

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



Efecto de las condiciones de cultivo en los programas de apoptosis intrínseco y extrínseco

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

ALUMNO/A:

Álvaro Martín Sabuco

TUTOR/A:

Máximo Ibo Galindo Orozco

TUTOR/A CENTRO:

Francisco José Iborra
Rodríguez

Curso Académico: 2º

VALENCIA, 04-06-2021

A mi familia y amigos, a mis tutores Francisco José Iborra y Máximo Ibo Galindo, a Cristina Martí y a mis compañeros de laboratorio Isabel, Álvaro, Candela, Andrés y Selene.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Apoptosis.....	3
1.2. Ensayos clínicos con TRAIL recombinantes e Ig anti-DR4/DR5.....	6
2. OBJETIVOS.....	10
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	11
3.1. Análisis de time-lapse mediante microscopía confocal de cultivos de células HeLa en 3 medios distintos.....	11
3.1.1 Cultivos celulares.....	11
3.1.2 Tratamiento con camptotecina y TRAIL.....	13
3.1.3 Videomicroscopía.....	13
3.1.4 Análisis de los videos y las fotos finales.....	14
3.2. Análisis transcriptómico.....	14
3.2.1 Extracción RNA y secuenciación.....	14
3.2.2. RNA-seq y procesamiento de los datos.....	14
3.3. Inmunohistoquímica celular para el estudio de los niveles de proteínas relacionadas con la ruta de apoptosis intrínseca y extrínseca.....	15
3.3.1 Cultivo celular.....	15
3.3.2 Fijación de las células.....	15
3.3.3 Inmunohistoquímica.....	15
3.3.4 Análisis inmunohistoquímica mediante microscopía de fluorescencia.....	16
3.4. Análisis estadístico.....	17
4.RESULTADOS.....	18
4.1 Análisis de los videos.....	18
4.2 Análisis transcriptómico.....	24
4.3 Análisis inmunohistoquímica mediante microscopía de fluorescencia.....	28
5. DISCUSIÓN.....	32
6. CONCLUSIONES.....	45
7. BIBLIOGRAFÍA.....	46
8. ANEXOS.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Ruta de la apoptosis, vía intrínseca y extrínseca.....	4
Figura 2. Receptores TRAIL.....	5
Figura 3. Ensayos clínicos elaborados cuya diana eran los receptores de TRAIL.....	7
Figura 4. Posibles nuevas dianas de la ruta de la apoptosis para tratamientos anticancerígenos.....	8
Figura 5. Placa p24 con los cultivos celulares.	12
Figura 6. Diagrama de la disposición de los cultivos en las placas p24 en función del medio y tratamiento.	12
Figura 7. Captura del fotograma 5 (2 horas 30 minutos) del time-lapse del cultivo control en normoxia tratado con 30 ng de TRAIL.	13
Figura 8. Inmunohistoquímica Cas8 (verde), BCL2 (rojo), DAPI (blanco) de células HeLa en medio control.	16
Figura 9. Supervivencia en Camptotecina	19
Figura 10. Supervivencia en TRAIL.....	20
Figura 11. Curvas de supervivencia frente al tiempo.	21
Figura 12. Tiempo de muerte en función de la concentración de camptotecina en diferentes medios (control, glucosa y glutamina) en normoxia.	22
Figura 13. Tiempo de muerte en función de la concentración de TRAIL en diferentes medios (control, glucosa y glutamina) en normoxia.....	23
Figura 14. Heatmap de los valores de CPMs para cada tipo de muestra y gen.	25
Figura 15. Heatmap de los valores de CPMs para cada tipo de muestra y gen.	26
Figura 16. Medias de las intensidades respecto al control obtenidas del análisis inmunohistoquímico para cada proteína.	29
Figura 17. Medias de las intensidades estandarizadas respecto al control obtenidas del análisis inmunohistoquímico para cada proteína.	30
Figura 18. Rutas de apoptosis intrínseca y extrínseca.	34
Figura 19. Logaritmo del porcentaje de supervivencia frente al tiempo.	43

