antiproliferativos; sin embargo, su función protectora puede perderse si las células son expuestas a estímulos inductores de apoptosis. La relación observada entre Sirt1 y p21/WAF1 parece estar a favor de la visión de que Sirt1 puede ejercer su función protectora por señalización para que se produzca una reducción en la tasa de proliferación, y permitir así la adaptación celular y supervivencia en un medio citotóxico.

La Glicoproteína P (P-gp) es una de las bombas de eflujo de fármacos más ampliamente descritas (Gottesman et al., 1995). Está codificada por el gen *mdr1*, superóxido dismutasa (SOD) (Blander et al., 2003; Meijer et al., 1987), y glutatión S-transferasa- π (GST- π), que cataliza la inactivación del fármaco (Doroshov et al., 1995). El Resveratrol, es un fenol que induce la actividad de Sirt1 y su función preotectora (Araki et al., 2004; Howitz et al., 2003). Chu et al. (2005) demostraron que al exponer células a este compuesto se producía un incremento de la expresión del gen *mdr1*, mejorándose la actividad del promotor.

La sobreexpresión ectópica del gen Sirt1 en células está acompañada de una fuerte expresión del gen *mdr1*, incrementándose la actividad del promotor de *mdr1*, igual que la inducción de expresión de la P-gp. Además células transfectadas con el gen Sirt1 muestran resistencia a doxorubicina. Estos datos, proporcionan pruebas concluyentes de que la expresión del gen *mdr1* puede estar controlada por Sirt1 (Chu et al., 2005).

1.6 Marcadores moleculares

1.6.1 Marcadores moleculares de envejecimiento celular

Hasta la fecha, aún no ha sido identificado un buen biomarcador de envejecimiento. El análisis de un solo biomarcador para describir el complejo proceso de envejecimiento resulta imposible, ya que son muchos los factores que influyen en el proceso de envejecimiento. Por ello, es necesario usar un conjunto de marcadores con el fin de determinar la edad biológica. En términos generales debemos considerar: marcadores bioquímicos, marcadores inmunológicos y marcadores genéticos.

En la tabla 3 se resumen los principales marcadores de envejecimiento.

Tabla 3. Principales marcadores de envejecimiento.

Proceso biológico subyacente	Posible biomarcador	Cambio con la edad	Validado en estudios		
			Cultivo celular/ Animales	Humanos	
				Transversal	Longitudinal
Estrés oxidativo	8-OHdG (ADN)	Aumento	+	+	-
	MDA	Aumento	+	+	-
	HNE	Aumento	+	+	-
	Grupos carbonilo (proteínas)	Aumento	+	-	-
Glicación de proteínas	CML	Aumento	+	+	-
	Pentosidina	Aumento	+	+	-
Inflamación	IL-6	Aumento	+	+	+
Telómeros	Longitud de los telómeros	Disminución	+	+	-
Hormonas	Hormona del crecimiento	Disminución	+	+	-
	IGF-1	Disminución	+	+	-
	DHEA	Disminución	+	+	+
	Estrógenos	Disminución	+	+	+
	Testosterona	Disminución	+	+	-

La investigación en marcadores de envejecimiento es necesaria ya que, desafortunadamente, la gran mayoría de los marcadores anteriormente descritos están relacionados además de con la edad, con diversas enfermedades. Por ello, ninguno de ellos puede ser considerado como un marcador de envejecimiento exclusivo.

1.6.1.1 Marcadores bioquímicos

a) Marcadores de estrés oxidativo

La teoría de los radicales libres plantea que la producción intracelular de ROS provoca un daño en las macromoléculas biológicas, hecho que conlleva a una disminución de las funciones vitales y al envejecimiento. Los radicales libres ejercen su acción sobre los ácidos nucleicos (particularmente en el ADN), las proteínas y las membranas (Gruber et al., 2008).

- Oxidación de los ácidos nucleicos

La 8-hidroxi-2'desoxiguanosina (8-OHdG) constituye uno de los principales marcadores del daño oxidativo a los ácidos nucleicos. Se forma cuando las ROS actúan sobre el ADN. La 8-OHdG altera la expresión génica al inhibir la metilación y ejerce también un efecto mutagénico al unirse a la adenosina en vez de a la citosina durante la replicación del ADN. Los niveles de 8-OHdG se encuentran relacionados inversamente con el período de vida media de los mamíferos y aumentan con la edad, de forma especial en el ADN mitocondrial.

- Oxidación proteica

La reacción entre las ROS y las proteínas puede alterar su estructura y, por ende, su función. Los grupos carbonilo se forman por la oxidación de las cadenas laterales de

varios aminoácidos, principalmente lisina, arginina, prolina y treonina. Así pues, estos grupos constituyen uno de los principales marcadores de la oxidación proteica. El sistema proteosomal degrada las proteínas que están ligeramente oxidadas. Sin embargo, las proteínas fuertemente oxidadas forman entrecruzamientos covalentes y agregados haciéndolas bastante resistentes a la proteólisis, acumulándose por tanto en las enfermedades y en el envejecimiento (Simm et al., 2008).

- **Peroxidación lipídica**

La peroxidación de los lípidos de las membranas celulares lleva a modificaciones en las propiedades biológicas de éstas. Los productos de este proceso son usados como biomarcadores de daño oxidativo. Los F2-isoprostanos se encuentran entre los principales marcadores. Son isómeros químicamente estables producidos por peroxidación no enzimática del ácido araquidónico. También, la peroxidación lipídica forma otros productos como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), los cuales forman aductos con ácidos nucleicos y proteínas que son mutagénicos y citotóxicos. Con la edad aumenta la concentración plasmática de MDA y HNE, hecho que indica que el proceso oxidativo se acelera en el envejecimiento (Gil et al., 2006).

b) Glicación de proteínas

La glicación de proteínas se encuentra estrechamente relacionada con el estrés oxidativo. La glucosa o la fructosa pueden reaccionar, de forma no enzimática, con los grupos $-NH_2$ de las proteínas, en especial con los grupos aminos de la cadena lateral de lisina, arginina e histidina, para formar bases de Schiff. Los aductos formados se reorganizan para formar los compuestos de Amadori, que son más estables, y representan un paso inicial en el proceso de glicación. En pasos siguientes, reacciones de deshidratación, condensación, oxidación y ciclación llevan a la formación de los productos finales de glicación avanzada (AGEs), como por ejemplo carboximetil-lisina (CML) y la pentosidina (Méndez, 2003). Los AGEs tienen la capacidad de formar enlaces covalentes de entrecruzamiento con proteínas de la sangre y de los tejidos, modificando por tanto su función biológica.

La formación de radicales libres de oxígeno altamente reactivos es otro fenómeno que se produce durante la glicación proteica. Esto desencadena el estrés oxidativo, activan la respuesta inflamatoria e inician la respuesta del sistema inmune.

La acumulación de AGEs se correlaciona con la edad. Los AGEs contribuyen a la disminución de la actividad motora, la disminución del poder mental y de la respuesta inmune, incrementando con todo ello el proceso de envejecimiento (Simm et al., 2008).

c) Marcadores hormonales

En el proceso de envejecimiento participan diversas hormonas. Así pues, la secreción de GH (hormona del crecimiento) disminuye durante el envejecimiento (alrededor de un 14% cada 10 años después de los 20-25 años). La DHEA (dehidroepiandrosterona) es una hormona que actúa como precursora de las hormonas sexuales estrógenos y testosterona, y que a la edad de 25-30 años los niveles en sangre alcanzan un pico y bajan hasta un 10-20% de este nivel a los 80 años. La concentración de estrógenos baja radicalmente durante la menopausia. Con la edad se produce un descenso progresivo y gradual de los niveles de testosterona. Estas hormonas son las más relevantes (Simm et al., 2008).

1.6.1.2 Marcadores inmunológicos/inflamación

El sistema inmunológico representa uno de los sistemas que sufre un mayor deterioro con la edad.

a) Inmunidad innata celular: fagocitos y actividad NK

Los fagocitos y las células natural killer (NK) son los encargados de llevar a cabo la inmunidad innata. Durante el envejecimiento se produce un aumento en la adherencia de las células fagocíticas al endotelio vascular, y a otros tejidos; y de una disminución en la siguiente etapa del proceso fagocítico, la quimiotaxis. Todo ello es consecuencia de un aumento de la expresión de las moléculas de adhesión, como la molécula de adhesión celular vascular circulante 1 (cVCAM-1) y la molécula de adhesión intercelular circulante 1 (cICAM-1). Esto contribuye a incrementar el riesgo de infecciones en los ancianos (Alonso-Fernández y Fuente, 2008).

Existen estudios que manifiestan una evidente asociación entre el descenso en la actividad NK en ancianos y el aumento en la incidencia de enfermedades infecciosas.

b) Inmunidad adquirida: linfocitos

La inmunidad adquirida consta de un componente humoral (anticuerpos) y un componente celular (linfocitos T y B).

Con el paso de los años tiene lugar un descenso en el porcentaje y el número de células T vírgenes y un aumento recíproco de las células T maduras. También se observa una capacidad proliferativa menor en respuesta a un antígeno.

En los linfocitos B los cambios, que se producen con la edad, son menores que los que ocurren en los linfocitos T. Tiene lugar, al igual que en los linfocitos T, una disminución de su capacidad proliferativa, una modificación en la producción de anticuerpos (disminuyendo los neoanticuerpos y aumentando la producción de autoanticuerpos) y el descenso de poblaciones celulares como las células dendríticas plasmacitoides, con la consiguiente disminución en la producción de interferón alfa (IFN- α) (Alonso-Fernández y Fuente, 2008).

c) Citocinas

Con el envejecimiento tiene lugar un descenso en la producción y liberación de interleucina 2 (IL-2). En cambio, el incremento de interleucina 6 (IL-6) con la edad, además de otros factores proinflamatorios y de estrés oxidativo, pueden contribuir al desarrollo de enfermedades crónicas asociadas al envejecimiento. Los niveles del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) aumentan durante el proceso de envejecimiento. También implican una mortalidad mayor asociada a enfermedades cardiovasculares, procesos inflamatorios o demencias (Alonso-Fernández y Fuente, 2008).

1.6.1.3 Marcadores genéticos

Con el paso de los años se produce un acortamiento de los telómeros. Cuando se acortan demasiado pierden su capacidad protectora. Además de la división celular, el estrés oxidativo puede inducir también este acortamiento (von Zglinicki y Martin-Ruiz, 2005).

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se pueden usar para medir la longitud de los telómeros en los seres humanos. La longitud de los telómeros de las PBMCs disminuye en los seres humanos en 20-60 pb por año de edad. Los estudios transversales indican que este parámetro se puede usar como marcador biológico de envejecimiento. Sin embargo, estudios longitudinales contradicen esta circunstancia (von Zglinicki y Martin-Ruiz, 2005).

Por otro lado, se han publicado estudios de marcadores genéticos de vulnerabilidad al deterioro cognitivo en el envejecimiento. Variaciones en genes codificantes para apolipoproteínas E (APOE) y C1 (APOC1) y enzima convertidora de angiotensina I (ACE) parece que modulan algunos aspectos del funcionamiento cognitivo, estructura o actividad cerebral en el envejecimiento (Solé-Padullés, 2004).

- a) APOE: representa uno de los principales constituyentes de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) e interviene en el transporte y distribución del colesterol y otros lípidos. El gen de la APOE se localiza en el cromosoma 19 (19q23) y presenta tres alelos comunes ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$), que dan lugar a tres isoformas de la proteína (E2, E3 y E4). El alelo $\epsilon 4$ parece que ejerce un papel negativo en la memoria y favorece los cambios funcionales y estructurales próximos a la enfermedad de Alzheimer en personas sanas de edad avanzada. Sin embargo, el alelo $\epsilon 2$ podría ser un factor protector frente a la demencia en el envejecimiento (Adalbert et al., 2007; Solé-Padullés, 2004).
- b) APOC1: el gen de la apolipoproteína C1 (APOC1) se localiza en la misma región que el gen APOE. Un polimorfismo presente en su región promotora da lugar a dos alelos (A y B). Investigaciones realizadas demuestran que el alelo APOC1 A, con o sin la coexistencia del alelo $\epsilon 4$, supone un factor de riesgo genético para la enfermedad de Alzheimer (Solé-Padullés, 2004).
- c) ACE: forma parte del sistema renina-angiotensina (RAS), que se encuentra asociado a patologías vasculares. Existe un polimorfismo en el gen que codifica para la ACE. Se caracteriza por la ausencia o presencia de un fragmento de 287 pb en el intrón 16 del cromosoma 17 (17q23). La expresión del alelo D (ausencia del fragmento) se relaciona con hipertensión arterial, demencia tipo Alzheimer, enfermedades cardiovasculares y patologías cerebrovasculares (Solé-Padullés, 2004).

1.6.2 Marcadores moleculares de resistencia a fármacos antineoplásicos

Las investigaciones realizadas en oncología han permitido la identificación y caracterización de marcadores moleculares de resistencia a fármacos antineoplásicos. Esto supone un gran avance y permite la administración de quimioterapias personalizadas a los pacientes, suponiendo una mayor efectividad de los tratamientos.

Los éxitos notables en este campo de investigación incluyen, la sobreexpresión de la proteína HER2 como marcador molecular en pacientes con cáncer de mama tratados con Trastuzumab (Slamon et al., 2001), y la delección del exón 19 o la sustitución del exón 21 (L858R) en el gen EGFR, en pacientes con metástasis de cáncer de pulmón de células no pequeñas tratados con Erlotinib (Khozin et al., 2014). Sin embargo, no todos los tumores poseen alteraciones genómicas inducidas por los fármacos y/o terapias dirigidas disponibles. Por ejemplo, la mayoría de los casos de cáncer de páncreas que desarrollan mutaciones en el gen KRAS, no poseen terapia dirigida efectiva (Bournet et al., 2016). KRAS es un excelente biomarcador, la identificación de la proteína KRAS determina la respuesta a terapia dirigida con anticuerpos antiEGFR (Cetuximab y Panitumumab), de forma que si la proteína es normal predice respuesta al tratamiento, y si está mutada predice ausencia de beneficio del tratamiento.

Mientras que el uso de biomarcadores predictivos en otros tipos de terapias personalizadas del cáncer es algo común y usado, aún no existe un protocolo estandarizado para la quimioterapia. Esto es principalmente debido a la falta de pruebas convincentes en estudios de biomarcadores que apoyen su utilidad clínica (Besse et al., 2013; Hayes, 2014; Lustgarten et al., 2013). Actualmente existen evidencias para determinar la utilidad clínica de biomarcadores predictivos para terapias dirigidas (Hayes et al., 1996; Meric-Bernstam et al., 2015; Simon et al., 2009). Sin embargo y según la bibliografía, este enfoque no ha sido lo suficientemente utilizado para evaluar la utilidad clínica de los biomarcadores quimiopredictivos (Rao et al., 2016).

Numerosos estudios demuestran que la expresión de genes de reparación del ADN como ERCC1, β -tubulinas o las Topoisomerasas pueden predecir la respuesta a Platino, Taxanos y a otros agentes citotóxicos (Lee et al., 2010; Pfister et al., 2012; Stengel et al., 2010). Además, existen 7 biomarcadores que han sido evaluados en varios tipos de tumores por su papel predictor de respuesta a quimioterápicos, en tratamientos de primera línea, avanzados, metastásicos y adyuvantes. Estos son:

- ERCC1–Platino
- RRM1– Gemcitabina
- TUBB3– Taxanos
- TYMS–5-fluorouracilo (5-FU) / Capecitabina
- MGMT– Temozolomida
- TOP1–irinotecán/topotecán
- TOP2A–antraciclina

Los estudios preclínicos sugieren que la subexpresión de ERCC1 sensibiliza a las células tumorales frente a agentes de Platino, mientras que la sobreexpresión induce resistencia (Gao et al., 2010; Usanova et al., 2010). Investigaciones realizadas por Rao et al. (2016) a partir de análisis retrospectivos de biomarcadores de niveles I-III, en

NSCLC apoyan la evidencia del efecto quimiosensibilizador provocado por la subexpresión de ERCC1 y RMM1, en respuesta a tratamientos con Platino y Gemcitabina, respectivamente.

Estudios preclínicos demuestran que la subexpresión de TYMS predice beneficio en la respuesta a 5-fluorouracilo (5-FU), mientras que la sobreexpresión no predice beneficio (Brody et al., 2006; Gu et al., 2012; Ide et al., 2012; Ijichi et al., 2014; Kurata et al., 2011; Ligabue et al., 2012; Meropol et al., 2006). Las evidencias obtenidas por Rao et al., 2016 apoyan que los efectos quimiosensibilizadores de la subexpresión de TYMS al tratar con 5-fluorouracilo (5-FU) y Capecitabina son principalmente de niveles II-III en el análisis retrospectivos de estudios clínicos.

La subexpresión de TUBB3 predice sensibilidad a Taxanos, mientras que la sobreexpresión predice resistencia, en cáncer de mama, en cáncer gástrico y en NSCLC (Derry et al., 1997; Kavallaris et al., 1997; Mozzetti et al., 2005). Esta evidencia es apoyada por estudios preclínicos y estudios retrospectivos realizados por Rao et al., (2016). Sin embargo, no encontraron ninguna evidencia, en ensayos prospectivos que apoyaran el efecto predictivo de la subexpresión de TUBB3 en respuesta a Taxanos.

Se piensa que la subexpresión de MGMT sensibiliza a las células tumorales a Temozolomida, mientras que la sobreexpresión induce resistencia (Augustine et al., 2009; Happold et al., 2012; Kitange et al., 2009; Kulke et al., 2009). Esto ha sido ampliamente comprobado y probado por Rao et al., (2016), en gliomas y tumores pituitarios. Así pues, demostraron que, en general, la evidencia que apoya el efecto quimiosensibilizador de la subexpresión de MGMT en respuesta a Temozolomida es principalmente de nivel IV en estudios preclínicos y de nivel II-III en algunos ensayos retrospectivos.

Estudios realizados en cáncer gastrointestinal sugieren que la sobreexpresión de TOP1 predice el rendimiento de terapias con Camptotecina (Cubillo et al., 2014; Horisberger et al., 2009; Sakai et al., 2012; Shen et al., 2013; Zhang et al., 2006). Sin embargo, en estudios realizados por Rao et al., (2016) encontraron poca evidencia en estudios retrospectivos y en estudios preclínicos que apoyasen el efecto quimiosensibilizante de la sobreexpresión de TOP1 y TOP2A en respuesta a terapias con Camptotecina y Antraciclinas en cáncer gastrointestinal y de mama, respectivamente.

Así pues, todo esto pone de manifiesto la gran importancia y la necesidad de investigación tanto en estos marcadores como en la búsqueda de otros nuevos, todo ello con el objetivo de administrar terapias más efectivas y eficaces, así como personalizadas al tipo de paciente y de tumor.

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

2.1 Planteamiento

2.1.1 Planteamiento del problema y justificación

Son muchos los estudios publicados sobre los mecanismos celulares y moleculares implicados en la resistencia a fármacos antineoplásicos. Sin embargo, la aparición de resistencia contra el agente antitumoral sigue siendo el principal problema de los tratamientos de quimioterapia actuales. Por tanto, la investigación en este campo de la ciencia, es de vital importancia para intentar conseguir avances en estos tratamientos con el consiguiente beneficio para los pacientes.

Por otro lado, se conocen también bastantes mecanismos celulares y moleculares implicados en el proceso de envejecimiento celular. No obstante, ya que se trata de un proceso enormemente complejo en el que participan distintos tipos celulares e interacciones entre estos y que además resulta de la suma de muchos factores, tanto internos como externos al organismo, es de vital importancia la investigación en este campo. Conociendo todos estos mecanismos, se podrá modificar el proceso de envejecimiento, y por ende, la susceptibilidad a enfermedades, tales como alteraciones del sistema inmune, aparición de tumores derivados de la desregulación de la proliferación celular, procesos degenerativos y disminuir así la mortalidad.

Hasta la fecha, existen pocos artículos publicados en los que se demuestre la relación existente entre el envejecimiento celular y la resistencia adquirida a los fármacos antineoplásicos. Por tanto, dada la importancia de estos procesos se hace necesario investigar en este campo con el objetivo de determinar los procesos celulares y moleculares que puedan tener lugar.

El presente estudio trata de establecer, una posible relación entre el envejecimiento celular y la resistencia adquirida a los fármacos antineoplásicos Cisplatino y Bleomicina en *Saccharomyces cerevisiae*, mediante la realización de ensayos de envejecimiento y la extracción, purificación e identificación de proteínas en cepas salvajes y resistentes a Cisplatino y Bleomicina.

2.1.2 Justificación del uso de *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico de estudio

Desde hace más de un siglo, *S. cerevisiae* es uno de los modelos eucariotas más simples y apropiados para la realización de ensayos biológicos. Su rápido crecimiento, la facilidad de cultivo y manejo, la facilidad de obtener mutantes y la ausencia de patogenicidad la hacen idónea para su uso en investigación. Ya que se trata de un organismo unicelular con una tasa de crecimiento rápida, puede ser usada en estudios celulares que, en organismos pluricelulares resultarían largos, complicados y costosos. De esta forma, se puede ahorrar tanto tiempo como dinero.

El conocimiento completo de su genoma así como su constante revisión supone una ventaja adicional de este microorganismo. Gracias a ello, se ha podido realizar la manipulación genética de los casi 6.600 genes que codifica su genoma, el uso extensivo de micromatrices de ADN para realizar investigaciones del transcriptoma y estudios

genéticos como: expresión génica, localización de proteínas y organización funcional del genoma y proteoma.

La maquinaria molecular de diversos procesos que tienen lugar en las células se encuentra conservada tanto en levaduras como en plantas y mamíferos. De hecho, frecuentemente se han introducido genes de organismos eucariotas superiores en levaduras para realizar análisis sistemáticos de su función.

Gracias a todo ello, este organismo constituye una importante herramienta para el análisis de la genómica funcional, ofreciendo un punto de inicio en el análisis de organismos eucariotas superiores.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo general

Los objetivos generales de este trabajo son:

- Seleccionar dos cepas celulares de *Saccharomyces cerevisiae* resistentes a Cisplatino y Bleomicina como modelo de estudio de resistencia a fármacos antineoplásicos y de envejecimiento celular.
- Estudiar la relación entre el envejecimiento celular y la resistencia adquirida a los fármacos antineoplásicos Cisplatino y Bleomicina en *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2.2 Objetivos específicos

Los objetivos específicos de este trabajo son:

- Seleccionar dos cepas de *S. cerevisiae* resistentes a Cisplatino y Bleomicina.
- Estudiar el efecto de la exposición a agentes antineoplásicos (Cisplatino y Bleomicina) en cepas de *S. cerevisiae* salvajes y resistentes a estos fármacos.
- Evaluar posibles mecanismos de resistencia cruzada.
- Estudiar el proceso de envejecimiento cronológico y replicativo en cepas de *S. cerevisiae* salvajes y resistentes a los fármacos Cisplatino y Bleomicina.
- Identificación proteica en la cepa salvaje y resistentes a Cisplatino y a Bleomicina, con el fin de establecer una relación entre los mecanismos de resistencia a esos fármacos y el proceso de envejecimiento celular.
- Realizar un análisis proteómico en las cepas resistentes con objeto de buscar posibles marcadores de resistencia y envejecimiento así como de los mecanismos implicados.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Laboratorio de Radiobiología

El presente estudio ha sido realizado en el laboratorio de Radiobiología, perteneciente al Departamento de Radiología y Medicina Física, Oftalmología y Otorrinolaringología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga. Dicho laboratorio no presenta diferencias considerativas con respecto a otros, a excepción de la necesidad de disponer de una zona donde las condiciones de asepsia sean lo más estrictas posibles, con el objetivo de prevenir y evitar la contaminación de los cultivos y los materiales. Mediante la utilización de cabinas de flujo laminar se ha podido obtener un ambiente aséptico/estéril que garantiza, junto con una buena manipulación por parte del personal, la casi ausencia de contaminación en los cultivos.

3.1.1 Áreas de trabajo

Se diferencian, en la medida de lo posible, seis zonas o áreas de trabajo:

- Área aséptica.
- Área de incubación.
- Zona para preparación del material, medios de cultivo y reactivos.
- Zona de lavado y esterilización.
- Bancos o áreas de trabajo.
- Área de almacenamiento

En laboratorio de Radiobiología es un laboratorio pequeño, con capacidad para 5 o 6 personas. Así pues, pese a escasez de espacio, algunas de estas áreas se reorganizan con el fin de garantizar la independencia de zonas y asepsia, contribuyendo a una optimización del espacio y los equipos.

En la zona más cercana a la puerta de entrada existe un área de lavado y esterilización. En esta zona tiene lugar lavado del material, esterilización y secado. Se dispone de un autoclave, una estufa de secado/horno, microondas, fregadero, muebles para el almacenamiento de material fungible y un frigorífico convencional (Fig.19).



Fig.19. Zona de lavado y esterilización en el laboratorio de Radiobiología.

Frente a esta zona se sitúa el área de preparación. Ahí tiene lugar la manipulación y preparación de los reactivos, medios de cultivo y soluciones no estériles. En esta zona se encuentran los siguientes equipos: pH-metro, agitadores magnéticos, balanza convencional y de precisión así como un pequeño stock de reactivos de frecuente uso (Fig. 20).



Fig. 20. Zona de preparación en el laboratorio de Radiobiología.

Existe un área de trabajo genérica (Fig. 21) y dos áreas específicas; una dedicada al revelado y fotografiado de geles (Fig. 22) y otra que cuenta con un puesto de trabajo con un ordenador portátil conectado a un sistema automático de conteo de colonias (Fig. 23). En el área genérica se dispone de una centrifuga de sobremesa, un termoblock y un equipo de electroforesis. En el área de revelado y fotografiado se sitúa un transiluminador de luz ultravioleta, un cono para crear oscuridad sobre el transiluminador y un soporte con sistema fotográfico. En ésta área el material se encuentra contaminado con bromuro de etidio (BrEt) por lo que debe de estar restringida, aislada y controlada. Otros equipos adicionales disponibles en el laboratorio son el termociclador para PCR y la cabina de extracción de gases.



Fig. 21. Área de trabajo genérica en el laboratorio de Radiobiología.

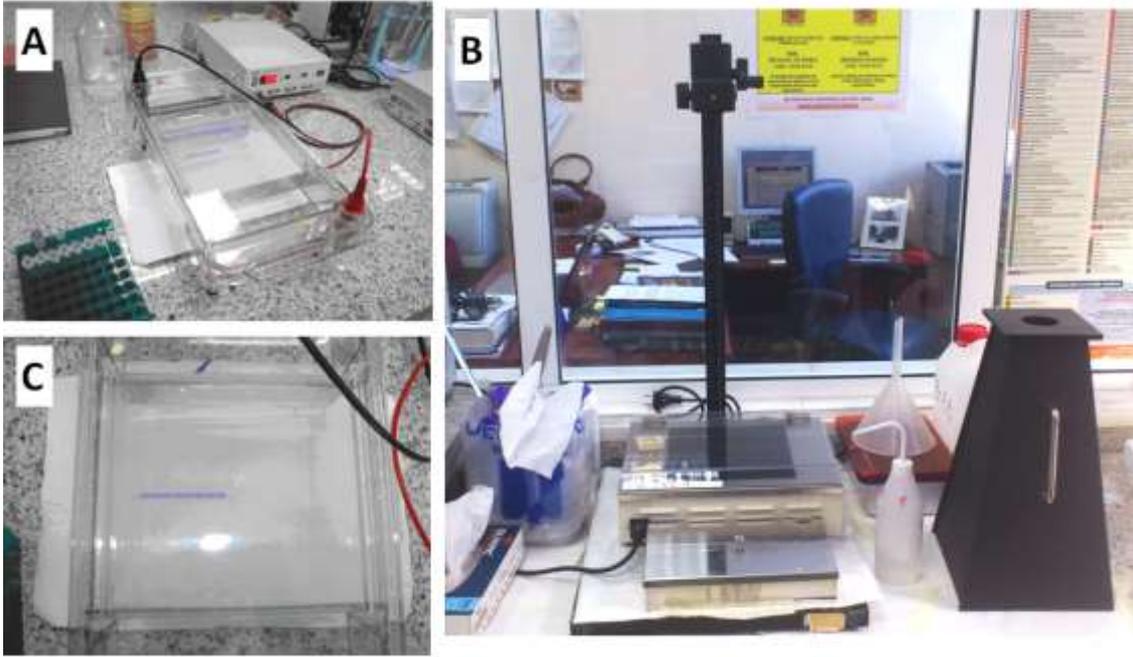


Fig. 22. Zona dedicada a la realización de electroforesis de ADN, revelado y fotografiado de geles. A) Cubeta de electroforesis y fuente de alimentación. B) Sistema para la fotodocumentación de geles. C) Detalle de gel con muestras de ADN.

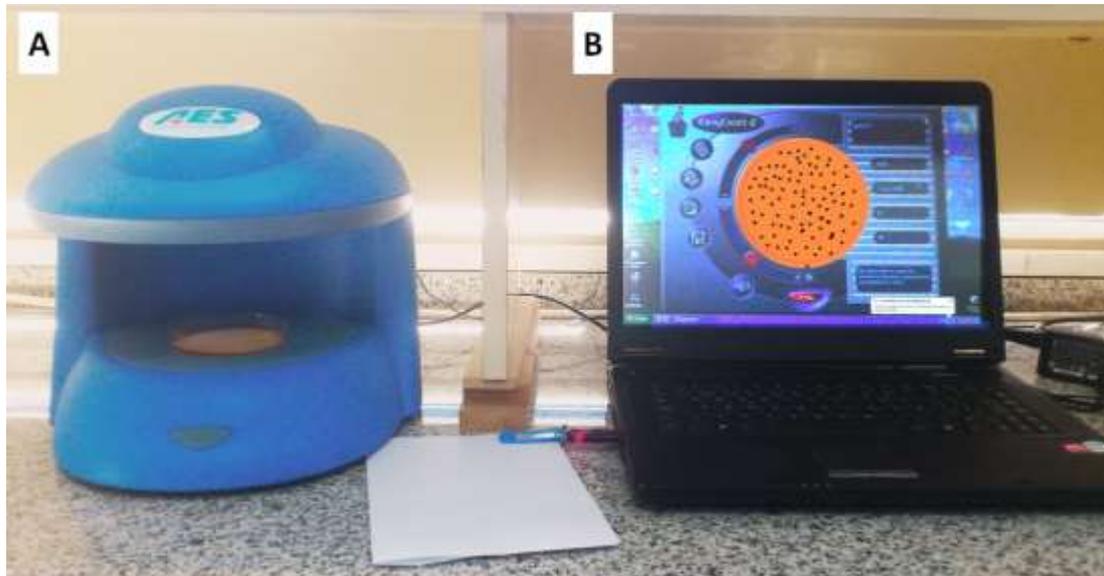


Fig. 23: Equipos para recuento automático de colonias. A) Equipo de visión adaptado para placas Petri. B) Software de análisis de imagen para recuento automatizado.

Se dispone también de armarios de seguridad, custodiados bajo llave, para el almacenamiento de productos químicos. Un armario es específico para productos químicos inflamables y otro para corrosivos.

El área de cultivo tiene que ser lo más aséptica posible. Se encuentra separada del laboratorio por unas mamparas de vidrio, cuya función es la de separar ambiente. Así se evitan las corrientes de aire y se favorece unas mayores condiciones de asepsia. En esta zona se encuentra el incubador de CO₂, estufas de cultivo así como las cabinas de flujo

laminar. Las cabinas de este laboratorio son verticales clase II tipo A1 y B1, con salida de aire filtrado al exterior (Fig. 24). En esta zona se dispone también de muebles con material fungible de uso frecuente así como equipos para los cultivos, microscopio convencional, microscopio invertido de contraste de fases y espectrofotómetro.



Fig. 24. Cabinas de flujo laminar y estufas.

3.1.2 Equipamiento y material fungible

A continuación se relacionan los equipos y material fungible del laboratorio de Radiobiología que se han utilizado para realizar la presente tesis (Tabla 4).

Tabla 4. Equipos y material fungible empleados.

EQUIPOS	FUNGIBLES
Incubador y estufa	Matraces Erlenmeyer
Cabina de flujo laminar vertical tipo II	Frascos y vasos de precipitado
Cabina de flujo laminar vertical	Probetas
Cabina de extracción de gases	Eppendorfs
Espectrofotómetro	Perlas de vidrio
Mechero bunsen	Asa de platino
Contador automático de colonias	Tubos de ensayo
Frigorífico y congelador	Portaobjetos
Vortex	Cubreobjetos
Centrífugas de sobremesa	Guantes de nitrilo
Autoclave	Placas petri
Agitadores magnéticos	Puntas de pipeta
Microscopios	
Pipetas automáticas	
Ordenador portátil y software	
Estufa de secado	
Microondas	
Lavador de Pipetas	
Equipo purificador de agua	
Agitador orbital	
Balanza estándar y de precisión	

3.2 Cepas de levadura

Los ensayos fueron realizados utilizando la cepa de levadura como modelo biológico. Concretamente se ha utilizado la levadura haploide *Saccharomyces cerevisiae* WS8105-1C (genotipo: *MATalpha*, *RAD HDF*, *ade2*, *arg4-17*, *trp1-289*, *ura3-52*). Esta cepa fue suministrada por la Dra. Anna A. Friedl (Radiobiological Institute, Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Alemania).

3.3 Medios de Cultivo

Para el crecimiento vegetativo, las cepas de levadura fueron cultivadas en medio compuesto de extracto de levadura, peptona y dextrosa (YPD) (1% extracto de levadura, 2 % peptona, 2% dextrosa) con o sin 2 % de Bacto-agar (dependiendo de que el cultivo se realizase en medio sólido o líquido) (Siede et al., 1996; Friedl et al., 1998).

Para realizar el estudio del envejecimiento celular, las levaduras fueron cultivadas en medio sintético de dextrosa (SDC) (2% dextrosa, 0,17% nitrógeno base, 0,5% sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$, 0,15 % aminoácidos 4X de los marcadores auxotróficos [ade, arg, trp, ura]) (Fabrizio y Longo, 2003).

Se usaron reactivos de la marca Difco, Becton Dickinson and Co. Sparks, MD, USA.

3.4 Fármacos citostáticos

Los fármacos usados han sido el Cisplatino y la Bleomicina.

3.4.1 Cisplatino

El Cisplatino (CASno. 15663-27-1, ECno. 239-733-8, MDLno. MFCD 00011623) (Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, MO, USA) también conocido como cis-diaminodicloroplatino, es un compuesto metálico (platino) con estructura geométrica plana (Fig. 25) (Rosemberg, 1973; Dasari y Tchounwou, 2014).

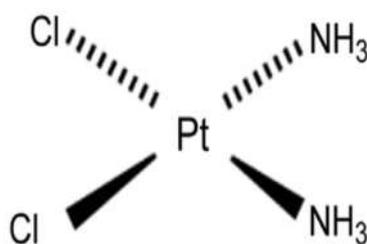


Fig. 25 Estructura química del Cisplatino.

3.4.2 Bleomicina

La Bleomicina (CASno. 9041-93-4, ECno. 232-925-2, MDLno. MFCD 00070310) (Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, MO, USA) es un agente antineoplásico de tipo glucopeptídico. Es un antibiótico glucopeptídico que se ha empleado en el tratamiento del cáncer, ya que posee la capacidad de retrasar el crecimiento de las células cancerosas (Fig. 26).

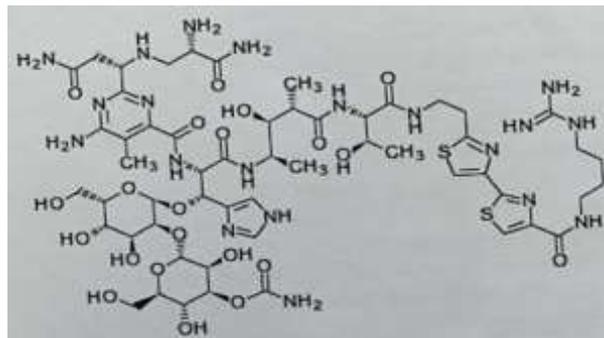


Fig. 26. Estructura química de la molécula de Bleomicina.

3.5 Ensayos de citotoxicidad

Previamente al inicio de los ensayos, se realizó un refresco de las placas madre mantenidas en refrigeración a 4°C y con menos de dos meses de antigüedad. Se sembraron dos placas con medio YPD y se incubaron 3 días a 30° C.

En un tubo eppendorf se depositó 1 ml de agua estéril y se le añadió, con un asa de platino estéril, un “loop” de células de las placas previamente refrescadas. A continuación se homogeneizó mediante el vórtex, y se realizó una dilución 10⁻¹. Se midió el valor de DO₆₀₀ para conocer la concentración celular de la muestra. El dato obtenido se aplicó en la fórmula:

$$C \cdot V = C' \cdot V'$$

En la que:

- C representa el número de células/ml en origen, que se obtienen a partir de la DO.
- C' representa la concentración celular que se desea. En este caso debe ser 2x10⁷ células/ml.
- V' es el volumen final que se desea obtener. En este caso debe de ser 1 ml.
- V es el volumen que se debe de coger para obtener la concentración C'.

De esta forma se calculó el volumen necesario que se precisó para tener una concentración de 2x10⁷ células/ml.

Se expuso durante 24 horas y a 30°C a:

Cisplatino: 0, 1, 10, 50, 100, 300, 500, 700 y 900 µg/ml.

Bleomicina: 0, 0,001, 0,003, 0,005, 0,008, 0,01, 0,03 y 0,06 UI/ml.

A continuación, se centrifugó durante 3 minutos a 3000 rpm, se retiró el sobrenadante y se lavó dos veces con agua destilada. Finalmente se añadió 1 ml de agua estéril.

Para realizar el drop test, se hicieron 5 diluciones decimales seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5}), a partir de las muestras controles y tratadas. Se puso 100 μl de cultivo en 900 μl de agua estéril. Seguidamente se sembró una alícuota de 5 μl en placas con medio YPD. Tras 3-4 días de cultivo a 30°C, se realizó el conteo de las colonias crecidas en cada una de las diluciones, con ayuda de un transiluminador y se fotografiaron las placas.

Se realizaron tres ensayos independientes con muestras repetidas.

A partir de los datos obtenidos se calculó:

ID 50: por ajuste lineal en la región de interés de la curva.

ID90: por ajuste polinómico de grado 3 en el caso del Cisplatino, y por ajuste lineal en la región de interés de la curva para la Bleomicina.

Para las cepas resistentes a los fármacos antineoplásicos Cisplatino y Bleomicina se aplicó el mismo protocolo.

La cepa resistente a Cisplatino (WS8105-1C-R300cisPt) se expuso durante 24 horas y a 30°C a las siguientes concentraciones de Cisplatino: 0, 1, 10, 50, 100, 300, 500, 700 y 900 $\mu\text{g/ml}$.

La cepa resistente a Bleomicina (WS8105-1C-R 0.158 Bleo) se expuso durante 24 horas y a 30°C a las siguientes concentraciones de Bleomicina: 0, 0,001, 0,003, 0,01, 0,03 y 0,06 UI/ml.

A partir de los datos obtenidos se calculó:

ID 50: por ajuste lineal en la región de interés de la curva.

ID90: por ajuste lineal en la región de interés de la curva.

3.6 Ensayo clonogénico

El ensayo clonogénico es, desde mediados del siglo pasado, uno de los métodos más usados para el estudio de la citotoxicidad de agentes físicos y químicos. Ello es debido a que mediante esta prueba se puede estimar la supervivencia celular, a partir de la capacidad que la célula posee de regenerarse y proliferar después de haber sido expuesta a un agente tóxico, de manera que la evaluación *in vitro*, permite estimar el posible tipo de respuesta al agente *in vivo* (Brown y Boger-Brown, 1999; Franken et al., 2006).

Este ensayo es conocido también como ensayo de supervivencia de colonias. Se basa en la formación de colonias a baja densidad celular, por tanto es un método óptimo para el análisis de la proliferación y la supervivencia celular. Esto es así puesto que permite estimar las diferencias en la tasa de crecimiento de una población celular ayudando a diferenciar entre alteraciones de la tasa de crecimiento (tamaño de la colonia) y la supervivencia celular (número de colonias) (Akman et al., 1990).

Al sembrar las células a densidades bajas (20 a 200), cada una crece estableciendo una colonia discreta (de forma general, cuando una colonia tiene más de 50 células es aceptada como válida). Una medida de la supervivencia es el porcentaje de células que forman colonias, mientras que el tamaño que posee la colonia es una medida de la tasa de crecimiento (Freshney, 2000; Franken et al., 2006).

El número de las colonias formadas se puede expresar como eficiencia en placa (PE), calculada con la siguiente fórmula:

$$PE = \frac{\text{N}^\circ \text{ Colonias formadas}}{\text{N}^\circ \text{ Células sembradas}} \times 100$$

Y la fracción superviviente (FS) como:

$$FS = \frac{\text{PE grupo tratado}}{\text{PE grupo control}} \times 100$$

Se hicieron diluciones decimales a partir de los tubos de ensayo en los que se encontraban los cultivos, tanto de los expuestos como de los no expuestos. Para ello, se tomó 100 µl del cultivo de cada tubo y se añadió a 900 µl de agua esteril. Así sucesivamente hasta llegar a la dilución 10^{-5} .

Se realizaron dos baterías de diluciones por cada muestra, sembrándose 2 placas con medio YPD de cada dilución con 100 µl de suspensión celular. Seguidamente las placas fueron incubadas a 30°C durante 3-5 días, se contaron las colonias crecidas y se calculó la fracción superviviente. Se han realizado 4 repeticiones de cada ensayo.

3.7 Drop test

Se utilizó el “drop test” como método de screening ya que es un método económico y visualmente muy rápido para el análisis. Es una variante del ensayo clonogénico.

Para realizarlo, se hicieron 5 diluciones decimales seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5}), a partir de las muestras controles y tratadas. Se puso 100 µl de cultivo en 900 µl de agua estéril. Seguidamente se sembró una alícuota de 5 µl en placas con medio YPD. Tras 3-4 días de cultivo a 30°C (Fig. 27), se realizó el conteo de las colonias crecidas en cada una de las diluciones, con ayuda de un transiluminador y se fotografiaron las placas.

El crecimiento de las muestras expuestas fue comparado con el crecimiento de los controles. Para calcular la fracción superviviente se usaron las diluciones que presentaban entre 10-30 colonias crecidas (Ruiz-Gómez y Martínez-Morillo, 2006).



Fig. 27. Incubación de placas en estufa a 30°C y ejemplo de drop test.

3.8 Cuantificación de la densidad celular

Se usó la espectrofotometría para llevar a cabo la cuantificación de la densidad celular. A partir de cada muestra, se realizó una dilución 10^{-1} en agua destilada estéril.

En una cubeta de espectrofotometría, de 1 cm de paso de luz, con agua destilada estéril se hizo el calibrado del espectrofotómetro. Seguidamente se midió la absorbancia o densidad óptica (DO) de cada dilución a 600 nm (DO_{600}).

La relación entre el número de células y DO_{600} es lineal hasta $DO_{600} = 1$. Cuando $DO_{600} = 0,1$ equivale a 3×10^6 células/ml. Así pues, conociendo la densidad óptica de la muestra problema, a 600 nm, se puede calcular el número de células/ml de la suspensión problema realizando una regla de tres. Las diluciones que se realizaron para medir la absorbancia fueron 10^{-1} , por lo que el resultado obtenido se multiplicó por 10 y se calculó el número de células/ml en el cultivo.

Se realizaron 3 diluciones por muestra, a fin de obtener un valor medio más fiable.

3.9 Envejecimiento Cronológico

3.9.1 Fase previa al envejecimiento

Previamente al inicio del envejecimiento cronológico, se realizó un refresco de las placas madre mantenidas en refrigeración a 4°C y con menos de dos meses de antigüedad. Se sembraron dos placas con medio YPD y se incubaron 3 días a 30° C.

En un tubo eppendorf se depositó 1 ml de medio SDC y se le añadió, con un asa de platino estéril, un “loop” de células de las placas previamente refrescadas. A continuación se homogeneizó mediante el vórtex, y se realizó una dilución 10^{-1} . Se midió el valor de DO_{600} para conocer la concentración celular de la muestra. El dato obtenido se aplicó en la fórmula:

$$C.V = C'.V'$$

En la que:

- C representa el número de células/ml en origen, que se obtienen a partir de la DO.
- C' representa la concentración celular que se desea. En este caso debe ser $1,5 \times 10^6$ células/ml,
- V' es el volumen final que se desea obtener. En este caso debe de ser 20 ml.
- V es el volumen que se debe de coger para obtener la concentración C'.

De esta forma se calculó el volumen necesario que se precisó para tener una concentración de $1,5 \times 10^6$ células/ml.

Seguidamente en un matraz Erlenmeyer de 250 ml (se debe mantener proporción 5:1 en los volúmenes), se añadió 20 ml de medio SDC y el volumen de células anteriormente calculado. Se mantuvo 4 días en agitación orbital a 300 rpm, 30°C, para que las células alcanzaran la fase estacionaria.

3.9.2 Fase de envejecimiento cronológico

Una vez alcanzada la fase estacionaria, se realizaron siembras periódicas, en placas con medio YPD, cada tres o cuatro días.

Como día 0 del envejecimiento se consideró el día de inicio de la fase de envejecimiento cronológico. Con el fin de evaluar periódicamente la capacidad clonogénica y por ende el envejecimiento celular, cada 3-4 días, se realizaron drop-test (Fig. 28).

Se hicieron 3 ensayos independientes para el estudio del envejecimiento de la cepa salvaje y de las cepas resistentes a CisPt y a Bleomicina; con cuatro repeticiones cada uno.

Tras cultivar las placas durante 3 días a 30°C, se fotografiaron, se realizó el recuento de las colonias crecidas y se calculó la fracción superviviente.

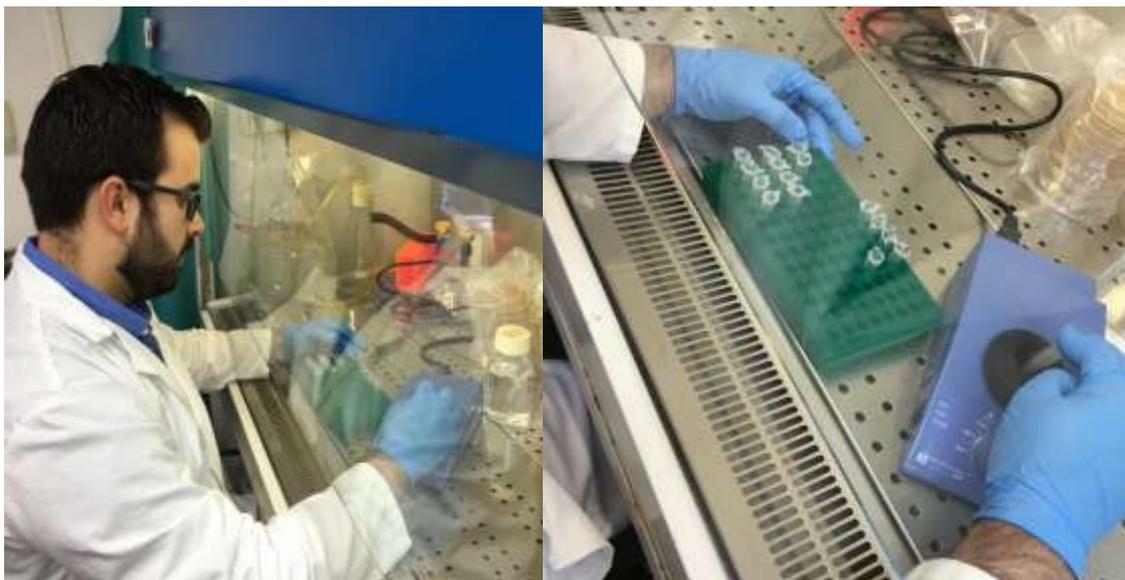


Fig. 28. Realización de diluciones seriadas para la siembra del drop test.

3.10 Envejecimiento replicativo

Para los ensayos de envejecimiento replicativo se sembraron en cada placa, con medio YPD, 4 muestras independientes de la cepa control, la cepa resistente a Cisplatino y la cepa resistente a Bleomicina. Cada loop se sembró siguiendo un patrón cuadrado (Fig. 29). Las muestras fueron incubadas en la estufa a 30° y durante 5 días. Seguidamente se conservaron en el frigorífico a 4°C durante dos días y después se realizó la resiembra. Se realizaron 9 pases de resiembra. Cada pase representa aproximadamente 25 generaciones, por tanto se obtuvo aproximadamente hasta la generación 225.



Fig. 29. Siembra de células en el ensayo replicativo.

3.11 Control de crecimiento con fármacos antineoplásicos

Se realizó un refresco de las placas madre mantenidas en refrigeración a 4°C y con menos de dos meses de antigüedad. Se sembraron dos placas con medio YPD y se incubaron 3 días a 30° C.