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Datos del análisis transcriptómico en los genes relacionados con la recombinación homóloga.....	27
Tabla 2. Tabla con los datos del time-lapse de las células control en normoxia con camptotecina.....	49
Tabla 3. Tabla con los datos del time-lapse de las células crecidas en glucosa en normoxia con camptotecina.....	49
Tabla 4. Tabla con los datos del time-lapse de las células crecidas en glutamina en normoxia con camptotecina.....	49
Tabla 5. Tabla con los datos del time-lapse de las células control en hipoxia con camptotecina.....	50
Tabla 6. Tabla con los datos del time-lapse de las células crecidas en glucosa en hipoxia con camptotecina.....	50
Tabla 7. Tabla con los datos del time-lapse de las células crecidas en glutamina en hipoxia con camptotecina.	50
Tabla 8. Tabla con los datos del time-lapse de las células control en normoxia con TRAIL.....	51
Tabla 9. Tabla con los datos del time-lapse de las células crecidas en glucosa en normoxia con TRAIL.....	51
Tabla 10. Tabla con los datos del time-lapse de las células crecidas en glutamina en normoxia con TRAIL.....	51
Tabla 11. Tabla con los datos del time-lapse de las células control en hipoxia con TRAIL.....	52
Tabla 12. Tabla con los datos del time-lapse de las células crecidas en glucosa en hipoxia con TRAIL.....	52
Tabla 13. Tabla con los datos del time-lapse de las células crecidas en glutamina en hipoxia con TRAIL.....	52
Tabla 14. Tabla donde se muestran los p-valor entre los tiempos de muerte entre las distintas concentraciones de camptotecina en medio control.....	53
Tabla 15. Tabla donde se muestran los p-valor entre los tiempos de muerte entre las distintas concentraciones de camptotecina en medio suplementado con glucosa.....	53
Tabla 16. Tabla donde se muestran los p-valor entre los tiempos de muerte entre las distintas concentraciones de camptotecina en medio suplementado con glutamina.....	53
Tabla 17. Tabla donde se muestran los p-valor entre los tiempos de muerte entre las distintas concentraciones de TRAIL en medio control.....	53
Tabla 18. Tabla donde se muestran los p-valor entre los tiempos de muerte entre las distintas concentraciones de TRAIL en medio suplementado con glucosa.....	54
Tabla 19. Tabla donde se muestran los p-valor entre los tiempos de muerte entre las distintas concentraciones de TRAIL en medio suplementado con glutamina.....	54
Tabla 20. Tabla donde se muestran los p-valor entre las intensidades de fluorescencia obtenidas de cada proteína al comparar los distintos medios.....	54
Tabla 21. Tabla donde se muestran los valores de intensidad de fluorescencia obtenidos de cada proteína ajustados respecto al control junto a su desviación estándar.....	55

RESUMEN

Los programas de apoptosis intrínseco y extrínseco se han situado en el punto de mira para el desarrollo de terapias antitumorales basadas en la activación de dichas vías. Uno de los compuestos que han surgido como uno de los más prometedores son los ligandos TRAIL. Dichos ligandos se unen a sus receptores específicos DR4 y DR5 y dan lugar a la activación de la vía extrínseca culminando en la apoptosis celular. Las ventajas que tiene este ligando frente al resto es su baja toxicidad siendo este el principal problema en ensayos clínicos anteriores donde se utilizaron otros ligandos activadores de la vía extrínseca. Pero aun así el tratamiento ha demostrado no ser muy eficaz. La eficacia de un tratamiento depende de muchos factores, entre ellos el microambiente tumoral, aspecto que no se ha estudiado en profundidad hasta la fecha en las terapias basadas en TRAIL. En este punto es donde encaja nuestro TFM, el objetivo es analizar si distintas condiciones de cultivo pueden aumentar o disminuir la sensibilidad a tratamientos tanto de la ruta intrínseca como extrínseca para en un futuro poder clasificar los pacientes según su microambiente tumoral y administrar el tratamiento más adecuado. Para ello se han realizado análisis del fenotipo mediante time-lapse junto a análisis transcriptómicos como proteómicos. Los resultados obtenidos han mostrado una gran influencia del medio y las condiciones ambientales en la susceptibilidad al tratamiento apareciendo medios más resistentes como el de glutamina o medios más susceptibles como el de glucosa cuyo fenotipo podía cambiar drásticamente al aplicarles un ambiente de normoxia o hipoxia.

Palabras clave: HeLa; TRAIL; camptotecina; metabolismo energético; hipoxia; normoxia; microambiente tumoral.

ABSTRACT

Intrinsic and extrinsic apoptosis programs have been targeted for the development of antitumor therapies based on the activation of these pathways. One of the compounds that have emerged as one of the most promising are TRAIL ligands. These ligands bind to their specific receptors DR4 and DR5 and lead to activation of the extrinsic pathway culminating in cell apoptosis. The advantage of this ligand over the others is its low toxicity, this being the main problem in previous clinical trials where other extrinsic pathway activating ligands were used. But even so, the treatment has not proved to be very effective. The efficacy of a treatment depends on many factors, including the tumor microenvironment, an aspect that has not been studied in depth to date in TRAIL-based therapies. This is where our TFM fits in, the objective is to analyze whether different culture conditions can increase or decrease the sensitivity to treatments of both the intrinsic and extrinsic route in order to be able to classify patients according to their tumor microenvironment and administer the most appropriate treatment in the future. For this purpose, phenotype analysis has been performed by time-lapse together with transcriptomic and proteomic analysis. The results obtained have shown a great influence of the medium and environmental conditions on the susceptibility to treatment, with more resistant media such as glutamine or more susceptible media such as glucose, whose phenotype could change drastically when a normoxic or hypoxic environment was applied.

Keywords: HeLa; TRAIL; camptothecin; energy metabolism; hypoxia; normoxia; tumor microenvironment.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Apoptosis.

El proceso de apoptosis se clasifica como uno de los tipos de muerte celular programada donde no ocurre inflamación ni activación exacerbada del sistema inmune^{1 2}. Este programa participa en multitud de funciones dentro de los organismos multicelulares, desde la supresión del crecimiento tumoral, la eliminación de linfocitos autoreactivos hasta la limitación en la actividad del sistema inmune tras una infección. Fue descrito como apoptosis por primera vez en 1972³ y se encuentra como el eje central de muchos tratamientos anticancerígenos actuales ya que dicha ruta se encuentra muchas veces desactivada en las células tumorales.

La ruta de la apoptosis se divide en dos vías en función del punto de inicio de esta, la vía intrínseca parte de daño o modificaciones en el DNA que no permitan a la célula continuar sobreviviendo o dividiéndose, activándose y dando lugar a la muerte celular. Una de las rutas más importantes de activación de dicha vía es la ruta dependiente de p53, proteína clave para la supresión del crecimiento tumoral y que se encuentra mutado en alrededor del 50% de los cánceres¹. Por otro lado, se encuentra la vía extrínseca donde el origen de la activación de la vía es la unión de algunos tipos de receptores (como los receptores de TRAIL, TNF o FAS) con sus correspondientes ligandos induciendo la muerte celular (Figura 1). Centrándonos en los receptores de TRAIL, existen 4 tipos de receptores a nivel transmembrana y uno en formato soluble, los 4 receptores transmembrana son DR4, DR5, DcR1 y DcR2⁴ (Figura 2); los dos primeros son los receptores funcionales que van a dar lugar, tras su activación, a su oligomerización en un homotrímero de receptores exponiendo sus dominios Death en el extremo carboxilo terminal para el reclutamiento de FADD a través de su propio dominio Death⁴. Dicha estructura se le denomina complejo DISC la cual permite la unión de la pro-caspasa 8 y 10 vía unión de los dominios DED (death effector domain) de las caspasas con los dominios DED de FADD, a continuación, ocurrirá la activación de las caspasas 8 y 10 y estas continuarán la ruta^{4 5}. Por otro lado, tenemos a DcR1 y DcR2, receptores señuelo cuyo dominio Death o no existe (DcR1) o no es funcional, y cuya principal función es reducir los niveles de activación de la ruta mediante la supresión de ligandos que no provocarán la activación de dicha vía. Otra función que posee DcR2 junto al receptor en estado soluble OPG es funcionar como receptores para ligandos de la ruta NFκβ dando lugar a un aumento en la supervivencia y proliferación celular⁴. DR4 y DR5 también pueden dar lugar a la activación de la ruta antiapoptótica NFκβ, aunque en menor medida que la vía extrínseca de la apoptosis, se cree que esto se debe a la

interacción de DR5 o FADD con proteínas antiapoptóticas como FLIP que derivan la señal hacia la activación de ruta de crecimiento celular ^{4 6}.