En un tubo eppendorf se depositó 1 ml de agua estéril y se le añadió, con un asa de platino estéril, un “loop” de células de las placas previamente refrescadas. A continuación se homogeneizó mediante el vórtex, y se realizó una dilución 10^{-1} . Se midió el valor de DO_{600} para conocer la concentración celular de la muestra. El dato obtenido se aplicó en la fórmula:

$$C.V = C'.V'$$

En la que:

- C representa el número de células/ml en origen, que se obtienen a partir de la DO.
- C' representa la concentración celular que se desea. En este caso debe ser 1×10^6 células/ml,
- V' es el volumen final que se desea obtener. En este caso debe de ser 8 ml.
- V es el volumen que se debe de coger para obtener la concentración C'.

De esta forma se calculó el volumen necesario que se precisó para tener una concentración de 1×10^6 células/ml.

Seguidamente en un matraz Erlenmeyer de 250 ml (se debe mantener proporción 5:1 en los volúmenes), se añadió 8 ml de medio YPD y el volumen de células anteriormente calculado. Se mantuvo en agitación orbital a 300 rpm, a 30°C, hasta que las células alcanzaron la fase estacionaria (8 días para los ensayos con Cisplatino y 16 días para los ensayos con Bleomicina). Se midió diariamente la DO_{600} .

Las concentraciones usadas de fármaco fueron las siguientes:

Cisplatino: 0, 1, 10, 100 y 300 $\mu\text{g/ml}$.

Bleomicina: 0, 0,001, 0,003, 0,005, 0,05 UI/ml.

De cada ensayo se hicieron dos repeticiones.

3.12 Selección de Resistencia a fármacos.

Se realizó un refresco de las placas madre mantenidas en refrigeración a 4°C y con menos de dos meses de antigüedad. Se sembraron dos placas con medio YPD y se incubaron 3 días a 30° C.

En un tubo eppendorf se depositó 1 ml de agua estéril y se le añadió, con un asa de platino estéril, un “loop” de células de las placas previamente refrescadas. A

continuación se homogeneizó mediante el vórtex, y se realizó una dilución 10^{-1} . Se midió el valor de DO_{600} para conocer la concentración celular de la muestra. El dato obtenido se aplicó en la fórmula:

$$C.V = C'.V'$$

En la que:

- C representa el número de células/ml en origen, que se obtienen a partir de la DO.
- C' representa la concentración celular que se desea. En este caso debe ser 1×10^6 células/ml,
- V' es el volumen final que se desea obtener. En este caso debe de ser 8 ml.
- V es el volumen que se debe de coger para obtener la concentración C'.

De esta forma se calculó el volumen necesario que se precisó para tener una concentración de 1×10^6 células/ml.

Seguidamente en un matraz Erlenmeyer de 250 ml (se debe mantener proporción 5:1 en los volúmenes), se añadió 8 ml de medio YPD, el volumen de células anteriormente calculado y el fármaco. Se realizaron 6 ciclos de 10 días para el Cisplatino y 7 ciclos de 15 días para la Bleomicina.

Cisplatino: 300 $\mu\text{g/ml}$ (dosis letal 90).

Bleomicina: 0,05 UI/ml del ciclo 1 al ciclo 5. 0,158 UI/ml (dosis letal 90) ciclo 6 y ciclo 7.

Se mantuvo en agitación orbital a 300 rpm, 30°C (Fig. 30). Diariamente se midió la DO_{600} .

De cada ensayo se realizaron 3 repeticiones.



Fig. 30. Incubación de los cultivos a 30°C y en agitación orbital a 300rpm.

3.13 Resistencia cruzada

Para evaluar si existían mecanismos de resistencia cruzada se sometió a la cepa resistente a Cisplatino (WS8105-1C-R300cisPt) y a la cepa resistente a Bleomicina (WS8105-1C-R 0.158 Bleo) al ensayo de citotoxicidad anteriormente descrito.

WS8105-1C-R300cisPt: 0, 0,001, 0,003, 0,005, 0,008, 0,01, 0,03, 0,05 y 0,06 UI/ml Bleomicina.

WS8105-1C-R 0.158 Bleo: 0, 1, 10, 50, 100, 300, 500, 700 y 900 µg/ml Cisplatino.

3.14 Análisis proteómico

Se realizó una extracción, purificación e identificación de proteínas en la cepa salvaje, en la cepa WS8105-1C-R300cisPt y en la cepa WS8105-1C-R 0.158 Bleo.

a) Descripción del ensayo

Análisis por espectrometría de masas en tándem mediante un sistema de trampa de iones “nano HPLC-ESI-MS/MS”.

La espectrometría de masas está basada en el comportamiento diferencial que presentan las moléculas ionizadas al atravesar campos eléctricos y magnéticos. Esta técnica permite que dichos iones sean separados en función de su relación masa/carga (m/z) y detectados posteriormente. La trampa de iones tiene la capacidad de almacenar un ion precursor de interés y eyectar los demás iones simultáneamente. Además, el ion precursor almacenado puede ser fragmentado en iones hijos para producir un espectro MS/MS que aporta información sobre su secuencia.

El sistema de ionización mediante electrospray es un tipo de ionización a presión atmosférica que permite una ionización muy suave de las moléculas. Es una técnica muy apropiada para la ionización de péptidos en disolución.

El análisis espectrométrico es precedido de una cromatografía líquida de alta resolución con nanoflujo (nano-HPLC) en una columna C18 que permite la separación de los péptidos antes de ser inyectados secuencialmente hacia la fuente de ionización, así como la eliminación de pequeñas cantidades de contaminantes que pudiesen interferir con el análisis.

El patrón de fragmentación codificado por el espectro MS/MS permite la identificación de la secuencia de aminoácidos del péptido que lo produce. Los datos relativos a los péptidos detectados son llevados a un análisis computacional mediante la herramienta de búsqueda en base de datos denominada Mascot.

b) Procedimiento del ensayo

- Preparación de las muestras

Se recogieron cantidades iguales de células de cada una de las tres muestras, se centrifugaron y lavaron 3 veces con tampón fosfato salino y se solubilizó cada *pellet* en un tampón de lisis con 200 μ L de urea 7 M, tiourea 2 M y CHAPS 4%. Posteriormente, se sonicaron las muestras para cortar los ácidos nucleicos y ayudar a la solubilización de las proteínas, manteniendo las muestras en hielo. A continuación, se centrifugaron a 16000 g durante 2 minutos para retirar el *debris* insoluble, se transfirieron los sobrenadantes a tubos nuevos y se purificaron los extractos mediante un protocolo de precipitación proteica con ácido tricloroacético modificado (2-D Clean-up kit, GE Healthcare; Munich, Alemania).

Para llevar a cabo una proteólisis asistida por gel, tras la purificación, se rehidrataron las muestras con agua y se embebieron en una matriz de proliacrilamida. Posteriormente, se procedió a la reducción de los puentes disulfuro con DTT, a la alquilación de las Cys con Yodoacetamida, se realizó una digestión en gel con tripsina y se llevó a cabo la extracción de los péptidos; todo ello, en un digestor automático (DigestPro, intavis Bioanalytical Instruments) según el procedimiento interno descrito por el laboratorio para este tipo de muestras.

- Condiciones cromatográficas

- Concentración y desalado de la muestra en columna de captura C18 ZORBAX 300SB-C18 (Agilent Technologies, Germany), 5x0,3 mm, con 5 μ m de diámetro de partícula y 300 Å de tamaño de poro, utilizando un gradiente de 98% de H₂O: 2% de acetonitrilo (ACN)/0,1% ácido fórmico (FA), a una velocidad de flujo de 20 μ L/min durante 6 min. La columna de captura se conecta en línea con una columna analítica ZORBAX 300SB-C18 (Agilent Technologies),

150x0,075 mm, con 3,5 μm de diámetro de partícula y 300 Å de tamaño de poro, a través de una válvula de 6 puertos.

- Elución de la muestra de la columna de captura a un flujo de 300 nL/min bajo condiciones de elución en gradiente, usando FA 0.1% en agua como fase móvil A, y FA 0.1% en ACN 80%/agua 20% como fase móvil B. El gradiente de elución se llevó a cabo según el siguiente esquema: condiciones isocráticas de 98% A:2% B durante 6 minutos, un incremento lineal hasta el 50% en 150 minutos, un incremento lineal hasta 90% B en 2 minutos, condiciones isocráticas de 90% B durante 3 minutos y vuelta a las condiciones iniciales en 3 minutos.

El volumen de inyección fue de 20 μL .

- **Condiciones de operación del espectrómetro de masas**

- El sistema LC se acopló a través de una fuente nanospray (CaptiveSpray, Bruker Daltonics) a un espectrómetro de masas de trampa de iones 3D (amaZon speed ETD, Bruker Daltonics) operando en modo positivo con un voltaje capilar establecido a 1500 V.
- Rango de barrido: m / z 300-1.500.
- Se llevó a cabo una adquisición “data-dependent” en modo automático que permitió obtener secuencialmente un espectro MS en “full scan” (m/z 300_1400) seguido de un espectro MS en tándem mediante CID de los ocho iones más abundantes.
- El control de carga de iones se estableció en 200.000, con un tiempo máximo de acumulación de 200 ms.
- Se aplicó una exclusión dinámica tras 2 espectros durante 12 segundos posteriores a la fragmentación para prevenir el aislamiento de la misma m/z.

- **Búsqueda en base de datos**

Para la identificación se ha empleado el software ProteinScape 3 (Bruker Daltonics) acoplado al motor de búsqueda Mascot 3.1 (Matrix Science), enfrentando los datos de MS/MS contra las bases de datos de secuencias de proteínas Swiss-Prot.

Mascot estima la probabilidad del número de coincidencias ocurridas al azar, vista la cantidad de picos en el espectro buscado y la distribución acumulada de los valores m/z de los iones esperados para todos los péptidos candidatos en la base de datos.

Se tuvieron en cuenta los siguientes de parámetros:

- Carbamidometilación de las cisteínas como modificación fija.
- Oxidación de las metioninas como modificación variable.
- Una pérdida de corte por tripsina.
- Tolerancia de masa de 0.6 Da para los precursores y 0.5 Da para las masas fragmentadas.

Los espectros MS/MS con puntuación por encima del umbral definido mediante Mascot se validaron manualmente.

c) Instrumentación usada en la realización del ensayo.

Digestor automático DigestPro MSI (Intavis Bioanalyticals Instruments), Nano-HPLC Agilent 1200 (Agilent Technologies), fuente de ionización “CaptiveSpray” (Bruker Daltonics) y espectrómetro de masas con trampa iónica “amaZon speed ETD” (Bruker Daltonics).

d) Expresión proteica relativa (emPAI).

El índice de abundancia proteica modificado exponencialmente (emPAI) ofrece una cuantificación relativa de proteínas en una mezcla. La abundancia relativa de cada proteína identificada en la muestra se estimó utilizando su valor de emPAI que es directamente proporcional al contenido de esa proteína en la muestra (Ishihama et al., 2005).

La fórmula para calcular el emPAI es la siguiente:

$$emPAI = 10^{\frac{N_{observed}}{N_{observable}} - 1}$$

Dónde:

- $N_{observed}$ es el número de péptidos observados experimentalmente.
- $N_{observable}$ es el número calculado de péptidos observables para cada proteína.

El incremento de emPAI de las cepas resistentes frente a la cepa salvaje se calculó dividiendo el valor de emPAI de la cepa resistente entre el de la cepa salvaje.

e) Análisis de interacciones y función proteica/génica.

Se ha realizado mediante el software “Genemania” (<http://www.genemania.org/>) para comparar los efectos, funciones e interacciones de proteínas.

Para la conversión de proteínas a genes se ha usado la aplicación “Uniprot” (<http://www.uniprot.org/>).

Para la búsqueda de genes y proteínas homólogas en humanos se ha usado: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/howto/find-homolog-gene/>

3.15 Análisis estadístico

Después de comprobar que las variables seguían una distribución Normal con la prueba Wilk-Shapiro rankit plot, se realizó la prueba estadística paramétrica Análisis de la Varianza (ANOVA) entre sujetos (tratamiento x tiempo). Se consideró un nivel de significación de $p < 0,001$ para todos los casos.

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS Statistics, V. 19.0.0, IBM.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Ensayos de citotoxicidad

Con objeto de estudiar el efecto causado por la exposición a los fármacos antineoplásicos (Cisplatino y Bleomicina) se procedió a evaluar la supervivencia de la cepa salvaje (wt) tras exponerla, durante 24 horas y a 30°C, a diferentes concentraciones de estos fármacos.

4.1.1 Ensayo de citotoxicidad con Cisplatino

Las células fueron expuestas a 0, 1, 10, 50, 100, 300, 500, 700 y 900 µg/ml de Cisplatino. Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron los drop test y se evaluó la fracción superviviente (FS). Los datos obtenidos fueron representados en una gráfica (figura 31) y mediante ajuste lineal se calculó la ID50, obteniéndose un valor de 89,68 µg/ml de Cisplatino. Para el caso de la ID90 se utilizó un ajuste polinómico de grado 3, obteniéndose un valor de 264,04 µg/ml de Cisplatino (tabla 5). Como se observa en la figura 31, hasta la dosis de 300 µg/ml de Cisplatino se produce una caída brusca en la fracción superviviente, asintotizándose a partir de esa dosis.

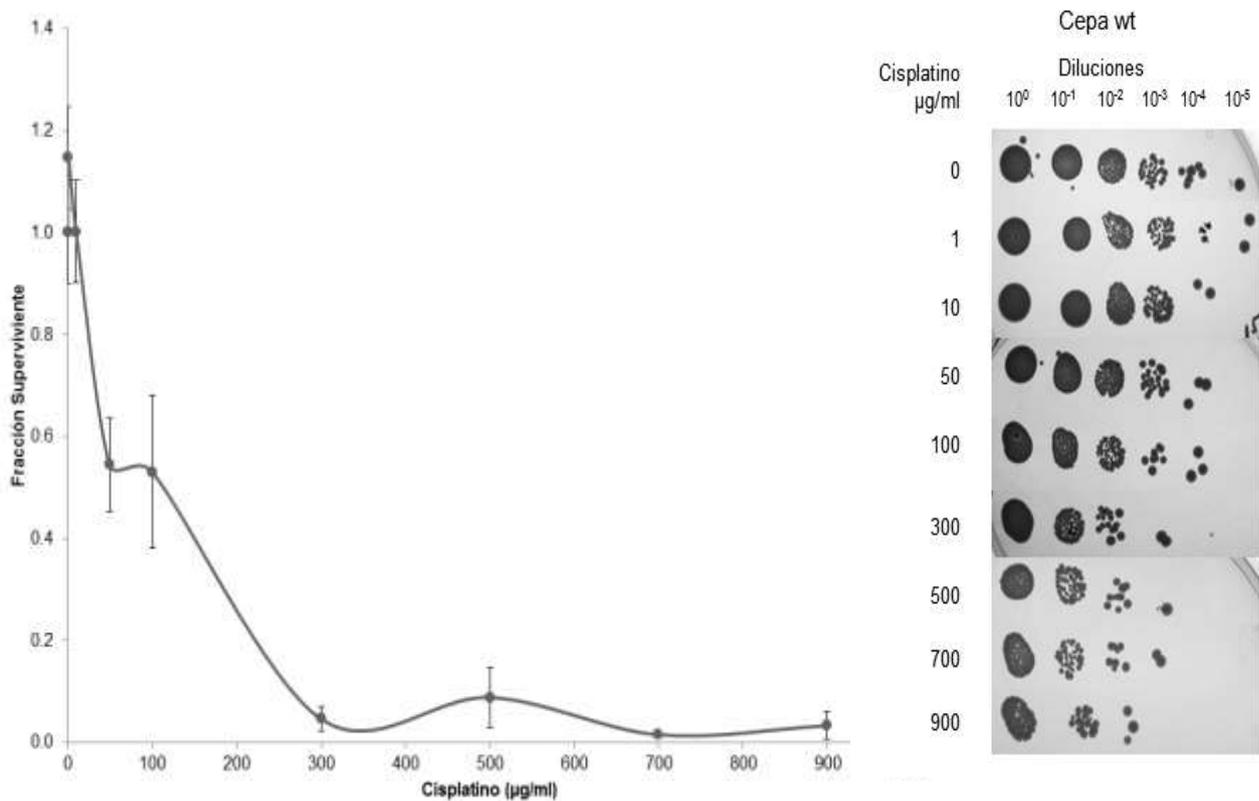


Fig. 31. Exposición de la cepa salvaje a diferentes concentraciones de Cisplatino. Media ± SD

Tabla 5. Dosis inhibitoria 50 y 90 de Cisplatino en la cepa salvaje.

	ID50	ID90
WS8105-1C (wt) + Cisplatino (µg/ml)	89,68	264,04

4.1.2 Ensayo de citotoxicidad con Bleomicina

Las células fueron expuestas a 0, 0,001, 0,003, 0,005, 0,008, 0,01, 0,03 y 0,06 UI/ml de Bleomicina. Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron los drop test y se evaluó la fracción superviviente (FS). Los datos obtenidos fueron representados en una gráfica (figura 32) y mediante ajuste lineal se calculó la ID50, obteniéndose un valor de 0,001 UI/ml de Bleomicina. Para el caso de la ID90 se utilizó también un ajuste lineal, obteniéndose un valor de 0,158 UI/ml de Bleomicina (tabla 6). Como se observa en la figura 32, hasta la dosis de 0,003 UI/ml de Bleomicina se produce una caída brusca en la fracción superviviente, asintotizándose a partir de esa dosis.

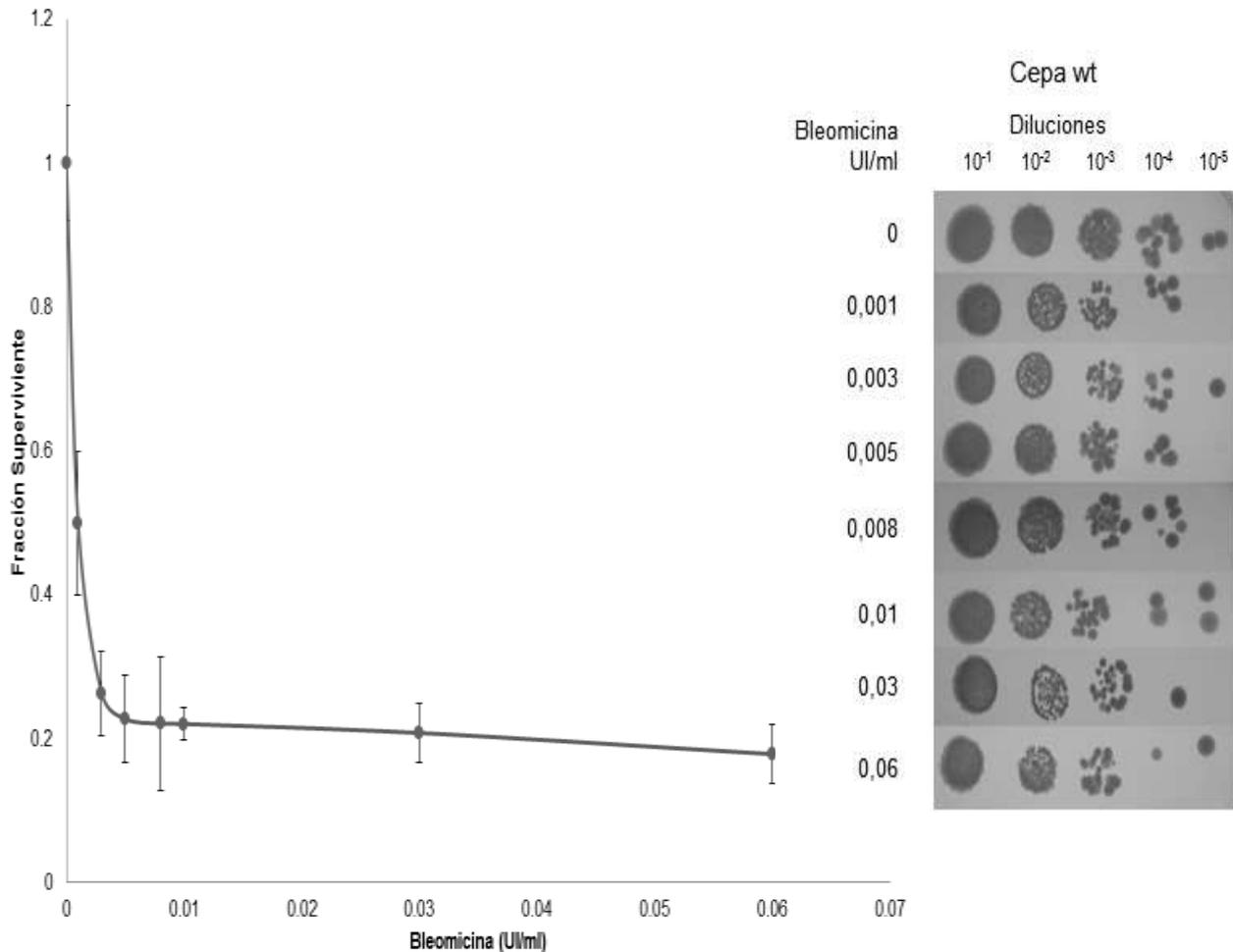


Fig. 32. Exposición de la cepa salvaje a diferentes concentraciones de Bleomicina. Media ± SD

Tabla 6. Dosis inhibitoria 50 y 90 de Bleomicina en la cepa salvaje.

	ID50	ID90
WS8105-1C (wt) + Bleomicina (UI/ml)	0,001	0,158

4.2 Control de crecimiento con Cisplatino y Bleomicina

Con objeto de evaluar el crecimiento de la cepa salvaje se expuso a distintas concentraciones de Cisplatino (entre 0 y 300 $\mu\text{g/ml}$) y Bleomicina (entre 0 y 0,05 UI/ml). Se mantuvo en agitación orbital a 300 rpm, a 30°C, hasta que las células alcanzaron la fase estacionaria.

4.2.1 Control de crecimiento con Cisplatino

En la figura 33 se puede apreciar como a las dosis de 0-100 $\mu\text{g/ml}$ y para un valor medio de N de $6,5 \times 10^7$ células/ml se alcanzó la fase estacionaria a los 4 días. Sin embargo, para ese mismo valor de N y a la dosis de 300 $\mu\text{g/ml}$ la fase estacionaria se alcanzó el día 7.

Además, se produce un retardo en el crecimiento celular. Así, para un valor de N de 3×10^7 células/ml las dosis de 0-10 $\mu\text{g/ml}$ presentaron un tiempo de 1,5 días, la dosis de 100 $\mu\text{g/ml}$ (ID50) de 3 días y la dosis de 300 $\mu\text{g/ml}$ (ID90) de 4 días.

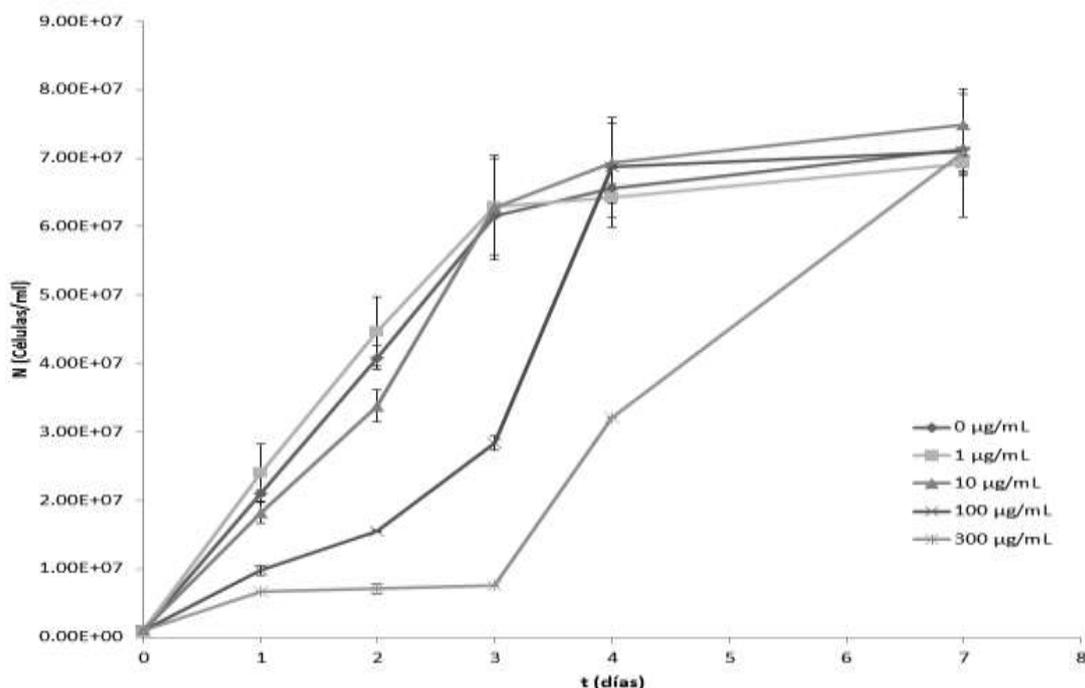


Figura 33. Control de crecimiento de la cepa salvaje sometida a distintas concentraciones de Cisplatino. Media \pm SD

4.2.2 Control de crecimiento con Bleomicina

En la figura 34 se puede apreciar como a las dosis de 0 y 0,001 UI/ml y para un valor medio de N de $1,3 \times 10^8$ células/ml se alcanzó la fase estacionaria a los 2 días. Sin embargo, para las dosis de 0,003 y 0,005 UI/ml y un valor de N de 1×10^8 células/ml la fase estacionaria se alcanzó el día 3, manteniéndose constante hasta el día 12 donde se produjo una segunda elevación hasta el día 14 que se asintotizó. Y a la dosis de 0,05 UI/ml y un valor de N de 1×10^8 células/ml la fase estacionaria se alcanzó el día 11.

Además, se produce un retardo en el crecimiento celular. Así, para un valor de N de 4×10^7 células/ml las dosis de 0 y 0,001 UI/ml presentaron un tiempo de 0,25 días, las dosis de 0,003 y 0,005 presentaron un tiempo de 1 día y la dosis de 0,05 UI/ml presentaron un tiempo de 9,5 días. Observándose por tanto un retraso del crecimiento en el tiempo.

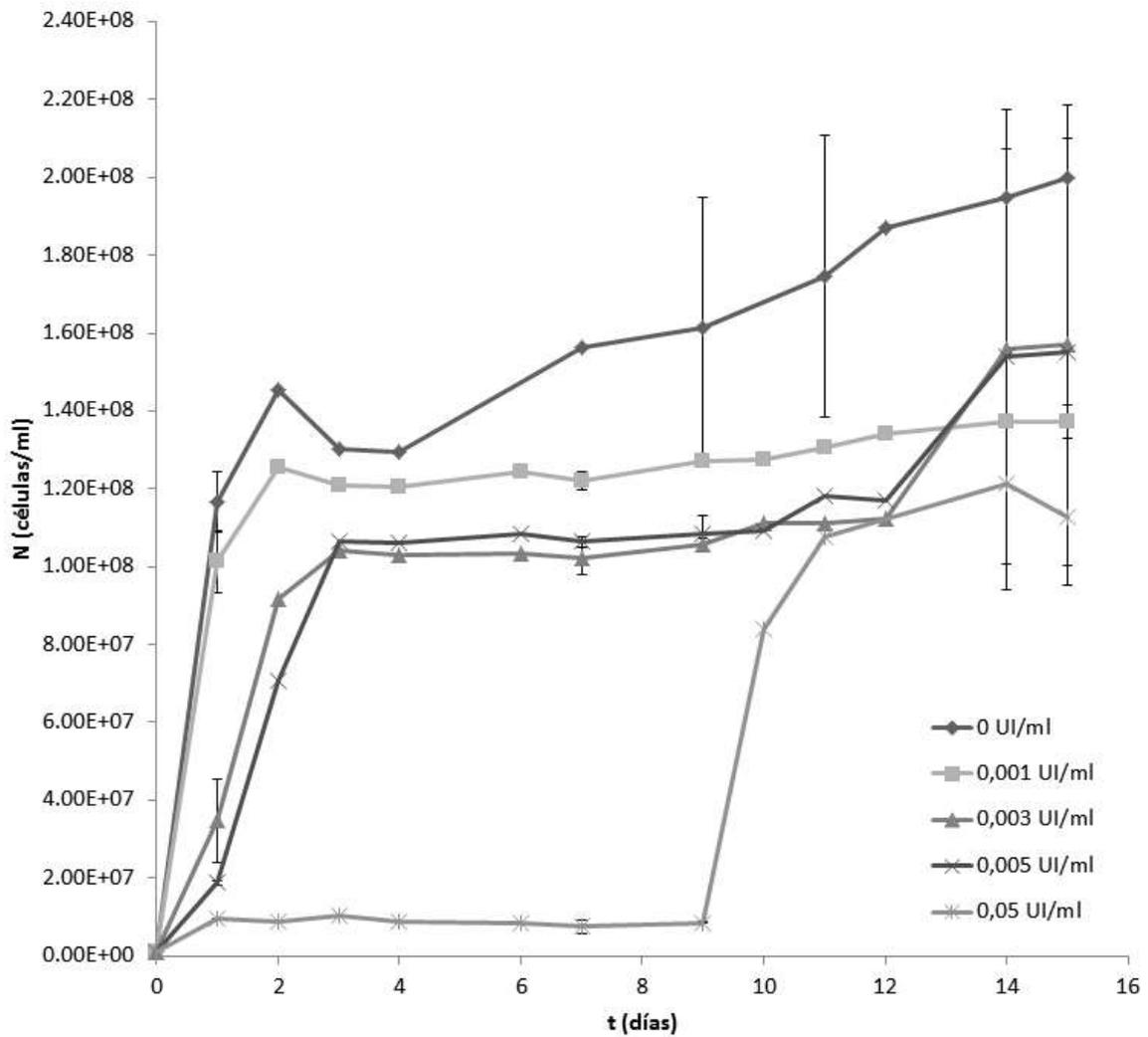


Figura 33. Control de crecimiento de la cepa salvaje sometida a distintas concentraciones de Bleomicina. Media \pm SD.

4.3 Selección de células resistentes a Cisplatino y a Bleomicina

Se realizaron 6 ciclos de 10 días para el Cisplatino y 7 ciclos de 15 días para la Bleomicina. La concentración usada de Cisplatino fue de 300 $\mu\text{g/ml}$ (ID90) y la concentración de Bleomicina fue de 0,05 UI/ml del ciclo 1 al ciclo 5, y de 0,158 UI/ml (ID90) ciclo 6 y ciclo 7.

Se mantuvo en agitación orbital a 300 rpm, 30°C (Fig. 30). Diariamente se midió la DO600.

4.3.1 Selección de células resistentes a Cisplatino

Como se observa en la figura 34, en el ciclo 1 y para un valor N de 9×10^7 células/ml la fase estacionaria se alcanzó el día 6. Sin embargo, para los ciclos 3-6 y para un valor medio de N de $2,25 \times 10^8$ células/ml la fase estacionaria se alcanzó en torno al día 4.

Además, se produce un retardo en el crecimiento celular. Así, para un valor de N de 9×10^7 células/ml el ciclo 1 presentó un tiempo de 6 días, el ciclo 2 de 3 días, el ciclo 3 y 4 de 1,75 días, el ciclo 5 de 3 días, y el ciclo 6 de 2,5 días. Así se pudo observar que para un mismo valor de N, conforme se realizaron más ciclos el tiempo en alcanzar ese valor disminuyó.

Así pues, al principio las células eran sensibles al fármaco y tenían un crecimiento celular bajo, pero conforme se fueron sometiendo en cada ciclo a la concentración del fármaco, desarrollaron mecanismos de resistencia que les permitía sobrevivir, crecer y dividirse aun en presencia de éste, aumentando por tanto el crecimiento celular. Además también pudo observarse que la fase estacionaria se alcanzó en un tiempo menor. Estos hechos indican la adquisición de resistencia. La cepa seleccionada como resistente a Cisplatino se denominó WS8105-1C-R300cisPt.

En la figura 35, se representan los 6 ciclos que tuvieron una duración de 80 días. Los más relevantes fueron el ciclo 1 que para un valor N de 9×10^7 células/ml presentó un tiempo de 6 días, el ciclo 3 que para un valor N de $2,1 \times 10^8$ células/ml presentó un tiempo de 30 días y el ciclo 4 que para un valor N de $2,45 \times 10^8$ células/ml presentó un tiempo de 40 días.

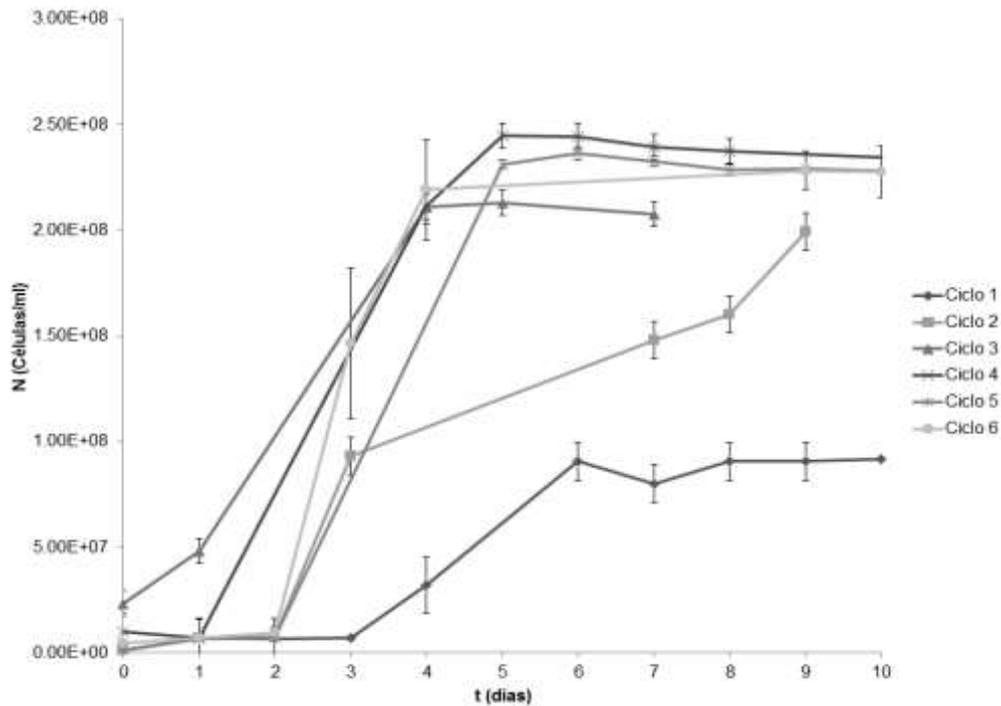


Figura 34. Ciclos de selección de resistencia a Cisplatino. Media \pm SD.

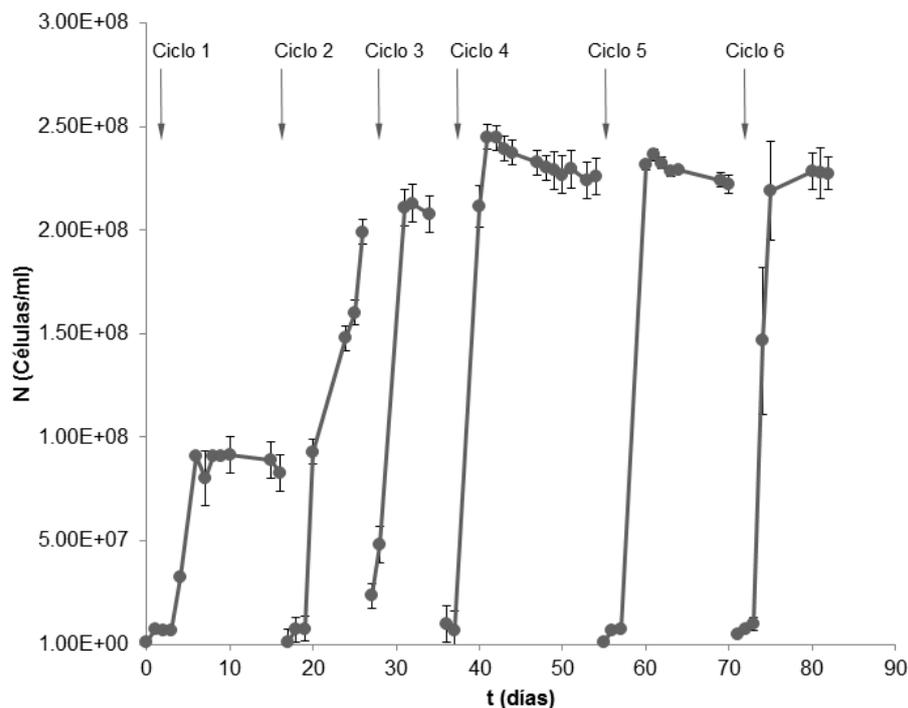


Figura 35. Evolución temporal del proceso de selección de resistencia a Cisplatino. Media \pm SD.

4.3.2 Selección de células resistentes a Bleomicina

Como se observa en la figura 36, en el ciclo 1 y para un valor N de $1,2 \times 10^8$ células/ml la fase estacionaria se alcanzó el día 14. Para el ciclo 2 y para un valor N de 9×10^7 células/ml la fase estacionaria se alcanzó el día 7. Para el ciclo 3 y para un valor

N de $1,1 \times 10^8$ células/ml la fase estacionaria se alcanzó el día 6. Para los ciclos 4-5 y para un valor medio N de $1,1 \times 10^8$ células/ml la fase estacionaria se alcanzó el día 5. Y para los ciclos 6 y 7 y para un valor medio N de $1,25 \times 10^8$ células/ml la fase estacionaria se alcanzó el día 6.

Además, se produce un retardo en el crecimiento celular. Así, para un valor de N de 4×10^7 células/ml el ciclo 1 presentó un tiempo de 9 días, el ciclo 2 de 6 días, el ciclo 3 de 5 días, y del ciclo 4-7 de aproximadamente 2 días. Así se pudo observar que para un mismo valor de N, conforme se realizaron más ciclos el tiempo en alcanzar ese valor disminuyó.

En la figura 37, se representan los 7 ciclos que tuvieron una duración de 110 días. El ciclo 1 que para un valor N de $1,1 \times 10^8$ células/ml presentó un tiempo de 15 días, los ciclos 2-6 que para un valor medio N de $1,1 \times 10^8$ células/ml presentaron un tiempo de 30, 47, 60, 80 y 96 días, respectivamente, y el ciclo 7 que para un valor N de $1,3 \times 10^8$ células/ml presentó un tiempo de 110 días.

Por tanto, ocurre algo similar al caso de selección de resistencia a Cisplatino. Así, al inicio del ensayo las células fueron sensibles al fármaco y por tanto el crecimiento fue menor, pero conforme se realizaron más ciclos, las células adquirieron resistencia a éste y aumentaron su crecimiento. Estos hechos indican la adquisición de resistencia. La cepa seleccionada como resistente a Bleomicina se denominó WS8105-1C-R 0.158 Bleo.

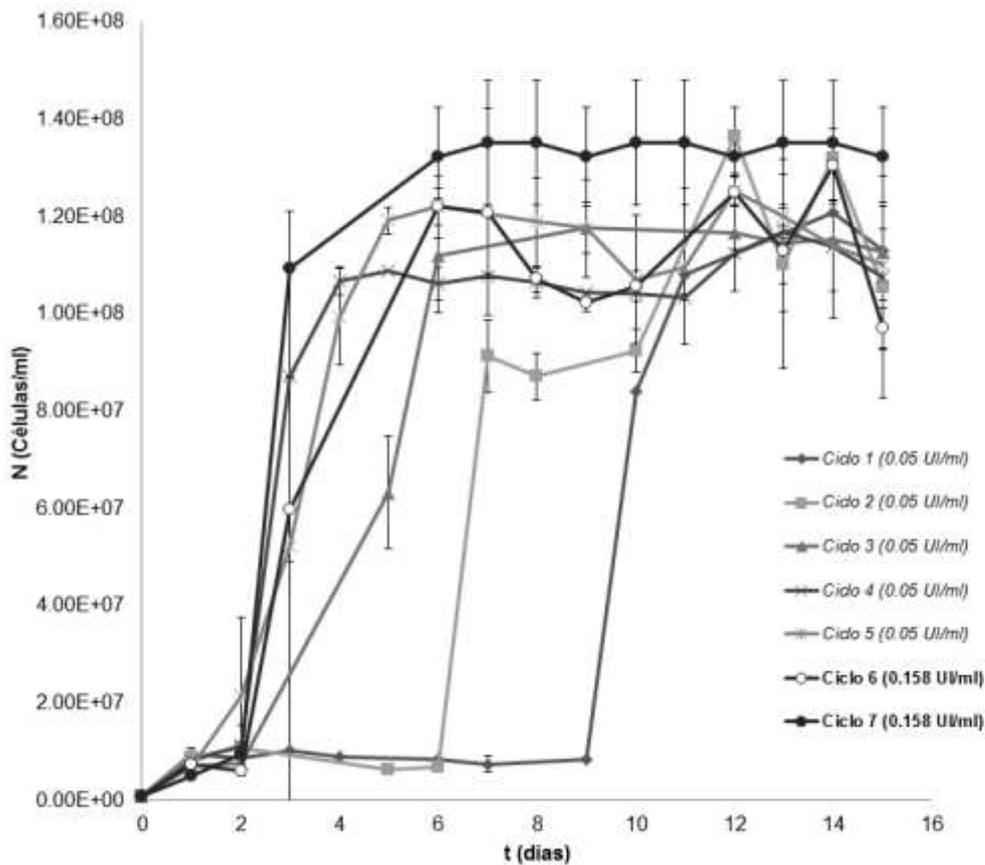


Figura 36. Ciclos de selección de resistencia a Bleomicina. Media \pm SD.

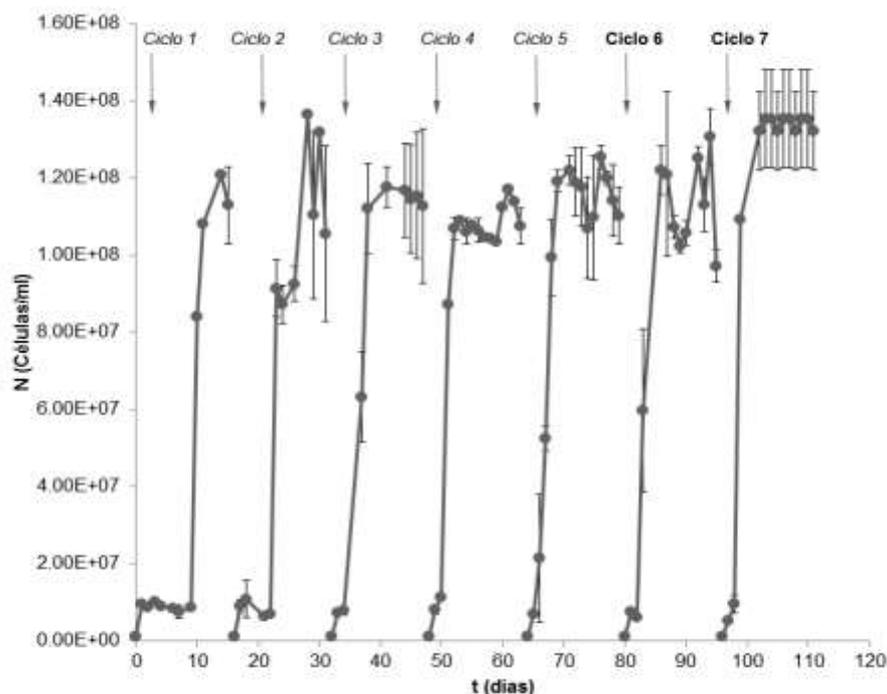


Figura 37. Evolución temporal del proceso de selección de resistencia a Bleomicina. Media \pm SD.

4.4 Citotoxicidad en las cepas resistentes a Cisplatino y a Bleomicina y resistencia cruzada

Con el objetivo de comprobar si la cepa WS8105-1C-R300cisPt (sometida al tratamiento de selección con Cisplatino), y la cepa WS8105-1C-R 0.158 Bleo (sometida al tratamiento de selección con Bleomicina), eran realmente resistentes a Cisplatino y Bleomicina respectivamente, se les realizó el mismo ensayo de citotoxicidad que a la cepa salvaje. Por otro lado, para evaluar si existían mecanismos de resistencia cruzada se expuso a la cepa WS8105-1C-R300cisPt al tratamiento con Bleomicina y a la cepa WS8105-1C-R 0.158 Bleo al tratamiento con Cisplatino.

4.4.1 Citotoxicidad a Cisplatino en la cepa WS8105-1C-R300cisPt

Como se puede observar en la figura 38 y 39, la disminución de la fracción superviviente en la cepa salvaje es claramente mayor que en la cepa WS8105-1C-R300cisPt. Mediante ajuste lineal en la región de la curva se calculó la ID50 y la ID90 de la cepa WS8105-1C-R300cisPt, obteniéndose un resultado de 224 $\mu\text{g/ml}$ Cisplatino (2,5 veces más resistente respecto de la cepa salvaje) y 735,2 $\mu\text{g/ml}$ Cisplatino (2,78 veces más resistente respecto de la cepa salvaje), respectivamente (Tabla 7). Así pues, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambas cepas ($p = 0,005$; ANOVA), concluyendo que la cepa WS8105-1C-R300cisPt sí es resistente al fármaco de selección (Cisplatino).

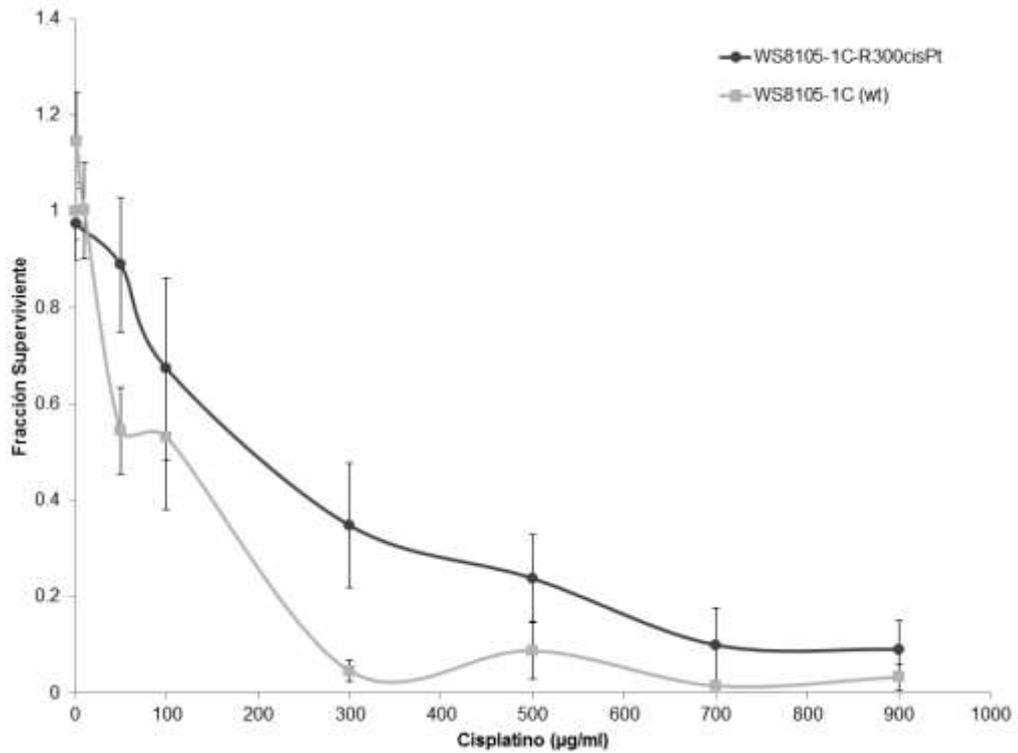


Figura 38. Evaluación de la citotoxicidad del Cisplatino. wt: cepa salvaje (control). WS8105-1C-R300cisPt: cepa resistente a Cisplatino. Media \pm SD. $p = 0,005$; (ANOVA).