Es necesario indicar que entre los dos receptores activos DR5 domina en la activación de la vía frente a DR4 ya que estudios⁷ demuestran que la eliminación de DR4 no induce una reducción significativa en los niveles de activación de la vía extrínseca mientras que la inactivación de DR5 sí que provoca la supresión prácticamente total de esta, a su vez el ligando TRAIL posee más afinidad hacia DR5 que a DR4 a temperatura corporal (37°C)⁸.

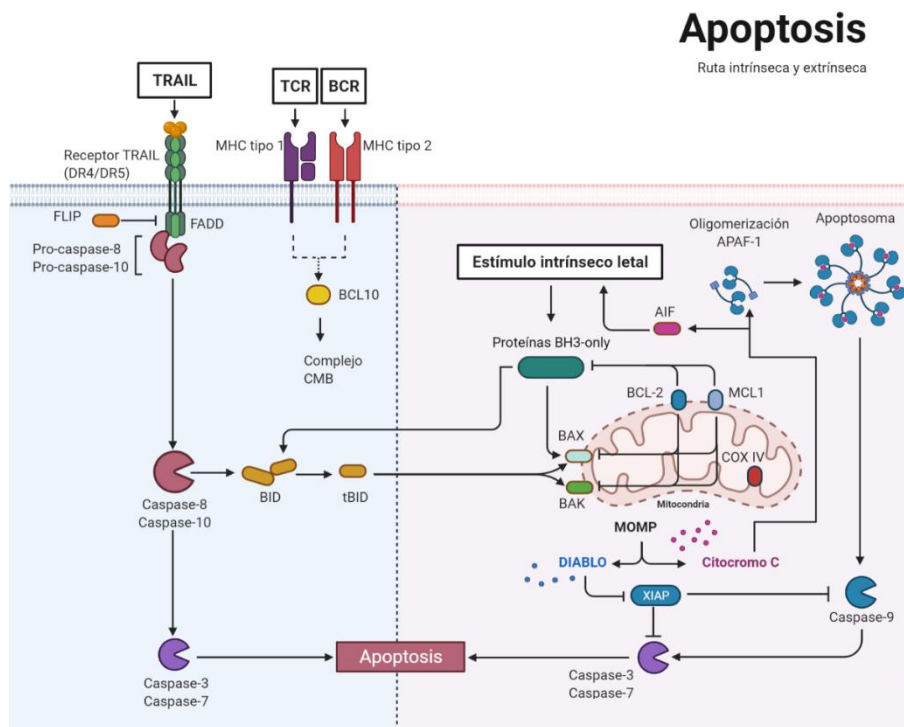


Figura 1. Ruta de la apoptosis, vía intrínseca y extrínseca.

Proteínas principales de cada una de las vías y como se interconectan. Creado con BioRender.com ⁹.

Existen multitud de aspectos que pueden alterar la funcionalidad de DR4 y DR5 en una célula tumoral, por ejemplo, aquellas células tumorales con DR5 mutado muestran un patrón de resistencia a la apoptosis por vía extrínseca que no se debe únicamente a la inhibición de la actividad de DR5 sino que la versión no funcional de este sigue permitiendo la unión de TRAIL por lo que secuestra a los ligandos y ejerce una dominancia negativa frente a DR4 ¹⁰. Otro aspecto que da lugar a un fenotipo resistente al tratamiento con TRAIL son aquellas células tumorales que poseen localización nuclear parcial de DR5; esto ocurre debido a la interacción de este con la importina 1 β que al interaccionar con las secuencias de localización nuclear de DR5 transportan a este

al núcleo, impidiendo que este pueda interactuar con TRAIL. Dicho fenotipo solo ocurre en algunos tipos celulares y podría causar supervivencia fraccionada en pacientes tratados con TRAIL ¹⁰. Tanto DR4 como DR5 son receptores que precisan de o-glicosilación, dicha modificación es realizada por GALNT14 y posteriormente procesada por la fucosiltransferasa y está muy relacionada con la sensibilidad a TRAIL. El motivo detrás de esto se teoriza que dichas modificaciones facilitan tanto la interacción entre receptores ayudando en la agregación y formación del DISC, como en la estabilidad de los receptores en membrana previniendo así su eliminación por endocitosis ^{12 13}.