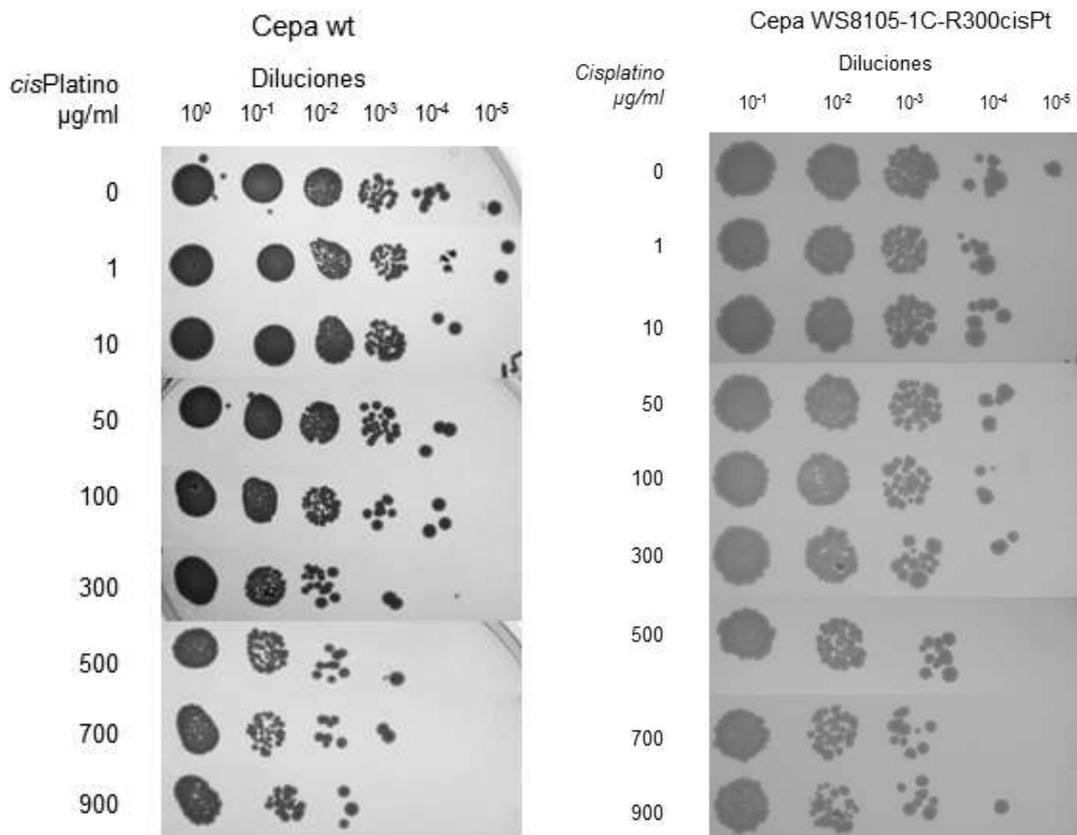


Figura 39. Citotoxicidad del Cisplatino evaluada mediante drop test. wt: cepa salvaje (control). WS8105-1C-R300cisPt: cepa resistente a Cisplatino.

Tabla 7. Resistencia a fármacos de la línea parental y resistente a Cisplatino.

	ID50 Cisplatino (µg/ml)	ID90 Cisplatino (µg/ml)
WS8105-1C (wt)	89.68	264.04
WS8105-1C-R300cisPt	224* (2.5)R	735.2* (2.78)R

WS8105-1C (wt): cepa salvaje. WS8105-1C-R300cisPt: cepa resistente a Cisplatino.
Entre paréntesis se indica el incremento relativo de resistencia (R) respecto de la línea salvaje (wt).
(Wt vs WS8105-1C-R300cisPt) + Cisplatino *p= 0,005; ANOVA.

4.4.2 Citotoxicidad a Bleomicina en la cepa WS8105-1C-R 0.158 Bleo

Como se puede observar en la figura 40 y 41, la disminución de la fracción superviviente en la cepa salvaje es claramente mayor que en la cepa WS8105-1C-R 0.158 Bleo. Mediante ajuste lineal en la región de la curva se calculó la ID50 y la ID90 de la cepa WS8105-1C-R 0.158 Bleo, obteniéndose un resultado de 0,0156 UI/ml Bleomicina (15,6 veces más resistente respecto de la cepa salvaje) y 2,818 UI/ml Bleomicina (17,83 veces más resistente respecto de la cepa salvaje), respectivamente (Tabla 8). Así pues, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambas cepas ($p = 0,0009$; ANOVA), concluyendo que la cepa WS8105-1C-R 0.158 Bleo sí es resistente al fármaco de selección (Bleomicina).

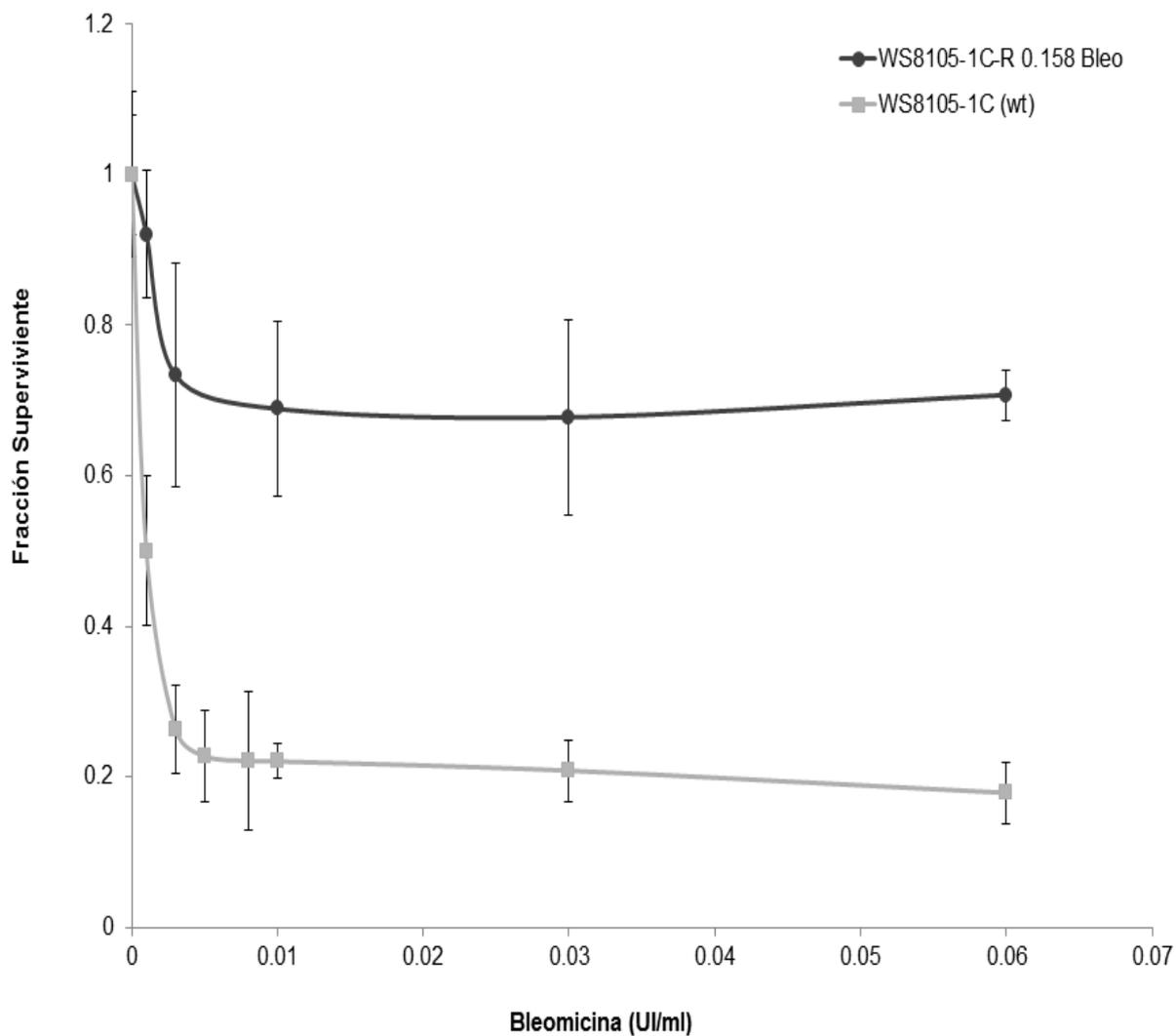


Figura 40. Evaluación de la citotoxicidad de la Bleomicina. wt: cepa salvaje (control). WS8105-1C-R 0.158 Bleo: cepa resistente a Bleomicina. Media \pm SD. $p = 0,0009$; ANOVA.

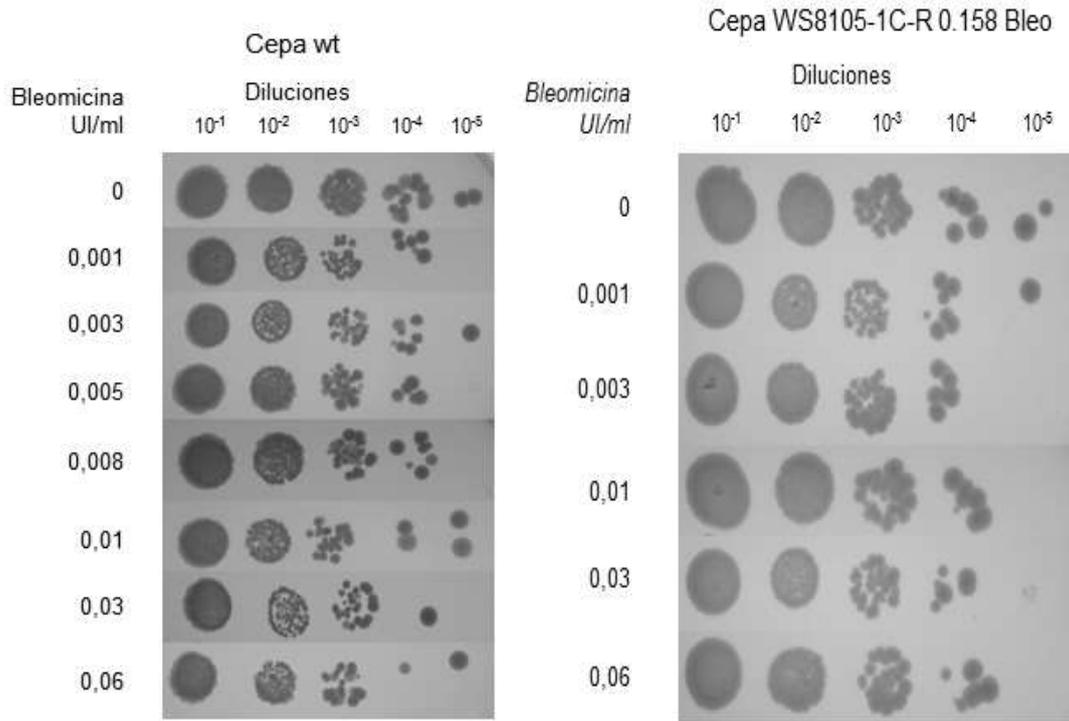


Figura 41. Citotoxicidad de la Bleomicina evaluada mediante drop test. wt: cepa salvaje (control). WS8105-1C-R 0.158 Bleo: cepa resistente a Bleomicina.

Tabla 8. Resistencia a fármacos de la línea parental y resistente a Bleomicina.

	ID50	ID90
	Bleomicina (UI/ml)	Bleomicina (UI/ml)
WS8105-1C (wt)	0.001	0.158
WS8105-1C-R 0.158 Bleo	0.0156** (15.6)R	2.818** (17.83)R

WS8105-1C (wt): cepa salvaje. WS8105-1C-R 0.158 Bleo: cepa resistente a Bleomicina. Entre paréntesis se indica el incremento relativo de resistencia (R) respecto de la línea salvaje (wt). (Wt vs WS8105-1C-R 0.158 Bleo) + Bleomicina **p = 0,0009; ANOVA.

4.4.3 Resistencia cruzada

Como se puede observar en la figura 42 y 43, la disminución de la fracción superviviente en la cepa WS8105-1C-R300cisPt es claramente mayor que en la cepa salvaje tras exponerlas a Bleomicina. Mediante ajuste lineal en la región de la curva se calculó la ID50 y la ID90 de la cepa WS8105-1C-R300cisPt, obteniéndose un resultado de 0,00054 UI/ml de Bleomicina (1,85 veces más sensible respecto de la cepa salvaje) y 0,00097 UI/ml de Bleomicina (162,89 veces más sensible respecto de la cepa salvaje) respectivamente (Tabla 9). Así pues, se puede concluir con que no hay diferencias estadísticamente significativas y que por tanto la cepa WS8105-1C-R300cisPt no es

resistente a Bleomicina, no existiendo resistencia cruzada, pero sí tiene lugar un aumento de la sensibilidad a Bleomicina ($p = 0,0009$; ANOVA), estadísticamente significativo.

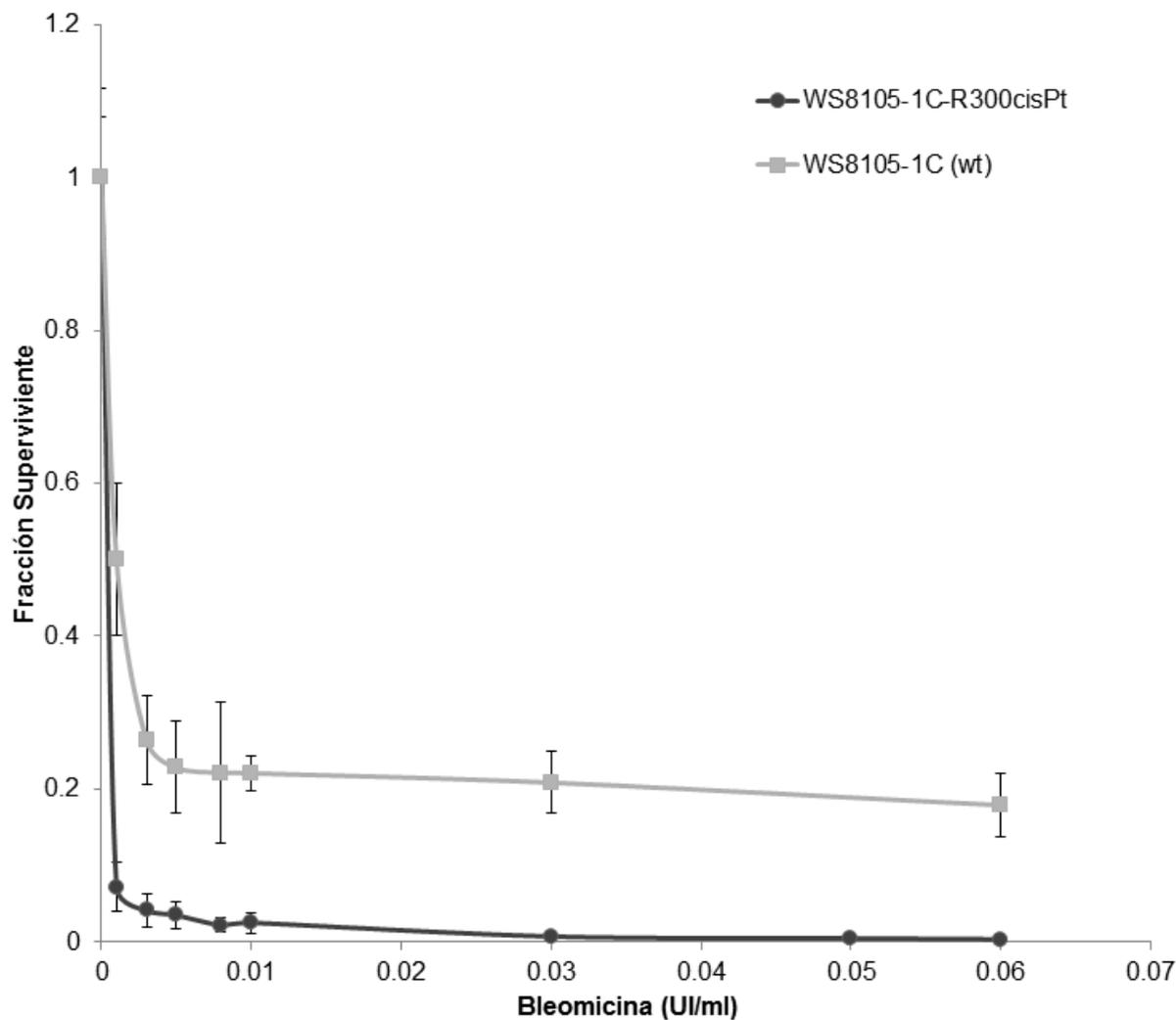


Figura 42. Evaluación de la citotoxicidad de la Bleomicina. wt: cepa salvaje (control). WS8105-1C-R300cisPt: cepa resistente a Cisplatino. Media \pm SD. $p = 0,0009$; ANOVA.

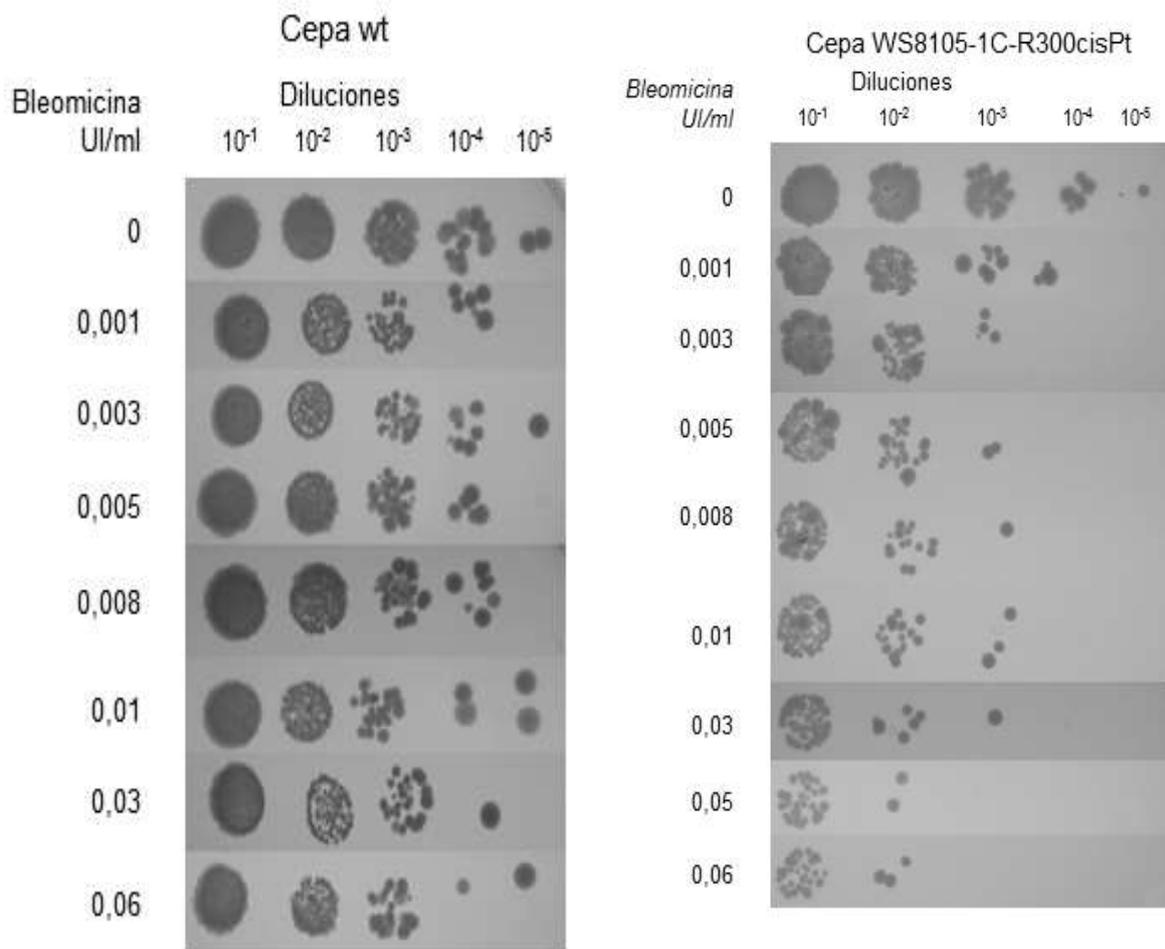


Figura 43. Citotoxicidad de la Bleomicina evaluada mediante drop test. wt: cepa salvaje (control). WS8105-1C-R300cisPt: cepa resistente a Cisplatino.

Tabla 9. Resistencia a Bleomicina de la cepa parental y de la cepa resistente a Cisplatino.

	ID50 Bleomicina (UI/ml)	ID90 Bleomicina (UI/ml)
WS8105-1C (wt)	0.001	0.158
WS8105-1C-R300cisPt	0.00054** (1.85)S	0.00097** (162.89)S

WS8105-1C (wt): cepa salvaje. WS8105-1C-R300cisPt: cepa resistente a Cisplatino. Entre paréntesis se indica el incremento relativo de sensibilidad (S) respecto de la línea salvaje (wt). (Wt vs WS8105-1C-R300cisPt) + Bleomicina **p = 0,0009; ANOVA.

Mediante ajuste lineal en la región de la curva se calculó la ID50 y la ID90 de la cepa WS8105-1C-R 0.158 Bleo, obteniéndose un resultado de 41,87 $\mu\text{g/ml}$ de Cisplatino (2,14 veces más sensible respecto de la cepa salvaje) y 1384 $\mu\text{g/ml}$ de Cisplatino (5,24 veces más resistente respecto de la cepa salvaje), respectivamente (Tabla 10). Así pues, se puede concluir con que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,077$) y que por tanto no existe resistencia cruzada con Cisplatino (Figura 44 y 45).

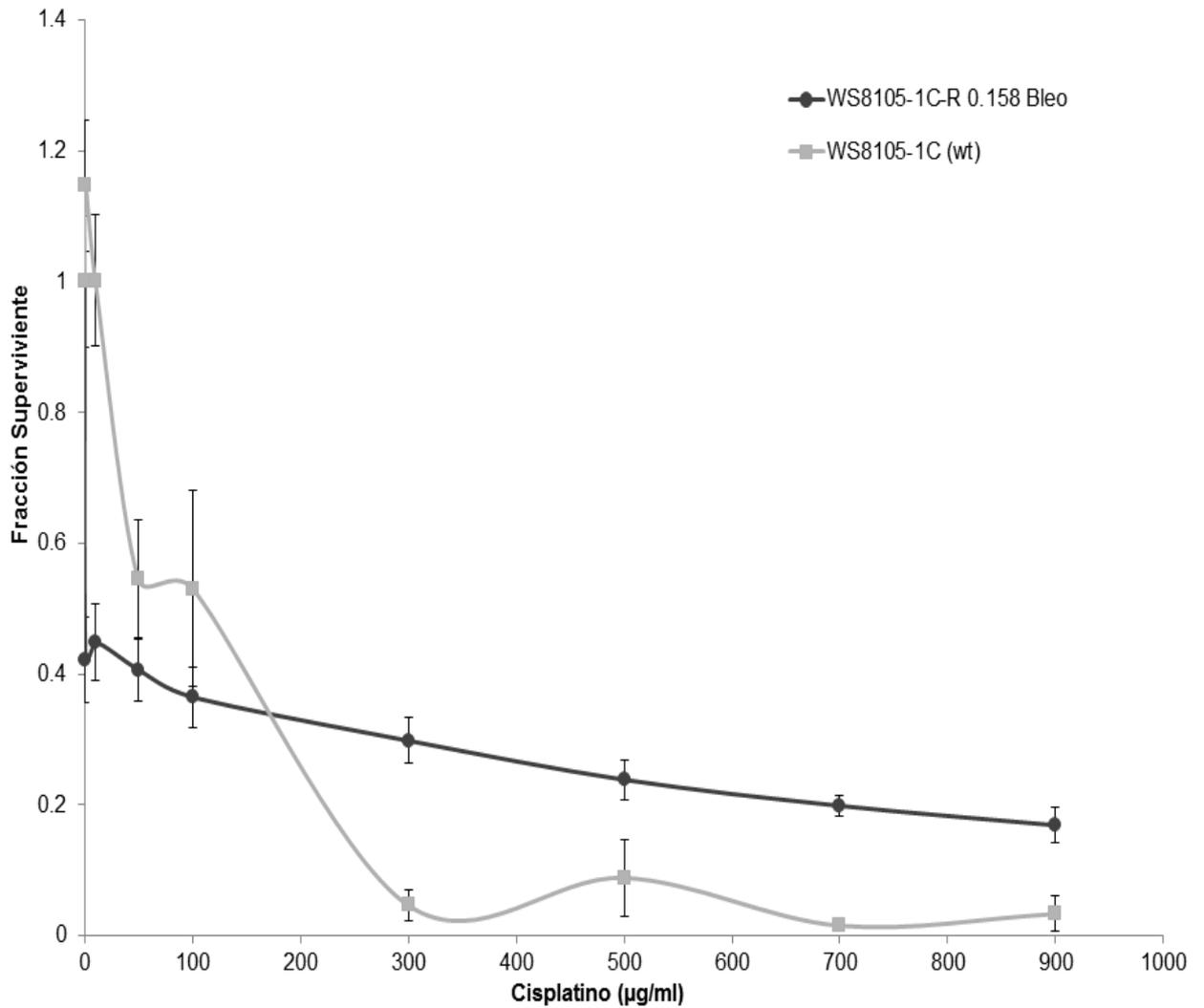


Figura 44. Evaluación de la citotoxicidad del Cisplatino. wt: cepa salvaje (control). WS8105-1C-R 0.158 Bleo: cepa resistente a Bleomicina. Media \pm SD. $p = 0,077$; ANOVA.

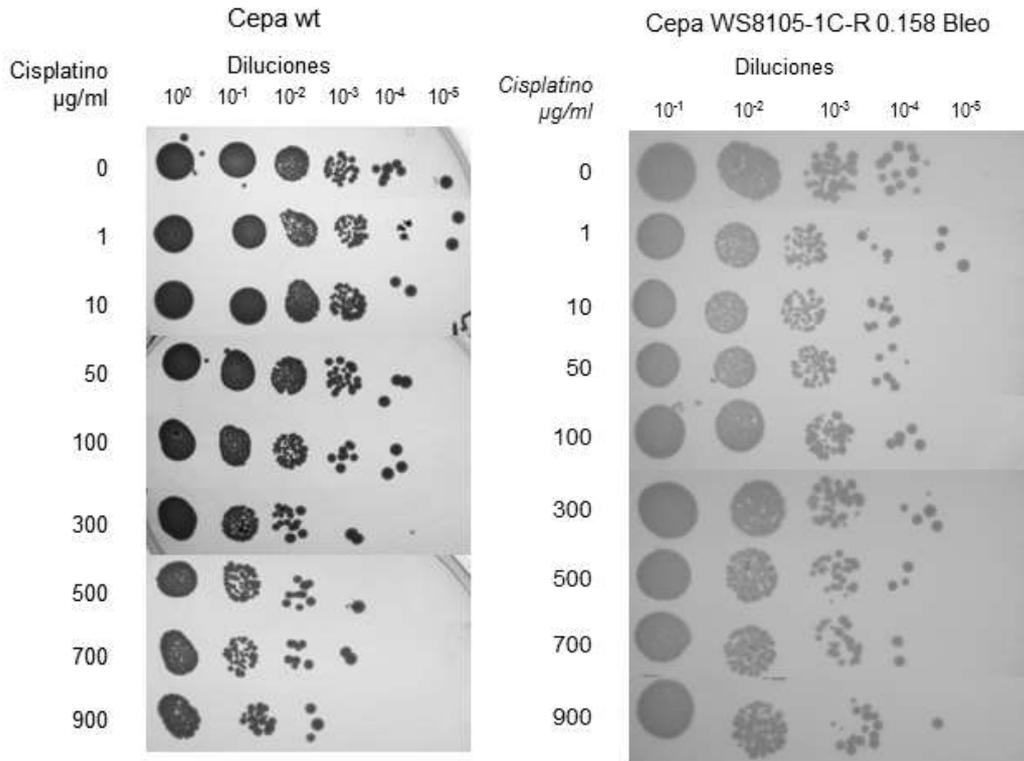


Figura 45. Citotoxicidad del Cisplatino evaluada mediante drop test. wt: cepa salvaje (control). WS8105-1C-R 0.158 Bleo: cepa resistente a Bleomicina.

Tabla 10. Resistencia a Cisplatino de la cepa parental y de la cepa resistente a Bleomicina.

	ID50 Cisplatino (µg/ml)	ID90 Cisplatino (µg/ml)
WS8105-1C (wt)	89.68	264.04
WS8105-1C-R 0.158 Bleo	41.87*** (2.14)S	1384*** (5.24)R

WS8105-1C (wt): cepa salvaje. WS8105-1C-R 0.158 Bleo: cepa resistente a Bleomicina. Entre paréntesis se indica el incremento relativo de sensibilidad (S) o resistencia (R) respecto de la línea salvaje (wt).

(Wt vs WS8105-1C-R 0.158 Bleo) + Cisplatino ***p = 0,077; ANOVA.

4.5 Envejecimiento cronológico

Durante los 31 días que duró el proceso de envejecimiento celular, se observó que en la cepa WS8105-1C-R300cisPt (resistente a Cisplatino) se producía un retraso del envejecimiento respecto de la cepa parental (Figura 46 y 47). En la cepa parental se produjo una caída brusca de la fracción superviviente (FS), asintotizándose en el día 3 y

con un valor de FS de 0,04. En cambio, en la cepa WS8105-1C-R300cisPt la caída de FS fue mucho menos brusca, asintotizándose en el día 15 en el valor de FS de 0,04.

Mediante ajuste lineal se calculó la FS50 obteniéndose un resultado de 1,61 días para la cepa wt y de 5,22 días para la cepa WS8105-1C-R300cisPt, mostrando por tanto un retraso en el envejecimiento, respecto de la línea parental, de 3,24 días (Tabla 11). Así pues, existen diferencias estadísticamente significativas de que la cepa resistente a Cisplatino envejece más lento que la cepa salvaje ($p = 0,0009$; ANOVA).

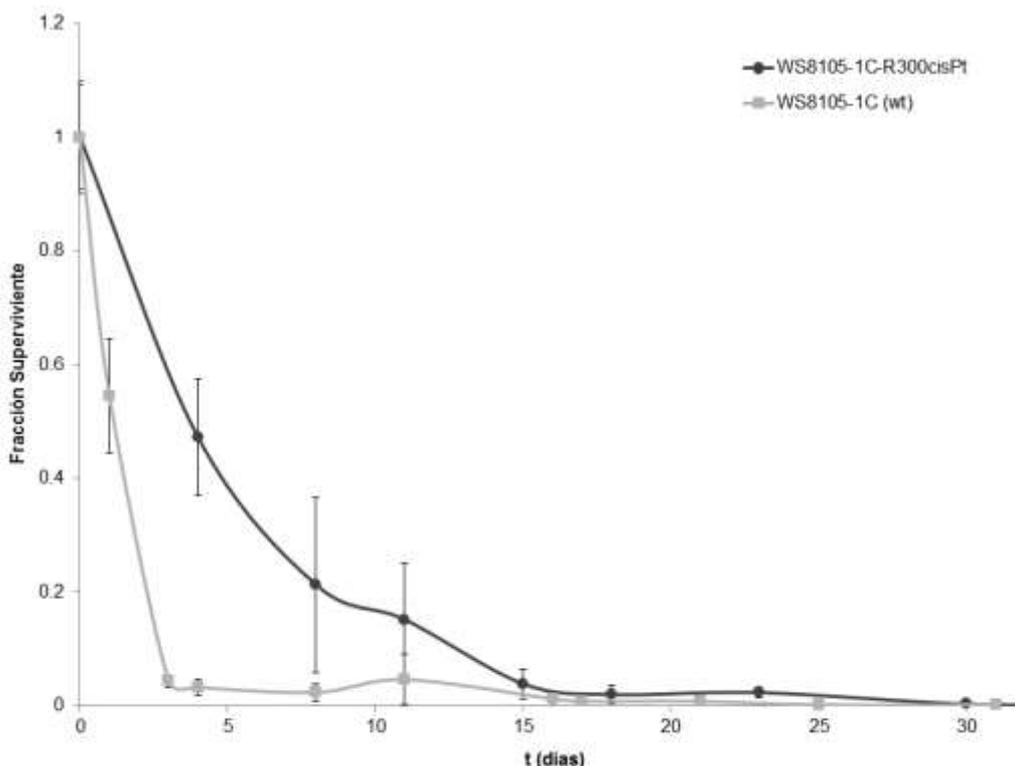


Figura 46. Envejecimiento cronológico en levaduras. wt: cepa salvaje (control). WS8105-1C-R300cisPt: resistente a Cisplatino. Media \pm SD. $p = 0,0009$; ANOVA.

Tabla 11. Envejecimiento cronológico en la línea salvaje y resistente a Cisplatino.

	Envejecimiento Cronológico FS ₅₀ (Días)	Retraso relativo en el envejecimiento
WS8105-1C (wt)	1,61	
WS8105-1C-R300cisPt	5,22	3.24

wt: cepa salvaje (control). WS8105-1C-R300cisPt: resistente a Cisplatino. Wt vs WS8105-1C-R300cisPt $p = 0,0009$; ANOVA.

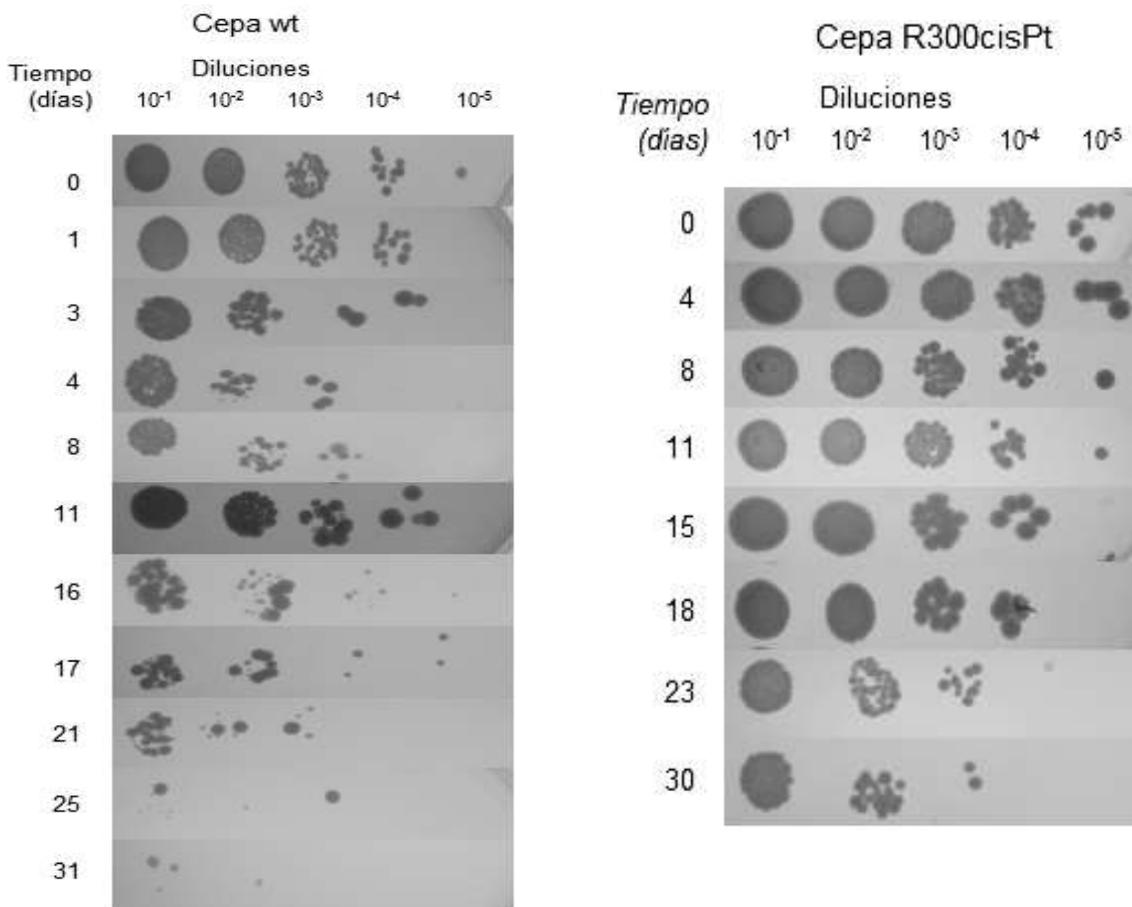


Figura 47. Envejecimiento cronológico evaluado mediante drop test. wt: cepa salvaje (control). WS8105-1C-R300cisPt: resistente a Cisplatino.

Durante los 31 días que duró el proceso de envejecimiento celular, se observó que en la cepa WS8105-1C-R 0.158 Bleo (resistente a Bleomicina) se producía un retraso del envejecimiento respecto de la cepa parental (Figura 48 y 49). En la cepa parental se produjo una caída brusca de la fracción superviviente (FS), asintotizándose en el día 3 y con un valor de FS de 0,04. En cambio, en la cepa WS8105-1C-R 0.158 Bleo la caída de FS fue mucho menos brusca, asintotizándose en el día 24 en el valor de FS de 0,04.

Mediante ajuste lineal se calculó la FS50 obteniéndose un resultado de 1,61 días para la cepa wt y de 13,48 días para la cepa WS8105-1C-R 0.158 Bleo, mostrando por tanto un retraso en el envejecimiento, respecto de la línea parental, de 8,37 días (Tabla 12). Así pues, existen diferencias estadísticamente significativas de que la cepa resistente a Bleomicina envejece más lento que la cepa salvaje ($p = 0,0009$; ANOVA). Además, el retraso producido en el envejecimiento es mayor en la cepa resistente a Bleomicina que en la cepa resistente a Cisplatino.

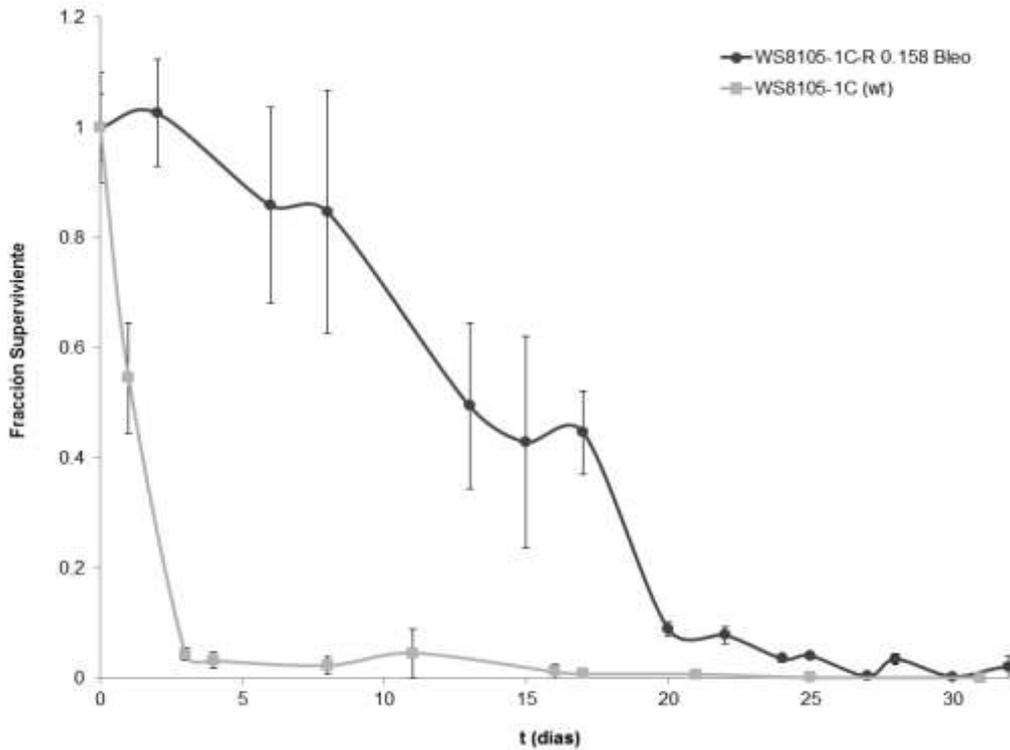


Figura 48. Envejecimiento cronológico en levaduras. wt: cepa salvaje (control). WS8105-1C-R 0.158 Bleo: resistente a Bleomicina. Media \pm SD. $p = 0,0009$; ANOVA.

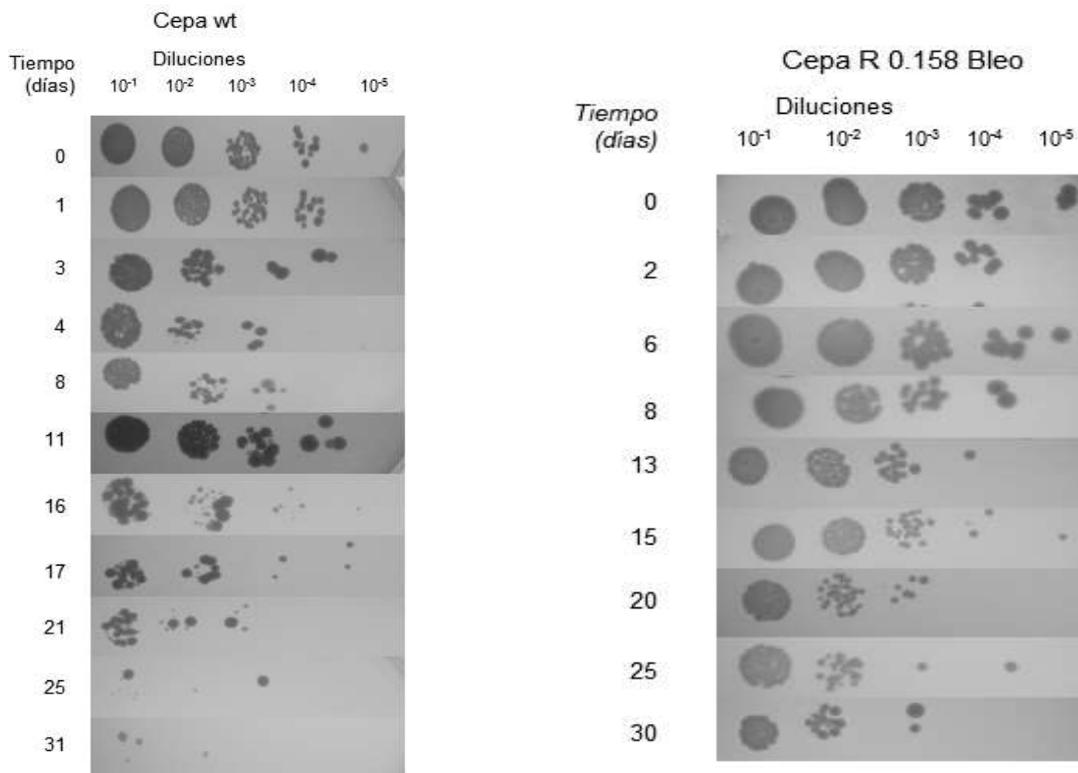


Figura 49. Envejecimiento cronológico evaluado mediante drop test. wt: cepa salvaje (control). WS8105-1C-R 0.158 Bleo: resistente a Bleomicina

Tabla 12. Envejecimiento cronológico en la línea salvaje y resistente a Bleomicina.

	Envejecimiento Cronológico FS ₅₀ (Días)	Retraso relativo en el envejecimiento
WS8105-1C (wt)	1,61	
WS8105-1C-R 0.158 Bleo	13,48	8.37

wt: cepa salvaje (control). WS8105-1C-R 0.158 Bleo: cepa resistente a Bleomicina.
wt vs WS8105-1C-R 0.158 Bleo p = 0,0009; ANOVA.

En la figura 50 se muestra la relación obtenida entre la variación relativa de resistencia, a Cisplatino y Bleomicina en las cepas resistentes, y el retraso en el envejecimiento cronológico. Se observa que tanto para los valores de ID50 e ID90 se produce un incremento de resistencia asociado a un aumento del retraso en el envejecimiento, respecto a la cepa wt, siendo mayor para la cepa resistente a Bleomicina (WS8105-1C-R 0.158 Bleo).

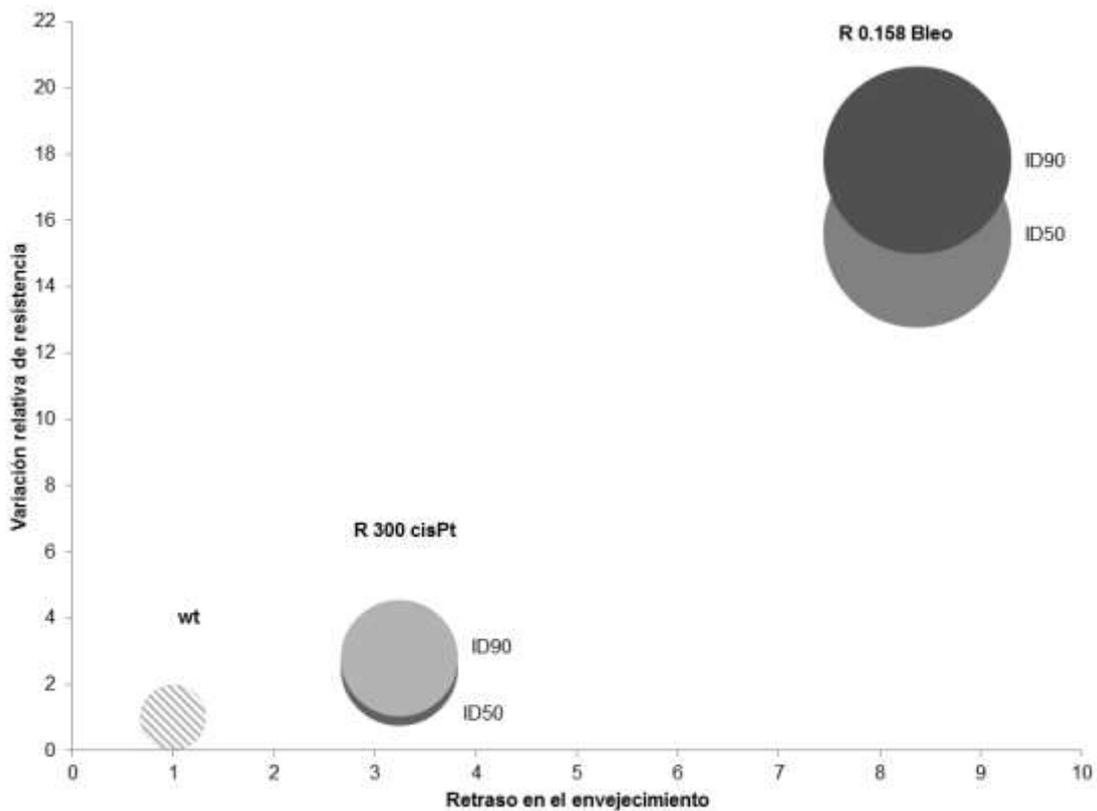


Figura 50. Correlación entre resistencia a Cisplatino y Bleomicina, y retraso en el envejecimiento

cronológico. wt: cepa salvaje (control). WS8105-1C-R300cisPt: resistente a Cisplatino. WS8105-1C-R 0.158 Bleo: resistente a Bleomicina.

4.6 Envejecimiento replicativo

En la figura 51, se muestra el envejecimiento replicativo en la cepa salvaje y en las cepas resistentes. Al igual que ocurre con el envejecimiento cronológico, se observa un retraso del envejecimiento en la cepa WS8105-1C-R300cisPt (resistente a Cisplatino) y en la cepa WS8105-1C-R 0.158 Bleo (resistente a Bleomicina) respecto de la parental.

El retraso en el envejecimiento se inicia a partir de la generación 100, donde se aprecian algunas diferencias de la cepa WS8105-1C-R300cisPt con la cepa salvaje y una marcada diferencia entre la cepa WS8105-1C-R 0.158 Bleo y la cepa salvaje. Dado que el análisis es cualitativo y puramente visual, podemos decir que el retraso es manifiestamente evidente en la generación 175.

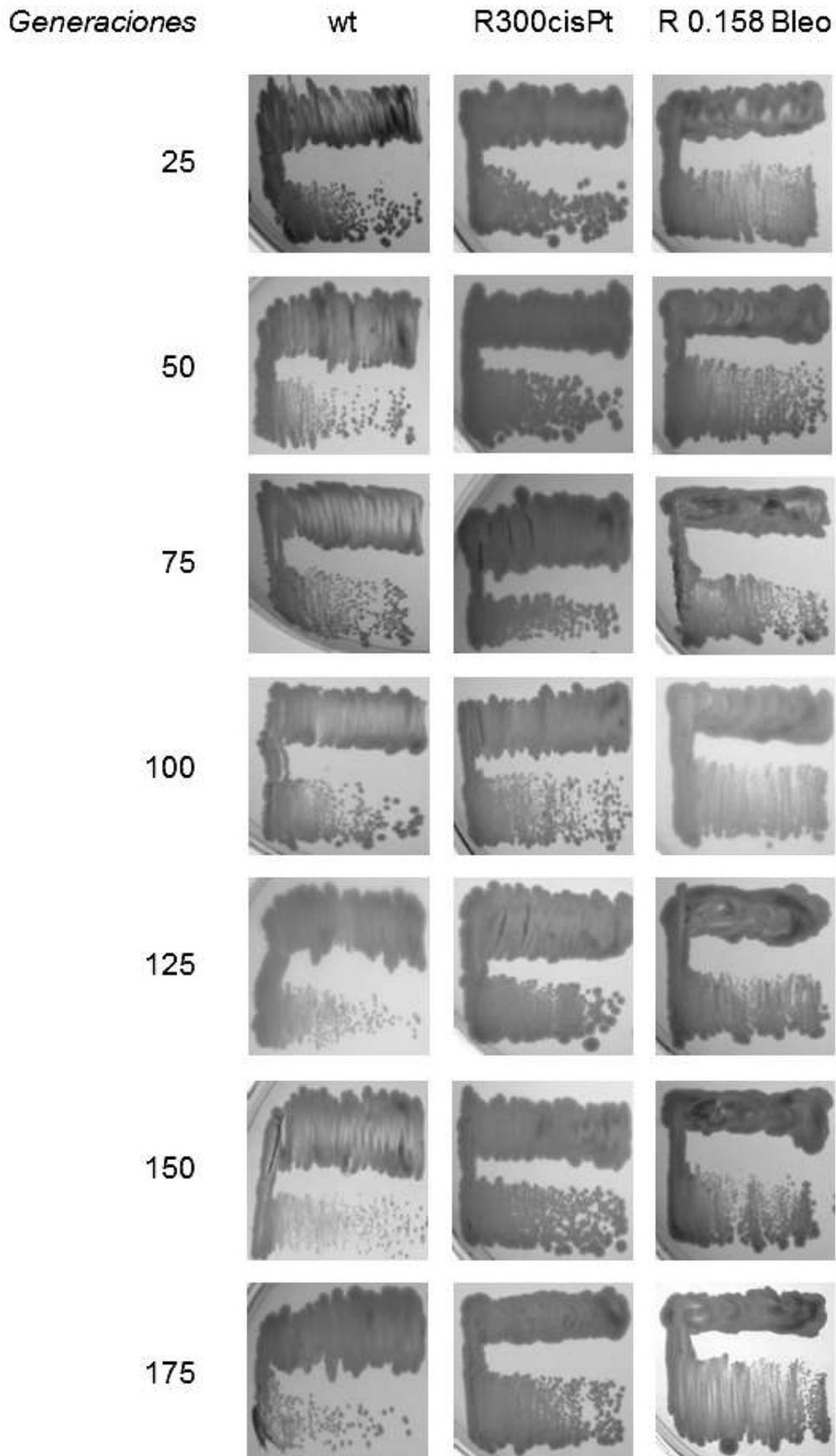


Figura 51. Envejecimiento replicativo. wt: cepa salvaje (control). WS8105-1C-R300cisPt: resistente a Cisplatino. WS8105-1C-R 0.158 Bleo: resistente a Bleomicina.

4.7 Análisis proteómico

4.7.1 Análisis proteómico cepa WS8105-1C-R300cisPt vs cepa wt

Como se aprecia en la figura 52, se han encontrado 59 proteínas que únicamente se expresan en la cepa wt (cepa salvaje), 64 que sólo se expresan en la cepa WS8105-1C-R300cisPt (resistente a Cisplatino), y 149 que se expresan en ambas cepas.

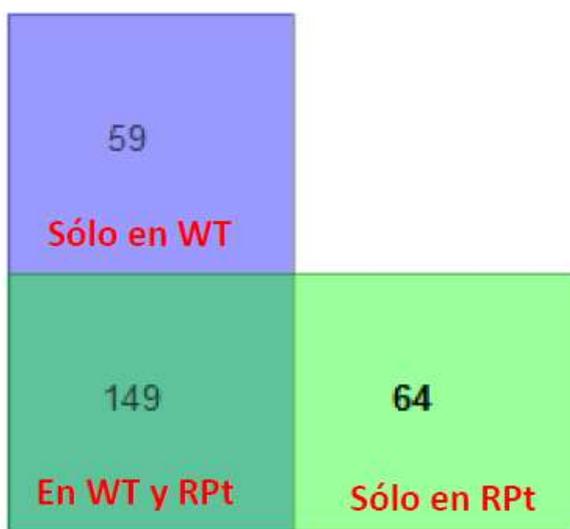


Figura 52. Proteínas expresadas. WT: cepa salvaje. RPt: WS8105-1C-R300cisPt (cepa resistente a Cisplatino).

En la tabla 13, se indican todas las proteínas comunes en ambas cepas con identidad u homología extensa (SCORE > 28; p <0,05).

Tabla 13. Proteínas comunes en ambas cepas con identidad u homología extensa (SCORE > 28; p <0,05).

PROTEÍNA	SCORE		emPAI		Δ emPAI
	wt	RCisPt	wt	RCisPt	
QCR2_YEAST	36	330	0,08	0,83	10,375
QCR1_YEAST	53	141	0,06	0,36	6,000
ALDH4_YEAST	189	461	0,18	0,81	4,500
ATPB_YEAST	227	950	0,4	1,75	4,375
ATPA_YEAST	242	954	0,37	1,32	3,568
SCW10_YEAST	34	229	0,08	0,25	3,125
HSP26_YEAST	141	542	0,46	1,43	3,109
ATPG_YEAST	146	336	0,19	0,56	2,947
PCKA_YEAST	87	389	0,11	0,29	2,636
PMG1_YEAST	360	551	0,73	1,69	2,315
RS14A_YEAST	205	138	0,22	0,5	2,273
ALF_YEAST	300	613	0,26	0,59	2,269

HSP77_YEAST	172	252	0,19	0,42	2,211
RS20_YEAST	62	125	0,24	0,53	2,208
CISY1_YEAST	98	270	0,19	0,41	2,158
ENG1_YEAST	170	251	0,08	0,17	2,125
HXKA_YEAST	173	112	0,06	0,12	2,000
PST1_YEAS7	36	69	0,07	0,14	2,000
MASY_YEAST	62	166	0,05	0,1	2,000
LYS12_YEAST	55	61	0,08	0,16	2,000
HSP12_YEAST	470	482	2,48	4,78	1,927
ATP5E_YEAST	129	194	1,27	2,44	1,921
TPIS_YEAST	397	841	0,4	0,76	1,900
HSP60_YEAST	300	583	0,5	0,93	1,860
NDI1_YEAST	60	97	0,06	0,11	1,833
HS104_YEAST	114	98	0,06	0,1	1,667
HSP71_YEAST	725	988	0,7	1,12	1,600
VATB_YEAST	87	119	0,11	0,17	1,545
IDH2_YEAST	46	155	0,17	0,26	1,529
IDH1_YEAST	224	329	0,17	0,26	1,529
KPYK1_YEAST	1240	1556	1,07	1,59	1,486
HSP72_YEAST	530	638	0,63	0,86	1,365
HSP75_YEAST	92	252	0,2	0,26	1,300
EF1A_YEAST	388	444	0,35	0,44	1,257
ALDH6_YEAST	201	268	0,32	0,4	1,250
HSP31_YEAST	506	393	1,27	1,56	1,228
HSC82_YEAST	429	439	0,31	0,36	1,161
RS17A_YEAST	147	131	0,2	0,21	1,050
RS19A_YEAST	79	134	0,2	0,21	1,050
HMF1_YEAST	37	114	0,23	0,24	1,043
IF6_YEAST	111	68	0,25	0,26	1,040
RL11A_YEAST	98	114	0,35	0,36	1,029
YP010_YEAST	301	419	0,42	0,43	1,024
H2B1_YEAST	143	195	0,51	0,52	1,020
PROF_YEAST	137	128	0,53	0,54	1,019
YP225_YEAST	177	115	0,66	0,67	1,015
CYPH_YEAST	1674	1375	2,88	2,91	1,010
RS21A_YEAST	313	348	2,24	2,26	1,009
RS21B_YEAST	358	321	2,24	2,26	1,009
SDO1L_YEAST	499	504	2,37	2,39	1,008
ENO1_YEAST	1893	1377	1,19	1,2	1,008
VDAC1_YEAST	770	690	1,7	1,71	1,006
RL10_YEAST	30	79	0,13	0,13	1,000
RS27A_YEAST	723	422	0,98	0,98	1,000
IPYR_YEAST	53	71	0,1	0,1	1,000
RS12_YEAST	49	168	0,47	0,47	1,000

APE2_YEAST	248	100	0,06	0,06	1,000
IF4A_YEAS7	476	363	0,41	0,41	1,000
RL6A_YEAST	43	71	0,16	0,16	1,000
KAR_YEAST	511	170	0,19	0,19	1,000
RS18A_YEAST	246	155	0,42	0,42	1,000
RS4A_YEAST	41	71	0,11	0,11	1,000
HIS2_YEAST	82	54	0,04	0,04	1,000
SERA_YEAST	89	41	0,06	0,06	1,000
TCTP_YEAST	98	52	0,17	0,17	1,000
MIC60_YEAS1	120	63	0,05	0,05	1,000
G6PI_YEAST	101	153	0,11	0,11	1,000
RS5_YEAST	429	288	0,27	0,27	1,000
RL12A_YEAST	146	143	0,4	0,4	1,000
SODC_YEAST	85	79	0,45	0,45	1,000
ATPD_YEAST	253	225	0,19	0,19	1,000
RL25_YEAST	42	84	0,21	0,21	1,000
PUR7_YEAST	90	118	0,09	0,09	1,000
CH10_YEAST	165	231	1,16	1,16	1,000
SAR1_YEAST	49	42	0,15	0,15	1,000
SFB2_YEAST	65	40	0,03	0,03	1,000
RS22A_YEAST	125	87	0,22	0,22	1,000
ODPB_YEAST	95	54	0,08	0,08	1,000
PRX1_YEAST	42	88	0,11	0,11	1,000
GPD1_YEAST	122	33	0,15	0,15	1,000
MMF1_YEAST	88	146	0,2	0,2	1,000
VATE_YEAST	103	81	0,12	0,12	1,000
TBCA_YEAST	36	45	0,27	0,27	1,000
PHB2_YEAST	46	47	0,09	0,09	1,000
RPAC1_YEAST	34	67	0,08	0,08	1,000
NHP6B_YEAST	42	42	0,29	0,29	1,000
YN034_YEAST	93	73	0,31	0,31	1,000
MLC1_YEAST	183	73	0,72	0,72	1,000
CYPC_YEAST	130	114	0,82	0,82	1,000
MRP8_YEAST	158	72	0,13	0,13	1,000
ATP14_YEAST	125	166	0,23	0,23	1,000
HMO1_YEAST	140	98	0,12	0,12	1,000
SCW4_YEAST	106	238	0,16	0,16	1,000
RS10A_YEAST	115	158	0,26	0,26	1,000
YHI0_YEAST	111	40	0,04	0,04	1,000
SODM_YEAST	198	204	0,26	0,26	1,000
YB085_YEAST	202	182	0,84	0,84	1,000
SYKC_YEAST	87	55	0,09	0,09	1,000
RDL1_YEAST	59	38	0,21	0,21	1,000
NDK_YEAST	43	58	0,41	0,41	1,000

NOP58_YEAST7	40	43	0,06	0,06	1,000
TSA1_YEAST	278	221	0,74	0,74	1,000
METE_YEAST	53	40	0,04	0,04	1,000
RS7A_YEAST	55	65	0,32	0,32	1,000
OAT_YEAST	152	140	0,14	0,14	1,000
ADH1_YEAST	2497	1292	1,45	1,27	0,876
ENO2_YEAST	2525	1753	2,03	1,67	0,823
EF2_YEAST	444	299	0,18	0,14	0,778
RS3_YEAST	241	266	0,77	0,58	0,753
PDC1_YEAST	1366	1105	1,45	1,01	0,697
RL30_YEAST	93	109	1,66	1,15	0,693
FAS2_YEAST	35	40	0,03	0,02	0,667
GLRX1_YEAST	351	185	1,56	1,03	0,660
YGP1_YEAST	303	225	0,28	0,18	0,643
G3P1_YEAST	3018	1063	1,54	0,98	0,636
DHOM_YEAST	491	242	0,27	0,17	0,630
RS6A_YEAST	111	141	0,4	0,25	0,625
IMDH4_YEAST	251	163	0,18	0,11	0,611
IMDH3_YEAST	254	84	0,18	0,11	0,611
COFI_YEAST	261	129	0,74	0,45	0,608
RS28A_YEAST	110	55	2,05	1,11	0,541
CYSD_YEAST	130	35	0,13	0,07	0,538
BMH1_YEAST	169	112	0,22	0,11	0,500
RTN1_YEAST	168	47	0,2	0,1	0,500
SYNC_YEAST	112	67	0,1	0,05	0,500
STI1_YEAST	151	140	0,1	0,05	0,500
PGK_YEAST	2860	1901	2,92	1,44	0,493
PSA2_YEAST	145	30	0,25	0,12	0,480
MCR1_YEAST7	42	102	0,19	0,09	0,474
RS7B_YEAST	52	34	0,32	0,15	0,469
OLA1_YEAST	93	32	0,15	0,07	0,467
RL1A_YEAST	162	127	0,28	0,13	0,464
ADPP_YEAST	114	72	0,26	0,12	0,462
RL23A_YEAST	395	77	0,5	0,23	0,460
BMH2_YEAST	157	106	0,22	0,1	0,455
NACB1_YEAST7	38	89	0,42	0,19	0,452
RLA0_YEAST	90	57	0,2	0,09	0,450
TRX1_YEAST	349	166	2,6	1,16	0,446
GLRX2_YEAST	152	35	0,45	0,2	0,444
COX17_YEAST	122	34	0,96	0,4	0,417
ACBP_YEAST	240	175	2,13	0,77	0,362
HXKG_YEAST	212	128	0,18	0,06	0,333
TRX2_YEAST	1814	485	11,99	3,69	0,308
AHP1_YEAST	939	481	1,95	0,59	0,303

SSZ1_YEAST	130	32	0,17	0,05	0,294
YNN4_YEAST	392	93	0,56	0,16	0,286
GBLP_YEAST	163	51	0,42	0,09	0,214
6PGD1_YEAST	192	62	0,33	0,06	0,182

Wt: cepa salvaje. RCispt: WS8105-1C-R300cisPt (cepa resistente a Cisplatino).

emPAI: expresión proteica relativa.

Δ emPAI: incremento de la expresión proteica relativa.

Se realizó un análisis con el objetivo de evaluar qué proteínas tuvieron una sobreexpresión mayor. Para ello se calculó el número de proteínas que se expresaban para diversos rangos de Δ emPAI (incremento de expresión). Así se obtuvo que para, un Δ emPAI entre 0-1 se obtuvieron 96 proteínas, para un Δ emPAI entre 1-2 se obtuvieron 36 proteínas, para un Δ emPAI entre 2-3 se obtuvieron 9 proteínas, para un Δ emPAI entre 3-4 se obtuvieron 3 proteínas, para un Δ emPAI entre 4-5 se obtuvieron 2 proteínas y para un Δ emPAI $>$ 5 se obtuvieron 2 proteínas. Con estos datos se decidió seleccionar como más significativas aquellas con un Δ emPAI $>$ 1,5, las cuales representan un 20,30% del total de proteínas (Figura 53).

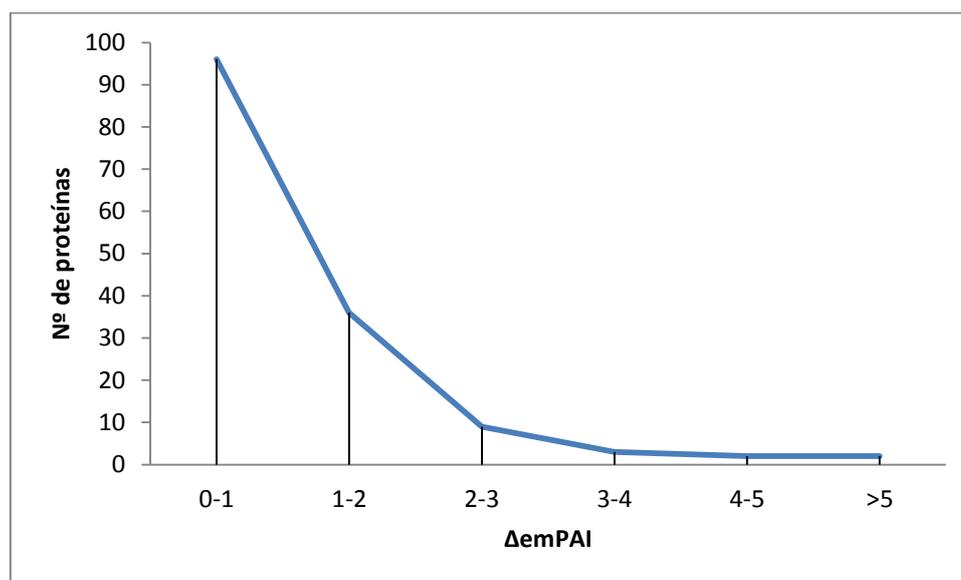


Figura 53. Número de proteínas expresadas en distintos rangos de Δ emPAI (incremento de expresión proteica).

Así pues se observó que, con una probabilidad del 95% se incrementó en 10,375 veces la expresión de la proteína QCR2 (gen QCR2), en 6 veces la proteína QCR1 (gen COR1), en 4,5 la proteína ALDH4 (gen ALD4), en 4,375 la proteína ATPB (gen ATP2), en 3,568 la proteína ATPA (gen ATP1), en 3,125 la proteína SCW10 (gen SCW10), en 3,109 la proteína HSP26 (gen HSP26), en 2,947 la proteína ATPG (gen ATP3), en 2,636 la proteína PCKA (gen PCK1), en 2,315 la proteína PMG1 (gen GPM1), en 2,273 la proteína RS14A (gen RPS14A), en 2,269 la proteína ALF (gen FBA1), en 2,211 la proteína HSP77 (gen SSC1), en 2,208 la proteína RS20 (gen RPS20), en 2,158 la proteína CISY1 (gen CIT1), en 2,125 la proteína ENG1 (gen

DSE4), en 2 la proteína HXKA (gen HXK1), PST1 (gen PST1), MASY (gen MLS1) y LYS12 (gen LYS12), en 1,927 la proteína HSP12 (gen HSP12), en 1,921 la proteína ATP5E (gen ATP15), en 1,9 la proteína TPIS (gen TPI1), 1,86 la proteína HSP60 (gen HSP60), en 1,833 la proteína NDI1 (gen NDI1), en 1,667 la proteína HS104 (gen HSP104), en 1,6 la proteína HSP71 (gen SSA1), en 1,545 la proteína VATB (gen VMA2), y en 1,529 la proteína IDH2 (gen IDH2) y IDH1 (gen IDH1) (Tabla 14). En la figura 54 se ilustra las funciones celulares de estas proteínas y en la tabla 14 se detallan explícitamente dichas funciones celulares.

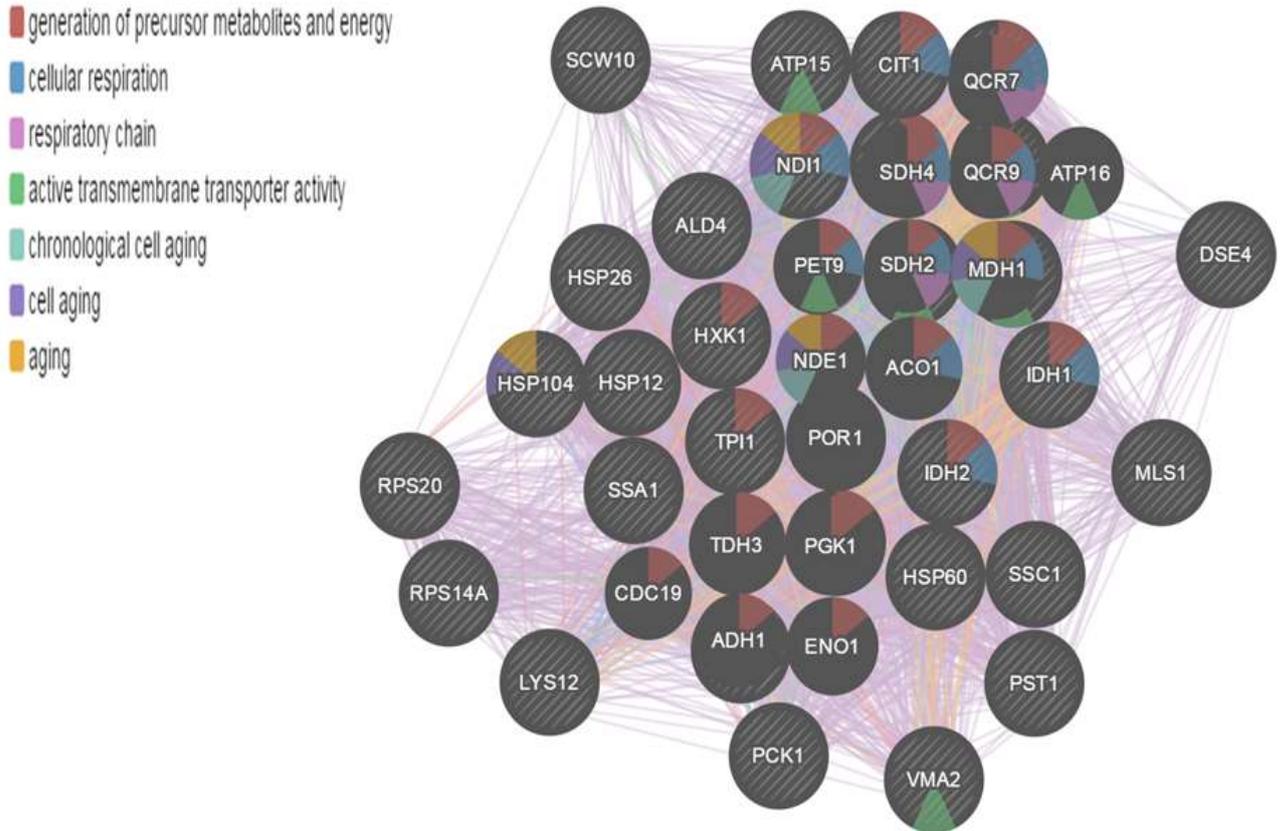


Figura 54. Funciones de los genes que codifican las proteínas con $\Delta\text{emPAI} > 1,5$ en la cepa WS8105-1C-R300cisPt (cepa resistente a Cisplatino).

Tabla 14. Proteínas comunes (genes que las codifican) y función en ambas cepas con identidad u homología extensa (SCORE > 28; p < 0,05) y con un $\Delta\text{emPAI} > 1,5$.

PROTEÍNAS	GENES	ΔemPAI	FUNCIÓN
QCR2_YEAST	QCR2	10,375	Subunidad 2 de ubiquinol-citocromo c reductasa (Complejo III). El complejo III es un componente de la cadena de transporte de electrones de la membrana mitocondrial interna.
QCR1_YEAST	COR1	6	Subunidad del complejo ubiquinol-citocromo c reductasa. El complejo ubiquinol-citocromo c reductasa (complejo bc1) es un componente de la

			cadena de transporte de electrones de la membrana mitocondrial interna.
ALDH4_YEAST	ALD4	4,5	Aldehído deshidrogenasa mitocondrial. Necesaria para el metabolismo del etanol y la conversión de acetaldehído en acetato. La actividad es dependiente de K^+ . Utiliza igualmente $NADP^+$ o NAD^+ como coenzimas. La expresión es reprimida por la glucosa. Puede sustituir la aldehído deshidrogenasa dependiente de $NADP$ citosólica cuando se dirige al citosol. El homólogo humano es ALDH2.
ATPB_YEAST	ATP2	4,375	Subunidad beta del sector F1 de la F1F0-ATP sintasa mitocondrial (síntesis de ATP).
ATPA_YEAST	ATP1	3,568	Subunidad alfa del sector F1 de la F1F0-ATP sintasa mitocondrial (síntesis de ATP).
SCW10_YEAST	SCW10	3,125	Proteína de la pared celular con semejanza a las glucanasas. Organización o biogénesis de la pared celular, conjugación y actividad hidrolasa actuando sobre los enlaces glucosídicos.
HSP26_YEAST	HSP26	3,109	Proteína pequeña de choque térmico (sHSP) con actividad chaperona; Forma huecos, oligómeros en forma de esfera que suprimen la agregación de proteínas desplegadas. La activación del oligómero requiere un cambio conformacional inducido por calor. También tiene actividad de unión al ARNm.
ATPG_YEAST	ATP3	2,947	Subunidad gamma del sector F1 de la F1F0-ATP sintasa mitocondrial (síntesis de ATP).
PCKA_YEAST	PCK1	2,636	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa. Enzima clave en la gluconeogénesis, cataliza la reacción temprana en la biosíntesis de hidratos de carbono (conversión de oxaloacetato en fosfoenolpiruvato y CO_2). La glucosa reprime la transcripción y acelera la degradación del ARNm, regulada por Mcm1p y Cat8p, localizada en el citosol.
PMG1_YEAST	GPM1	2,315	Fosfoglicerato mutasa. Cataliza la conversión del 3-fosfoglicerato en 2-fosfoglicerato durante la glucólisis y la reacción inversa durante la gluconeogénesis.
RS14A_YEAST	RPS14 A	2,273	Componente proteico de la subunidad ribosómica pequeña (40S). Necesaria

			para el ensamblaje de ribosomas y el procesamiento pre-ARNr 20S. Homóloga a la proteína ribosómica S14 de mamífero.
ALF_YEAST	FBA1	2,269	Fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa. Necesaria para la glucólisis y la gluconeogénesis; Cataliza la conversión de fructosa 1,6 bisfosfato en gliceraldehído-3-P y dihidroxiacetona-P. Se localiza en la superficie externa mitocondrial tras el estrés oxidativo.
HSP77_YEAST	SSC1	2,211	ATPasa. Constituye el componente motor de la Translocasa de la membrana mitocondrial interna (complejo TIM23). Implicada en la translocación y plegamiento proteico.
RS20_YEAST	RPS20	2,208	Componente proteico de la subunidad ribosómica pequeña (40S). Involucrados en la maduración de la subunidad pequeña (ARNr) y la traducción. La sobreproducción suprime mutaciones que afectan a la transcripción dependiente de ARN polimerasa III; Homóloga a la proteína ribosomal S20 de mamíferos.
CISY1_YEAST	CIT1	2,158	Citrato sintasa. Cataliza la condensación del Oxalacetato y Acetil-CoA, para formar Citrato en el Ciclo de Krebs. Constituye la enzima limitante del ciclo.
ENG1_YEAST	DSE4	2,125	Endo-1,3(4)-beta-glucanasa 1. Proteína específica segregada por las células de hija y que similar a las glucanasas. Degrada la pared celular de la hija haciendo que ésta se separe de célula progenitora.
HXKA_YEAST	HXK1	2	Isoenzima 1 de la hexoquinasa; Proteína citosólica que cataliza la fosforilación de la Glucosa durante el metabolismo de ésta (conversión de la Glucosa en Glucosa-6-fosfato).
PST1_YEAS7	PST1	2	Manoproteínas de la pared celular. Estructura de la pared celular.
MASY_YEAST	MLS1	2	Malato sintasa, enzima del ciclo del glioxilato. Cataliza la condensación del Glioxilato con Acetil-CoA para formar malato.
LYS12_YEAST	LYS12	2	Homoisocitrato deshidrogenasa. Cataliza la conversión de homoisocitrato en α -cetoacido (vía de formación de Lisina).
HSP12_YEAST	HSP12	1,927	Proteína de la membrana plasmática implicada en mantener la organización de

			la membrana. Participa en el mantenimiento de la organización durante las condiciones de estrés: inducido por choque térmico, estrés oxidativo, estrés osmótico, fase estacionaria, el agotamiento de la glucosa, el oleato y el alcohol; La abundancia de proteínas aumenta en respuesta al estrés de replicación del ADN y la restricción dietética. Regulado por las vías HOG y Ras-Pka
ATP5E_YEAST	ATP15	1,921	Subunidad épsilon del sector F1 de la F1F0-ATP sintasa mitocondrial (síntesis de ATP).
TPIS_YEAST	TPI1	1,9	Triosa fosfato isomerasa, abundante enzima glucolítica. Cataliza la interconversión entre Gliceraldehído-3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato. Se localiza en las mitocondrias y en la membrana plasmática.
HSP60_YEAST	HSP60	1,86	Chaperonina mitocondrial tetradecamérica. Necesaria para el plegamiento de polipéptidos y ensamblaje del complejo (ATP-dependiente). Previene la agregación y media el replegamiento de las proteínas después del choque térmico. Juega un papel en la transmisión de mtDNA.
NDI1_YEAST	NDI1	1,833	NADH: ubiquinona oxidoreductasa. Transfiere electrones del NADH a la Ubiquinona en la cadena respiratoria pero no bombea protones. En estrés apoptótico, se activa en las mitocondrias mediante escisión N-terminal, luego se transloca al citoplasma para inducir la apoptosis. Homólogo de AIFM2 humano.
HS104_YEAST	HSP104	1,667	Proteína de choque térmico que coopera con Ydj1p (Hsp40) y Ssa1p (Hsp70) para replegar y reactivar proteínas previamente desnaturalizadas y agregadas. Responden a tensiones como: calor, etanol y arsenito de sodio. Incremento de proteínas frente a estrés de replicación del ADN.
HSP71_YEAST	SSA1	1,6	Miembro de la familia HSP70. ATPasa implicada en el plegamiento de proteínas y el transporte nuclear dirigido señal de localización nuclear (NLS) . Necesaria para la degradación de proteínas, de vida media corta, dependientes de ubiquitina.

			Forma el complejo chaperone con Ydj1p. Localizadas en el núcleo, citoplasma, y pared celular.
VATB_YEAST	VMA2	1,545	Subunidad B del dominio hidrofílico orientado hacia el citosolo (V ₁) de la V-ATPasas (vacuolares). La abundancia de proteínas aumenta en respuesta al estrés de replicación del ADN. Implicadas en la acidificación vacuolar y la homeostasis del calcio.
IDH2_YEAST	IDH2	1,529	Subunidad de la Isocitrato deshidrogenasa dependiente del NAD(+) mitocondrial. El complejo cataliza la oxidación del Isocitrato al Alfa-cetoglutarato en el ciclo de Krebs.
IDH1_YEAST	IDH1	1,529	Subunidad de la Isocitrato deshidrogenasa dependiente del NAD(+) mitocondrial. El complejo cataliza la oxidación del Isocitrato al Alfa-cetoglutarato en el ciclo de Krebs.

Wt: cepa salvaje. RCispt: WS8105-1C-R300cisPt (cepa resistente a Cisplatino). ΔemPAI: incremento de la expresión proteica.

En la tabla 15 se muestran las proteínas anteriormente descritas con los genes que la codifican y además los genes homólogos en humanos.

Tabla 15. Proteínas y genes que las codifican en *S. cerevisiae* y genes homólogos en humanos.

PROTEÍNA	Gen (<i>S. cerevisiae</i>)	Gen homólogo humano
QCR2_YEAST	QCR2	<u>UQCRC2</u> , <i>H.sapiens</i> ubiquinol-cytochrome c reductase core protein II
QCR1_YEAST	COR1	<u>FAM9B</u> , <i>H.sapiens</i> family with sequence similarity 9, member B <u>NCOR1</u> , <i>H.sapiens</i> nuclear receptor corepressor 1 <u>SYCP3</u> , <i>H.sapiens</i> synaptonemal complex protein 3
ALDH4_YEAST	ALD4	<u>ALDH1B1</u> , <i>H.sapiens</i> aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1
ATPB_YEAST	ATP2	<u>ATP5B</u> , <i>H.sapiens</i> ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1
ATPA_YEAST	ATP1	<u>ATP5A1</u> , <i>H.sapiens</i> ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1

		complex, alpha subunit 1, cardiac muscle
SCW10_YEAST	SCW10	Desconocido o no existe
HSP26_YEAST	HSP26	Desconocido o no existe
ATPG_YEAST	ATP3	<u>ATP5C1, <i>H.sapiens</i></u> ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1
PCKA_YEAST	PCK1	<u>PRKCB, <i>H.sapiens</i></u> protein kinase C, beta <u>PCK2, <i>H.sapiens</i></u> phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial) <u>PCK1, <i>H.sapiens</i></u> phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble)
PMG1_YEAST	GPM1	<u>PGAM4, <i>H.sapiens</i></u> phosphoglycerate mutase family member 4 <u>PGAM2, <i>H.sapiens</i></u> phosphoglycerate mutase 2 (muscle)
RS14A_YEAST	RPS14A	<u>RPS14, <i>H.sapiens</i></u> ribosomal protein S14
ALF_YEAST	FBA1	Desconocido o no existe
HSP77_YEAST	SSC1	<u>ATP2C1, <i>H.sapiens</i></u> ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, type 2C, member 1 <u>AQP9, <i>H.sapiens</i></u> aquaporin 9 <u>ELOVL1, <i>H.sapiens</i></u> ELOVL fatty acid elongase 1 <u>HSPA9, <i>H.sapiens</i></u> heat shock 70kDa protein 9 (mortalin)
RS20_YEAST	RPS20	<u>RPS20, <i>H.sapiens</i></u> ribosomal protein S20
CISY1_YEAST	CIT1	Desconocido o no existe
ENG1_YEAST	DSE4	Desconocido o no existe
HXKA_YEAST	HXK1	<u>HK1, <i>H.sapiens</i></u> hexokinase 1
PST1_YEAS7	PST1	<u>ST8SIA4, <i>H.sapiens</i></u> ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 4
MASY_YEAST	MLS1	Desconocido o no existe
LYS12_YEAST	LYS12	Desconocido o no existe
HSP12_YEAST	HSP12	Desconocido o no existe
ATP5E_YEAST	ATP15	Desconocido o no existe

TPIS_YEAST	TPI1	<u>TPI1, <i>H.sapiens</i></u> triosephosphate isomerase 1
HSP60_YEAST	HSP60	<u>HSPD1, <i>H.sapiens</i></u> heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin) <u>ACO2, <i>H.sapiens</i></u> aconitase 2, mitochondrial
NDI1_YEAST	NDI1	Desconocido o no existe
HS104_YEAST	HSP104	Desconocido o no existe
HSP71_YEAST	SSA1	<u>HSPA1L, <i>H.sapiens</i></u> heat shock 70kDa protein 1-like <u>TRIM21, <i>H.sapiens</i></u> tripartite motif containing 21
VATB_YEAST	VMA2	<u>ATP6V1B1, <i>H.sapiens</i></u> ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 56/58kDa, V1 subunit B1 <u>ATP6V1B2, <i>H.sapiens</i></u> ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 56/58kDa, V1 subunit B2
IDH2_YEAST	IDH2	<u>IDH2, <i>H.sapiens</i></u> isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial <u>IDH3B, <i>H.sapiens</i></u> isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) beta <u>IDH3A, <i>H.sapiens</i></u> isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha
IDH1_YEAST	IDH1	<u>IDH1, <i>H.sapiens</i></u> isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble <u>IDH3B, <i>H.sapiens</i></u> isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) beta

Por otro lado, en la figura 55 se muestran las interacciones que existen entre los genes que codifican a estas proteínas. Así se puede observar que, existe co-expresión (77,8%), interacciones físicas (7,98%), interacciones genéticas (1,21%) y co-localización (0,92%).

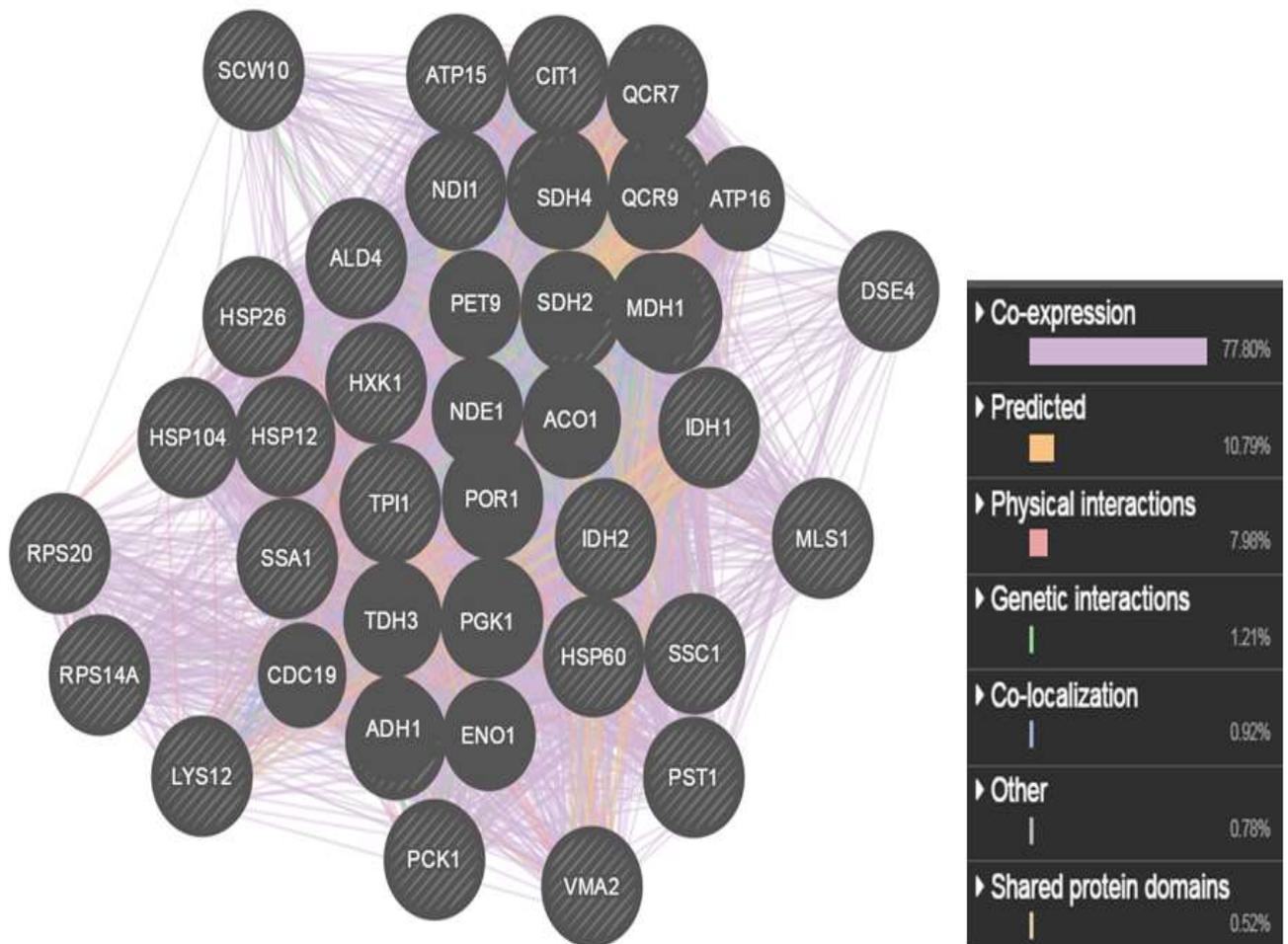


Figura 55. Interacciones entre los genes que codifican las proteínas con $\Delta\text{emPAI} > 1,5$ en la cepa WS8105-1C-R300cisPt (cepa resistente a Cisplatino).

De las 30 proteínas analizadas con $\Delta\text{emPAI} > 1,5$, se realizó un estudio más minucioso de aquellas que presentaron mayores valores de ΔemPAI . Así se analizaron las proteínas QCR2 (gen QCR2), QCR1 (gen COR1), ALDH4 (gen ALD4), ATPB (gen ATP2), ATPA (gen ATP1), SCW10 (gen SCW10), HSP26 (gen HSP26), ATPG (gen ATP3), y PCKA (gen PCK1).

El gen QCR2 (proteína QCR2) está implicado en el transporte de iones transmembrana, en la cadena respiratoria mitocondrial y en la membrana mitocondrial interna. Como se muestra en la figura 56 existe co-expresión con los genes ATP1, ATP2, ATP3, COR1, PCK1, SCW10 y ALD4.

El gen COR1 (proteína QCR) está implicado en la respiración celular, actividad transportadora de iones y protones transmembrana, cadena respiratoria mitocondrial y en la membrana mitocondrial interna. Como se muestra en la figura 56 existe co-expresión con los genes ATP1 (proteína ATPA), PCK1 (proteína PCKA) y SCW10 (proteína SCW10).

El gen ALD4 (proteína ALDH4) está implicado en el metabolismo del etanol y la conversión de acetaldehído en acetato. La actividad es dependiente de K^+ . Como se muestra en la figura 56 existe co-expresión con los genes ATP1 (proteína ATPA), COR1 (proteína QCR1), PCK1 (proteína PCKA) y SCW10 (proteína SCW10).

El gen ATP2 (proteína ATPB) está implicado en el transporte de protones transmembrana, transporte de iones transmembrana, transporte activo transmembrana y membrana mitocondrial interna. Como se muestra en la figura 56 existe co-expresión con los genes SCW10 (proteína SCW10), ATP1 (proteína ATPA), ATP3 (proteína ATPG), COR1 (proteína QCR1), ALD4 (proteína ALDH4) y PCK1 (proteína PCKA).

El gen ATP1 (proteína ATPA) está implicado en el transporte de protones transmembrana, transporte de iones transmembrana, transporte activo transmembrana, y membrana mitocondrial interna. Como se muestra en la figura 56 existe co-expresión con los genes SCW10 (proteína SCW10) y PCKA1 (proteína PCKA).

El gen SCW10 (proteína SCW10) está implicado en la organización o biogénesis de la pared celular, conjugación y actividad hidrolasa actuando sobre los enlaces glucosídicos. Como se muestra en la figura 56 existe co-expresión con los genes QCR2 (proteína QCR2), COR1 (proteína QCR1), ALD4 (proteína ALDH4), ATP2 (proteína ATPB), ATP3 (proteína ATPG), PCK1 (proteína PCKA) y ATP1 (ATPA).

El gen HSP26 (proteína HSP26) está implicado en la formación de huecos, oligómeros en forma de esfera que suprimen la agregación de proteínas desplegadas. La activación del oligómero requiere un cambio conformacional inducido por calor. También tiene actividad de unión al ARNm. Como se muestra en la figura 56 existe co-expresión con los genes ATP1 (ATPA), ATP3 (proteína ATPG), ALD4 (proteína ALDH4), PCK1 (proteína PCKA), COR1 (proteína QCR1) y QCR2 (proteína QCR2).

El gen ATP3 (proteína ATPG) está implicado en el transporte de protones transmembrana, transporte de iones transmembrana, transporte activo transmembrana, y membrana mitocondrial interna. Como se muestra en la figura 56 existe co-expresión con los genes ATP1 (ATPA), COR1 (proteína QCR1), SCW10 (proteína SCW10) y ALD4 (proteína ALDH4).

El gen PCK1 (proteína PCKA) está implicado en la gluconeogénesis, el enzima cataliza la reacción temprana en la biosíntesis de hidratos de carbono (conversión de oxaloacetato en fosfoenolpiruvato y CO_2). Como se muestra en la figura 56 existe co-expresión con el gene SCW10 (proteína SCW10).

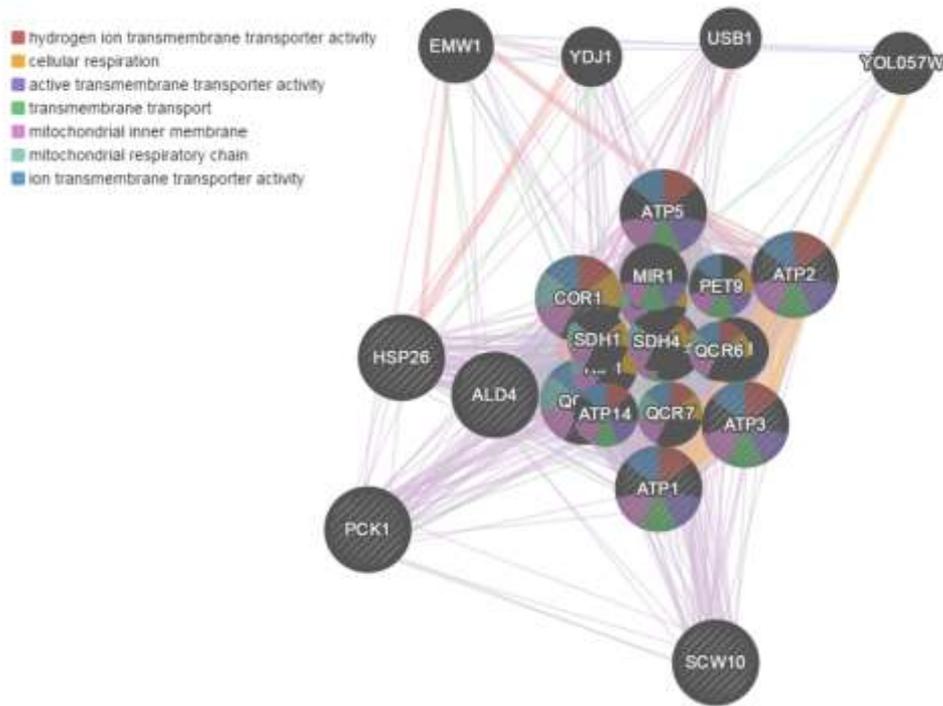


Figura 56. Funciones e interacciones entre los genes que codifican las proteínas con $\Delta\text{empAI} > 2,5$ en la cepa WS8105-1C-R300cisPt (cepa resistente a Cisplatino).

El resto de proteínas fueron descartadas porque, por un lado la sobreexpresión fue mínima, y por otro, porque los niveles de expresión de proteínas presentes en ambas cepas fueron iguales. En cuanto a los niveles de subexpresión no fueron detectables por este método de cuantificación proteica.

En la figura 52, se muestra que en la cepa WS8105-1C-R300cisPt (cepa resistente a Cisplatino) aparecen 64 proteínas que no aparecen en la cepa salvaje. En la tabla 16 se detallan dichas proteínas con identidad u homología extensa (SCORE > 28; $p < 0,05$). De éstas cabe destacar las que presentan identidad u homología extensa mayor (SCORE > 300), como son: G3P2, EXG1 y ADH2.

Tabla 16. Proteínas que únicamente se expresan en la cepa WS8105-1C-R300cisPt, con identidad u homología extensa (SCORE > 28; $p < 0,05$).

PROTEÍNA	SCORE
G3P2_YEAST	1444.2
EXG1_YEAST	546.9
ADH2_YEAST	312.0
COX4_YEAST	231.9
MDHC_YEAST	229.5
MDHM_YEAST	217.4
GRP78_YEAST	198.1
TPM1_YEAST	185.2
MPG1_YEAST	174.4
ACEA_YEAST	171.4
PLB3_YEAST	164.4
THRC_YEAST	124.1

RL17A_YEAST	123.8
GST1_YEAST	116.1
PABP_YEAST	114.6
QCR7_YEAST	113.4
GLYC_YEAST	113.3
NTF2_YEAST	109.7
YNU8_YEAST	96.9
ECM33_YEAS2	96.7
UCRI_YEAST	94.9
SDHA_YEAST	93.9
ATPO_YEAST	92.6
RIR2_YEAST	90.6
CARP_YEAST	89.9
WTM1_YEAST	89.1
ILV5_YEAST	73.6
RS16A_YEAST	72.6
RL13A_YEAST	68.1
ARF1_YEAST	68.0
RS24A_YEAST	66.0
RIR4_YEAST	63.9
IDHC_YEAST	62.7
COX14_YEAST	59.8
ADK_YEAST	58.5
RS2_YEAST	57.6
ADT2_YEAST	52.8
COX6_YEAST	51.8
ACT_YEAST	48.3
ACON_YEAST	48.2
ATPF_YEAST	46.7
GCSH_YEAST	46.4
RL27A_YEAST	46.3
GAS1_YEAST	44.0
RS8A_YEAST	43.5
BCA1_YEAST	43.3
GCSP_YEAST	42.8
HSP79_YEAST	42.4
MDHP_YEAST	39.0
RL14A_YEAST	37.9
LSP1_YEAST	37.7
COX12_YEAST	37.0
SS100_YEAST	36.1
RL31A_YEAST	35.8
PST2_YEAST	35.7
RL8A_YEAST	35.2
BGL2_YEAST	34.5
RL7A_YEAST	33.9
RTK1_YEAST	33.6
RSSA1_YEAS1	32.1
GAS5_YEAST	31.6
TIM10_YEAST	31.2

ODP2_YEAST	31.1
KSS1_YEAST	30.2

Wt: cepa salvaje. RCispt: WS8105-1C-R300cisPt (cepa resistente a Cisplatino).

4.7.2 Análisis proteómico cepa WS8105-1C-R 0.158 Bleo vs cepa wt

Como se aprecia en la figura 57, se han encontrado 34 proteínas que únicamente se expresan en la cepa wt (cepa salvaje), 77 que sólo se expresan en la cepa WS8105-1C-R 0.158 Bleo (cepa resistente a Bleomicina), y 174 que se expresan en ambas cepas.

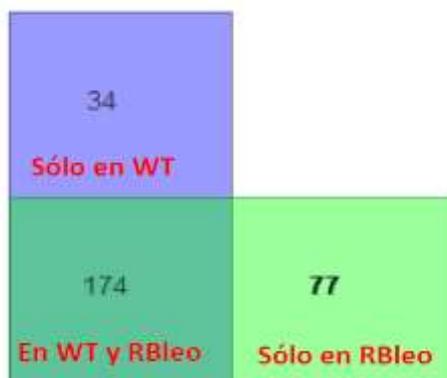


Figura 57. Proteínas expresadas. WT: cepa salvaje. RBleo: WS8105-1C-R 0.158 Bleo (cepa resistente a Bleomicina).

De las 174 proteínas comunes se seleccionaron aquellas con identidad u homología extensa (SOCRE) e incremento de expresión proteica (Δ emPAI) más elevados (SCORE > 28; $p < 0,05$), obteniéndose un total de 49 proteínas (Tabla 17).

Tabla 17. Proteínas comunes en ambas cepas con identidad u homología extensa (SCORE > 28; $p < 0,05$).

PROTEINA	SCORE		emPAI		Δ emPAI
	wt	Rbleo	wt	Rbleo	
YL179_YEAST	44	585	0,14	2,4	17,143
TPIS_YEAST	397	1250	0,4	1,76	4,400
YP225_YEAST	177	340	0,66	2,29	3,470
SODC_YEAST	85	209	0,45	1,54	3,422
HSP77_YEAST	172	457	0,19	0,55	2,895
HSP60_YEAST	300	829	0,5	1,36	2,720
PMG1_YEAST	360	773	0,73	1,69	2,315

ALF_YEAST	300	660	0,26	0,59	2,269
HSC82_YEAST	429	505	0,31	0,65	2,097
MLC1_YEAST	183	440	0,72	1,48	2,056
HSP72_YEAST	530	1049	0,63	1,22	1,937
HSP12_YEAST	470	673	2,48	4,78	1,927
HSP71_YEAST	725	1187	0,7	1,32	1,886
ATPB_YEAST	227	454	0,4	0,75	1,875
YB085_YEAST	202	290	0,84	1,5	1,786
RL30_YEAST	93	187	0,66	1,15	1,742
G3P3_YEAST	2911	2936	0,97	1,55	1,598
BMH1_YEAST	169	413	0,22	0,35	1,591
BMH2_YEAST	157	311	0,22	0,34	1,545
COFI_YEAST	261	324	0,74	1,1	1,486
HSP31_YEAST	506	503	1,27	1,88	1,480
TRX1_YEAST	349	350	2,6	3,69	1,419
KPYK1_YEAST	1240	1665	1,07	1,45	1,355
HSP75_YEAST	92	399	0,2	0,26	1,300
HSP76_YEAST	71	374	0,2	0,26	1,300
EF1A_YEAST	388	397	0,35	0,44	1,257
IF4A_YEAS7	476	580	0,41	0,51	1,244
EF2_YEAST	444	496	0,18	0,22	1,222
ENO2_YEAST	2525	4140	2,03	2,47	1,217
PGK_YEAST	2860	3440	2,92	3,23	1,106

ADH1_YEAST	2497	1839	1,45	1,47	1,014
CYPH_YEAST	1674	2599	2,88	2,91	1,010
AHP1_YEAST	939	846	1,95	1,97	1,010
RS28A_YEAST	110	281	2,05	2,07	1,010
RS21A_YEAST	313	431	2,24	2,26	1,009
RS21B_YEAST	358	417	2,24	2,26	1,009
SDO1L_YEAST	499	511	2,37	2,39	1,008
ATP5E_YEAST	129	169	1,27	1,28	1,008
PDC1_YEAST	1366	1729	1,45	1,46	1,007
GLRX1_YEAST	351	263	1,56	1,57	1,006
ALDH6_YEAST	201	364	0,32	0,32	1,000
ATPA_YEAST	242	372	0,37	0,37	1,000
DHOM_YEAST	491	358	0,27	0,27	1,000
KAR_YEAST	511	305	0,19	0,17	0,895
ENO1_YEAST	1893	3134	1,19	1,06	0,891
TRX2_YEAST	1814	1095	11,99	9,15	0,763
G3P1_YEAST	3018	2178	1,54	1,15	0,747
VDAC1_YEAST	770	422	1,7	1,22	0,718
RS5_YEAST	429	505	0,27	0,13	0,481

Wt: cepa salvaje. **RBleo:** WS8105-1C-R 0.158 Bleo (cepa resistente a Bleomicina).
 Δ mPAI: incremento de la expresión proteica.

Se realizó un análisis con el objetivo de evaluar qué proteínas tuvieron una sobreexpresión mayor. Para ello se calculó el número de proteínas que se expresaban para diversos rangos de Δ mPAI (incremento de expresión). Así se obtuvo que para, un Δ mPAI entre 0-1 se obtuvieron 9 proteínas, para un Δ mPAI entre 1-2 se obtuvieron 30 proteínas, para un Δ mPAI entre 2-3 se obtuvieron 6 proteínas, para un Δ mPAI entre 3-4 se obtuvieron 2 proteínas, para un Δ mPAI entre 4-5 se obtuvo 1 proteína y

para un $\Delta\text{emPAI} > 5$ se obtuvo 1 proteína. Con estos datos se decidió seleccionar como más significativas aquellas con un $\Delta\text{emPAI} > 1,5$, las cuales representaron un 38,8 % del total de proteínas (Figura 58).

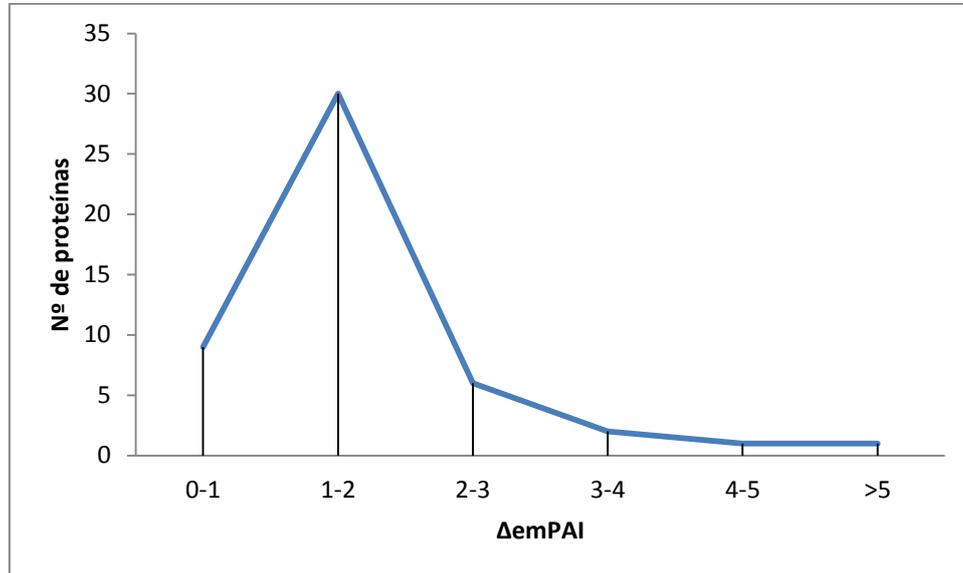


Figura 58. Número de proteínas expresadas en distintos rangos de ΔemPAI (incremento de expresión proteica).

Así pues se observó que, con una probabilidad del 95% se incrementó en 17,143 veces la expresión de la proteína YL179, en 4,4 veces la proteína TPIS, en 3,47 la proteína YP225, en 3,422 la proteína SODC, en 2,895 la proteína HSP77, en 2,72 la proteína HSP60, en 2,315 la proteína PMG1, en 2,269 la proteína ALF, en 2,097 la proteína HSC82, en 2,056 la proteína MLC1, en 1,937 la proteína HSP72, en 1,927 la proteína HSP12, en 1,886 la proteína HSP71, en 1,875 la proteína ATPB, en 1,786 la proteína YB085, en 1,742 la proteína RL30, en 1,598 la proteína G3P3, en 1,591 la proteína BMH1, y en 1,545 la proteína BMH2 (Tabla 18). En la figura 59 se ilustra las funciones celulares de estas proteínas y los genes que las codifican, y en la tabla 18 se detallan explícitamente las funciones celulares.

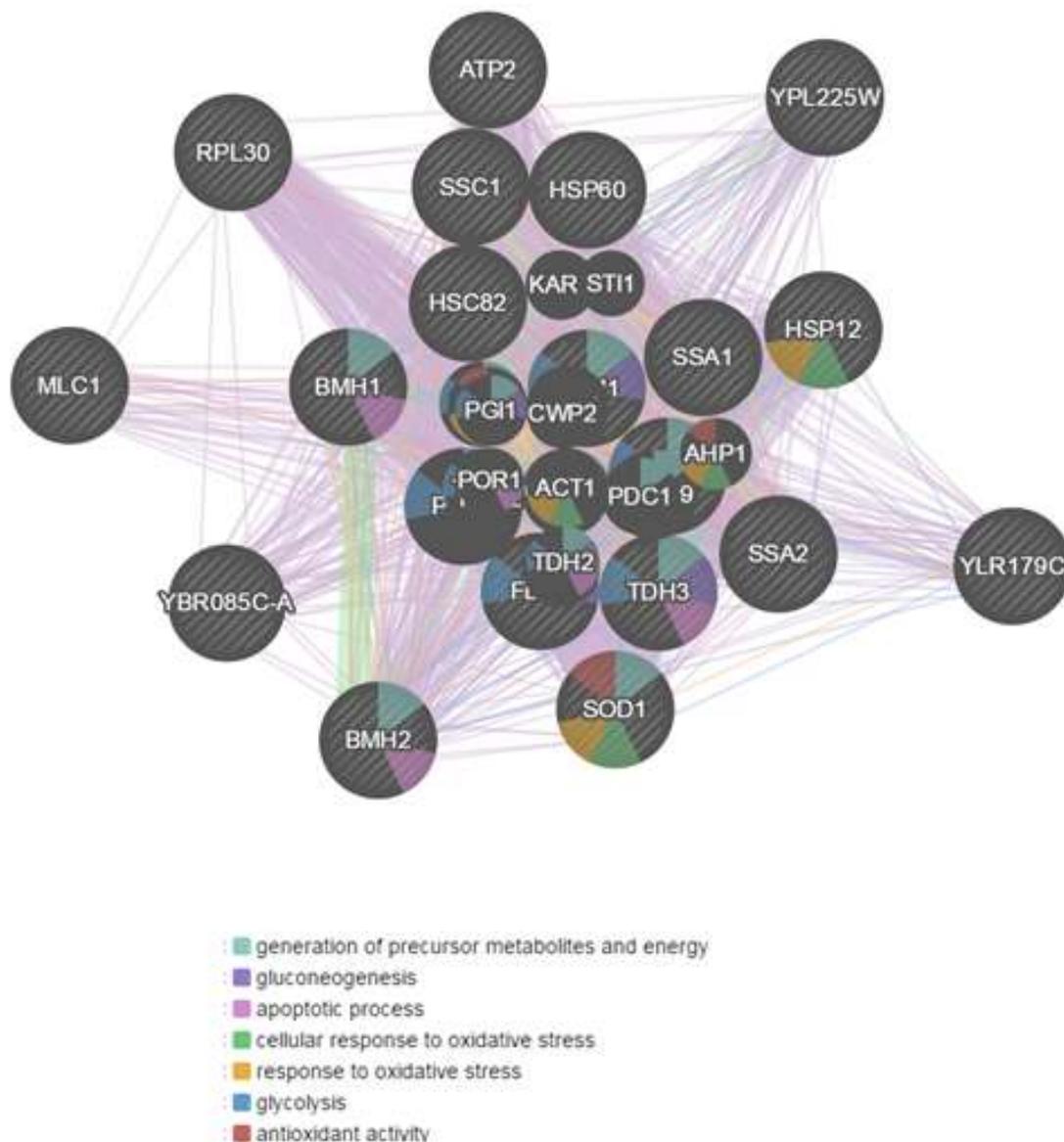


Figura 59. Funciones de los genes que codifican las proteínas con $\Delta\text{emPAI} > 1,5$ en la cepa WS8105-1C-R 0.158 Bleo (cepa resistente a Bleomicina).

Tabla 18. Proteínas comunes (genes que la codifican) y funciones en ambas cepas con identidad u homología extensa ($\text{SCORE} > 28$; $p < 0,05$) y con un $\Delta\text{emPAI} > 1,5$.

PROTEÍNA	GENES	ΔemPAI	FUNCIÓN
YL179_YEAST	YLR179C	17,143	Proteína de función desconocida. La transcripción es activada por las proteínas parálogas Yrm1p y Yrr1p, junto con las proteínas implicadas en resistencia multidrogas. Se localiza en el citoplasma y el núcleo.
TPIS_YEAST	TPI1	4,400	Triosa fosfato isomerasa implicada en la degradación glicolítica de los carbohidratos en piruvato; Se localiza en las mitocondrias y

			membranas plasmáticas.
YP225_YEAST	YPL225W	3,470	Proteína de función desconocida. Pueden interactuar con ribosomas, basándose en experimentos de copurificación. La abundancia de proteínas aumenta en respuesta al estrés de replicación del ADN
SODC_YEAST	SOD1	3,422	Superóxido dismutasa implicada en la homeostasis del cobre y del zinc, metabolismo del superóxido, envejecimiento celular, organización de la pared celular, regulación de la respiración celular y regulación de la transcripción en respuesta al estrés oxidativo; Localizada en el núcleo, el citosol y el espacio intermembrana mitocondrial
HSP77_YEAST	SSC1	2,895	ATPasa. Constituye el componente motor de la Translocasa de la membrana mitocondrial interna (complejo TIM23). Implicada en la translocación y plegamiento proteico.
HSP60_YEAST	HSP60	2,720	Chaperonina mitocondrial tetradecamerica. Necesaria para el plegamiento de polipéptidos y ensamblaje del complejo (ATP-dependiente). Previene la agregación y media el replegamiento de las proteínas después del choque térmico. Juega un papel en la transmisión de mtDNA.
PMG1_YEAST	GPM1	2,315	Fosfoglicerato mutasa (tetramérica). Media la conversión de 3-fosfoglicerato en 2-fosfoglicerato durante la glucólisis y la reacción inversa durante la gluconeogénesis.
ALF_YEAST	FBA1	2,269	Fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa. Necesaria para la glucólisis y la gluconeogénesis; Cataliza la conversión de fructosa 1,6 bisfosfato en gliceraldehído-3-P y dihidroxiacetona-P. Se localiza en la superficie externa mitocondrial tras el estrés oxidativo.
HSC82_YEAST	HSC82	2,097	Chaperona citoplasmática de la familia Hsp90. Posee actividad ATPasa, plegamiento de proteínas, respuesta al calor y organización de telómeros.
MLC1_YEAST	MLC1	2,056	Interactúa con Myo1p, Iqg1p y Myo2p para coordinar la formación y contracción del anillo de actomiosina.
HSP72_YEAST	SSA2	1,937	Proteína de unión a ATP de la familia HSP70. Implicadas en el plegamiento de proteínas. Importación vacuolar de proteínas. Degradación de proteínas, de vida media corta, dependientes de ubiquitina. Y en la importación de tRNA en el núcleo en condiciones de inanición.
HSP12_YEAST	HSP12	1,927	Proteína de la membrana plasmática implicada en mantener la organización de la membrana. Participa en el mantenimiento de la organización durante las condiciones de estrés: inducido por choque térmico,

			estrés oxidativo, estrés osmótico, fase estacionaria, el agotamiento de la glucosa, el oleato y el alcohol; La abundancia de proteínas aumenta en respuesta al estrés de replicación del ADN y la restricción dietética. Regulado por las vías HOG y Ras-Pka.
HSP71_YEAST	SSA1	1,886	Miembro de la familia HSP70. ATPasa implicada en el plegamiento de proteínas y el transporte nuclear dirigido señal de localización nuclear (NLS) . Necesaria para la degradación de proteínas, de vida media corta, dependientes de ubiquitina. Forma el complejo chaperone con Ydj1p. Localizadas en el núcleo, citoplasma, y pared celular.
ATPB_YEAST	ATP2	1,875	Subunidad beta del sector F1 de la F1F0-ATP sintasa mitocondrial (síntesis de ATP).
YB085_YEAST	YBR085C-A	1,786	Proteína de función desconocida. La abundancia de proteínas aumenta en respuesta al estrés de replicación del ADN.
RL30_YEAST	RPL30	1,742	Proteína L30 de la subunidad ribosómica 60S. Involucrada en el procesamiento del pre-rRNA en el nucléolo. Autorregulación del “splicing”. Homóloga a la proteína ribosomal L30 de mamíferos.
G3P3_YEAST	TDH3	1,598	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), isoenzima 3. Involucrada en la glucólisis y la gluconeogénesis. Tetrámero que cataliza la reacción de conversión del gliceraldehído-3-fosfato en 1,3-bis-fosfoglicerato (y viceversa). Detectado en el citoplasma y en la pared celular;
BMH1_YEAST	BMH1	1,591	Proteína 14-3-3, isoforma mayor. Controla el proteoma a nivel post-transcripcional, se une a proteínas y al ADN. Implicado en la regulación de la exocitosis, transporte de vesículas, señalización Ras / MAPK y señalización sensible a la rapamicina, formación de agresomas, y punto de control de la posición del huso. La proteína aumenta en abundancia y la distribución relativa al núcleo aumenta también como consecuencia del estrés de replicación del ADN.
BMH2_YEAST	BMH2	1,545	Proteína 14-3-3, isoforma menor. Controla el proteoma a nivel post-transcripcional, se une a proteínas y al ADN. Implicado en la regulación de la exocitosis, transporte de vesículas, señalización Ras / MAPK y señalización sensible a la rapamicina, formación de agresomas, y punto de control de la posición del huso. La proteína aumenta en abundancia y la distribución relativa al núcleo aumenta también como consecuencia del estrés de replicación del ADN.

Wt: cepa salvaje. RBleo: WS8105-1C-R 0.158 Bleo (cepa resistente a Bleomicina).
 Δ emPAI: incremento de la expresión proteica relativa.

En la tabla 19 se muestran las proteínas anteriormente descritas con los genes que la codifican y además los genes homólogos en humanos.

Tabla 19. Proteínas y genes que las codifican en *S. cerevisiae* y genes homólogos en humanos.

PROTEINA	Gen (<i>S. cerevisiae</i>)	Gen Homólogo humano
YL179_YEAST	YLR179C	Desconocido o no existe
TPIS_YEAST	TPI1	<u>TPI1, <i>H.sapiens</i></u> triosephosphate isomerase 1
YP225_YEAST	YPL225W	<u>PBDC1, <i>H.sapiens</i></u> polysaccharide biosynthesis domain containing 1
SODC_YEAST	SOD1	<u>CCS, <i>H.sapiens</i></u> copper chaperone for superoxide dismutase <u>SOD1, <i>H.sapiens</i></u> superoxide dismutase 1, soluble
HSP77_YEAST	SSC1	<u>ATP2C1, <i>H.sapiens</i></u> ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, type 2C, member 1 <u>AQP9, <i>H.sapiens</i></u> aquaporin 9 <u>ELOVL1, <i>H.sapiens</i></u> ELOVL fatty acid elongase 1 <u>HSPA9, <i>H.sapiens</i></u> heat shock 70kDa protein 9 (mortalin)
HSP60_YEAST	HSP60	<u>HSPD1, <i>H.sapiens</i></u> heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin) <u>ACO2, <i>H.sapiens</i></u> aconitase 2, mitochondrial
PMG1_YEAST	GPM1	<u>PGAM4, <i>H.sapiens</i></u> phosphoglycerate mutase family member 4 <u>PGAM2, <i>H.sapiens</i></u> phosphoglycerate mutase 2 (muscle)
ALF_YEAST	FBA1	Desconocido o no existe
HSC82_YEAST	HSC82	<u>HSP90AB1, <i>H.sapiens</i></u> heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1
MLC1_YEAST	MLC1	<u>MYL1, <i>H.sapiens</i></u> myosin, light chain 1, alkali; skeletal, fast <u>MLC1, <i>H.sapiens</i></u> megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts 1
HSP72_YEAST	SSA2	<u>HSPA1L, <i>H.sapiens</i></u> heat shock 70kDa protein 1-like <u>TROVE2, <i>H.sapiens</i></u> TROVE domain family, member 2
HSP12_YEAST	HSP12	Desconocido o no existe

HSP71_YEAST	SSA1	<u>HSPA1L, <i>H.sapiens</i></u> heat shock 70kDa protein 1-like <u>TRIM21, <i>H.sapiens</i></u> tripartite motif containing 21
ATPB_YEAST	ATP2	<u>ATP5B, <i>H.sapiens</i></u> ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide
YB085_YEAST	YBR085C-A	Desconocido o no existe
RL30_YEAST	RPL30	<u>RPL30, <i>H.sapiens</i></u> ribosomal protein L30
G3P3_YEAST	TDH3	<u>GAPDH, <i>H.sapiens</i></u> glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
BMH1_YEAST	BMH1	<u>YWHAE, <i>H.sapiens</i></u> tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon
BMH2_YEAST	BMH2	<u>YWHAE, <i>H.sapiens</i></u> tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon

Por otro lado, en la figura 60 se muestran las interacciones que existen entre los genes que codifican a estas proteínas. Así se puede observar que, existe co-expresión (82,98%), interacciones físicas (1,17%), interacciones genéticas (6,87%) y co-localización (0,20%).

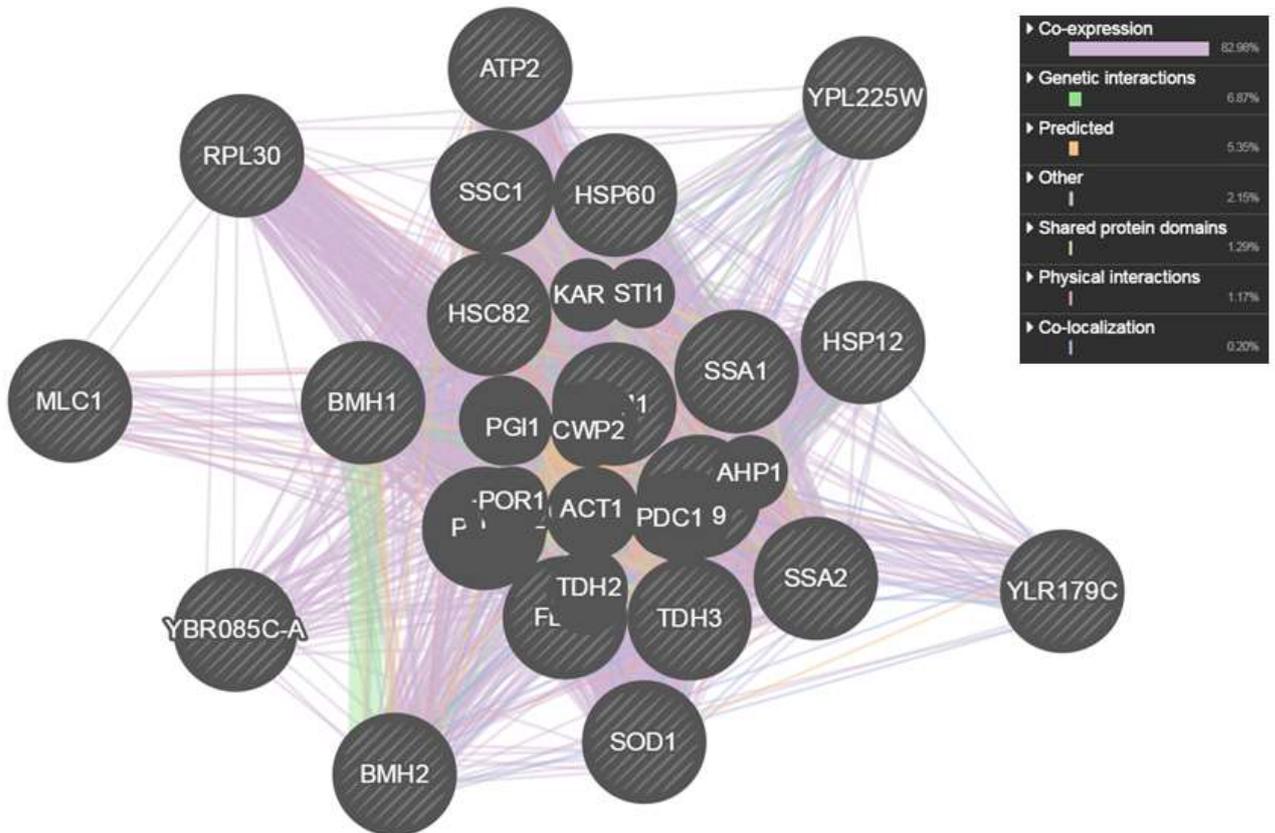


Figura 60. Interacciones entre los genes que codifican las proteínas con $\Delta\text{emPAI} > 1,5$ en la cepa WS8105-1C-R 0.158 Bleo (cepa resistente a Bleomicina).

De las 19 proteínas analizadas con $\Delta\text{emPAI} > 1,5$, se realizó un estudio más minucioso de aquellas que presentaron mayores valores de $\Delta\text{emPAI} (> 2,5)$. Así se analizaron las proteínas YL179 (gen YLR179C), TPIS (gen TPI1), YP225 (gen YPL225W), SODC (gen SOD1), HSP77 (gen SSC1) y HSP60 (gen HSP60). En la tabla 18 se detallan las funciones proteicas y en la figura 61 se ilustran las interacciones entre los genes y las funciones.

Del gen YLR179C (proteína YL179) no se conoce la función hasta la fecha. Como se muestra en la figura 61 existe co-expresión con los genes SSC1 (proteína HSP77), TPI1 (proteína TPIS) y SOD1 (proteína SODC).

El gen TPI1 (proteína TPIS) interviene en procesos metabólicos de la glucosa y en la generación de precursores metabólicos y energía. Como se muestra en la figura 61 existe co-expresión con los genes SSC1 (proteína HSP77) e YPL225W (proteína YP225).

Del gen YPL225W (proteína YP225) no se conoce la función hasta la fecha. Como se muestra en la figura 61 existe co-expresión con los genes TPI1 (proteína TPIS) y SOD1 (proteína SODC).

El gen SOD1 (proteína SODC) interviene en la generación de precursores metabólicos y energía, en procesos metabólicos de las ROS y posee actividad oxidorreductasa. Como se muestra en la figura 61 existe co-expresión con los genes TPI1 (proteína TPIS), YPL225W (proteína YP225) y SSC1 (proteína HSP77).

El gen SSC1 (proteína HSP77) está implicado en la translocación y plegamiento proteico. Como se muestra en la figura 61 existe co-expresión con los genes YLR179C (proteína YL179), TPI1 (proteína TPIS), SOD1 (proteína SODC) y HSP60 (proteína HSP60).

El gen HSP60 (proteína HSP60) interviene el plegamiento de polipéptidos y ensamblaje del complejo (ATP-dependiente). Previene la agregación y media el replegamiento de las proteínas después del choque térmico. Como se muestra en la figura 61 existe co-expresión con los genes SSC1 (proteína HSP77), SOD1 (proteína SODC), TPI1 (proteína TPIS) e YLR179C (proteína YL179).

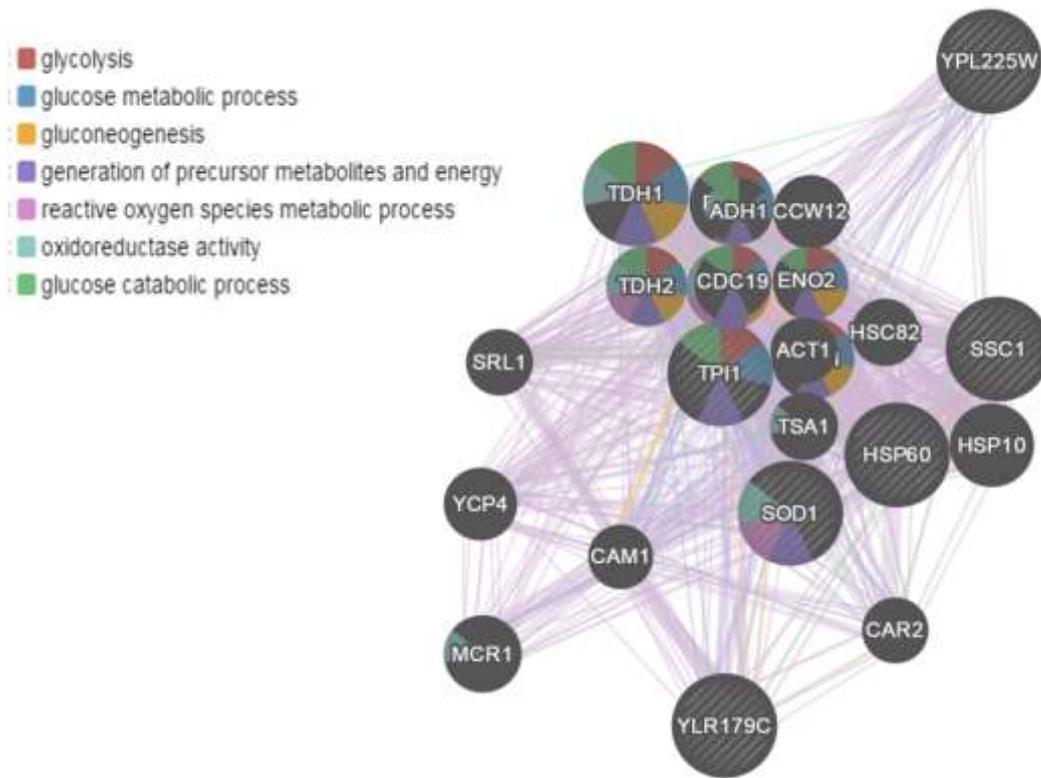


Figura 61. Funciones e interacciones entre los genes que codifican las proteínas con $\Delta\text{empAI} > 2,5$ en la cepa WS8105-1C-R 0.158 Bleo (cepa resistente a Bleomicina).

El resto de proteínas fueron descartadas porque, por un lado la sobreexpresión fue mínima, y por otro, porque los niveles de expresión de proteínas presentes en ambas cepas fueron iguales. En cuanto a los niveles de subexpresión no fueron detectables por este método de cuantificación proteica.

En la figura 57, se muestra que en la cepa WS8105-1C-R 0.158 Bleo (cepa resistente a Bleomicina) aparecen 77 proteínas que no aparecen en la cepa salvaje. En la tabla 20 se detallan dichas proteínas con identidad u homología extensa (SCORE > 28; $p < 0,05$). De éstas cabe destacar las que presentan identidad u homología extensa mayor (SCORE > 300), como son: ADK y ADH2.

Tabla 20. Proteínas que únicamente se expresan en la WS8105-1C-R 0.158 Bleo, con identidad u homología extensa (SCORE > 28; $p < 0,05$).

PROTEÍNA	SCORE
ADK_YEAST	582.8
ADH2_YEAST	320.0
GRP78_YEAST	276.1

NTF2_YEAST	272.8
ILV5_YEAST	242.7
PDC6_YEAST	223.2
ZEO1_YEAST	187.7
BCA1_YEAST	175.4
YPD1_YEAST	172.2
PABP_YEAST	153.9
WTM1_YEAST	138.9
FDH1_YEAS7	116.4
SAHH_YEAST	114.9
RS8A_YEAST	109.6
COX4_YEAST	96.5
AK_YEAST	92.8
CALM_YEAST	91.8
RL17A_YEAST	89.1
HSP79_YEAST	87.0
TPM1_YEAST	84.2
CDC48_YEAST	83.7
EXG1_YEAST	77.6
ECM33_YEAS2	71.1
MDHP_YEAST	70.1
TPM2_YEAST	66.7
THRC_YEAST	65.3
ACT_YEAST	61.8
RL20A_YEAST	60.8

SGT2_YEAST	60.6
ATPF_YEAST	58.7
COX6_YEAST	57.8
YL257_YEAST	57.3
ARO8_YEAST	57.0
RL4A_YEAST	53.2
GCSH_YEAST	50.5
GPP1_YEAST	50.2
MPM1_YEAST	49.5
RS24A_YEAST	49.4
NHP6A_YEAST	49.0
CARP_YEAST	48.7
ACPM_YEAST	48.5
ACON_YEAST	48.3
MDHM_YEAST	47.3
COX14_YEAST	47.2
FKBP_YEAST	46.8
HOSC_YEAST	46.0
SYSC_YEAST	45.0
ACEA_YEAST	42.2
EF3A_YEAST	41.9
PFD6_YEAST	41.8
MET22_YEAST	41.5
FRDA_YEAST	41.3
HSP78_YEAST	39.9

EF1G2_YEAST	39.9
COX12_YEAST	39.6
PSA3_YEAST	39.4
ATC2_YEAST	38.8
OYE2_YEAST	38.8
RSSA1_YEAS1	38.3
PFKA2_YEAST	38.0
DUG1_YEAST	37.9
METK1_YEAST	37.9
PEX19_YEAS7	36.1
MMS2_YEAST	35.8
RS16A_YEAST	35.5
GAR1_YEAST	35.1
ATX1_YEAST	35.0
MAM33_YEAST	35.0
ARF1_YEAST	34.7
CDC37_YEAST	34.1
RL28_YEAST	34.1
IF5A1_YEAST	31.6
TRX3_YEAST	31.6
RL27A_YEAST	31.2
DBP5_YEAS7	31.0
LCF4_YEAST	30.8
YM44_YEAST	30.7

Wt: cepa salvaje. WS8105-1C-R 0.158 Bleo: cepa resistente a Bleomicina.

4.7.3 Análisis de las proteínas comunes en la cepa Wt, WS8105-1C-R300cisPt y WS8105-1C-R 0.158 Bleo

Como se aprecia en la figura 62, se han encontrado 143 proteínas que se expresan en las tres cepas.

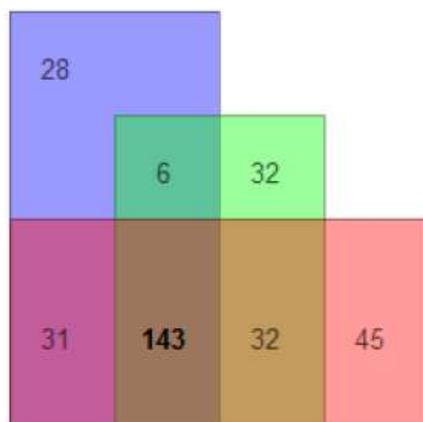


Fig. 62. N° de proteínas expresadas en las tres cepas.

En la tabla 21 se muestran, de las 143 proteínas comunes encontradas en las tres cepas con identidad u homología extensa (SCORE > 28; p <0,05), aquellas con mayores valores de emPAI y de SCORE.

Tabla 21. Proteínas comunes en las tres cepas con identidad u homología extensa (SCORE > 28; p <0,05).

PROTEÍNA	SCORE			emPAI		
	wt	RcisPt	Rbleo	wt	RcisPt	Rbleo
ALDH4_YEAS T	189	461	174	0,18	0,81	0,11
ATPB_YEAST	227	950	454	0,4	1,75	0,75
ATPA_YEAST	242	954	372	0,37	1,32	0,37
HSP26_YEAST	141	542	134	0,46	1,43	0,14
ATPG_YEAST	146	336	251	0,19	0,56	0,31
PCKA_YEAST	87	389	172	0,11	0,29	0,16
PMG1_YEAST	360	551	773	0,73	1,69	1,69
ALF_YEAST	300	613	660	0,26	0,59	0,59
HSP77_YEAST	172	252	457	0,19	0,42	0,55
HSP12_YEAST	470	982	673	2,48	4,788	4,78
ATP5E_YEAST	129	194	169	1,27	2,44	1,28
TPIS_YEAST	397	841	1250	0,4	0,76	1,76
HSP60_YEAST	300	583	829	0,5	0,93	1,36
RL30_YEAST	93	109	187	0,66	1,15	1,15
HSP71_YEAST	725	988	1187	0,7	1,12	1,32
IDH1_YEAST	224	329	229	0,17	0,26	0,37
KPYK1_YEAST	1240	1556	1665	1,07	1,59	1,45
HSP72_YEAST	530	638	1049	0,63	0,86	1,22

HSP75_YEAST	92	252	399	0,2	0,26	0,26
EF1A_YEAST	388	444	397	0,35	0,44	0,44
ALDH6_YEAST	201	268	364	0,32	0,4	0,32
T						
HSP31_YEAST	506	393	503	1,27	1,56	1,88
HSC82_YEAST	429	439	505	0,31	0,36	0,65
YP010_YEAST	301	419	226	0,42	0,43	0,43
YP225_YEAST	177	115	340	0,66	0,67	2,29
CYPH_YEAST	1674	1375	2599	2,88	2,91	2,91
RS21A_YEAST	313	348	431	2,24	2,26	2,26
RS21B_YEAST	358	321	417	2,24	2,26	2,26
SDO1L_YEAST	499	504	511	2,37	2,39	2,39
ENO1_YEAST	1893	1377	3134	1,19	1,2	1,06
VDAC1_YEAST	770	690	422	1,7	1,71	1,22
T						
CH10_YEAST	165	231	272	1,16	1,16	0,67
IF4A_YEAST	476	363	580	0,41	0,41	0,51
KAR_YEAST	511	170	305	0,19	0,19	0,19
MLC1_YEAST	183	73	440	0,72	0,72	1,48
RS27A_YEAST	723	422	256	0,98	0,98	0,67
RS5_YEAST	429	288	505	0,27	0,27	0,13
SODC_YEAST	85	79	209	0,45	0,45	1,54
YB085_YEAST	202	182	290	0,84	0,84	1,5
ADH1_YEAST	2497	1292	1839	1,45	1,27	1,47
ENO2_YEAST	2525	1753	4140	2,03	1,67	2,47
EF2_YEAST	444	299	496	0,18	0,14	0,22
PDC1_YEAST	1366	1105	1729	1,45	1,01	1,46
GLRX1_YEAST	351	185	263	1,56	1,03	1,57
YGP1_YEAST	303	225	86	0,28	0,18	0,18
G3P1_YEAST	3018	1063	2178	1,54	0,98	1,15
DHOM_YEAST	491	242	358	0,27	0,17	0,27
T						
COFI_YEAST	261	129	324	0,74	0,45	1,1
RS28A_YEAST	110	55	281	2,05	1,11	2,07
BMH1_YEAST	169	112	413	0,22	0,11	0,35
PGK_YEAST	2860	1901	3440	2,92	1,44	3,23
RL23A_YEAST	395	77	183	0,5	0,23	0,5
BMH2_YEAST	157	106	311	0,22	0,1	0,34
TRX1_YEAST	349	166	350	2,6	1,16	3,69
ACBP_YEAST	240	175	172	2,13	0,77	0,77
TRX2_YEAST	1814	485	1095	11,99	3,69	9,15
AHP1_YEAST	939	481	846	1,95	0,59	1,97
YNN4_YEAST	392	93	121	0,56	0,16	0,34

Wt: cepa salvaje. RCispt: WS8105-1C-R300cisPt (cepa resistente a Cisplatino). WS8105-1C-R
0.158 Bleo: cepa resistente a Bleomicina.

ΔempPAI: incremento de la expresión proteica relativa.

De todas ellas se seleccionaron aquellas con identidad u homología extensa (SCORE) y que presentaron incremento de expresión proteica (Δ emPAI) (SCORE > 28; $p < 0,05$). Se muestran los incrementos de expresión proteica en las cepas WS8105-1C-R300cisPt (cepa resistente a Cisplatino) y WS8105-1C-R 0.158 Bleo (cepa resistente a Bleomicina) en relación a la cepa salvaje (Tabla 22).

Tabla 22. Proteínas comunes en las tres cepas con identidad u homología extensa (SCORE > 28; $p < 0,05$) e incremento de la expresión proteica (Δ emPAI).

PROTEÍNA	Δ emPAI RCispt/Wt	PROTEÍNA	Δ emPAI RBleo/Wt
ALDH4_YEAST	4,500	TPIS_YEAST	4,400
ATPB_YEAST	4,375	YP225_YEAST	3,470
ATPA_YEAST	3,568	SODC_YEAST	3,422
HSP26_YEAST	3,109	HSP77_YEAST	2,895
ATPG_YEAST	2,947	HSP60_YEAST	2,720
PCKA_YEAST	2,636	PMG1_YEAST	2,315
PMG1_YEAST	2,315	ALF_YEAST	2,269
ALF_YEAST	2,269	IDH1_YEAST	2,176
HSP77_YEAST	2,211	HSC82_YEAST	2,097
HSP12_YEAST	1,931	MLC1_YEAST	2,056
ATP5E_YEAST	1,921	HSP72_YEAST	1,937
TPIS_YEAST	1,900	HSP12_YEAST	1,927
HSP60_YEAST	1,860	HSP71_YEAST	1,886
RL30_YEAST	1,742	ATPB_YEAST	1,875
HSP71_YEAST	1,600	YB085_YEAST	1,786
IDH1_YEAST	1,529	RL30_YEAST	1,742
KPYK1_YEAST	1,486	ATPG_YEAST	1,632
HSP72_YEAST	1,365	BMH1_YEAST	1,591
HSP75_YEAST	1,300	BMH2_YEAST	1,545
EF1A_YEAST	1,257	COFI_YEAST	1,486
ALDH6_YEAST	1,250	HSP31_YEAST	1,480
HSP31_YEAST	1,228	PCKA_YEAST	1,455
HSC82_YEAST	1,161	TRX1_YEAST	1,419
YP010_YEAST	1,024	KPYK1_YEAST	1,355
YP225_YEAST	1,015	HSP75_YEAST	1,300
CYPH_YEAST	1,010	HSP76_YEAST	1,300
RS21A_YEAST	1,009	EF1A_YEAST	1,257
RS21B_YEAST	1,009	IF4A_YEAS7	1,244
SDO1L_YEAST	1,008	EF2_YEAST	1,222
ENO1_YEAST	1,008	ENO2_YEAST	1,217
VDAC1_YEAST	1,006	PGK_YEAST	1,106
CH10_YEAST	1,000	YP010_YEAST	1,024
IF4A_YEAS7	1,000	ADH1_YEAST	1,014
KAR_YEAST	1,000	CYPH_YEAST	1,010
MLC1_YEAST	1,000	AHP1_YEAST	1,010

RS27A_YEAST	1,000	RS28A_YEAST	1,010
RS5_YEAST	1,000	RS21A_YEAST	1,009
SODC_YEAST	1,000	RS21B_YEAST	1,009
YB085_YEAST	1,000	SDO1L_YEAST	1,008
ADH1_YEAST	0,876	ATP5E_YEAST	1,008
ENO2_YEAST	0,823	PDC1_YEAST	1,007
EF2_YEAST	0,778	GLRX1_YEAST	1,006
PDC1_YEAST	0,697	ALDH6_YEAST	1,000
GLRX1_YEAST	0,660	ATPA_YEAST	1,000
YGP1_YEAST	0,643	DHOM_YEAST	1,000
G3P1_YEAST	0,636	KAR_YEAST	1,000
DHOM_YEAST	0,630	RL23A_YEAST	1,000
COFI_YEAST	0,608	ENO1_YEAST	0,891
RS28A_YEAST	0,541	TRX2_YEAST	0,763
BMH1_YEAST	0,500	G3P1_YEAST	0,747
PGK_YEAST	0,493	VDAC1_YEAST	0,718
RL23A_YEAST	0,460	RS27A_YEAST	0,684
BMH2_YEAST	0,455	YGP1_YEAST	0,643
TRX1_YEAST	0,446	ALDH4_YEAST	0,611
ACBP_YEAST	0,362	YNN4_YEAST	0,607
TRX2_YEAST	0,308	CH10_YEAST	0,578
AHP1_YEAST	0,303	RS5_YEAST	0,481
YNN4_YEAST	0,286	ACBP_YEAST	0,362
		HSP26_YEAST	0,304

Wt: cepa salvaje. RCispt: WS8105-1C-R300cisPt (cepa resistente a Cisplatino). WS8105-1C-R 0.158 Bleo: cepa resistente a Bleomicina.

En la tabla 23 se seleccionan las proteínas que estando presentes en WS8105-1C-R300cisPt (cepa resistente a Cisplatino) y en WS8105-1C-R 0.158 Bleo (cepa resistente a Bleomicina), tienen una variación de emPAI mayor a 2,4 en cualquiera de las cepas. Si estamos buscando proteínas que tengan relación con el envejecimiento deben estar coexpresadas en ambas cepas resistentes, ya que ambas cepas retrasan el envejecimiento; aunque no en el mismo grado. Se marcan en color las proteínas más sospechosas de estar relacionadas con el envejecimiento. Se hace el análisis de interacciones y funciones y habrá que ver si las sospechosas realmente influyen.

Tabla 23. Proteínas presentes en WS8105-1C-R300cisPt (cepa resistente a Cisplatino) y en WS8105-1C-R 0.158 Bleo (cepa resistente a Bleomicina), con una variación de emPAI mayor a 2,4 en cualquiera de las cepas.

PROTEÍNA	Δ emPAI RCispt/Wt	Δ emPAI RBleo/Wt	Gen (<i>S. cerevisiae</i>)
ALDH4_YEAST	4,500	0,611	ALD4
ATPB_YEAST	4,375	1,875	ATP2
ATPA_YEAST	3,568	1,000	ATP1
HSP26_YEAST	3,109	0,304	HSP26
ATPG_YEAST	2,947	1,632	ATP3
PCKA_YEAST	2,636	1,455	PCK1
TPIS_YEAST	1,900	4,400	TPI1
YP225_YEAST	1,015	3,470	YPL225W
SODC_YEAST	1,000	3,422	SOD1
HSP77_YEAST	2,211	2,895	SSC1
HSP60_YEAST	1,860	2,720	HSP60

En la tabla 24, se muestran las proteínas anteriormente descritas con los genes que la codifican y además los genes homólogos en humanos.

Tabla 24. Proteínas y genes que las codifican en *S. cerevisiae* y genes homólogos en humanos.

PROTEÍNA	Gen (<i>S. cerevisiae</i>)	Gen Homólogo humano
ALDH4_YEAST	ALD4	NO SELECCIONADO DE INTERÉS
ATPB_YEAST	ATP2	<u>ATP5B, <i>H.sapiens</i></u> ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide
ATPA_YEAST	ATP1	NO SELECCIONADO DE INTERÉS
HSP26_YEAST	HSP26	NO SELECCIONADO DE INTERÉS
ATPG_YEAST	ATP3	<u>ATP5C1, <i>H.sapiens</i></u> ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1
PCKA_YEAST	PCK1	<u>PRKCB, <i>H.sapiens</i></u> protein kinase C, beta <u>PCK2, <i>H.sapiens</i></u> phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial) <u>PCK1, <i>H.sapiens</i></u> phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble)
TPIS_YEAST	TPI1	<u>TPI1, <i>H.sapiens</i></u> triosephosphate isomerase 1
YP225_YEAST	YPL225W	NO SELECCIONADO DE INTERÉS
SODC_YEAST	SOD1	NO SELECCIONADO DE INTERÉS
HSP77_YEAST	SSC1	<u>ATP2C1, <i>H.sapiens</i></u> ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, type 2C, member 1 <u>AQP9, <i>H.sapiens</i></u>

HSP60_YEAST		aquaporin 9 <u>ELOVL1, <i>H.sapiens</i></u> ELOVL fatty acid elongase 1 <u>HSPA9, <i>H.sapiens</i></u> heat shock 70kDa protein 9 (mortalin)
	HSP60	<u>HSPD1, <i>H.sapiens</i></u> heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin) <u>ACO2, <i>H.sapiens</i></u> aconitase 2, mitochondrial

En la figura 63 se muestran las interacciones que existen entre los genes seleccionados anteriormente que codifican las proteínas con $\Delta\text{empAI} > 2,4$. Así se puede observar que, existe co-expresión (70.17%), interacciones físicas (1,24%), interacciones genéticas (4,45%) y co-localización (0,13%).

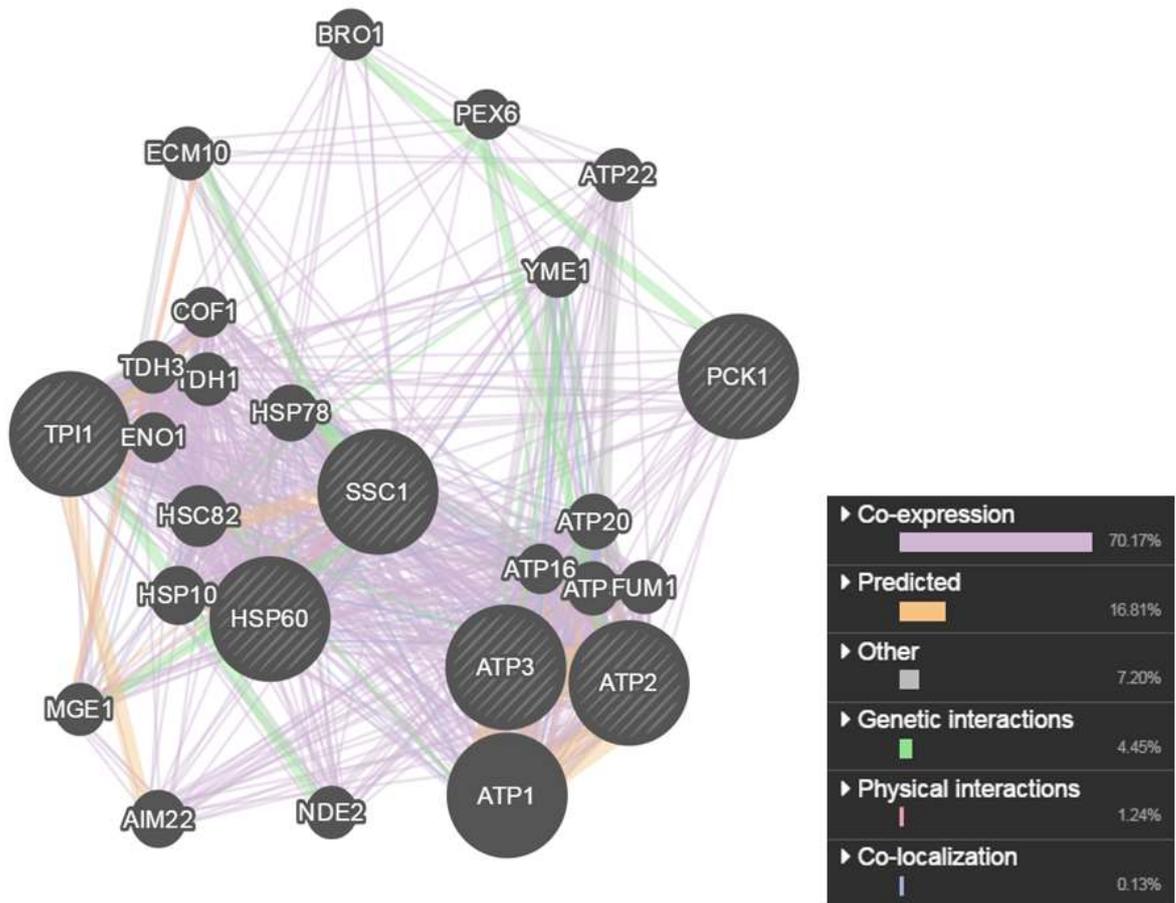


Figura 63. Interacciones entre los genes que codifican las proteínas con $\Delta\text{empAI} > 2,4$.

Se analizaron las proteínas ATPB (gen ATP2), ATPG (gen ATP3), PCKA (gen PCK1), TPIS (gen TPI1), HSP77 (gen SSC1) y HSP60 (gen HSP60). En la tabla 25 se detallan las funciones proteicas y en la figura 64 se ilustran las interacciones entre los genes y las funciones.

El gen ATP2 (proteína ATPB) está implicado en el transporte transmembrana y síntesis de ATP. Como se muestra en la figura 64 existe co-expresión con los genes ATP3 (proteína ATPG), TPI1 (proteína TPIS), PCK1 (proteína PCKA) y HSP60 (proteína HSP60).

El gen ATP3 (proteína ATPG) está implicado en el transporte transmembrana y síntesis de ATP. Como se muestra en la figura 64 existe co-expresión con los genes ATP2 (proteína ATPB), TPI1 (proteína TPIS), SSC1 (HSP77) y HSP60 (proteína HSP60).

El gen PCK1 (proteína PCKA) está implicado en la gluconeogénesis. El enzima que codifica este gen, cataliza la reacción temprana en la biosíntesis de hidratos de carbono (conversión de oxaloacetato en fosfoenolpiruvato y CO₂). Como se muestra en la figura 64 existe co-expresión con los genes ATP2 (proteína ATPB), TPI1 (proteína TPIS), SSC1 (HSP77) y HSP60 (proteína HSP60).

El gen TPI1 (proteína TPIS) está implicado en la glucólisis. Como se muestra en la figura 64 existe co-expresión con los genes ATP3 (proteína ATPG) y PCK1 (proteína PCKA).

El gen SSC1 (proteína HSP77) está implicado en la translocación y plegamiento proteico. Como se muestra en la figura 64 existe co-expresión con los genes HSP60 (proteína HSP60), ATP2 (proteína ATPB), ATP3 (proteína ATPG), PCK1 (proteína PCKA) y TPI1 (proteína TPIS).

El gen HSP60 (proteína HSP60) interviene el plegamiento de polipéptidos y ensamblaje del complejo (ATP-dependiente). Previene la agregación y media el replegamiento de las proteínas después del choque térmico. Como se muestra en la figura 64 existe co-expresión con los genes ATP3 (proteína ATPG), PCK1 (proteína PCKA) y TPI1 (proteína TPIS).

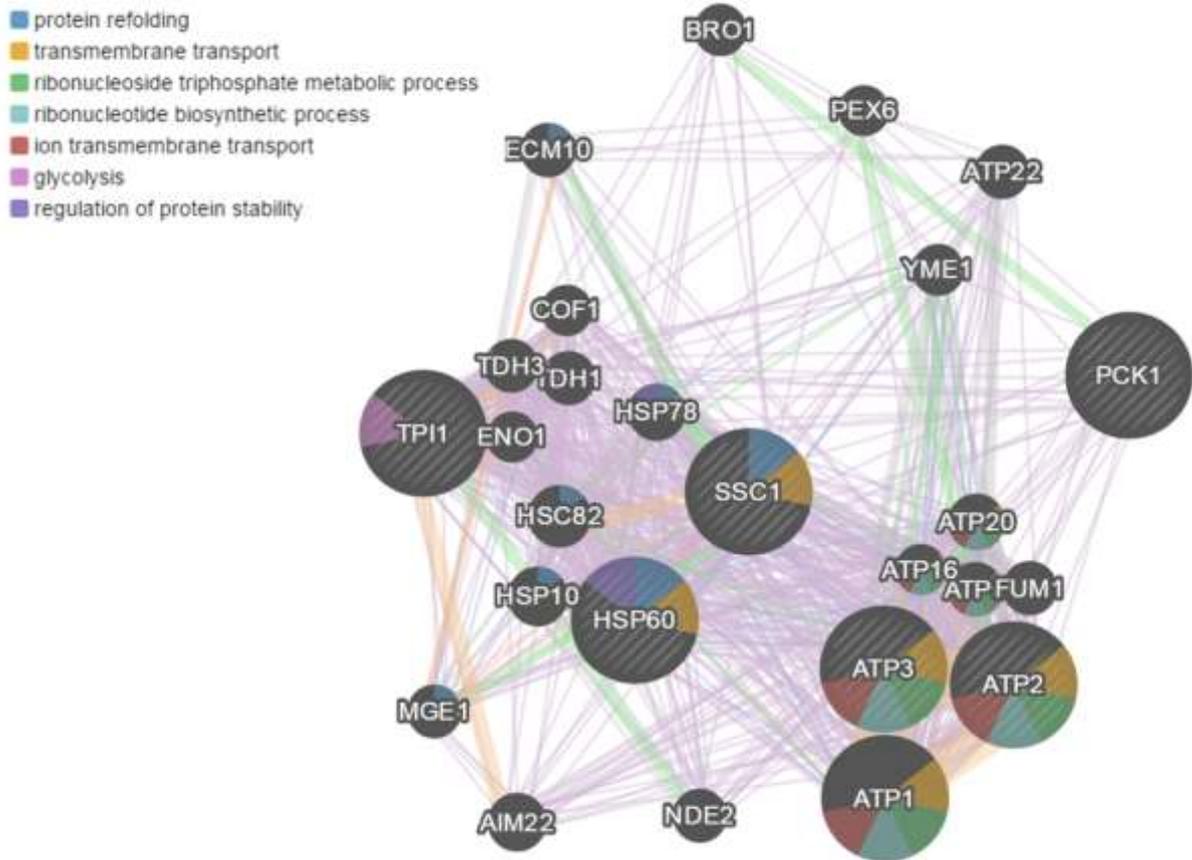


Figura 64. Funciones e interacciones entre los genes que codifican las proteínas con $\Delta mPAI > 2,4$.
 Tabla 25. Proteínas comunes (genes que la codifican) y funciones en ambas cepas con identidad u homología extensa (SCORE > 28; p < 0,05) y con un $\Delta mPAI > 2,4$ (incremento de la expresión proteica).

PROTEÍNA	$\Delta mPAI$ RCispt/Wt	$\Delta mPAI$ RBleo/Wt	GEN (<i>S. cerevisiae</i>)	FUNCIÓN PROTEICA
ATPB_YEAST	4,375	1,875	ATP2	Síntesis de ATP
ATPG_YEAST	2,947	1,632	ATP3	Síntesis de ATP
PCKA_YEAST	2,636	1,455	PCK1	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa. Enzima clave en la gluconeogénesis, cataliza la reacción temprana en la biosíntesis de hidratos de carbono (conversión de oxaloacetato en fosfoenolpiruvato y CO ₂). La glucosa reprime la transcripción y acelera la degradación del ARNm, regulada por Mcm1p y Cat8p, localizada en el citosol.

TPIS_YEAST	1,900	4,400	TPI1	Triosa fosfato isomerasa, abundante enzima glucolítica. Cataliza la interconversión entre Gliceraldehído-3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato. Se localiza en las mitocondrias y en la membrana plasmática.
HSP77_YEAST	2,211	2,895	SSC1	ATPasa. Constituye el componente motor de la Translocasa de la membrana mitocondrial interna (complejo TIM23). Implicada en la translocación y plegamiento proteico.
HSP60_YEAST	1,860	2,720	HSP60	Chaperonina mitocondrial tetradecamérica. Necesaria para el plegamiento de polipéptidos y ensamblaje del complejo (ATP-dependiente). Previene la agregación y media el replegamiento de las proteínas después del choque térmico. Juega un papel en la transmisión de mtDNA.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

En la actualidad, existe una corriente de investigación en la cual, los científicos recurren a la proteómica (estudio de la estructura, función y patrones de expresión de las proteínas) con la confianza de encontrar nuevos biomarcadores que puedan ser utilizados para la identificación de enfermedades, para pronosticar la posibilidad de recidiva del cáncer, resistencia a la quimioterapia, el envejecimiento, etc.

También, los investigadores están estudiando los patrones de expresión génica para así ayudar a determinar el pronóstico de los pacientes o su reacción ante algún tipo de terapia.

Por tanto, es de vital importancia el avance en este campo de investigación puesto que conociendo marcadores de resistencia a quimioterapia se podrán administrar terapias personalizadas que sean más efectivas y que causen menos efectos secundarios en los pacientes.

El proceso de senescencia y envejecimiento celular es un fenómeno multifactorial y universal (Pardue y De Baryshe, 1999), que se produce a todos los niveles de organización biológica (genes, células, tejidos y sistemas) (Hekimi y Guarente, 2003). Está demostrado que los mecanismos celulares implicados en el envejecimiento son similares en todas las especies, por lo que lo estudiado en otros organismos puede ser extrapolado a la especie humana.

No obstante, aunque el proceso es universal, no tiene lugar a la misma velocidad en todas las especies. De la eficiencia con la que el organismo es capaz de mantener el funcionamiento de sus células, tejidos y órganos depende la duración de la vida (Holliday, 1998).

Saccharomyces cerevisiae es un magnífico modelo eucariota para estudiar las funciones celulares básicas y la identificación de mecanismos celulares y moleculares de respuesta ante agentes causantes de daño celular, ya que se trata de una célula eucariota, fácil, sencilla y rápida de cultivar y donde los mecanismos celulares implicados en la respuesta a agentes citotóxicos se encuentran muy conservados (Ruiz-Gómez y Martínez-Morillo, 2006).

5.1 Resistencia a Cisplatino y Bleomicina

Con el paso del tiempo las células son capaces de adquirir resistencia a los fármacos antineoplásicos, siendo capaces de seguir creciendo y propagándose.

Los mecanismos implicados en la resistencia a Cisplatino incluyen la disminución de la entrada celular del fármaco y aumento de la extrusión, activación de sistemas de detoxificación, alteración de las dianas celulares, incremento de la reparación del ADN, alteración de la apoptosis y alteración de la expresión de oncogenes (Chao, 1996; Dempke et al., 2000; Siddik, 2003; Stewart 2007).

La resistencia a Bleomicina constituye una gran preocupación en la clínica. Normalmente ocurre en la recidiva de tumores de células germinales, donde es más comúnmente usado. Aunque el mecanismo por el que se produce la resistencia no está del todo claro, existen diversas posibilidades por las que se puede producir este fenómeno: a) alteración de la entrada y salida celular de bleomicina (Bokemeyer, 2008; Pron et al., 1994); b) mayor capacidad de reparación del daño del ADN inducido por Bleomicina (Bokemeyer, 2008; Pron et al., 1999; Tuimala et al., 2002); c) incremento del metabolismo de inactivación de bleomicina (Tuimala et al., 2002; Robertson et al., 2001; Liu et al., 2011).

Uno de los inconvenientes a la hora de realizar el presente trabajo fue la elección del protocolo a seguir. Si bien existen numerosos estudios sobre citotoxicidad y resistencia a fármacos antineoplásicos, es complicado encontrar protocolos idénticos y por lo tanto resulta difícil comparar resultados. No obstante, no cabe duda de que *Saccharomyces cerevisiae* constituye uno de los mejores modelos biológicos de estudio de este proceso, ya que la mayoría de los trabajos están realizados usando este organismo como modelo.

El protocolo usado para evaluar la citotoxicidad del Cisplatino y la Bleomicina fue de elaboración propia y consistió en someter a la cepa salvaje a diversas dosis de fármaco, con el fin de evaluar cuáles de éstas tenían efecto sobre la levadura y establecer así la ID50 y la ID90. El valor obtenido de ID90, en la citotoxicidad del Cisplatino fue de 264 $\mu\text{g/ml}$, coincidiendo prácticamente igual con la dosis usada por Liao et al., (2007) en un estudio, y que determinó un valor de 250 $\mu\text{g/ml}$ de Cisplatino. La ID90 obtenida para Bleomicina fue de 0,158 UI/ml, siendo distinta a dosis usadas por otros autores.

La ventaja de evaluar la citotoxicidad y los valores de ID50 e ID90 de estos fármacos en esta cepa, y no usar valores estandarizados y obtenidos por otros autores, es la especificidad de la dosis en esta cepa. Con ello, nos aseguramos que esas dosis de fármacos son las exactas y las que causan el efecto deseado en la levadura. Además, es un ensayo rápido y sencillo a partir del cual se pueden obtener resultados más fiables y exactos.

5.2 Selección de cepas resistentes a Cisplatino y a Bleomicina

La mayoría de los estudios existentes sobre selección de cepas resistentes a estos fármacos se basan en trabajos de genética molecular, mediante los que a través de la inserción, delección, sobreexpresión o subexpresión de genes se consigue la resistencia (Furuchi et al., 2001; Huang et al., 2005; Kowalski et al., 2008; Mariani et al., 2014; Schenk et al., 2003). Sin embargo, la forma mediante la que las células tumorales adquieren la resistencia es a través de la exposición al fármaco en los distintos ciclos de quimioterapia. Por tanto, para que el proceso sea lo más parecido a lo que ocurre en la realidad, en este trabajo la selección se ha llevado a cabo mediante la exposición de las células a estos fármacos en distintos ciclos, usando una ID90, hasta conseguir convertirlas en resistentes. Entre las ventajas, además de la similitud con la realidad en los tratamientos de quimioterapia, hay que hacer mención a que es un método sencillo y fácil de realizar así como económico. Por tanto, se podría realizar no sólo con estos fármacos, sino también con el resto de fármacos usados en la quimioterapia, extrapolando posteriormente los resultados al ámbito de la clínica.

5.3 Envejecimiento y su relación con la resistencia a Cisplatino y a Bleomicina

La senescencia celular, que tradicionalmente ha sido asociada con el envejecimiento del organismo, ha surgido recientemente como un determinante clave relacionado con la quimioterapia del cáncer (Berns, 2002; Kahlem et al., 2004; Lowe et al., 2004; Schmitt et al., 2002; Shay y Roninson, 2004). De hecho, forzar a las células tumorales a la senescencia ha sido suficiente para la reversión de su fenotipo resistente (Zheng et al., 2004). Estos resultados sugieren que la deficiencia en la senescencia podría regular los primeros acontecimientos que controlan el desarrollo de resistencia a

la quimioterapia. Por tanto, la identificación de genes antisenescencia podría tener una utilidad terapéutica potencial para la predicción y/o prevención de resistencia a fármacos antineoplásicos.

La actividad mejorada del gen Sir2 permitió descubrir que estaba asociado a un incremento de la longevidad en levaduras (Imai et al., 2000; Kaeberlein et al., 1999), gusanos (Hekimi y Guarente, 2003), moscas (Rogina y Helfand, 2004), y roedores (Cohen et al., 2004). El homólogo humano, Sirt1, también se ha descrito estar implicado en la longevidad, mediante la inhibición de la senescencia celular (Brunet et al., 2004; Cheng et al., 2003; Smith, 2002; Vaziri et al., 2001; Yeung et al., 2004).

Estudios realizados por Chu et al. (2005), en células tumorales de neuroblastoma, osteosarcoma, mama y ovario, resistentes y sensibles a fármacos antineoplásicos, sugieren que el aumento de la expresión de Sirt1 puede representar un fenómeno general asociado con la resistencia a la quimioterapia, independientemente del tipo celular o del fármaco usado para inducir resistencia. Además, tras analizar biopsias de tumores después de haber tratado a los pacientes con quimioterapia se han observado elevadas cantidades de Sirt1.

Así pues, si este gen que está asociado al envejecimiento y además está también asociado al proceso de resistencia a quimioterapia, cabe pensar que deben de existir también otros genes que estén implicados en ambos procesos. Por ello, y tras evaluar en este trabajo que se producía un retraso en el envejecimiento cronológico y replicativo de las cepas resistentes frente a la cepa salvaje, se realizó un análisis proteico con el fin de establecer genes y proteínas implicados en ambos procesos. Aunque los resultados no coincidieron exactamente con Chu et al. (2005), ya que no se encontró sobreexpresión del Sirt1, sí que se encontró sobreexpresión de otras proteínas y genes, los cuales podrían estar implicados en ambos procesos. En el punto 5.6 se discute más específicamente los resultados obtenidos.

5.4 Análisis proteómico cepa WS8105-1C-R300cisPt vs cepa wt

Los genes y proteínas identificados en este trabajo no coinciden con los genes que incrementan la resistencia a Cisplatino publicados en la bibliografía. A continuación se describen los genes identificados por otros autores y que juegan un papel en la resistencia a Cisplatino.

La inactivación del gen FCY2, en células de levaduras, que codifica una permeasa para la citosina/purina y que también transporta protones a través de la membrana plasmática produce fuerte resistencia a Cisplatino. De igual forma ocurre con el gen HPT1, que codifica la hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa, cuya inactivación produce resistencia a Cisplatino (Huang et al., 2005). También, la inactivación de los genes ADE16 y ADE17, en células de levaduras, que codifican isoenzimas que funcionan en los dos últimos pasos de la biosíntesis de novo de la Inosina 5'-Monofosfato, producen resistencia al Cisplatino (Kowalski et al., 2008). Además, genes implicados en la ubiquitinación (YMR275C/BUL1), biogénesis y arquitectura de la pared celular (YLR436C/ECM30), en la reparación del ADN (IXR1) y en la estabilidad genómica (YOR144C/ELG1) también contribuyen a la resistencia a Cisplatino cuando son eliminados (Huang et al., 2005). La eliminación del gen GUK1, que codifica la proteína Guanilato-Quinasa la cual convierte el GMP a GDP, incrementa la resistencia a Cisplatino (Kowalski et al., 2008). El gen ITR1, que codifica el transportador de glucosa myo-inositol, incrementa la resistencia a Cisplatino cuando se elimina (Huang et al., 2005). La eliminación del gen NMD2, que codifica una proteína implicada en la degradación del ARN mensajero mediada por mutaciones terminadoras (NMD), y del

gen NOT3, que codifica el componente del complejo central CCR4-NOT y está implicado en la iniciación y elongación de la transcripción y en la degradación del ARNm, incrementan la resistencia a Cisplatino (Huang et al., 2005). NPR2 (nitrógeno permeasa) es un gen, en levaduras, de sensibilidad a fármacos cuya eliminación conduce a resistencia no sólo al Cisplatino, sino también a la Doxorrubicina (Schenk et al., 2003). La eliminación de los genes RAS2, TOR1 y SCH9, que codifican las proteínas Ras2, Tor1 y Sch9 respectivamente y que están relacionadas con cascadas de señalización que modulan el metabolismo celular en respuesta a nutrientes, incrementa la resistencia a Cisplatino (Mariani et al., 2014). El gen SEM1, que codifica un regulador de la exocitosis y que también funciona como subunidad del proteasoma 26S, incrementa la resistencia a Cisplatino cuando se elimina (Huang et al., 2005). La eliminación del gen SKI3, que codifica proteínas asociadas al exosoma que degrada el ARNm, incrementa la resistencia a Cisplatino (Huang et al., 2005). La eliminación del gen SKY1, que codifica una proteína quinasa SR (SRPK) involucrada en la regulación de las proteínas que están implicadas en el metabolismo del ARNm y la homeostasis, incrementa la resistencia a Cisplatino (Huang et al., 2005; Schenk et al., 2002; Schenk et al., 2003). La eliminación del gen SNF6, que participa en la regulación global de la transcripción y es parte del complejo remodelador de la cromatina SNF/SWI; el gen SOK1, que codifica una proteína que actúa como supresora de la proteína Quinasa A funcionando en la señalización dependiente del AMPc; el gen STP1, que codifica un factor de transcripción específico de la ARN polimerasa II; el gen UPF3, que está implicado en la degradación de ARN mediado por sinsentido (NMD); y el gen VPS29, que participa en la clasificación vacuolar de proteínas y está involucrado en el transporte retrógrado de proteínas de los endosomas a la región trans-Golgi, incrementan la resistencia a Cisplatino (Huang et al., 2005). La delección del gen YWL214W del cual no está demasiado clara su función pudiendo superponerse con SKI8 (represor de la traducción); del gen YJL135W del cual tampoco está demasiado clara su función pudiendo superponerse con LCB3 (metabolismo de esfingolípidos); del gen YJL175W que es un dudoso marco de lectura abierto (ORF) que se superpone al gen SWI3 y que interactúan con SNF6; y del gen YLR352W el cual actualmente no se encuentra caracterizado, incrementan la resistencia a Cisplatino (Huang et al., 2005).

Por otro lado, la activación y sobreexpresión del gen ADE4, que codifica la Fosforribosil-pirofosfato-amidotransferasa que cataliza la primera etapa de la ruta de biosíntesis de nucleótidos de purina 'de novo', incrementa la resistencia a Cisplatino (Kowalski et al., 2008). La sobreexpresión del gen YAP6, que codifica un factor de transcripción de la cremallera de Leucina, incrementa la resistencia a Cisplatino. Y la sobreexpresión del gen CIN5 y el gen YDR259c incrementan también la resistencia a Cisplatino. Estos genes codifican dos proteínas nucleares Cin5 y Ydr259c, las cuales podrían actuar como factores transcripcionales, regulando la expresión de ciertos genes que confieren resistencia a los agentes alquilantes del ADN (Furuchi et al., 2001).

5.4.1 Proteínas comunes en la cepa WS8105-1C-R300cisPt y en la Cepa wt

En este estudio se han seleccionado, de todas las proteínas encontradas en la cepa resistente a Cisplatino (WS8105-1C-R300cisPt) y en la cepa salvaje, aquellas con una variación de emPAI mayor a 2,5 respecto de la cepa salvaje, como sospechosas de estar relacionadas con el proceso de resistencia a Cisplatino. Así se analizaron las proteínas QCR2 (gen QCR2), QCR1 (gen COR1), ALDH4 (gen ALD4), ATPB (gen ATP2),

ATPA (gen ATP1), SCW10 (gen SCW10), HSP26 (gen HSP26), ATPG (gen ATP3), y PCKA (gen PCK1).

QCR2

Esta proteína constituye la subunidad 2 del ubiquinol-citocromo c reductasa (Complejo III). El complejo III es un componente de la cadena de transporte de electrones de la membrana mitocondrial interna (Dorsman y Grivell, 1990; Oudshoorn et al., 1987; Reinders et al., 2007).

Fue la más destacable de todas las proteínas, pues presentó un incremento de expresión de 10,375 veces con respecto a la cepa salvaje. Tanto en la bibliografía como en Saccharomyces Genome Database no aparece nada descrito de que esta proteína esté implicada en la resistencia a Cisplatino. Por tanto, el hallazgo de esta sobreexpresión sugiere que esta proteína y también la cadena de transporte de electrones pueden estar implicados en el proceso de resistencia a Cisplatino. Así pues, esta proteína puede suponer un nuevo biomarcador de resistencia a este fármaco. El gen homólogo en humanos es UQCRC2 y podría ser usada como biomarcador, para lo que hacen falta estudios posteriores.

QCR1

Constituye la subunidad del complejo ubiquinol-citocromo c reductasa. El complejo ubiquinol-citocromo c reductasa (complejo bc1) es un componente de la cadena de transporte de electrones de la membrana mitocondrial interna (Tzagoloff et al., 1986).

Al igual que la proteína QCR2, QCR1 presentó también un incremento bastante considerable de expresión, en concreto, de 6 veces más con respecto a la cepa salvaje. Tanto en la bibliografía como en Saccharomyces Genome Database no aparece nada descrito de que esta proteína esté implicada en la resistencia a Cisplatino. Así pues QCR1, que es de la misma familia que QCR2, y que presenta similar función puede ser un buen candidato a marcador de resistencia a Cisplatino. El gen homólogo en humanos es NCOR1 y podría ser usada como biomarcador, si se demuestra su utilidad en estudios posteriores.

ALDH4

Esta proteína es la Aldehído deshidrogenasa mitocondrial. Necesaria para el metabolismo del etanol y la conversión de acetaldehído en acetato. La actividad es dependiente de K^+ . Utiliza igualmente $NADP^+$ o NAD^+ como coenzimas. La expresión es reprimida por glucosa. Puede sustituir la aldehído deshidrogenasa dependiente de $NADP$ citosólica cuando se dirige al citosol (Mukhopadhyay et al., 2013; Reinders et al., 2007; Serrano, 1999; Tessier et al., 1998).

Presentó un incremento de expresión de 4,5 veces con respecto a la cepa salvaje. Tanto en la bibliografía como en Saccharomyces Genome Database no aparece nada descrito de que esta proteína esté implicada en la resistencia a Cisplatino. Por tanto, el hallazgo de esta sobreexpresión sugiere que esta proteína puede estar implicada en el proceso de resistencia a Cisplatino. Así pues, esta proteína puede suponer un nuevo biomarcador de resistencia a este fármaco. El gen homólogo en humanos es ALDH1B1 y podría ser usada como biomarcador.

ATPB, ATPA y ATPG

La proteína ATPB constituye la subunidad beta del sector F1 de la F1F0-ATP sintasa mitocondrial (síntesis de ATP) (Rak y Tzagoloff, 2009; Reinders et al., 2007; Takeda et al., 1985).

Presentó un incremento de expresión de 4,375 veces con respecto a la cepa salvaje. Por lo que este hecho sugiere que debe de estar implicada en el proceso de resistencia a Cisplatino.

La proteína ATPA constituye la subunidad alfa del sector F1 de la F1F0-ATP sintasa mitocondrial (síntesis de ATP) (Foyen et al., 2013; Rak y Tzagoloff, 2009; Takeda et al., 1986; Reinders et al., 2007).

Presentó un incremento de expresión de 3,568 veces con respecto a la cepa salvaje. Por lo que este hecho sugiere que debe de estar implicada en el proceso de resistencia a Cisplatino.

La proteína ATPG constituye la subunidad gamma del sector F1 de la F1F0-ATP sintasa mitocondrial (síntesis de ATP) (Paul et al., 1994).

Presentó un incremento de expresión de 2,947 veces con respecto a la cepa salvaje. Por lo que este hecho sugiere que debe de estar implicada en el proceso de resistencia a Cisplatino.

Existen 3 tipos de ATPasas: la F-ATPasa, V-ATPasa y la P-ATPasa. Estudios realizados por Liao et al., (2007) en levaduras, muestran que la delección de los genes VMA13, VMA4, VMA6, VMA7, VMA8, VMA9, VMA10 y VMA16 (que codifican subunidades de la V-ATPasa) producen sensibilidad a Cisplatino. Además, en células de mamíferos, una de las subunidades de la V-ATPasa es inducida por Cisplatino (Torigoe et al., 2002). Por tanto, la V-ATPasa está implicada entre los mecanismos celulares de respuesta a este fármaco.

En este estudio se ha encontrado una sobreexpresión de la proteína ATPB, ATPA y ATPG, que constituyen subunidades del sector F1 de la F1F0-ATP sintasa. Como se ha dicho, pertenecen a las familias de las ATPasas, con lo cual, es lógico pensar que la sobreexpresión desencadene las resistencia al fármaco, posiblemente como ocurre en el caso de la V-ATPasa. En la base de datos Saccharomyces Genome Database se indica que la delección del gen ATP2 (proteína ATPB) produce una disminución de la resistencia a Cisplatino, por tanto es lógico pensar, que la sobreexpresión del gen, y por ende el aumento de la cantidad de proteína ATPB, esté relacionado con la resistencia a este fármaco. Sin embargo, en cuanto al gen ATP1 (proteína ATPA) y al gen ATP3 (proteína ATPG) no se le atribuyen resistencia conocida al Cisplatino. No obstante, en este estudio se produce una sobreexpresión de estas dos proteínas, por lo que ello sugiere que estas proteínas puedan suponer nuevos biomarcadores de resistencia a este fármaco. Los genes homólogos en humanos son ATP5B, ATP5A1 y ATP5C1 respectivamente, y podrían ser usadas como biomarcadores de resistencia al Cisplatino.

SCW10

Es una proteína de la pared celular con semejanza a las glucanasas. Implicada en la organización o biogénesis de la pared celular, conjugación y actividad hidrolasa actuando sobre los enlaces glucosídicos (Byrne y Wolfe, 2005; Cappellaro et al., 1998; Zeitlinger et al., 2003).

Presentó un incremento de expresión de 3,125 veces con respecto a la cepa salvaje. Tanto en la bibliografía como en Saccharomyces Genome Database no aparece nada descrito de que esta proteína esté implicada en la resistencia a Cisplatino. Por tanto, el hallazgo de esta sobreexpresión sugiere que esta proteína puede estar implicada en el proceso de resistencia a Cisplatino. Quizás ya que interviene en la organización y

biogénesis de la pared celular pueda de esta forma reorganizarla dificultando así la acción del Cisplatino. Así pues, esta proteína puede suponer un nuevo biomarcador de resistencia a este fármaco en levaduras, ya que esta proteína no se encuentra en humanos.

HSP26

Es una proteína pequeña de choque térmico (sHSP) con actividad chaperona. Forma huecos, oligómeros en forma de esfera que suprimen la agregación de proteínas desplegadas. La activación del oligómero requiere un cambio conformacional inducido por calor. También tiene actividad de unión al ARNm (Bentley et al., 1992; Rossi y Lindquist, 1989; Susek y Lindquist, 1990; Thayer et al., 2014; Tsvetanova et al., 2010; White et al., 2006).

Presentó un incremento de expresión de 3,109 veces con respecto a la cepa salvaje. No aparece nada descrito en la bibliografía de que esta proteína esté implicada en la resistencia a Cisplatino. Por tanto, el hallazgo de esta sobreexpresión sugiere que esta proteína puede estar implicada en el proceso de resistencia a Cisplatino. Esto puede ser debido a que HSP26 se trata de una proteína chaperona. La función de estas proteínas es la de ayudar al plegamiento de otras proteínas recién formadas en la síntesis de proteínas. Por tanto, tras la acción citotóxica del Cisplatino, la célula tiene que incrementar sus mecanismos celulares y moleculares y producir más proteínas para hacer frente al fármaco y poder sobrevivir. Así, el incremento de HSP26 facilitará el plegamiento de las proteínas sintetizadas. Por ello, esta proteína puede suponer un nuevo biomarcador de resistencia a Cisplatino.

PCKA

Esta proteína es la Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa. Es un enzima clave en la gluconeogénesis, cataliza la reacción temprana en la biosíntesis de hidratos de carbono (conversión de oxaloacetato en fosfoenolpiruvato y CO₂). La glucosa reprime la transcripción y acelera la degradación del ARNm, regulada por Mcm1p y Cat8p, localizada en el citosol (Haarasilta y Oura, 1975; Haarasilta y Taskinen, 1977; Haurie et al., 2001; Kuo y Grayhack, 1994; Llanos et al., 2001; Proft y Grzesitza, 1995; Yin et al., 2000).

Presentó un incremento de expresión de 2,636 veces con respecto a la cepa salvaje. No aparece nada descrito en la bibliografía de que esta proteína esté implicada en la resistencia a Cisplatino. Por tanto, el hallazgo de esta sobreexpresión sugiere que esta proteína puede estar implicada en el proceso de resistencia a Cisplatino. Como se ha explicado, es una enzima clave de la ruta gluconeogénica, vía metabólica alternativa y de gran importancia para la obtención de glucosa. Esto hace pensar que la célula, ante la citotoxicidad del Cisplatino, busca rutas alternativas para la obtención de energía. Por ello, esta proteína podría suponer un nuevo biomarcador de resistencia a Cisplatino. El gen homólogo en humanos es PCK2.

Por tanto, se puede observar que las proteínas sobreexpresadas están relacionadas con la cadena transportadora de electrones y síntesis de ATP, plegamiento proteico, organización y biogénesis de la pared celular y gluconeogénesis. Algo coherente pues ante una situación de estrés citotóxico la célula tiene que incrementar estos mecanismos, que son fundamentales en la célula, para poder hacer frente al fármaco y así sobrevivir.

5.4.2 Proteínas únicamente expresadas en la cepa WS8105-1C-R300cisPt.

Se identificaron 64 proteínas que se expresaron únicamente en la cepa WS8105-1C-R300cisPt. Sin embargo, aunque sin tener la certeza de que no se expresaron en la cepa salvaje puede ser que estas proteínas hayan aparecido *de novo*, como posible mecanismo de resistencia a Cisplatino. Por ello, es necesario realizar estudios más específicos para evaluarlas y así poder relacionarlas o no con la resistencia a este fármaco.

5.5 Análisis proteómico cepa WS8105-1C-R 0.158 Bleo vs cepa wt

En la bibliografía se han encontrado diversos genes que incrementan la resistencia a Bleomicina, sin embargo, ninguna de las proteínas (y los genes que las codifican) que se han seleccionado en este estudio, con un incremento de expresión considerable (emPAI > 2,5), aparecen relacionados con la resistencia a Bleomicina descrita por otros autores.

Las proteínas seleccionadas en este estudio han sido: YL179 (gen YLR179C), TPIS (gen TPI1), YP225 (gen YPL225W), SODC (gen SOD1), HSP77 (gen SSC1) y HSP60 (gen HSP60).

YL179

YL179 es una proteína de función desconocida. Presentó un incremento de expresión de 17,143 con respecto a la cepa salvaje. Por tanto, ya que no se conoce la función habría que hacer un estudio exhaustivo para averiguar en los procesos que se encuentra implicada, porque la sobreexpresión en la cepa resistente a Bleomicina fue bastante elevada, pudiendo ser un buen biomarcador de resistencia a este fármaco.

TPIS

Es una Triosa fosfato isomerasa implicada en la degradación glicolítica de los carbohidratos en piruvato (Alber y Kawasaki, 1981).

Presentó un incremento de expresión de 4,4 con respecto a la cepa salvaje. Ya que es una enzima de la glucólisis hace pensar que la célula, ante la citotoxicidad del fármaco, tiene que incrementar las proteínas implicadas en la obtención de energía, para así poder hacer frente al fármaco e intentar sobrevivir. Por ello, esta proteína podría suponer un nuevo biomarcador de resistencia a Bleomicina.

YP225

YP225 es una proteína de función desconocida. Presentó un incremento de expresión de 3,47 con respecto a la cepa salvaje. Por tanto, ya que no se conoce la función habría que hacer un estudio exhaustivo para averiguar en los procesos que se encuentra implicada, porque la sobreexpresión en la cepa resistente a Bleomicina fue considerable, pudiendo ser un buen biomarcador de resistencia a este fármaco.

SODC

Superóxido dismutasa está implicada en la homeostasis del cobre y del zinc, metabolismo del superóxido, envejecimiento celular, organización de la pared celular, regulación de la respiración celular y regulación de la transcripción en respuesta al estrés oxidativo (Lyons et al., 2000; Reddi y Culotta, 2013; Saffi et al., 2006; Schmidt et al., 2012; Tkach et al., 2012; Tsang et al., 2014; Varabyova et al., 2013; Wood y

Thiele, 2009). Presentó un incremento de expresión de 3,422 con respecto a la cepa salvaje.

Para que se active la molécula de Bleomicina necesita la unión con un metal de transición reducido [Fe (II) o Cu (I)], la presencia de oxígeno y un agente reductante. Una vez activa, el efecto citotóxico se ejerce a través de la generación de ROS y por daño directo al ADN y ARN (Abraham et al., 2003; Bukowski et al., 2004; Burger et al., 1981; Galm et al., 2005; Povirk, 1996; Vorobjev et al., 2003).

La Bleomicina activa puede llevar a cabo la producción de radicales hidroxilo, superóxido y peróxido de hidrógeno, los cuales reaccionan rápidamente y de forma inespecífica con moléculas, produciendo la oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Bukowski et al., 2004). Por tanto, es lógica la sobreexpresión de esta proteína ya que SODC se encarga por un lado de la homeostasis del cobre, que es un metal de transición reducido necesario para la activación de la molécula de Bleomicina. Por otro lado se encarga del metabolismo del superóxido, cataliza la dismutación del superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Debido a esto es una importante defensa antioxidante en la mayoría de las células.

Por ello, esta proteína podría suponer un nuevo biomarcador de resistencia a Bleomicina. El gen homólogo en humanos es SOD1.

HSP77

Es una ATPasa de la familia Hsp70. Constituye el componente motor de la Translocasa de la membrana mitocondrial interna (complejo TIM23). Implicada en la translocación y plegamiento proteico (Byrne y Wolfe, 2005; Liu et al., 2001; Lopez-Buesa et al., 1998; Morishima et al., 1990; Truscott et al., 2003). Presentó un incremento de expresión de 2,895 con respecto a la cepa salvaje.

El transporte de proteínas al interior de la mitocondria requiere de la participación de 4 complejos proteicos intercalados en la membrana: los llamados TOM, TIM22, TIM23 y SAM.

Por tanto, esta proteína es necesaria para el transporte de otras proteínas al interior de la mitocondria. Algo que hace pensar que su sobreexpresión esté relacionada con la resistencia a Bleomicina, pues quizás ante la citotoxicidad del fármaco, la célula tiene que incrementar los mecanismos celulares y moleculares de transporte, incrementando la síntesis proteica para así poder hacer frente al fármaco e intentar sobrevivir. Por ello, esta proteína podría suponer un nuevo biomarcador de resistencia a Bleomicina. El gen homólogo en humanos es ATP2C1.

HSP60

Chaperonina mitocondrial tetradecamerica. Necesaria para el plegamiento de polipéptidos y ensamblaje del complejo (ATP-dependiente). Previene la agregación y media el replegamiento de las proteínas después del choque térmico. Juega un papel en la transmisión de mtDNA (Cheng et al., 1989; Cheng et al., 1990; Kaufman et al., 2003; Koll et al., 1992; Reading et al., 1989; Reinders et al., 2007). Presentó un incremento de expresión de 2,72 con respecto a la cepa salvaje.

Las proteínas son las moléculas que ejecutan la mayor parte de las acciones que se producen en la célula. Para que esto sea posible, necesitan adquirir una estructura tridimensional que permita la función para la que han sido diseñadas. La mayor parte de las veces, no pueden adquirir esta configuración por sí solas y requieren la ayuda de unas proteínas especializadas denominadas chaperonas moleculares. Existen multitud de chaperonas en la célula, pero las dos familias más importantes se llaman Hsp60 y

Hsp70. Entre las dos ayudan a plegar la mayor parte de las proteínas celulares. Un trabajo, dirigido por el investigador del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), José María Valpuesta, del Centro Nacional de Biotecnología, en Madrid, muestra por primera vez que estos dos tipos de chaperonas colaboran entre sí para hacer que el plegamiento de proteínas en las células eucariotas sea mucho más eficiente.

Por tanto, es lógico pensar que tras la acción citotóxica de la Bleomicina, la célula tiene que incrementar sus mecanismos celulares y moleculares implicados en la producción de proteínas para hacer frente al fármaco y poder sobrevivir, ya que las proteínas son las moléculas que ejecutan la mayor parte de las acciones que se producen en la célula. Así, el incremento de HSP60 facilitará el plegamiento de las proteínas sintetizadas. Por ello, esta proteína puede suponer un nuevo biomarcador de resistencia a Bleomicina. El gen homólogo en humanos es HSPD1.

5.5.1 Proteínas únicamente expresadas en la cepa WS8105-1C-R 0.158 Bleo

Se identificaron 77 proteínas que se expresaron únicamente en la cepa WS8105-1C-R 0.158 Bleo. Sin embargo, aunque sin tener la certeza de que no se expresaron en la cepa salvaje puede ser que estas proteínas hayan aparecido *de novo*, como posible mecanismo de resistencia a Bleomicina. Por ello, es necesario realizar estudios más específicos para evaluarlas y así poder relacionarlas o no con la resistencia a este fármaco.

5.6 Análisis proteómico cepa WS8105-1C-R300cisPt vs WS8105-1C-R 0.158 Bleo vs cepa wt. Relación con el envejecimiento.

El envejecimiento, como ocurre con otros procesos biológicos, es un proceso multifactorial producido por la interacción de diversos mecanismos moleculares que actúan paralelamente. Así pues, este trabajo no hubiese estado completo si no se hubiesen estudiado genes (proteínas) que pudiesen mantener una relación con el envejecimiento (Pardue y De Baryshe, 1999), ya que aunque ambas cepas resistentes no presentaban resistencia cruzada, sí que presentaron una respuesta similar al envejecimiento, puesto que éstas envejecieron más lento que la cepa salvaje.

La teoría genómica establece que los genes son los responsables de la duración máxima de la vida (entre 25-35%) (Bengtson y Schaie, 1998). El resto corresponde a los factores ambientales (Ljunquist et al., 1998; McGue et al., 1993). Los genes que regulan la longitud de los telómeros, la reparación del ADN y la respuesta al estrés celular afectan al envejecimiento (Allen, 1996; Bodnar et al., 1998; Shay y Wright, 2000). La apoptosis tiene lugar en todos los tejidos del organismo. Es un modo de conservar la forma y función de los órganos así como también de suprimir las células malignas o defectuosas. Ésta ejerce un rol importante en el envejecimiento de órganos como hueso, cerebro, el sistema inmune, entre otros. El exceso de este proceso da lugar a situaciones patológicas. Existen evidencias de que la apoptosis juega un importante papel en enfermedades como Alzheimer, Parkinson y arteriosclerosis (Madeo et al., 1999; Madeo et al., 2002), que están relacionadas con la edad (Toussaint, 1993; Madeo et al., 1999; Madeo et al., 2002).

Un biomarcador de envejecimiento se define como un parámetro biológico de un organismo que, ya sea sólo o combinado con otros y en ausencia de enfermedad, pronosticará de forma exacta la capacidad funcional, a una edad concreta que puede que no coincida con la propia edad cronológica (Baker y Sprott, 1988). Por esta razón, no es sorprendente que muchos científicos sean críticos ante la posibilidad de identificar biomarcadores de envejecimiento, ya que el envejecimiento es un proceso que no es homogéneo y no ocurre a una única velocidad ni entre individuos ni incluso entre los diferentes tejidos y órganos de un mismo individuo.

Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio podrían sugerir que las proteínas comunes identificadas en las tres cepas, podrían ser consideradas como candidatas a biomarcadores de la edad fisiológica real de los individuos; al menos con el propósito de plantear nuevos proyectos de investigación.

Estos resultados son esperanzadores, ya que es difícil encontrar un biomarcador de envejecimiento, que abra multitud de posibilidades hacia terapias más personalizadas. Aquel factor que ayude a incrementar la cantidad de información actuará contra el envejecimiento (Semsei, 2000).

Así, se han seleccionado las proteínas que, estando presentes en WS8105-1C-R300cisPt (cepa resistente a Cisplatino) y en WS8105-1C-R 0.158 Bleo (cepa resistente a Bleomicina), tienen una variación de emPAI mayor a 2,4 en cualquiera de las cepas. Si estamos buscando proteínas que tengan relación con el envejecimiento deben estar coexpresadas en ambas cepas resistentes, ya que ambas cepas retrasan el envejecimiento; aunque no en el mismo grado. A continuación se detallan las proteínas más sospechosas de estar relacionadas con el envejecimiento:

ATPB (gen ATP2), ATPG (gen ATP3), PCKA (gen PCK1), TPIS (gen TPI1), HSP77 (gen SSC1) y HSP60 (gen HSP60).

ATPB

La proteína ATPB constituye la subunidad beta del sector F1 de la F1F0-ATP sintasa mitocondrial (síntesis de ATP) (Rak y Tzagoloff, 2009; Reinders et al., 2007; Takeda et al., 1985).

La cepa resistente a Cisplatino presentó un incremento de expresión de 4,375 veces y la cepa resistente a Bleomicina de 1,875 veces, con respecto a la cepa salvaje. Por tanto, pese a que hubo sobreexpresión en ambas cepas resistentes, el incremento fue mayor en la cepa resistente a Cisplatino.

En los ensayos de envejecimiento cronológico y replicativo se obtuvo que en ambas cepas resistentes se produjo un retraso en el envejecimiento. Por ello, esto sugiere que el incremento de expresión de esta proteína, como consecuencia de la resistencia adquirida a ambos fármacos, tiene un efecto de retraso en el envejecimiento cronológico y replicativo. Estos resultados concuerdan con información obtenida de "Saccharomyces Genome Database", en la que se indica que la delección del gen ATP2 (proteína ATPB) produce una disminución del ciclo de vida cronológico. Por tanto, la sobreexpresión de este gen conlleva a un aumento de dicho ciclo. Así pues, esta proteína puede ser un buen candidato a biomarcador de envejecimiento celular. Y además, se deduce de aquí que los mecanismos de adquisición de resistencia a estos fármacos están relacionados con los mecanismos del envejecimiento. El gen homólogo en humanos es ATP5B.

ATPG

La proteína ATPG constituye la subunidad gamma del sector F1 de la F1F0-ATP sintasa mitocondrial (síntesis de ATP) (Paul et al., 1994).

La cepa resistente a Cisplatino presentó un incremento de expresión de 2,947 veces y la cepa resistente a Bleomicina de 1,632 veces, con respecto a la cepa salvaje. Por tanto, pese a que hubo sobreexpresión en ambas cepas resistentes, el incremento fue mayor en la cepa resistente a Cisplatino.

En los ensayos de envejecimiento cronológico y replicativo se obtuvo que en ambas cepas resistentes se produjo un retraso en el envejecimiento. Por ello, esto sugiere que el incremento de expresión de esta proteína, como consecuencia de la resistencia adquirida a ambos fármacos, tiene un efecto de retraso en el envejecimiento cronológico y replicativo. Estos resultados concuerdan con resultados obtenidos por Francis et al., (2007) en los que indica que la ganancia de función del gen ATP3 (proteína ATPG), en levaduras, incrementan el ciclo de vida cronológico y por tanto retrasan el envejecimiento. Así pues, esta proteína puede ser un buen candidato a biomarcador de envejecimiento celular. Y además, se deduce de aquí que los mecanismos de adquisición de resistencia a estos fármacos están relacionados con los mecanismos del envejecimiento. El gen homólogo en humanos es ATP5C1.

PCKA

Esta proteína es la Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa. Es un enzima clave en la gluconeogénesis, cataliza la reacción temprana en la biosíntesis de hidratos de carbono (conversión de oxaloacetato en fosfoenolpiruvato y CO₂). La glucosa reprime la transcripción y acelera la degradación del ARNm, regulada por Mcm1p y Cat8p, localizada en el citosol (Haarasilta y Oura, 1975; Haarasilta y Taskinen, 1977; Haurie et al., 2001; Kuo y Grayhack, 1994; Llanos et al., 2001; Proft y Grzesitza, 1995; Yin et al., 2000).

La cepa resistente a Cisplatino presentó un incremento de expresión de 2,636 veces y la cepa resistente a Bleomicina de 1,455 veces, con respecto a la cepa salvaje. Por tanto, pese a que hubo sobreexpresión en ambas cepas resistentes, el incremento fue mayor en la cepa resistente a Cisplatino.

En los ensayos de envejecimiento cronológico y replicativo se obtuvo que en ambas cepas resistentes se produjo un retraso en el envejecimiento. Por ello, esto sugiere que el incremento de expresión de esta proteína, como consecuencia de la resistencia adquirida a ambos fármacos, tiene un efecto de retraso en el envejecimiento cronológico y replicativo. Estos resultados concuerdan con información obtenida de "Saccharomyces Genome Database", en la que se indica que la delección del gen PCK1 produce una disminución del ciclo de vida cronológico. Por tanto, la sobreexpresión de este gen conlleva a un aumento de dicho ciclo. Así pues, esta proteína puede ser un buen candidato a biomarcador de envejecimiento celular. Y además, se deduce de aquí que los mecanismos de adquisición de resistencia a estos fármacos están relacionados con los mecanismos del envejecimiento. El gen homólogo en humanos es PCK2.

TPIS

Es una Triosa fosfato isomerasa implicada en la degradación glicolítica de los carbohidratos en piruvato (Alber y Kawasaki, 1981).

La cepa resistente a Cisplatino presentó un incremento de expresión de 1,9 veces y la cepa resistente a Bleomicina de 4,4 veces, con respecto a la cepa salvaje. Por tanto, pese a que hubo sobreexpresión en ambas cepas resistentes, el incremento fue mayor en la cepa resistente a Bleomicina.

En los ensayos de envejecimiento cronológico y replicativo se obtuvo que en ambas cepas resistentes se produjo un retraso en el envejecimiento. Por ello, esto sugiere que el incremento de expresión de esta proteína, como consecuencia de la resistencia adquirida

a ambos fármacos, tiene un efecto de retraso en el envejecimiento cronológico y replicativo. En la bibliografía no aparece nada descrito sobre la posible relación de este gen con el envejecimiento celular. Ya que es una enzima de la glucólisis hace pensar que la célula, ante la citotoxicidad de los fármacos, tiene que incrementar las proteínas implicadas en la obtención de energía, para así poder hacer frente al fármaco e intentar sobrevivir.

Así pues, esta proteína podría ser un buen candidato a biomarcador de envejecimiento celular. Y además, se deduce de aquí que los mecanismos de adquisición de resistencia a estos fármacos están relacionados con los mecanismos del envejecimiento. El gen homólogo en humanos es TPI1.

HSP77

Es una ATPasa de la familia Hsp70. Constituye el componente motor de la Translocasa de la membrana mitocondrial interna (complejo TIM23). Implicada en la translocación y plegamiento proteico (Byrne y Wolfe, 2005; Liu et al., 2001; Lopez-Buesa et al., 1998; Morishima et al., 1990; Truscott et al., 2003).

La cepa resistente a Cisplatino presentó un incremento de expresión de 2,211 veces y la cepa resistente a Bleomicina de 2,895 veces, con respecto a la cepa salvaje. Por tanto, pese a que hubo sobreexpresión en ambas cepas resistentes, el incremento fue mayor en la cepa resistente a Bleomicina.

En los ensayos de envejecimiento cronológico y replicativo se obtuvo que en ambas cepas resistentes se produjo un retraso en el envejecimiento. Por ello, esto sugiere que el incremento de expresión de esta proteína, como consecuencia de la resistencia adquirida a ambos fármacos, tiene un efecto de retraso en el envejecimiento cronológico y replicativo. Sin embargo, estos resultados discrepan con Perić et al., 2016 que determinan que en mutantes de levaduras deficientes en chaperonas (gen SSC1) se produce un incremento en el ciclo de vida cronológico y replicativo. Por tanto, serán necesarios más estudios, para contrastar estas diferencias de resultados, antes de poder establecer esta proteína como candidato a biomarcador de envejecimiento.

HSP60

Chaperonina mitocondrial tetradecamerica. Necesaria para el plegamiento de polipéptidos y ensamblaje del complejo (ATP-dependiente). Previene la agregación y media el replegamiento de las proteínas después del choque térmico. Juega un papel en la transmisión de mtDNA (Cheng et al., 1989; Cheng et al., 1990; Kaufman et al., 2003; Koll et al., 1992; Reading et al., 1989; Reinders et al., 2007).

La cepa resistente a Cisplatino presentó un incremento de expresión de 1,860 veces y la cepa resistente a Bleomicina de 2,720 veces, con respecto a la cepa salvaje. Por tanto, pese a que hubo sobreexpresión en ambas cepas resistentes, el incremento fue mayor en la cepa resistente a Bleomicina.

En los ensayos de envejecimiento cronológico y replicativo se obtuvo que en ambas cepas resistentes se produjo un retraso en el envejecimiento. Por ello, esto sugiere que el incremento de expresión de esta proteína, como consecuencia de la resistencia adquirida a ambos fármacos, tiene un efecto de retraso en el envejecimiento cronológico y replicativo. En la bibliografía no aparece nada descrito sobre la posible relación de este gen (proteína) con el envejecimiento celular. Sin embargo, Perić et al., 2016 determinan que en mutantes de levaduras deficientes en chaperonas se produce un incremento en el ciclo de vida cronológico y replicativo. Por tanto, serán necesarios más estudios, para

contrastar estas diferencias de resultados, antes de poder establecer esta proteína como candidato a biomarcador de envejecimiento. El gen homólogo en humanos es HSPD1.

5.7 Biomarcadores en la clínica

Numerosos estudios demuestran que la expresión de genes de reparación del ADN como ERCC1, β -tubulinas o las Topoisomerasas pueden predecir la respuesta a Platino, Taxanos y a otros agentes citotóxicos (Lee et al., 2010; Pfister et al., 2012; Stengel et al., 2010).

Además, existen 7 biomarcadores que han sido evaluados en varios tipos de tumores por su papel predictor de respuesta a quimioterápicos, en tratamientos de primera línea, avanzados, metastásicos y adyuvantes. Estos son: ERCC1–Platino, RRM1– Gemcitabina, TUBB3– Taxanos, TYMS–5-fluorouracilo (5-FU) / Capecitabina, MGMT– Temozolomida, TOP1–irinotecán/topotecán y TOP2A–antraciclinas.

Las proteínas sobreexpresadas identificadas en este trabajo no coinciden con estos resultados, encontrándonos por tanto ante la posibilidad de haber identificado posibles nuevos biomarcadores de resistencia a estos fármacos, para lo que harán falta estudios posteriores.

Existen evidencias de que el gen humano Sirt1 (Sir2 en levaduras), está implicado en la longevidad, mediante la inhibición de la senescencia celular (Brunet et al., 2004; Cheng et al., 2003; Smith, 2002; Vaziri et al., 2001; Yeung et al., 2004). Estudios realizados por Chu et al. (2005), en células tumorales de neuroblastoma, osteosarcoma, mama y ovario, resistentes y sensibles a fármacos antineoplásicos, sugieren que el aumento de la expresión de Sirt1 puede representar un fenómeno general asociado con la resistencia a la quimioterapia, indistintamente del tipo celular o del fármaco usado para inducir resistencia. Además, se observaron elevadas cantidades de Sirt1 en biopsias de tumores tras haber tratado a los pacientes con quimioterapia.

Aunque los resultados del presente estudio no coinciden con los descritos en la bibliografía, sí que se encontró sobreexpresión de otras proteínas y genes, los cuales podrían estar implicados en ambos procesos y pueden suponer nuevos biomarcadores, para lo que serán necesarios estudios posteriores.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. La levadura *S. cerevisiae* constituye un modelo biológico ideal para el estudio de los fundamentos moleculares y celulares de la resistencia a fármacos antineoplásicos y del envejecimiento.
2. La exposición a Cisplatino y Bleomicina prolongada en el tiempo confiere resistencia a estos fármacos en *S. cerevisiae*.
3. No existe resistencia cruzada a ambos fármacos en el modelo de estudio con el método de selección y dosis empleados.
4. El incremento de expresión de las proteínas QCR2 (gen QCR2), QCR1 (gen COR1), ALDH4 (gen ALD4), ATPB (gen ATP2), ATPA (gen ATP1), SCW10 (gen SCW10), HSP26 (gen HSP26), ATPG (gen ATP3), y PCKA (gen PCK1) en la cepa resistente a Cisplatino sugiere que podrían estar implicadas en el proceso de resistencia. Por tanto, podrían ser buenos candidatos a biomarcadores de quimioresistencia a Cisplatino.
5. El incremento de expresión de las proteínas YL179 (gen YLR179C), TPIS (gen TPI1), YP225 (gen YPL225W), SODC (gen SOD1), HSP77 (gen SSC1) y HSP60 (gen HSP60) en la cepa resistente a Bleomicina sugiere que podrían estar implicadas en el proceso de resistencia. Por tanto, podrían ser buenos candidatos a biomarcadores de quimioresistencia a este fármaco.
6. La expresión de nuevas proteínas en las cepas resistentes a Cisplatino y Bleomicina y que no se tiene la certeza de que no estén expresadas en la cepa salvaje, podrían ser la base de estudios futuros de evaluación de expresión de nuevas proteínas, relacionadas con los procesos de resistencia a Cisplatino y Bleomicina.
7. Las cepas seleccionadas resistentes a Cisplatino y Bleomicina presentan un incremento en el ciclo de vida cronológico y replicativo, produciéndose un retraso en el envejecimiento. Esto hecho sugiere que deben existir mecanismos celulares y moleculares comunes entre la adquisición de resistencia a estos fármacos y el retraso en el envejecimiento celular.
8. En la cepa resistente a Cisplatino y en la cepa resistente a Bleomicina se produce sobreexpresión de proteínas comunes con respecto a la cepa salvaje. Las proteínas sobreexpresadas son: ATPB (gen ATP2), ATPG (gen ATP3), PCKA (gen PCK1), TPIS (gen TPI1), HSP77 (gen SSC1) y HSP60 (gen HSP60). Estas proteínas podrían ser buenos candidatos a biomarcadores de envejecimiento celular.
9. Los procesos de adquisición de resistencia a Cisplatino y Belomicina, y su relación con el retraso en el envejecimiento cronológico y replicativo son fenómenos multifactoriales donde intervienen múltiples mecanismos celulares y moleculares.

REFERENCIAS

7. REFERENCIAS

- Abraham, A. T., Lin, J. J., Newton, D. L., Rybak, S., & Hecht, S. M. (2003). RNA cleavage and inhibition of protein synthesis by bleomycin. *Chemistry & biology*, 10(1), 45-52.
- Adalbert, R., Gilley, J., & Coleman, M. P. (2007). A β , tau and ApoE4 in Alzheimer's disease: the axonal connection. *Trends in molecular medicine*, 13(4), 135-142.
- Adams, J. M., & Cory, S. (2002). Apoptosomes: engines for caspase activation. *Current opinion in cell biology*, 14(6), 715-720.
- Adrain, C., & Martin, S. J. (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends in biochemical sciences*, 26(6), 390-397.
- Agarwal, R., & Kaye, S. B. (2003). Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 3(7), 502-516.
- Aggarwal, S. K. (1993). A histochemical approach to the mechanism of action of cisplatin and its analogues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 41(7), 1053-1073.
- Aggarwal, S. K., Broomhead, J. A., Fairlie, D. P., & Whitehouse, M. W. (1980). Platinum drugs: combined anti-lymphoproliferative and nephrotoxicity assay in rats. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 4(4), 249-258.
- Alber, T., & Kawasaki, G. (1981). Nucleotide sequence of the triose phosphate isomerase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of molecular and applied genetics*, 1(5), 419-434.
- Allen, J. F. (1996). Separate sexes and the mitochondrial theory of ageing. *Journal of Theoretical Biology*, 180(2), 135-140.
- Alonso-Fernández, P., & de la Fuente, M. (2008). Marcadores inmunológicos de envejecimiento. *Revista Española de Geriatria y Gerontología*, 43(3), 167-179.
- Anderson, R. M., Bitterman, K. J., Wood, J. G., Medvedik, O., & Sinclair, D. A. (2003). Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 423(6936), 181-185.
- Andrade, M. A., Sander, C., & Valencia, A. (1998). Updated catalogue of homologues to human disease-related proteins in the yeast genome. *FEBS letters*, 426(1), 7-16.

- Aouida, M., & Ramotar, D. (2006). Bleomycin transport holds the key for improved anticancer therapy. *Cancer Therapy*, 4, 171-182.
- Aouida, M., Leduc, A., Huijie, W. A. N. G., & Ramotar, D. (2004a). Characterization of a transport and detoxification pathway for the antitumour drug bleomycin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 384(1), 47-58.
- Aouida, M., Pagé, N., Leduc, A., Peter, M., & Ramotar, D. (2004b). A genome-wide screen in *Saccharomyces cerevisiae* reveals altered transport as a mechanism of resistance to the anticancer drug bleomycin. *Cancer research*, 64(3), 1102-1109.
- Araki, T., Sasaki, Y., & Milbrandt, J. (2004). Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science*, 305(5686), 1010-1013.
- Arnold, M., Karim-Kos, H. E., Coebergh, J. W., Byrnes, G., Antilla, A., Ferlay, J. & Soerjomataram, I. (2015). Recent trends in incidence of five common cancers in 26 European countries since 1988: Analysis of the European Cancer Observatory. *European journal of cancer*, 51(9), 1164-1187.
- Augustine, C. K., Yoo, J. S., Potti, A., Yoshimoto, Y., Zipfel, P. A., Friedman, H. S., ... & Tyler, D. S. (2009). Genomic and molecular profiling predicts response to temozolomide in melanoma. *Clinical Cancer Research*, 15(2), 502-510.
- Austad, S. N. (2009). Comparative biology of aging. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 64(2), 199-201.
- Austad, S. N. (2009). Comparative biology of aging. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 64(2), 199-201.
- Baker, G. T., & Sprott, R. L. (1988). Biomarkers of aging. *Experimental gerontology*, 23(4-5), 223-239.
- Bala, M., & Mathew, L. (2001). An in vitro approach to study chromosomal DNA damage. *Molecular biology reports*, 28(4), 199-207.
- Baldini, N., Scotlandi, K., Barbanti-Bròdano, G., Manara, M. C., Maurici, D., Bacci, G., ... & Serra, M. (1995). Expression of P-glycoprotein in high-grade osteosarcomas in relation to clinical outcome. *New England Journal of Medicine*, 333(21), 1380-1385.

- Barlogie, B., Drewinko, B., Schumann, J., & Freireich, E. J. (1976). Pulse cytophotometric analysis of cell cycle perturbation with bleomycin in vitro. *Cancer research*, 36(3), 1182-1187.
- Bassett, D. E., Basrai, M. A., Carla, C., Katsumi, K., & Philip, H. (1996). Exploiting the complete yeast genome sequence. *Current opinion in genetics & development*, 6(6), 763-766.
- Basu, A. (1993). The potential of protein kinase C as a target for anticancer treatment. *Pharmacology & therapeutics*, 59(3), 257-280.
- Basu, A., & Krishnamurthy, S. (2010). Cellular responses to cisplatin-induced DNA damage. *Journal of nucleic acids*, 2010.
- Basu, A., & Sivaprasad, U. (2007). Protein kinase C ϵ makes the life and death decision. *Cellular signalling*, 19(8), 1633-1642.
- Basu, A., & Tu, H. (2005). Activation of ERK during DNA damage-induced apoptosis involves protein kinase C δ . *Biochemical and biophysical research communications*, 334(4), 1068-1073.
- Bengtson VL, Schaie KW. 1998. Handbook of Theories of Aging. 2nd ed. Springer Publishing Company. New York.
- Bentley, N. J., Fitch, I. T., & Tuite, M. F. (1992). The small heat- shock protein Hsp26 of *Saccharomyces cerevisiae* assembles into a high molecular weight aggregate. *Yeast*, 8(2), 95-106.
- Berns, A. (2002). Senescence: a companion in chemotherapy?. *Cancer Cell*, 1(4), 309-311.
- Berra, E., Diaz-Meco, M. T., & Moscat, J. (1998). The activation of p38 and apoptosis by the inhibition of Erk is antagonized by the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 273(17), 10792-10797.
- Berra, E., Municio, M. M., Sanz, L., Frutos, S., Diaz-Meco, M. T., & Moscat, J. (1997). Positioning atypical protein kinase C isoforms in the UV-induced apoptotic signaling cascade. *Molecular and Cellular Biology*, 17(8), 4346-4354.
- Besse, B., Olaussen, K. A., & Soria, J. C. (2013). ERCC1 and RRM1: ready for prime time?. *Journal of Clinical Oncology*, 31(8), 1050-1060.
- Bianco, R., Troiani, T., Tortora, G., & Ciardiello, F. (2005). Intrinsic and acquired resistance to EGFR inhibitors in human cancer therapy. *Endocrine-related cancer*, 12(Supplement 1), S159-S171.

- Blander, G., de Oliveira, R. M., Conboy, C. M., Haigis, M., & Guarente, L. (2003). Superoxide dismutase 1 knock-down induces senescence in human fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 278(40), 38966-38969.
- Blasco, M. A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 6(8), 611-622.
- Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C. P., Morin, G. B., ... & Wright, W. E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *science*, 279(5349), 349-352.
- Bokemeyer, C. (2008). Bleomycin in testicular cancer: will pharmacogenomics improve treatment regimens?. *Journal of Clinical Oncology*, 26(11), 1783-1785.
- Bosetti, C., Bertuccio, P., Malvezzi, M., Levi, F., Chatenoud, L., Negri, E., & La Vecchia, C. (2013). Cancer mortality in Europe, 2005–2009, and an overview of trends since 1980. *Annals of oncology*, mdt301.
- Bournet, B., Buscail, C., Muscari, F., Cordelier, P., & Buscail, L. (2016). Targeting KRAS for diagnosis, prognosis, and treatment of pancreatic cancer: Hopes and realities. *European Journal of Cancer*, 54, 75-83.
- Bowles, J. T. (1998). The evolution of aging: a new approach to an old problem of biology. *Medical hypotheses*, 51(3), 179-221.
- Brancho, D., Tanaka, N., Jaeschke, A., Ventura, J. J., Kelkar, N., Tanaka, Y., ... & Davis, R. J. (2003). Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes & development*, 17(16), 1969-1978.
- Bray, F., & Møller, B. (2006). Predicting the future burden of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6(1), 63-74.
- Breuninger, L. M., Paul, S., Gaughan, K., Miki, T., Chan, A., Aaronson, S. A., & Kruh, G. D. (1995). Expression of multidrug resistance-associated protein in NIH/3T3 cells confers multidrug resistance associated with increased drug efflux and altered intracellular drug distribution. *Cancer Research*, 55(22), 5342-5347.
- Brody, J. R., Hucl, T., Gallmeier, E., Winter, J. M., Kern, S. E., & Murphy, K. M. (2006). Genomic copy number changes affecting the thymidylate synthase (TYMS) gene in cancer: a model for patient classification to aid fluoropyrimidine therapy. *Cancer research*, 66(19), 9369-9373.
- Brown, S. J., Cole, M. D., & Erives, A. J. (2008). Evolution of the holozoan ribosome biogenesis regulon. *BMC genomics*, 9(1), 1.

- Brozovic, A., Ambriović-Ristov, A., & Osmak, M. (2010). The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Critical reviews in toxicology*, 40(4), 347-359.
- Brunet, A., Sweeney, L. B., Sturgill, J. F., Chua, K. F., Greer, P. L., Lin, Y., ... & Hu, L. S. (2004). Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science*, 303(5666), 2011-2015.
- Bruni, L., Diaz, M., Castellsagué, M., Ferrer, E., Bosch, F. X., & de Sanjosé, S. (2010). Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *Journal of Infectious Diseases*, 202(12), 1789-1799.
- Bukowski, M. R., Zhu, S., Koehntop, K. D., Brennessel, W. W., & Que Jr, L. (2004). Characterization of an FeIII-OOH species and its decomposition product in a bleomycin model system. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 9(1), 39-48.
- Burger, R. M., Peisach, J., & Horwitz, S. B. (1981). Activated bleomycin. A transient complex of drug, iron, and oxygen that degrades DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 256(22), 11636-11644.
- Byrne, K. P., & Wolfe, K. H. (2005). The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species. *Genome research*, 15(10), 1456-1461.
- Byrne, K. P., & Wolfe, K. H. (2005). The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species. *Genome research*, 15(10), 1456-1461.
- Cappellaro, C., Mrsa, V., & Tanner, W. (1998). New Potential Cell Wall Glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and Their Involvement in Mating. *Journal of bacteriology*, 180(19), 5030-5037.
- Carter, B. J., De Vroom, E., Long, E. C., Van Der Marel, G. A., Van Boom, J. H., & Hecht, S. M. (1990). Site-specific cleavage of RNA by Fe (II). bleomycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(23), 9373-9377.
- Carter, M. E., & Brunet, A. (2007). FOXO transcription factors. *Current Biology*, 17(4), R113-R114.
- Casares, C., Ramírez-Camacho, R., Trinidad, A., Roldán, A., Jorge, E., & García-Berrocal, J. R. (2012). Reactive oxygen species in apoptosis induced by

cisplatin: review of physiopathological mechanisms in animal models. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 269(12), 2455-2459.

- Center, M. M., Jemal, A., & Ward, E. (2009). International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 18(6), 1688-1694.
- Center, M. M., Jemal, A., Lortet-Tieulent, J., Ward, E., Ferlay, J., Brawley, O., & Bray, F. (2012). International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. *European urology*, 61(6), 1079-1092.
- Chabner, B. A., & Roberts, T. G. (2005). Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews Cancer*, 5(1), 65-72.
- Chandra, P., & Brouwer, K. L. (2004). The complexities of hepatic drug transport: current knowledge and emerging concepts. *Pharmaceutical research*, 21(5), 719-735.
- Chang, B. D., Swift, M. E., Shen, M., Fang, J., Broude, E. V., & Roninson, I. B. (2002). Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(1), 389-394.
- Chang, L., & Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 410(6824), 37-40.
- Chao, C. C. (1996). Molecular basis of cis-diamminedichloroplatinum (II) resistance: a review. *Journal of the Formosan Medical Association= Taiwan yi zhi*, 95(12), 893-900.
- Chen, G., Jaffrézou, J. P., Fleming, W. H., Durán, G. E., & Sikic, B. I. (1994). Prevalence of multidrug resistance related to activation of the *mdr1* gene in human sarcoma mutants derived by single-step doxorubicin selection. *Cancer research*, 54(18), 4980-4987.
- Chen, J., & Stubbe, J. (2004). Bleomycins: new methods will allow reinvestigation of old issues. *Current opinion in chemical biology*, 8(2), 175-181.
- Chen, J., & Stubbe, J. (2005). Bleomycins: towards better therapeutics. *Nature Reviews Cancer*, 5(2), 102-112.
- Cheng, H. L., Mostoslavsky, R., Saito, S. I., Manis, J. P., Gu, Y., Patel, P., ... & Chua, K. F. (2003). Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(19), 10794-10799.

- Cheng, M. Y., Hartl, F. U., & Norwich, A. L. (1990). The mitochondrial chaperonin hsp60 is required for its own assembly.
- Cheng, M. Y., Hartl, F. U., Martin, J., Pollock, R. A., Kalousek, F., Neupert, W., ... & Horwich, A. (1989). Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria. *Nature*, (6208), 585-674.
- Chino, F., Peppercorn, J., Taylor, D. H., Lu, Y., Samsa, G., Abernethy, A. P., & Zafar, S. Y. (2014). Self-reported financial burden and satisfaction with care among patients with cancer. *The oncologist*, 19(4), 414-420.
- Christensen, K., Doblhammer, G., Rau, R., & Vaupel, J. W. (2009). Ageing populations: the challenges ahead. *The lancet*, 374(9696), 1196-1208.
- Chu, F., Chou, P. M., Zheng, X., Mirkin, B. L., & Rebbaa, A. (2005). Control of multidrug resistance gene *mdr1* and cancer resistance to chemotherapy by the longevity gene *sirt1*. *Cancer research*, 65(22), 10183-10187.
- Clarke, L. (2009). *Studies on the mechanism of action of the chemotherapeutic drug bleomycin on cell lines derived from haemangioma and keloid* (Doctoral dissertation, Durham University).
- Cohen, H. Y., Miller, C., Bitterman, K. J., Wall, N. R., Hekking, B., Kessler, B., ... & Sinclair, D. A. (2004). Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science*, 305(5682), 390-392.
- Colditz, G. A., Wolin, K. Y., & Gehlert, S. (2012). Applying what we know to accelerate cancer prevention. *Science translational medicine*, 4(127), 127rv4-127rv4.
- Cordon-Cardo, C., O'Brien, J. P., Boccia, J., Casals, D., Bertino, J. R., & Melamed, M. R. (1990). Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 38(9), 1277-1287.
- Cubillo, A., Hernando-Requejo, O., García-García, E., Rodríguez-Pascual, J., De Vicente, E., Morelli, P., ... & Prados, S. (2014). A prospective pilot study of target-guided personalized chemotherapy with intensity-modulated radiotherapy in patients with early rectal cancer. *American journal of clinical oncology*, 37(2), 117-121.
- Dang, C. V. (2013). MYC, metabolism, cell growth, and tumorigenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(8), a014217.

- Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116(2), 205-219.
- Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116(2), 205-219.
- Danø, K. (1973). Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 323(3), 466-483.
- Dasari, S., & Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European journal of pharmacology*, 740, 364-378.
- Dasari, S., & Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European journal of pharmacology*, 740, 364-378.
- De Angelis, R., Sant, M., Coleman, M. P., Francisci, S., Baili, P., Pierannunzio, D., ... & Bielska-Lasota, M. (2014). Cancer survival in Europe 1999–2007 by country and age: results of EUROCORE-5—a population-based study. *The lancet oncology*, 15(1), 23-34.
- De Boer, J., Andressoo, J. O., de Wit, J., Huijmans, J., Beems, R. B., van Steeg, H., ... & Meradji, M. (2002). Premature aging in mice deficient in DNA repair and transcription. *Science*, 296(5571), 1276-1279.
- De Martel, C., Ferlay, J., Franceschi, S., Vignat, J., Bray, F., Forman, D., & Plummer, M. (2012). Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *The lancet oncology*, 13(6), 607-615.
- de Vries, E., Soerjomataram, I., Lemmens, V. E. P. P., Coebergh, J. W. W., Barendregt, J. J., Oenema, A., ... & Renehan, A. G. (2010). Lifestyle changes and reduction of colon cancer incidence in Europe: A scenario study of physical activity promotion and weight reduction. *European Journal of Cancer*, 46(14), 2605-2616.
- Deacon, K., Mistry, P., Chernoff, J., Blank, J. L., & Patel, R. (2003). p38 MAP Kinase Mediates Cell Death and p21-Activated Kinase (PAK) Mediates Cell Survival During Chemotherapeutic Drug-Induced Mitotic Arrest. *Molecular Biology of the Cell*.
- Dean, M., Hamon, Y., & Chimini, G. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of lipid research*, 42(7), 1007-1017.
- Dean, M., Hamon, Y., & Chimini, G. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of lipid research*, 42(7), 1007-1017.

- Decottignies, A., & Goffeau, A. (1997). Complete inventory of the yeast ABC proteins. *Nature genetics*, 15(2), 137-145.
- Dempke, W., Voigt, W., Grothey, A., Hill, B. T., & Schmoll, H. J. (2000). Cisplatin resistance and oncogenes-a review. *Anti-cancer drugs*, 11(4), 225-236.
- Demple, B., & Harrison, L. (1994). Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annual review of biochemistry*, 63(1), 915-948.
- Derry, W. B., Wilson, L., Khan, I. A., Ludueña, R. F., & Jordan, M. A. (1997). Taxol differentially modulates the dynamics of microtubules assembled from unfractionated and purified β -tubulin isotypes. *Biochemistry*, 36(12), 3554-3562.
- Desoize, B. (2002). Cancer and metals and metal compounds. *Critical reviews in oncology/hematology*, 42(1), 1-3.
- DiGiovanna AG. 2000. Human Aging: Biological Perspectives. Mc Graw-Hill Companies. New York.
- Doroshov, J. H., Metz, M. Z., Matsumoto, L., Winters, K. A., Sakai, M., Muramatsu, M., & Kane, S. E. (1995). Transduction of NIH 3T3 cells with a retrovirus carrying both human MDR1 and glutathione S-transferase π produces broad-range multidrug resistance. *Cancer research*, 55(18), 4073-4078.
- Dorsman, J. C., & Grivell, L. A. (1990). Expression of the gene encoding subunit II of yeast QH2: cytochrome c oxidoreductase is regulated by multiple factors. *Current genetics*, 17(6), 459-464.
- Duckett, D. R., Bronstein, S. M., Taya, Y., & Modrich, P. (1999). hMutS α - and hMutL α -dependent phosphorylation of p53 in response to DNA methylator damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(22), 12384-12388.
- Eastman, A., & Barry, M. A. (1987). Interaction of trans-diamminedichloroplatinum (II) with DNA: formation of monofunctional adducts and their reaction with glutathione. *Biochemistry*, 26(12), 3303-3307.
- Einhorn, L. H. (2002). Curing metastatic testicular cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(7), 4592-4595.
- Ellis, L. M., & Hicklin, D. J. (2009). Resistance to targeted therapies: refining anticancer therapy in the era of molecular oncology. *Clinical Cancer Research*, 15(24), 7471-7478.
- Enomoto, A., Wempe, M. F., Tsuchida, H., Shin, H. J., Cha, S. H., Anzai, N., ... & Anders, M. W. (2002). Molecular Identification of a Novel Carnitine

Transporter Specific to Human Testis INSIGHTS INTO THE MECHANISM OF CARNITINE RECOGNITION. *Journal of Biological Chemistry*, 277(39), 36262-36271.

- Erez, O., & Kahana, C. (2001). Screening for modulators of spermine tolerance identifies Sky1, the SR protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, as a regulator of polyamine transport and ion homeostasis. *Molecular and cellular biology*, 21(1), 175-184.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: [http:// globocan.iarc.fr](http://globocan.iarc.fr). Accessed June 19, 2015.
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W. W., Comber, H., ... & Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *European journal of cancer*, 49(6), 1374-1403.
- Finkel, S. (2000). Introduction to behavioural and psychological symptoms of dementia (BPSD). *International journal of geriatric psychiatry*.
- Fletcher, J. I., Haber, M., Henderson, M. J., & Norris, M. D. (2010). ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nature Reviews Cancer*, 10(2), 147-156.
- Forman, D., de Martel, C., Lacey, C. J., Soerjomataram, I., Lortet-Tieulent, J., Bruni, L., ... & Franceschi, S. (2012). Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine*, 30, F12-F23.
- Foyn, H., Van Damme, P., Støve, S. I., Glomnes, N., Evjenth, R., Gevaert, K., & Arnesen, T. (2013). Protein N-terminal acetyltransferases act as N-terminal propionyltransferases in vitro and in vivo. *Molecular & Cellular Proteomics*, 12(1), 42-54.
- Francis, B. R., White, K. H., & Thorsness, P. E. (2007). Mutations in the Atp1p and Atp3p subunits of yeast ATP synthase differentially affect respiration and fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 39(2), 127-144.
- Fraumeni, J. F., & Schottenfeld, D. (Eds.). (2006). *Cancer epidemiology and prevention*. Oxford University Press.
- Frye, R. A. (2000). Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochemical and biophysical research communications*, 273(2), 793-798.

- Furuchi, T., Ishikawa, H., Miura, N., Ishizuka, M., Kajiya, K., Kuge, S., & Naganuma, A. (2001). Two nuclear proteins, Cin5 and Ydr259c, confer resistance to cisplatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Pharmacology*, 59(3), 470-474.
- Gallo, C. M., Smith, D. L., & Smith, J. S. (2004). Nicotinamide clearance by Pnc1 directly regulates Sir2-mediated silencing and longevity. *Molecular and cellular biology*, 24(3), 1301-1312.
- Galm, U., Hager, M. H., Van Lanen, S. G., Ju, J., Thorson, J. S., & Shen, B. (2005). Antitumor antibiotics: bleomycin, enediynes, and mitomycin. *Chemical reviews*, 105(2), 739-758.
- Gao, Y., Su, D., Ying, L., Lv, W., & Ma, S. (2010). Enhanced Cisplatin Cytotoxicity by RNA Interfering the Excision Repair Cross-complementing Gene 1 in Lung Cancer Cell A549/DDP. *Chinese Journal of Lung Cancer*, 13(9).
- García Mata, J., García-Palomo Pérez, A., & García Gómez, J. (2009). Quimioterapia antineoplásica. En: *Principios del tratamiento oncológico*. Cortés Funes H, Colomer Bosch R, eds. Barcelona: Publicaciones Permanyer, 219-59.
- Gil, L., Siems, W., Mazurek, B., Gross, J., Schroeder, P., Voss, P., & Grune, T. (2006). Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes. *Free radical research*, 40(5), 495-505.
- Goossens, A., de la Fuente, N., Forment, J., Serrano, R., & Portillo, F. (2000). Regulation of yeast H⁺-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters. *Molecular and cellular biology*, 20(20), 7654-7661.
- Gottesman, M. M. (2002). Mechanisms of cancer drug resistance. *Annual review of medicine*, 53(1), 615-627.
- Gottesman, M. M., Hrycyna, C. A., Schoenlein, P. V., Germann, U. A., & Pastan, I. (1995). Genetic analysis of the multidrug transporter. *Annual review of genetics*, 29(1), 607-649.
- Gottesman, M. M., Hrycyna, C. A., Schoenlein, P. V., Germann, U. A., & Pastan, I. (1995). Genetic analysis of the multidrug transporter. *Annual review of genetics*, 29(1), 607-649.
- Graham, L. A., Flannery, A. R., & Stevens, T. H. (2003). Structure and assembly of the yeast V-ATPase. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 35(4), 301-312.

- Gregorcyk, S., Kang, Y., Brandt, D., Kolm, P., Singer, G., & Perry, R. R. (1996). p-Glycoprotein expression as a predictor of breast cancer recurrence. *Annals of surgical oncology*, 3(1), 8-14.
- Grieb, B. C., Boyd, K., Mitra, R., & Eischen, C. M. (2016). Haploinsufficiency of the Myc regulator Mtbp extends survival and delays tumor development in aging mice. *Aging*.
- Grieb, B. C., Gramling, M. W., Arrate, M. P., Chen, X., Beauparlant, S. L., Haines, D. S., ... & Eischen, C. M. (2014). Oncogenic protein MTBP interacts with MYC to promote tumorigenesis. *Cancer research*, 74(13), 3591-3602.
- Gross, A., Yin, X. M., Wang, K., Wei, M. C., Jockel, J., Milliman, C., ... & Korsmeyer, S. J. (1999). Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *Journal of Biological Chemistry*, 274(2), 1156-1163.
- Gruber, J., Schaffer, S., & Halliwell, B. (2007). The mitochondrial free radical theory of ageing--where do we stand?. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 13, 6554-6579.
- Gu, W., Fang, F. F., Li, B., Cheng, B. B., & Ling, C. Q. (2012). Characterization and resistance mechanisms of a 5-fluorouracil-resistant hepatocellular carcinoma cell line. *Asian Pacific journal of cancer prevention*, 13(9), 4807-4814.
- Guillén Ponce C, Molina Garrido MJ, Carrato Mena A. (2013). Cisplatino y análogos. En: *Oncomecum. E. Díaz-Rubio, P. Pérez Segura eds. Barcelona: Publicaciones Permanyer*, 25-38.
- Gulbins, E., Dreschers, S., & Bock, J. (2003). Role of mitochondria in apoptosis. *Experimental Physiology*, 88(01), 85-90.
- Gupta, S. C., Hevia, D., Patchva, S., Park, B., Koh, W., & Aggarwal, B. B. (2012). Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. *Antioxidants & redox signaling*, 16(11), 1295-1322.
- Gustafson, W. C., & Weiss, W. A. (2010). Myc proteins as therapeutic targets. *Oncogene*, 29(9), 1249-1259.
- HAARASILTA, S., & Oura, E. (1975). On the activity and regulation of anaplerotic and gluconeogenic enzymes during the growth process of baker's yeast. *European Journal of Biochemistry*, 52(1), 1-7.

- Haarasilta, S., & Taskinen, L. (1977). Location of three key enzymes of gluconeogenesis in baker's yeast. *Archives of microbiology*, 113(1-2), 159-161.
- Hamra, G. B., Guha, N., Cohen, A., Laden, F., Raaschou-Nielsen, O., Samet, J. M., ... & Loomis, D. (2014). Outdoor particulate matter exposure and lung cancer: a systematic review and meta-analysis.
- Happold, C., Roth, P., Wick, W., Schmidt, N., Florea, A. M., Silgner, M., ... & Weller, M. (2012). Distinct molecular mechanisms of acquired resistance to temozolomide in glioblastoma cells. *Journal of neurochemistry*, 122(2), 444-455.
- Harris, A. L., & Hochhauser, D. (1992). Mechanisms of multidrug resistance in cancer treatment. *Acta Oncologica*, 31(2), 205-213.
- Hasty, P., & Vijg, J. (2002). Genomic priorities in aging. *Science*, 296(5571), 1250-1251.
- Haurie, V., Perrot, M., Mini, T., Jenö, P., Sagliocco, F., & Boucherie, H. (2001). The Transcriptional Activator Cat8p Provides a Major Contribution to the Reprogramming of Carbon Metabolism during the Diauxic Shift in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(1), 76-85.
- Hayakawa, J., Ohmichi, M., Kurachi, H., Ikegami, H., Kimura, A., Matsuoka, T., ... & Murata, Y. (1999). Inhibition of extracellular signal-regulated protein kinase or c-Jun N-terminal protein kinase cascade, differentially activated by cisplatin, sensitizes human ovarian cancer cell line. *Journal of Biological Chemistry*, 274(44), 31648-31654.
- Hayes D. (2014). Daniel Hayes Leads Tour of Caris. Website. In: GOLDBERG P, ed.: The Cancer Letter)
- Hayes, D. F., Bast, R. C., Desch, C. E., Fritsche, H., Kemeny, N. E., Jessup, J. M., ... & Ravdin, P. (1996). Tumor marker utility grading system: a framework to evaluate clinical utility of tumor markers. *Journal of the National Cancer Institute*, 88(20), 1456-1466.
- Hazzalin, C. A., Cano, E., Cuenda, A., Barratt, M. J., Cohen, P., & Mahadevan, L. C. (1996). p38/RK is essential for stress-induced nuclear responses: JNK/SAPKs and c-Jun/ATF-2 phosphorylation are insufficient. *Current Biology*, 6(8), 1028-1031.
- Hekimi, S., & Guarente, L. (2003). Genetics and the specificity of the aging process. *Science*, 299(5611), 1351-1354.

- Hekimi, S., & Guarente, L. (2003). Genetics and the specificity of the aging process. *Science*, 299(5611), 1351-1354.
- Hekimi, S., Burgess, J., Bussière, F., Meng, Y., & Bénard, C. (2001). Genetics of lifespan in *C. elegans*: molecular diversity, physiological complexity, mechanistic simplicity. *TRENDS in Genetics*, 17(12), 712-718.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805), 770-776.
- Henkart, P. A. (1996). ICE family proteases: mediators of all apoptotic cell death?. *Immunity*, 4(3), 195-201.
- Hildt, E. (2009). Living longer: age retardation and autonomy. *Medicine, Health Care and Philosophy*, 12(2), 179-185.
- Hittelman, W. N., & Rao, P. N. (1974). Bleomycin-induced damage in prematurely condensed chromosomes and its relationship to cell cycle progression in CHO cells. *Cancer research*, 34(12), 3433-3439.
- Hoareau-Aveilla, C., Henry, Y., & Leblanc, T. (2008). [Dyskeratosis congenita, a disease caused by defective telomere maintenance]. *Medecine sciences: M/S*, 24(4), 390-398.
- Hofmann, J. W., Zhao, X., De Cecco, M., Peterson, A. L., Pagliaroli, L., Manivannan, J., ... & Li, X. (2015). Reduced expression of MYC increases longevity and enhances healthspan. *Cell*, 160(3), 477-488.
- Holliday, R. (1998). Causes of aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854(1), 61-71.
- Horisberger, K., Erben, P., Muessle, B., Woernle, C., Stroebel, P., Kaehler, G., ... & Hofheinz, R. D. (2009). Topoisomerase I expression correlates to response to neoadjuvant irinotecan-based chemoradiation in rectal cancer. *Anti-cancer drugs*, 20(6), 519-524.
- Howitz, K. T., Bitterman, K. J., Cohen, H. Y., Lamming, D. W., Lavu, S., Wood, J. G., ... & Scherer, B. (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 425(6954), 191-196.
- Hsu, A. L., Murphy, C. T., & Kenyon, C. (2003). Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science*, 300(5622), 1142-1145
- Huang, C., Ma, W. Y., Maxiner, A., Sun, Y., & Dong, Z. (1999). p38 kinase mediates UV-induced phosphorylation of p53 protein at serine 389. *Journal of Biological Chemistry*, 274(18), 12229-12235.

- Huang, R. Y., Eddy, M., Vujcic, M., & Kowalski, D. (2005). Genome-wide screen identifies genes whose inactivation confer resistance to cisplatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cancer research*, 65(13), 5890-5897.
- Ide, H., Kikuchi, E., Hasegawa, M., Kozakai, N., Kosaka, T., Miyajima, A., & Oya, M. (2012). Prognostic significance of 5-fluorouracil metabolism-relating enzymes and enhanced chemosensitivity to 5-fluorouracil by 5-chloro 2, 4-dihydroxy-pyridine in urothelial carcinoma. *BMC cancer*, 12(1), 1.
- Ijichi, K., Adachi, M., Ogawa, T., Hasegawa, Y., & Murakami, S. (2014). Cell-cycle distribution and Thymidilate Synthase (TS) expression correlate with 5-FU resistance in head and neck carcinoma cells. *Anticancer research*, 34(6), 2907-2911.
- Imai, S. I., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M., & Guarente, L. (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*, 403(6771), 795-800.
- International Agency for Research on Cancer. (2012). Personal habits and indoor combustions. *Lyon: International Agency for Research on Cancer*.
- Iritani, B. M., & Eisenman, R. N. (1999). c-Myc enhances protein synthesis and cell size during B lymphocyte development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(23), 13180-13185.
- Ishida, S., Lee, J., Thiele, D. J., & Herskowitz, I. (2002). Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(22), 14298-14302.
- Izbicki, G., Segel, M. J., Christensen, T. G., Conner, M. W., & Breuer, R. (2002). Time course of bleomycin- induced lung fibrosis. *International journal of experimental pathology*, 83(3), 111-119.
- Jain, R. K. (1998). The next frontier of molecular medicine: delivery of therapeutics. *Nature medicine*, 4(6), 655-657.
- Jain, R. K., & Stylianopoulos, T. (2010). Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nature reviews Clinical oncology*, 7(11), 653-664.
- Jani, J. P., Mistry, J. S., Morris, G., Davies, P., Lazo, J. S., & Sebt, S. M. (1992). In vivo circumvention of human colon carcinoma resistance to bleomycin. *Cancer research*, 52(10), 2931-2937.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(2), 69-90.

- Jemal, A., Center, M. M., DeSantis, C., & Ward, E. M. (2010). Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 19(8), 1893-1907.
- Jennerwein, M., & Andrews, P. A. (1995). Effect of intracellular chloride on the cellular pharmacodynamics of cis-diamminedichloroplatinum (II). *Drug metabolism and disposition*, 23(2), 178-184.
- Jilani, A., & Ramotar, D. (2002). Purification and partial characterization of a DNA 3'-phosphatase from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochemistry*, 41(24), 7688-7694.
- Jilani, A., Ramotar, D., Slack, C., Ong, C., Yang, X. M., Scherer, S. W., & Lasko, D. D. (1999). Molecular cloning of the human gene, PNKP, encoding a polynucleotide kinase 3'-phosphatase and evidence for its role in repair of DNA strand breaks caused by oxidative damage. *Journal of Biological Chemistry*, 274(34), 24176-24186.
- Johnson, F. B., Sinclair, D. A., & Guarente, L. (1999). Molecular biology of aging. *Cell*, 96(2), 291-302.
- Johnson, G. L., & Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*, 298(5600), 1911-1912.
- Johnson, R. E., Torres-Ramos, C. A., Izumi, T., Mitra, S., Prakash, S., & Prakash, L. (1998). Identification of APN2, the *Saccharomyces cerevisiae* homolog of the major human AP endonuclease HAP1, and its role in the repair of abasic sites. *Genes & development*, 12(19), 3137-3143.
- Johnson, S. C., Rabinovitch, P. S., & Kaeberlein, M. (2013). mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature*, 493(7432), 338-345.
- Joshi, N., & Grant, S. G. (2005). DNA double-strand break damage and repair assessed by pulsed-field gel electrophoresis. *Molecular Toxicology Protocols*, 121-129.
- Jules-Elysee, K., & White, D. A. (1990). Bleomycin-induced pulmonary toxicity. *Clinics in chest medicine*, 11(1), 1.
- Juliano, R. L., & Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 455(1), 152-162.
- Juo, P., Kuo, C. J., Reynolds, S. E., Konz, R. F., Raingeaud, J., Davis, R. J., ... & Blenis, J. (1997). Fas activation of the p38 mitogen-activated protein kinase

signalling pathway requires ICE/CED-3 family proteases. *Molecular and Cellular Biology*, 17(1), 24-35.

- Kaafarani, I., Fernandez-Sauze, S., Berenguer, C., Chinot, O., Delfino, C., Dussert, C., ... & Figarella-Branger, D. (2009). Targeting adrenomedullin receptors with systemic delivery of neutralizing antibodies inhibits tumor angiogenesis and suppresses growth of human tumor xenografts in mice. *The FASEB Journal*, 23(10), 3424-3435.
- Kaeberlein, M., McVey, M., & Guarente, L. (1999). The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes & development*, 13(19), 2570-2580.
- Kahlem, P., Dörken, B., & Schmitt, C. A. (2004). Cellular senescence in cancer treatment: friend or foe?. *The Journal of clinical investigation*, 113(2), 169-174.
- Kaina, B., & Christmann, M. (2002). DNA repair in resistance to alkylating anticancer drugs. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*, 40(8), 354-367.
- Kaminski, N., Zuo, F., Cojocar, G., Yakhini, Z., Ben-Dor, A., Morris, D., ... & Heller, R. A. (2002). Use of oligonucleotide microarrays to analyze gene expression patterns in pulmonary fibrosis reveals distinct patterns of gene expression in mice and humans. *CHEST Journal*, 121(3_suppl), 31S-32S.
- Kaouass, M., Audette, M., Ramotar, D., Verma, S., De Montigny, D., Gamache, I., ... & Poulin, R. (1997). The STK2 gene, which encodes a putative Ser/Thr protein kinase, is required for high-affinity spermidine transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 17(6), 2994-3004.
- Karaszi, E., Jakab, K., Homolya, L., Szakacs, G., Hollo, Z., Telek, B., ... & Kappelmayer, J. (2001). Calcein assay for multidrug resistance reliably predicts therapy response and survival rate in acute myeloid leukaemia. *British journal of haematology*, 112(2), 308-314.
- Karim-Kos, H. E., de Vries, E., Soerjomataram, I., Lemmens, V., Siesling, S., & Coebergh, J. W. W. (2008). Recent trends of cancer in Europe: a combined approach of incidence, survival and mortality for 17 cancer sites since the 1990s. *European journal of cancer*, 44(10), 1345-1389.
- Kartner, N., & Ling, V. (1983). Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science*, 221(4617), 1285-1288.
- Kastan, M. B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., & Craig, R. W. (1991). Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer research*, 51(23 Part 1), 6304-6311.

- Kaufman, B. A., Kolesar, J. E., Perlman, P. S., & Butow, R. A. (2003). A function for the mitochondrial chaperonin Hsp60 in the structure and transmission of mitochondrial DNA nucleoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology*, *163*(3), 457-461.
- Kavallaris, M., Kuo, D. Y., Burkhart, C. A., Regl, D. L., Norris, M. D., Haber, M., & Horwitz, S. B. (1997). Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific beta-tubulin isotypes. *Journal of Clinical Investigation*, *100*(5), 1282.
- Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., & Tabtiang, R. (1993). A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature*, *366*(6454), 461-464.
- Khozin, S., Blumenthal, G. M., Jiang, X., He, K., Boyd, K., Murgo, A., ... & Pazdur, R. (2014). US Food and Drug Administration approval summary: erlotinib for the first-line treatment of metastatic non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor exon 19 deletions or exon 21 (L858R) substitution mutations. *The oncologist*, *19*(7), 774-779.
- Kirkwood, T. B. (2005). Understanding the odd science of aging. *Cell*, *120*(4), 437-447.
- Kirwan, M., & Dokal, I. (2009). Dyskeratosis congenita, stem cells and telomeres. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, *1792*(4), 371-379.
- Kitange, G. J., Carlson, B. L., Schroeder, M. A., Grogan, P. T., Lamont, J. D., Decker, P. A., ... & Sarkaria, J. N. (2009). Induction of MGMT expression is associated with temozolomide resistance in glioblastoma xenografts. *Neuro-oncology*, *11*(3), 281-291.
- Klein, T. E., Chang, J. T., Cho, M. K., Easton, K. L., Ferguson, R., Hewett, M., ... & Rubin, D. L. (2001). Integrating genotype and phenotype information: an overview of the PharmGKB project. *Pharmacogenomics J*, *1*(3), 167-170.
- Koll, H., Guiard, B., Rassow, J., Ostermann, J., Horwich, A. L., Neupert, W., & Hartl, F. U. (1992). Antifolding activity of hsp60 couples protein import into the mitochondrial matrix with export to the intermembrane space. *Cell*, *68*(6), 1163-1175.
- Kowalski, D., Pendyala, L., Daignan-Fornier, B., Howell, S. B., & Huang, R. Y. (2008). Dysregulation of purine nucleotide biosynthesis pathways modulates cisplatin cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular pharmacology*, *74*(4), 1092-1100.

- Kruh, G. D., & Belinsky, M. G. (2003). The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene*, 22(47), 7537-7552.
- Kulke, M. H. (2009). Kulke MH, Hornick JL, Fraenhoffer C, Hooshmand S, Ryan DP, Enzinger PC, Meyerhardt JA, Clark JW, Stuart K, Fuchs CS, Redston MS. O6-methylguanine DNA methyltransferase deficiency and response to temozolomide-based therapy in patients with neuroendocrine tumors. *Clin Cancer Res*, 15(1), 338-45.
- Kuo, M. H., & Grayhack, E. (1994). A library of yeast genomic MCM1 binding sites contains genes involved in cell cycle control, cell wall and membrane structure, and metabolism. *Molecular and cellular biology*, 14(1), 348-359.
- Kurata, N., Fujita, H., Ohuchida, K., Mizumoto, K., Mahawithitwong, P., Sakai, H., ... & Tanaka, M. (2011). Predicting the chemosensitivity of pancreatic cancer cells by quantifying the expression levels of genes associated with the metabolism of gemcitabine and 5-fluorouracil. *International journal of oncology*, 39(2), 473.
- La Vecchia, C., Rota, M., Malvezzi, M., & Negri, E. (2015). Potential for improvement in cancer management: reducing mortality in the European Union. *The oncologist*, 20(5), 495-498.
- Lashkari, D. A., DeRisi, J. L., McCusker, J. H., Namath, A. F., Gentile, C., Hwang, S. Y., ... & Davis, R. W. (1997). Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(24), 13057-13062.
- Lazo, J. S., Sebt, S. M., & Schellens, J. H. (1996). Bleomycin. *Cancer chemotherapy and biological response modifiers*, 16, 39.
- Lee, L. F., Li, G., Templeton, D. J., & Ting, J. P. Y. (1998). Paclitaxel (Taxol)-induced gene expression and cell death are both mediated by the activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK/SAPK). *Journal of Biological Chemistry*, 273(43), 28253-28260.
- Lee, S., Park, Y. H., Kim, K. H., Cho, E. Y., Ahn, Y. C., Kim, K., ... & Im, Y. H. (2010). Thymidine synthase, thymidine phosphorylase, and excision repair cross-complementation group 1 expression as predictive markers of capecitabine plus cisplatin chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced oesophageal squamous cell carcinoma. *British journal of cancer*, 103(6), 845-851.

- Leslie, E. M., Deeley, R. G., & Cole, S. P. (2005). Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and applied pharmacology*, 204(3), 216-237.
- Levi, J. A., Raghavan, D., Harvey, V., Thompson, D., Sandeman, T., Gill, G., ... & Kerestes, Z. (1993). The importance of bleomycin in combination chemotherapy for good-prognosis germ cell carcinoma. Australasian Germ Cell Trial Group. *Journal of clinical oncology*, 11(7), 1300-1305.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., & Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94(4), 491-501.
- Liao, C., Hu, B., Arno, M. J., & Panaretou, B. (2007). Genomic screening in vivo reveals the role played by vacuolar H⁺ ATPase and cytosolic acidification in sensitivity to DNA-damaging agents such as cisplatin. *Molecular pharmacology*, 71(2), 416-425.
- Ligabue, A., Marverti, G., Liebl, U., & Myllykallio, H. (2012). Transcriptional activation and cell cycle block are the keys for 5-fluorouracil induced up-regulation of human thymidylate synthase expression. *PLoS one*, 7(10), e47318.
- Liu, Q., Krzewska, J., Liberek, K., & Craig, E. A. (2001). Mitochondrial Hsp70 Ssc1: role in protein folding. *Journal of Biological Chemistry*, 276(9), 6112-6118.
- Liu, S., Lai, Y., Zhao, W., Wu, M., & Zhang, Z. (2011). Links between DNA polymerase beta expression and sensitivity to bleomycin. *Toxicology*, 281(1), 63-69.
- Ljungquist, B., Berg, S., Lanke, J., McClearn, G. E., & Pedersen, N. L. (1998). The effect of genetic factors for longevity: a comparison of identical and fraternal twins in the Swedish Twin Registry. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 53(6), M441-M446.
- Llanos, L., Briones, R., Yévenes, A., González-Nilo, F. D., Frey, P. A., & Cardemil, E. (2001). Mutation Arg336 to Lys in *Saccharomyces cerevisiae* phosphoenolpyruvate carboxykinase originates an enzyme with increased oxaloacetate decarboxylase activity. *FEBS letters*, 493(1), 1-5.
- London, W. T., & McGlynn, K. A. (1996). Liver cancer. *Cancer epidemiology and prevention*, 3, 763-786.
- Lopez-Buesa, P., Pfund, C., & Craig, E. A. (1998). The biochemical properties of the ATPase activity of a 70-kDa heat shock protein (Hsp70) are governed by

the C-terminal domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(26), 15253-15258.

- Lowe, S. W., Cepero, E., & Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature*, 432(7015), 307-315.
- Lu, H. P., & Chao, C. C. (2012). Cancer cells acquire resistance to anticancer drugs: an update. *Biomedical journal*, 35(6), 464.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., & Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94(4), 481-490.
- Lustgarten, D. E. S., Deshpande, C., Aggarwal, C., Wang, L. C., Saloura, V., Vachani, A., ... & Nowak, A. K. (2013). Thymidylate synthase and folyl-polyglutamate synthase are not clinically useful markers of response to pemetrexed in patients with malignant pleural mesothelioma. *Journal of Thoracic Oncology*, 8(4), 469-477.
- Lyons, T. J., Nersissian, A., Huang, H., Yeom, H., Nishida, C. R., Graden, J. A., ... & Valentine, J. S. (2000). The metal binding properties of the zinc site of yeast copper-zinc superoxide dismutase: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 5(2), 189-203.
- Ma, L., & Center, M. S. (1992). The gene encoding vacuolar H⁺-ATPase subunit C is overexpressed in multidrug resistant HL60 cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 182(2), 675-681.
- Madeo, F., Fröhlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S. J., Wolf, D. H., & Fröhlich, K. U. (1999). Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *The Journal of cell biology*, 145(4), 757-767.
- Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lächelt, S., Herlan, M., ... & Fröhlich, K. U. (2002). A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Molecular cell*, 9(4), 911-917.
- Maki, C. G., & Howley, P. M. (1997). Ubiquitination of p53 and p21 is differentially affected by ionizing and UV radiation. *Molecular and Cellular Biology*, 17(1), 355-363.
- Maliepaard, M., Scheffer, G. L., Faneyte, I. F., van Gastelen, M. A., Pijnenborg, A. C., Schinkel, A. H., ... & Schellens, J. H. (2001). Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer research*, 61(8), 3458-3464.
- Mariani, D., Castro, F. A., Almeida, L. G., Fonseca, F. L., & Pereira, M. D. (2014). Protection against cisplatin in calorie-restricted *Saccharomyces*

cerevisiae is mediated by the nutrient-sensor proteins Ras2, Tor1, or Sch9 through its target Glutathione. *FEMS yeast research*, 14(8), 1147-1159.

- Marshall, C. J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*, 80(2), 179-185.
- Martin, G. M., & Oshima, J. (2000). Lessons from human progeroid syndromes. *Nature*, 408(6809), 263-266.
- Martin, L. P., Hamilton, T. C., & Schilder, R. J. (2008). Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. *Clinical Cancer Research*, 14(5), 1291-1295.
- Martindale, J. L., & Holbrook, N. J. (2002). Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *Journal of cellular physiology*, 192(1), 1-15.
- Martinez-Zaguilán, R., Raghunand, N., Lynch, R. M., Bellamy, W., Martinez, G. M., Rojas, B., ... & Gillies, R. J. (1999). pH and drug resistance. I. Functional expression of plasmalemmal V-type H⁺-ATPase in drug-resistant human breast carcinoma cell lines. *Biochemical pharmacology*, 57(9), 1037-1046.
- Martin-Moreno, J. M., Soerjomataram, I., & Magnusson, G. (2008). Cancer causes and prevention: a condensed appraisal in Europe in 2008. *European Journal of Cancer*, 44(10), 1390-1403.
- Mathers, C., Fat, D. M., & Boerma, J. T. (2008). *The global burden of disease: 2004 update*. World Health Organization.
- McGrath, T., & Center, M. S. (1988). Mechanisms of multidrug resistance in HL60 cells: evidence that a surface membrane protein distinct from P-glycoprotein contributes to reduced cellular accumulation of drug. *Cancer research*, 48(14), 3959-3963.
- McGue, M., Vaupel, J. W., Holm, N., & Harvald, B. (1993). Longevity is moderately heritable in a sample of Danish twins born 1870–1880. *Journal of gerontology*, 48(6), B237-B244.
- McGue, M., Vaupel, J. W., Holm, N., & Harvald, B. (1993). Longevity is moderately heritable in a sample of Danish twins born 1870–1880. *Journal of gerontology*, 48(6), B237-B244.
- Meijer, C., Mulder, N. H., Timmer-Bosscha, H., Zijlstra, J. G., & De Vries, E. G. E. (1987). Role of free radicals in an adriamycin-resistant human small cell lung cancer cell line. *Cancer research*, 47(17), 4613-4617.

- Mellish, K. J., Kelland, L. R., & Harrap, K. R. (1993). In vitro platinum drug chemosensitivity of human cervical squamous cell carcinoma cell lines with intrinsic and acquired resistance to cisplatin. *British journal of cancer*, 68(2), 240.
- Méndez, J. D. (2003). Productos finales de glicación avanzada y complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. *Gac Med Mex*, 139(1), 49-55.
- Meric-Bernstam, F., Johnson, A., Holla, V., Bailey, A. M., Brusco, L., Chen, K., ... & Davies, M. A. (2015). A decision support framework for genomically informed investigational cancer therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(7), djv098.
- Meropol, N. J., Gold, P. J., Diasio, R. B., Andria, M., Dhimi, M., Godfrey, T., ... & Schwartz, R. (2006). Thymidine phosphorylase expression is associated with response to capecitabine plus irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 24(25), 4069-4077.
- Meyer, N., & Penn, L. Z. (2008). Reflecting on 25 years with MYC. *Nature Reviews Cancer*, 8(12), 976-990.
- Milane, L., Duan, Z., & Amiji, M. (2011). Role of hypoxia and glycolysis in the development of multi-drug resistance in human tumor cells and the establishment of an orthotopic multi-drug resistant tumor model in nude mice using hypoxic pre-conditioning. *Cancer cell international*, 11(1), 1.
- Miyaki, M., Ono, T., Hori, S., & Umezawa, H. (1975). Binding of bleomycin to DNA in bleomycin-sensitive and-resistant rat ascites hepatoma cells. *Cancer research*, 35(8), 2015-2019.
- Morishima, N., Nakagawa, K. I., Yamamoto, E., & Shibata, T. (1990). A subunit of yeast site-specific endonuclease SceI is a mitochondrial version of the 70-kDa heat shock protein. *Journal of Biological Chemistry*, 265(25), 15189-15197.
- Mozzetti, S., Ferlini, C., Concolino, P., Filippetti, F., Raspaglio, G., Prislei, S., ... & Scambia, G. (2005). Class III β -tubulin overexpression is a prominent mechanism of paclitaxel resistance in ovarian cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 11(1), 298-305.
- Mukhopadhyay, A., Wei, B., & Weiner, H. (2013). Mitochondrial NAD dependent aldehyde dehydrogenase either from yeast or human replaces yeast cytoplasmic NADP dependent aldehyde dehydrogenase for the aerobic growth of yeast on ethanol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(6), 3391-3398.

- Neff, N. F., Ellis, N. A., Ye, T. Z., Noonan, J., Huang, K., Sanz, M., & Proytcheva, M. (1999). The DNA helicase activity of BLM is necessary for the correction of the genomic instability of bloom syndrome cells. *Molecular biology of the cell*, 10(3), 665-676.
- Newton, A. C. (2003). Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochemical Journal*, 370(2), 361-371.
- Nichols, C. R., Roth, B. J., Loehrer, P. J., Williams, S. D., & Einhorn, L. H. (1994, October). Salvage chemotherapy for recurrent germ cell cancer. In *Seminars in oncology* (Vol. 21, No. 5 Suppl 12, pp. 102-108).
- Nishizuka, Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*, 258(5082), 607-614.
- Nowak, G. (2002). PKC- α and ERK1/2 mediate mitochondrial dysfunction, decreases in active Na⁺ transport, and cisplatin-induced apoptosis in renal cells. *Journal of Biological Chemistry*.
- Nuver, J., Holzik, M. F. L., van Zweeden, M., Hoekstra, H. J., Meijer, C., Suurmeijer, A. J., ... & Sleijfer, D. T. (2005). Genetic variation in the bleomycin hydrolase gene and bleomycin-induced pulmonary toxicity in germ cell cancer patients. *Pharmacogenetics and genomics*, 15(6), 399-405.
- Nyström, T. (2007). A bacterial kind of aging. *PLoS Genet*, 3(12), e224.
- O'farrell, P. A., Gonzalez, F., Zheng, W., Johnston, S. A., & Joshua-Tor, L. (1999). Crystal structure of human bleomycin hydrolase, a self-compartmentalizing cysteine protease. *Structure*, 7(6), 619-627.
- Obe, G., Johannes, C., & Ritter, S. (2010). The number and not the molecular structure of DNA double-strand breaks is more important for the formation of chromosomal aberrations: a hypothesis. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 701(1), 3-11.
- Ono, M., & Kuwano, M. (2006). Molecular mechanisms of epidermal growth factor receptor (EGFR) activation and response to gefitinib and other EGFR-targeting drugs. *Clinical Cancer Research*, 12(24), 7242-7251.
- OUDSHOORN, P., STEEG, H., SWINKELS, B. W., SCHOPPINK, P., & GRIVELL, L. A. (1987). Subunit II of yeast QH2: cytochrome-c oxidoreductase. *European Journal of Biochemistry*, 163(1), 97-103.
- Ozben, T. (2007). Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *Journal of pharmaceutical sciences*, 96(9), 2181-2196.

- Pardue, M. L., & DeBaryshe, P. G. (1999). Telomeres and telomerase: more than the end of the line. *Chromosoma*, 108(2), 73-82.
- Pardue, M. L., & DeBaryshe, P. G. (1999). Telomeres and telomerase: more than the end of the line. *Chromosoma*, 108(2), 73-82.
- Parkin, D. M. (2006). The global health burden of infection- associated cancers in the year 2002. *International journal of cancer*, 118(12), 3030-3044.
- Pastwa, E., Neumann, R. D., & Winters, T. A. (2001). In vitro repair of complex unligatable oxidatively induced DNA double-strand breaks by human cell extracts. *Nucleic acids research*, 29(16), e78-e78.
- Paul, M. F., Ackerman, S., Yue, J., Arselin, G., Velours, J., & Tzagolof, A. (1994). Cloning of the yeast ATP3 gene coding for the gamma-subunit of F1 and characterization of atp3 mutants. *Journal of Biological Chemistry*, 269(42), 26158-26164.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K., & Cobb, M. H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions 1. *Endocrine reviews*, 22(2), 153-183.
- Peer, D., Karp, J. M., Hong, S., Farokhzad, O. C., Margalit, R., & Langer, R. (2007). Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature nanotechnology*, 2(12), 751-760.
- Peng, K. C., Cluzeaud, F., Bens, M., Van Huyen, J. P. D., Wioland, M. A., Lacave, R., & Vandewalle, A. (1999). Tissue and cell distribution of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in mouse intestine and kidney. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 47(6), 757-767.
- Pereira, R. D. S. (1998). The use of baker's yeast in the generation of asymmetric centers to produce chiral drugs and other compounds. *Critical reviews in biotechnology*, 18(1), 25-64.
- Perez, R. P. (1998). Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. *European Journal of Cancer*, 34(10), 1535-1542.
- Perić, M., Dib, P. B., Dennerlein, S., Musa, M., Rudan, M., Lovrić, A., ... & Raimundo, N. (2016). Crosstalk between cellular compartments protects against proteotoxicity and extends lifespan. *Scientific Reports*, 6.
- Perls, T., Kunkel, L., & Puca, A. (2002). The genetics of aging. *Current opinion in genetics & development*, 12(3), 362-369.

- Persidis, A. (1999). Cancer multidrug resistance. *Nature biotechnology*, 17(1), 94-95.
- Persons, D. L., Yazlovitskaya, E. M., Cui, W., & Pelling, J. C. (1999). Cisplatin-induced activation of mitogen-activated protein kinases in ovarian carcinoma cells: inhibition of extracellular signal-regulated kinase activity increases sensitivity to cisplatin. *Clinical Cancer Research*, 5(5), 1007-1014.
- Pfister, T. D., Hollingshead, M., Kinders, R. J., Zhang, Y., Evrard, Y. A., Ji, J., ... & Divelbiss, R. (2012). Development and validation of an immunoassay for quantification of topoisomerase I in solid tumor tissues. *PloS one*, 7(12), e50494.
- Phizicky, E. M., & Fields, S. (1995). Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiological reviews*, 59(1), 94-123.
- Pinto, A. L., & Lippard, S. J. (1985). Binding of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum (II)(cisplatin) to DNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 780(3), 167-180.
- Plummer, M., Franceschi, S., Vignat, J., Forman, D., & de Martel, C. (2015). Global burden of gastric cancer attributable to *Helicobacter pylori*. *International Journal of Cancer*, 136(2), 487-490.
- Povirk, L. F. (1996). DNA damage and mutagenesis by radiomimetic DNA-cleaving agents: bleomycin, neocarzinostatin and other enediynes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 355(1), 71-89.
- Primeau, A. J., Rendon, A., Hedley, D., Lilge, L., & Tannock, I. F. (2005). The distribution of the anticancer drug Doxorubicin in relation to blood vessels in solid tumors. *Clinical Cancer Research*, 11(24), 8782-8788.
- Proft, M., & Grzesitza, D. (1995). Identification and characterization of regulatory elements in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene PCK1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics MGG*, 246(3), 367-373.
- Pron, G., Belehradec, J., Orłowski, S., & Mir, L. M. (1994). Involvement of membrane bleomycin-binding sites in bleomycin cytotoxicity. *Biochemical pharmacology*, 48(2), 301-310.
- Pron, G., Mahrouf, N., Orłowski, S., Tounekti, O., Poddevin, B., Belehradec, J., & Mir, L. M. (1999). Internalisation of the bleomycin molecules responsible for

bleomycin toxicity: a receptor-mediated endocytosis mechanism. *Biochemical pharmacology*, 57(1), 45-56.

- Raghunand, N., Martinez-Zaguilán, R., Wright, S. H., & Gillies, R. J. (1999). pH and drug resistance. II. Turnover of acidic vesicles and resistance to weakly basic chemotherapeutic drugs. *Biochemical pharmacology*, 57(9), 1047-1058.
- Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J. S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R. J., & Davis, R. J. (1995). Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *Journal of Biological Chemistry*, 270(13), 7420-7426.
- Rak, M., & Tzagoloff, A. (2009). F1-dependent translation of mitochondrially encoded Atp6p and Atp8p subunits of yeast ATP synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(44), 18509-18514.
- Ramotar, D. (1997). The apurinic–apyrimidinic endonuclease IV family of DNA repair enzymes. *Biochemistry and cell biology*, 75(4), 327-336.
- Ramotar, D., & Masson, J. Y. (1996). A *Saccharomyces cerevisiae* mutant defines a new locus essential for resistance to the antitumour drug bleomycin. *Canadian journal of microbiology*, 42(8), 835-843.
- Ramotar, D., & Wang, H. (2003). Protective mechanisms against the antitumor agent bleomycin: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics*, 43(4), 213-224.
- Ramotar, D., Popoff, S. C., Gralla, E. B., & Demple, B. (1991). Cellular role of yeast Apn1 apurinic endonuclease/3'-diesterase: repair of oxidative and alkylation DNA damage and control of spontaneous mutation. *Molecular and Cellular Biology*, 11(9), 4537-4544.
- Ramotar, D., Popoff, S. C., Gralla, E. B., & Demple, B. (1991). Cellular role of yeast Apn1 apurinic endonuclease/3'-diesterase: repair of oxidative and alkylation DNA damage and control of spontaneous mutation. *Molecular and Cellular Biology*, 11(9), 4537-4544.
- Reading, D. S., Hallberg, R. L., & Myers, A. M. (1989). Characterization of the yeast HSP60 gene coding for a mitochondrial assembly factor. *Nature*, 337(6208), 655-659.
- Rebbaa, A., Zheng, X., Chou, P. M., & Mirkin, B. L. (2003). Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence. *Oncogene*, 22(18), 2805-2811.

- Reddi, A. R., & Culotta, V. C. (2013). SOD1 integrates signals from oxygen and glucose to repress respiration. *Cell*, 152(1), 224-235.
- Reinders, J., Wagner, K., Zahedi, R. P., Stojanovski, D., Eyrich, B., Van der Laan, M., ... & Meisinger, C. (2007). Profiling phosphoproteins of yeast mitochondria reveals a role of phosphorylation in assembly of the ATP synthase. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(11), 1896-1906.
- Reinders, J., Wagner, K., Zahedi, R. P., Stojanovski, D., Eyrich, B., Van der Laan, M., ... & Meisinger, C. (2007). Profiling phosphoproteins of yeast mitochondria reveals a role of phosphorylation in assembly of the ATP synthase. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(11), 1896-1906.
- RG Amrit, F., & C May, R. (2010). Younger for longer: insulin signalling, immunity and ageing. *Current aging science*, 3(3), 166-176.
- Robertson, K. A., Bullock, H. A., Xu, Y., Tritt, R., Zimmerman, E., Ulbright, T. M., ... & Kelley, M. R. (2001). Altered expression of Ape1/ref-1 in germ cell tumors and overexpression in NT2 cells confers resistance to bleomycin and radiation. *Cancer research*, 61(5), 2220-2225.
- Robertson, K. A., Bullock, H. A., Xu, Y., Tritt, R., Zimmerman, E., Ulbright, T. M., ... & Kelley, M. R. (2001). Altered expression of Ape1/ref-1 in germ cell tumors and overexpression in NT2 cells confers resistance to bleomycin and radiation. *Cancer research*, 61(5), 2220-2225.
- Rodes Texidor J, Guardia Massó J. 1997. Biología del envejecimiento. Editorial Masson. pp 3472–3475. Barcelona.
- Roger, E., Kalscheuer, S., Kirtane, A., Guru, B. R., Grill, A. E., Whittum-Hudson, J., & Panyam, J. (2012). Folic acid functionalized nanoparticles for enhanced oral drug delivery. *Molecular pharmaceutics*, 9(7), 2103-2110.
- Rogina, B., & Helfand, S. L. (2004). Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(45), 15998-16003.
- Rosenberg, B. (1973). Platinum coordination complexes in cancer chemotherapy. *Naturwissenschaften*, 60(9), 399-406.
- Rosenberg, B., Van Camp, L., & Krigas, T. (1965). Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, 205(4972), 698-699.

- Rossi, J. M., & Lindquist, S. (1989). The intracellular location of yeast heat-shock protein 26 varies with metabolism. *The Journal of cell biology*, 108(2), 425-439.
- Ruiz-Gómez, M. J., & Martínez-Morillo, M. (2006). Iron (III) chloride hexahydrate does not enhance methotrexate cytotoxicity on *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemotherapy*, 52(5), 226-230.
- Saffi, J., Sonogo, L., Varela, Q. D., & Salvador, M. (2006). Antioxidant activity of L-ascorbic acid in wild-type and superoxide dismutase deficient strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Redox Report*, 11(4), 179-184.
- Sakai, A., Kasahara, K., Ohmori, T., Kimura, H., Sone, T., Fujimura, M., & Nakao, S. (2012). MET increases the sensitivity of gefitinib-resistant cells to SN-38, an active metabolite of irinotecan, by up-regulating the topoisomerase I activity. *Journal of Thoracic Oncology*, 7(9), 1337-1344.
- Salgado A, Guillén F. 1990. Manual de Geriatria. Editorial Salvat. pp 1–17. Barcelona
- Sanchez-Prieto, R., Rojas, J. M., Taya, Y., & Gutkind, J. S. (2000). A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in the transcriptional activation of p53 on genotoxic stress by chemotherapeutic agents. *Cancer research*, 60(9), 2464-2472.
- Sanchez-Prieto, R., Sanchez-Arevalo, V. J., Servitja, J. M., & Gutkind, J. S. (2002). Regulation of p73 by c-Abl through the p38 MAP kinase pathway. *Oncogene*, 21(6), 974-979.
- Sander, M., & Ramotar, D. (1997). Partial purification of Pde1 from *Saccharomyces cerevisiae*: enzymatic redundancy for the repair of 3'-terminal DNA lesions and abasic sites in yeast. *Biochemistry*, 36(20), 6100-6106.
- Sanz, G., Mir, L., & Jacquemin-Sablon, A. (2002). Bleomycin resistance in mammalian cells expressing a genetic suppressor element derived from the SRPK1 gene. *Cancer research*, 62(15), 4453-4458.
- Sanz, G., Mir, L., & Jacquemin-Sablon, A. (2002). Bleomycin resistance in mammalian cells expressing a genetic suppressor element derived from the SRPK1 gene. *Cancer research*, 62(15), 4453-4458.
- Schächter, F. (1998). Causes, effects, and constraints in the genetics of human longevity. *The American Journal of Human Genetics*, 62(5), 1008-1014.

- Scheffer, G. L., Pijnenborg, A. C. L. M., Smit, E. F., Müller, M., Postma, D. S., Timens, W., ... & Scheper, R. J. (2002). Multidrug resistance related molecules in human and murine lung. *Journal of clinical pathology*, 55(5), 332-339.
- Schenk, P. W., Boersma, A. W., Brandsma, J. A., den Dulk, H., Burger, H., Stoter, G., ... & Nooter, K. (2001). SKY1 is involved in cisplatin-induced cell kill in *Saccharomyces cerevisiae*, and inactivation of its human homologue, SRPK1, induces cisplatin resistance in a human ovarian carcinoma cell line. *Cancer research*, 61(19), 6982-6986.
- Schenk, P. W., Boersma, A. W., Brok, M., Burger, H., Stoter, G., & Nooter, K. (2002). Inactivation of the *Saccharomyces cerevisiae* SKY1 Gene Induces a Specific Modification of the Yeast Anticancer Drug Sensitivity Profile Accompanied by a Mutator Phenotype. *Molecular pharmacology*, 61(3), 659-666.
- Schenk, P. W., Brok, M., Boersma, A. W., Brandsma, J. A., Den Dulk, H., Burger, H., ... & Nooter, K. (2003). Anticancer drug resistance induced by disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* NPR2 gene: a novel component involved in cisplatin-and doxorubicin-provoked cell kill. *Molecular pharmacology*, 64(2), 259-268.
- Schinkel, A. H. (1997, June). The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 8, No. 3, pp. 161-170). Academic Press.
- Schinkel, A. H., Smit, J. J. M., Van Tellingen, O., Beijnen, J. H., Wagenaar, E., Van Deemter, L., ... & Berns, A. J. M. (1994). Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell*, 77(4), 491-502.
- Schmidt, A., Beck, T., Koller, A., Kunz, J., & Hall, M. N. (1998). The TOR nutrient signalling pathway phosphorylates NPR1 and inhibits turnover of the tryptophan permease. *The EMBO journal*, 17(23), 6924-6931.
- Schmidt, M., Akasaka, K., Messerly, J. T., & Boyer, M. P. (2012). Role of Hog1, Tps1 and Sod1 in boric acid tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 158(10), 2667-2678.
- Schmitt, C. A. (2003). Senescence, apoptosis and therapy—cutting the lifelines of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 3(4), 286-295.
- Schmitt, C. A., Fridman, J. S., Yang, M., Lee, S., Baranov, E., Hoffman, R. M., & Lowe, S. W. (2002). A senescence program controlled by p53 and p16 INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell*, 109(3), 335-346.

- Schwartz, D. R., Homanics, G. E., Hoyt, D. G., Klein, E., Abernethy, J., & Lazo, J. S. (1999). The neutral cysteine protease bleomycin hydrolase is essential for epidermal integrity and bleomycin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(8), 4680-4685.
- Sebti, S. M., Jani, J. P., Mistry, J. S., Gorelik, E., & Lazo, J. S. (1991). Metabolic inactivation: a mechanism of human tumor resistance to bleomycin. *Cancer research*, 51(1), 227-232.
- Semsei, I. (2000). On the nature of aging. *Mechanisms of ageing and development*, 117(1), 93-108.
- SERRANO, R. (1999). A proposal for nomenclature of aldehyde dehydrogenases in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the stress-inducible ALD2 and ALD3 genes. *Yeast*, 15, 829-842.
- Shay, J. W., & Roninson, I. B. (2004). Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene*, 23(16), 2919-2933.
- Shay, J. W., & Wright, W. E. (2000). Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nature reviews Molecular cell biology*, 1(1), 72-76.
- Shen, J., Wei, J., Wang, H., Yue, G., Yu, L., Yang, Y., ... & Guan, W. (2013). A three-gene signature as potential predictive biomarker for irinotecan sensitivity in gastric cancer. *Journal of translational medicine*, 11(1), 1.
- Shi, Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular cell*, 9(3), 459-470.
- Shichiri, M., & Hirata, Y. (2003). Regulation of cell growth and apoptosis by adrenomedullin. *Hypertension Research*, 26(Suppl), S9-S14.
- Shrivastava, A., Kuzontkoski, P. M., Groopman, J. E., & Prasad, A. (2011). Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the cross-talk between apoptosis and autophagy. *Molecular cancer therapeutics*, 10(7), 1161-1172.
- Siddik, Z. H. (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22(47), 7265-7279.
- Sierra, F. (2009). Biology of aging summit report. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 64(2), 155-156.
- Simm, A., Nass, N., Bartling, B., Hofmann, B., Silber, R. E., & Navarrete Santos, A. (2008). Potential biomarkers of ageing. *Biological chemistry*, 389(3), 257-265

- Simon, R. M., Paik, S., & Hayes, D. F. (2009). Use of archived specimens in evaluation of prognostic and predictive biomarkers. *Journal of the National Cancer Institute*, 101(21), 1446-1452.
- Singh, J. P., Mittal, M. K., Saxena, S., Bansal, A., Bhatia, A., & Kulshreshtha, P. (2005). Role of p-glycoprotein expression in predicting response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer-a prospective clinical study. *World journal of surgical oncology*, 3(1), 1.
- Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., ... & Baselga, J. (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *New England Journal of Medicine*, 344(11), 783-792.
- Smith, J. S. (2002). Human Sir2 and the 'silencing' of p53 activity. *Trends in cell biology*, 12(9), 404-406.
- Soerjomataram, I., De Vries, E., Pukkala, E., & Coebergh, J. W. (2007). Excess of cancers in Europe: a study of eleven major cancers amenable to lifestyle change. *International journal of cancer*, 120(6), 1336-1343.
- Sognier, M. A., Hittelman, W. N., & Rao, P. N. (1979). Effect of DNA repair inhibitors on the induction and repair of bleomycin-induced chromosome damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 60(1), 61-72.
- Solé-Padullés, C., Clemente, I., & Bartrés-Faz, D. (2004). Marcadores genéticos relacionados con el déficit cognitivo en el envejecimiento. *anales de psicología*, 20(2), 187-204.
- Soussi, T., & Bérout, C. (2001). Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nature Reviews Cancer*, 1(3), 233-239.
- Steinmetz, L. M., & Davis, R. W. (2000). High-density arrays and insights into genome function. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 17(1), 109-146.
- Steinmetz, L. M., Scharfe, C., Deutschbauer, A. M., Mokranjac, D., Herman, Z. S., Jones, T., ... & Davis, R. W. (2002). Systematic screen for human disease genes in yeast. *Nature genetics*, 31(4), 400-404.
- Stengel, C., Newman, S. P., Leese, M. P., Potter, B. V. L., Reed, M. J., & Purohit, A. (2010). Class III β -tubulin expression and in vitro resistance to microtubule targeting agents. *British journal of cancer*, 102(2), 316-324.

- Stewart, D. J. (2007). Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. *Critical reviews in oncology/hematology*, 63(1), 12-31.
- Susek, R. E., & Lindquist, S. U. S. A. N. (1990). Transcriptional derepression of the *Saccharomyces cerevisiae* HSP26 gene during heat shock. *Molecular and cellular biology*, 10(12), 6362-6373.
- Szakács, G., Paterson, J. K., Ludwig, J. A., Booth-Genthe, C., & Gottesman, M. M. (2006). Targeting multidrug resistance in cancer. *Nature reviews Drug discovery*, 5(3), 219-234.
- Takebe, N., Harris, P. J., Warren, R. Q., & Ivy, S. P. (2011). Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. *Nature reviews Clinical oncology*, 8(2), 97-106.
- Takeda, M., Chen, W. J., Saltzgaber, J., & Douglas, M. G. (1986). Nuclear genes encoding the yeast mitochondrial ATPase complex. Analysis of ATP1 coding the F1-ATPase alpha-subunit and its assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 261(32), 15126-15133.
- Takeda, M., Vassarotti, A., & Douglas, M. G. (1985). Nuclear genes coding the yeast mitochondrial adenosine triphosphatase complex. Primary sequence analysis of ATP2 encoding the F1-ATPase beta-subunit precursor. *Journal of Biological Chemistry*, 260(29), 15458-15465.
- Tamai, I., Ohashi, R., Nezu, J. I., Yabuuchi, H., Oku, A., Shimane, M., ... & Tsuji, A. (1998). Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. *Journal of Biological Chemistry*, 273(32), 20378-20382.
- Tang, M. K., Zhou, H. Y., Yam, J. W., & Wong, A. S. (2010). c-Met overexpression contributes to the acquired apoptotic resistance of nonadherent ovarian cancer cells through a cross talk mediated by phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase 1/2. *Neoplasia*, 12(2), 128-IN5.
- Tansey, W. P. (2014). Mammalian MYC proteins and cancer. *New Journal of Science*, 2014.
- Taylor, R. C., Cullen, S. P., & Martin, S. J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(3), 231-241.
- Tessier, W. D., Meaden, P. G., Dickinson, F. M., & Midgley, M. (1998). Identification and disruption of the gene encoding the K⁺-activated acetaldehyde dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology letters*, 164(1), 29-34.

- Tew, K. D. (1994). Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer research*, 54(16), 4313-4320.
- Thayer, N. H., Leverich, C. K., Fitzgibbon, M. P., Nelson, Z. W., Henderson, K. A., Gafken, P. R., ... & Gottschling, D. E. (2014). Identification of long-lived proteins retained in cells undergoing repeated asymmetric divisions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(39), 14019-14026.
- Tkach, J. M., Yimit, A., Lee, A. Y., Riffle, M., Costanzo, M., Jaschob, D., ... & Davis, T. N. (2012). Dissecting DNA damage response pathways by analysing protein localization and abundance changes during DNA replication stress. *Nature cell biology*, 14(9), 966-976.
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet- Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, 65(2), 87-108.
- Tounekti, O., Pron, G., Belehradek, J., & Mir, L. M. (1993). Bleomycin, an apoptosis-mimetic drug that induces two types of cell death depending on the number of molecules internalized. *Cancer research*, 53(22), 5462-5469.
- Toussaint, O. (1993). La biología del envejecimiento celular II. El umbral crítico de acumulación de errores: sus cualidades, limitaciones y consecuencias en las enfermedades crónicas asociadas al envejecimiento. *Revista de Gerontología*, 3(4), 217-227.
- Townsend, D. M., & Tew, K. D. (2003). The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*, 22(47), 7369-7375.
- Trédan, O., Galmarini, C. M., Patel, K., & Tannock, I. F. (2007). Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *Journal of the National Cancer Institute*, 99(19), 1441-1454.
- Trock, B. J., Leonessa, F., & Clarke, R. (1997). Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance. *Journal of the National Cancer Institute*, 89(13), 917-931.
- Truscott, K. N., Voos, W., Frazier, A. E., Lind, M., Li, Y., Geissler, A., ... & Meisinger, C. (2003). A J-protein is an essential subunit of the presequence translocase-associated protein import motor of mitochondria. *The Journal of cell biology*, 163(4), 707-713.
- Trzaska, S. (2005). Cisplatin. *Chemical & engineering news*, 83(25), 52-52.

- Tsang, C. K., Liu, Y., Thomas, J., Zhang, Y., & Zheng, X. S. (2014). Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. *Nature communications*, 5.
- Tsvetanova, N. G., Klass, D. M., Salzman, J., & Brown, P. O. (2010). Proteome-wide search reveals unexpected RNA-binding proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS one*, 5(9), e12671.
- Tuimala, J., Szekely, G., Gundy, S., Hirvonen, A., & Norppa, H. (2002). Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic-metabolizing enzymes: role in mutagen sensitivity. *Carcinogenesis*, 23(6), 1003-1008.
- Tyner, S. D., Venkatachalam, S., Choi, J., Jones, S., Ghebranious, N., Igelmann, H., ... & Park, S. H. (2002). p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature*, 415(6867), 45-53.
- Tzagoloff, A., Wu, M. A., & Crivellone, M. (1986). Assembly of the mitochondrial membrane system. Characterization of COR1, the structural gene for the 44-kilodalton core protein of yeast coenzyme QH₂-cytochrome c reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 261(36), 17163-17169.
- Ueda, K., Cardarelli, C., Gottesman, M. M., & Pastan, I. (1987). Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(9), 3004-3008.
- Umezawa, H. A. M. A. O. (1971). Natural and artificial bleomycins: Chemistry and antitumour activities. *Pure and applied chemistry*, 28(4), 665-680.
- Umezawa, H., Maeda, K., Takeuchi, T., & Okami, Y. (1966). New antibiotics, bleomycin A and B. *The Journal of antibiotics*, 19(5), 200.
- Usanova, S., Piée-Staffa, A., Sied, U., Thomale, J., Schneider, A., Kaina, B., & Köberle, B. (2010). Cisplatin sensitivity of testis tumour cells is due to deficiency in interstrand-crosslink repair and low ERCC1-XPF expression. *Molecular cancer*, 9(1), 1.
- Vaccarella, S., Lortet-Tieulent, J., Plummer, M., Franceschi, S., & Bray, F. (2013). Worldwide trends in cervical cancer incidence: impact of screening against changes in disease risk factors. *European journal of cancer*, 49(15), 3262-3273.
- Van Laar, T., Steegenga, W. T., Jochemsen, A. G., Terleth, C., & Van der Eb, A. J. (1994). Bloom's syndrome cells GM1492 lack detectable p53 protein but exhibit normal G1 cell-cycle arrest after UV irradiation. *Oncogene*, 9(3), 981-983.

- van Roermund, C. W., Hettema, E. H., van den Berg, M., Tabak, H. F., & Wanders, R. J. (1999). Molecular characterization of carnitine- dependent transport of acetyl- CoA from peroxisomes to mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of a plasma membrane carnitine transporter, Agp2p. *The EMBO Journal*, 18(21), 5843-5852.
- Vance, J. R., & Wilson, T. E. (2001). Repair of DNA strand breaks by the overlapping functions of lesion-specific and non-lesion-specific DNA 3' phosphatases. *Molecular and cellular biology*, 21(21), 7191-7198.
- Vance, J. R., & Wilson, T. E. (2001). Repair of DNA strand breaks by the overlapping functions of lesion-specific and non-lesion-specific DNA 3' phosphatases. *Molecular and cellular biology*, 21(21), 7191-7198.
- Varabyova, A., Topf, U., Kwiatkowska, P., Wrobel, L., Kaus- Drobek, M., & Chacinska, A. (2013). Mia40 and MINOS act in parallel with Ccs1 in the biogenesis of mitochondrial Sod1. *FEBS Journal*, 280(20), 4943-4959.
- Vaziri, H., Dessain, S. K., Eaton, E. N., Imai, S. I., Frye, R. A., Pandita, T. K., ... & Weinberg, R. A. (2001). hSIR2/SIRT1 functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell*, 107(2), 149-159.
- Verheij, M., Ruiter, G. A., Zerp, S. F., van Blitterswijk, W. J., Fuks, Z., Haimovitz-Friedman, A., & Bartelink, H. (1998). The role of the stress-activated protein kinase (SAPK/JNK) signaling pathway in radiation-induced apoptosis. *Radiotherapy and oncology*, 47(3), 225-232.
- Vorobjev, P. E., Smith, J. B., Pyshnaya, I. A., Levina, A. S., Zarytova, V. F., & Wickstrom, E. (2003). Site-specific cleavage of RNA and DNA by complementary DNA-bleomycin A5 conjugates. *Bioconjugate chemistry*, 14(6), 1307-1313.
- Walne, A. J., & Dokal, I. (2009). Advances in the understanding of dyskeratosis congenita. *British journal of haematology*, 145(2), 164-172.
- Wang, L., Azad, N., Kongkaneramt, L., Chen, F., Lu, Y., Jiang, B. H., & Rojanasakul, Y. (2008). The Fas death signaling pathway connecting reactive oxygen species generation and FLICE inhibitory protein down-regulation. *The Journal of Immunology*, 180(5), 3072-3080.
- Wang, X., Martindale, J. L., & Holbrook, N. J. (2000). Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 275(50), 39435-39443.
- Wang, Y. (2014). Molecular links between caloric restriction and Sir2/SIRT1 activation. *Diabetes & metabolism journal*, 38(5), 321-329.

- Ware, K. E., Marshall, M. E., Heasley, L. R., Marek, L., Hinz, T. K., Hercule, P., ... & Heasley, L. E. (2010). Rapidly acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in NSCLC cell lines through de-repression of FGFR2 and FGFR3 expression. *PloS one*, 5(11), e14117.
- Warner, H. R. (2005). Developing a research agenda in biogerontology: basic mechanisms. *Science's SAGE KE*, 2005(44), pe33.
- Wei, C. L., Wu, Q., Vega, V. B., Chiu, K. P., Ng, P., Zhang, T., ... & Liu, J. (2006). A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell*, 124(1), 207-219.
- Weng, N. P., Palmer, L. D., Levine, B. L., Lane, H. C., June, C. H., & Hodes, R. J. (1997). Tales of tails: regulation of telomere length and telomerase activity during lymphocyte development, differentiation, activation, and aging. *Immunological reviews*, 160(1), 43-54.
- White, H. E., Orlova, E. V., Chen, S., Wang, L., Ignatiou, A., Gowen, B., ... & Saibil, H. R. (2006). Multiple distinct assemblies reveal conformational flexibility in the small heat shock protein Hsp26. *Structure*, 14(7), 1197-1204.
- Willcox, B. J., Donlon, T. A., He, Q., Chen, R., Grove, J. S., Yano, K., ... & Curb, J. D. (2008). FOXO3A genotype is strongly associated with human longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(37), 13987-13992.
- Wood, L. K., & Thiele, D. J. (2009). Transcriptional activation in yeast in response to copper deficiency involves copper-zinc superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 284(1), 404-413.
- Wright, S. R., Boag, A. H., Valdimarsson, G., Hipfner, D. R., Campling, B. G., Cole, S. P., & Deeley, R. G. (1998). Immunohistochemical detection of multidrug resistance protein in human lung cancer and normal lung. *Clinical Cancer Research*, 4(9), 2279-2289.
- Wu, Z. Z., & Chao, C. C. K. (2010). Knockdown of NAPA using short-hairpin RNA sensitizes cancer cells to cisplatin: implications to overcome chemoresistance. *Biochemical pharmacology*, 80(6), 827-837.
- Wu, Z. Z., Lu, H. P., & Chao, C. C. K. (2010). Identification and functional analysis of genes which confer resistance to cisplatin in tumor cells. *Biochemical pharmacology*, 80(2), 262-276.
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R. J., & Greenberg, M. E. (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*, 270(5240), 1326.

- Yap, T. A., Carden, C. P., & Kaye, S. B. (2009). Beyond chemotherapy: targeted therapies in ovarian cancer. *Nature Reviews Cancer*, 9(3), 167-181.
- Yeh, P. Y., Chuang, S. E., Yeh, K. H., Song, Y. C., Ea, C. K., & Cheng, A. L. (2002). Increase of the resistance of human cervical carcinoma cells to cisplatin by inhibition of the MEK to ERK signaling pathway partly via enhancement of anticancer drug-induced NF κ B activation. *Biochemical pharmacology*, 63(8), 1423-1430.
- Yen, H. C., Chang, H. M., Majima, H. J., Chen, F. Y., & Li, S. H. (2005). Levels of reactive oxygen species and primary antioxidant enzymes in WI38 versus transformed WI38 cells following bleomycin treatment. *Free Radical Biology and Medicine*, 38(7), 950-959.
- Yen, H. C., Li, S. H., Majima, H. J., Huang, Y. H., Chen, C. P., Liu, C. C., ... & Chen, C. W. (2011). Up-regulation of antioxidant enzymes and coenzyme Q10 in a human oral cancer cell line with acquired bleomycin resistance. *Free radical research*, 45(6), 707-716.
- Yeung, F., Hoberg, J. E., Ramsey, C. S., Keller, M. D., Jones, D. R., Frye, R. A., & Mayo, M. W. (2004). Modulation of NF- κ B- dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *The EMBO journal*, 23(12), 2369-2380.
- Yin, Z., Hatton, L., & Brown, A. J. (2000). Differential post- transcriptional regulation of yeast mRNAs in response to high and low glucose concentrations. *Molecular microbiology*, 35(3), 553-565.
- Yuan, L., Yu, W. M., & Qu, C. K. (2003). DNA damage-induced G2/M checkpoint in SV40 large T antigen-immortalized embryonic fibroblast cells requires SHP-2 tyrosine phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 278(44), 42812-42820.
- Zamble, D. B., & Lippard, S. J. (1995). Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy. *Trends in biochemical sciences*, 20(10), 435-439.
- Zeitlinger, J., Simon, I., Harbison, C. T., Hannett, N. M., Volkert, T. L., Fink, G. R., & Young, R. A. (2003). Program-specific distribution of a transcription factor dependent on partner transcription factor and MAPK signaling. *Cell*, 113(3), 395-404.
- Zglinicki, T. V., & Martin-Ruiz, C. M. (2005). Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases. *Current molecular medicine*, 5(2), 197-203.
- Zhang, L., Gu, F. X., Chan, J. M., Wang, A. Z., Langer, R. S., & Farokhzad, O. C. (2008). Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 83(5), 761-769.

- Zhang, W., Shannon, W. D., Duncan, J., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., & McLeod, H. L. (2006). Expression of drug pathway proteins is independent of tumour type. *The Journal of pathology*, 209(2), 213-219.
- Zheng, X., Chou, P. M., Mirkin, B. L., & Rebbaa, A. (2004). Senescence-initiated Reversal of Drug Resistance Specific Role of Cathepsin L. *Cancer research*, 64(5), 1773-1780.
- Znaor, A., van den Hurk, C., Primic-Zakelj, M., Agius, D., Coza, D., Demetriou, A., ... & Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in South Eastern Europe in the last decade: gaps persist compared with the rest of Europe. *European Journal of Cancer*, 49(7), 1683-1691.

ANEXOS

ANEXO 1

Producción científica:

- Burgos-Molina A.M., López-Díaz B., Gil-Carmona L., Ruiz-Gómez M.J. Drop test as a valid method to evaluate the cytotoxicity of antineoplastic drugs. 15th ASEICA International Congress. Sevilla, 21 – 23 octubre 2015. Comunicación Póster. Internacional. Publicación: Abstracts' book, pp 76.
- Burgos-Molina A.M., López-Díaz B., Gil-Carmona L., Ruiz-Gómez M.J. Evaluation of adaptive response to cisplatin in a resistant cell model. 15th ASEICA International Congress. Sevilla, 21 – 23 octubre 2015. Comunicación Póster. Internacional. Publicación: Abstracts' book, pp 113-114.