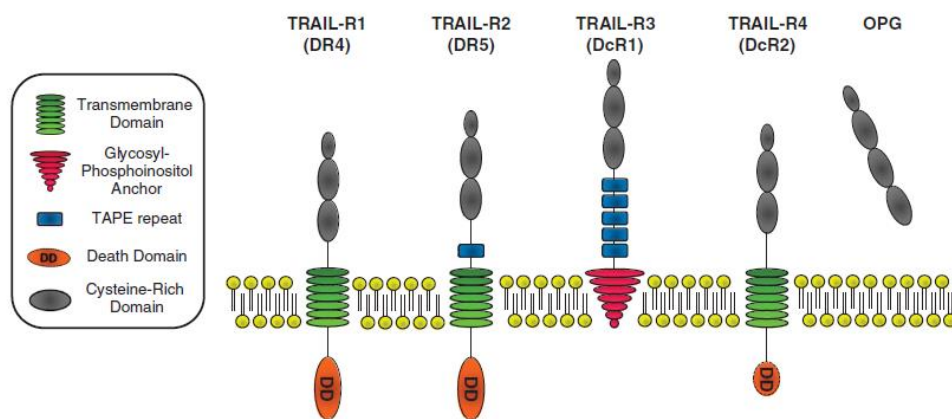


Figura 2. Receptores TRAIL.

Receptores del ligando TRAIL y su estructura ¹⁰.

Una vez activada la vía a partir de DR4 o DR5 existe una co-activación de la vía intrínseca a partir de la activación de Bid en tBid por parte de la caspasa 8 y 10 ya que este interactúa con Bax y Bak causante de la MOMP (permeabilización de la membrana externa mitocondrial) punto clave de la vía intrínseca, lo que podría amplificar la eficiencia total la ruta.

La activación de la ruta extrínseca vía DR4/DR5 está muy ligada a la función del sistema inmune de supresión antitumoral ya que algunos de estos ligandos se encuentran en la superficie de células del sistema inmune hasta que son liberado al suero donde pueden transportarse e inducir la apoptosis en células tumorales. Los niveles basales de TRAIL en el ser humano rondan 100 pg/mL mostrándose así no dañinos para células sanas a estos niveles ⁴

En cuanto a la activación de la ruta intrínseca uno de los compuestos que provocan la activación de esta es la camptotecina, dicho compuesto se une a la topoisomerasa I

bloqueando que esta pueda liberarse de la cadena de DNA durante la mitosis y, por lo tanto, induciendo la activación de la vía intrínseca de la apoptosis

1.2. Ensayos clínicos con TRAIL recombinantes e Ig anti-DR4/DR5.

El mismo mecanismo de activación de la vía extrínseca se ha intentado replicar en varios ensayos de tratamientos anticancerígenos donde, mediante estímulos externos inductores de la apoptosis que dieran lugar a la reducción del tamaño tumoral. Existen distintos ligandos y receptores dentro de la familia de los TNFs, pero el descubrimiento de TRAIL supuso un gran avance en su posible uso como tratamiento oncológico. Esto se debe a que ensayos clínicos con otros TNFs desembocaron en síndrome del shock inflamatorio y toxicidad grave en el hígado mientras que TRAIL provoca niveles de efectos adversos mucho más reducidos en el paciente. Otra ventaja de TRAIL como tratamiento respecto a otros ligandos es que DR4 y DR5 no precisan de que TRAIL se encuentre unido a membrana mientras que otros receptores como FAS sí ⁴ (Figura 2). Pese a todas estas ventajas el uso de TRAIL como tratamiento posee una gran limitación, en las células tumorales que poseen una mutación en los niveles de caspasa 8 reduciéndolos de manera significativa a su vez que una sobreexpresión en los niveles de FLIP provoca que, al ser tratadas con TRAIL, este de lugar a la activación de la ruta NFκβ en vez de la vía extrínseca de la apoptosis dando lugar a un aumento en la proliferación y supervivencia del tumor ¹⁶. Un ejemplo de esto podría situarse en los pacientes de tumor pancreático o colorectal con KRAS mutado, ya que se ha descubierto que una sobreexpresión de DR5 se sitúa como parámetro relacionado con la malignidad y correlacionado con el crecimiento tumoral, una posible explicación a esto se centraría en la inactivación de la ruta extrínseca de la apoptosis a través de DR5 en pos de activar la ruta NFκβ ¹², es por ello que pacientes con este fenotipo no deberían ser recomendados para el tratamiento con TRAIL. Debido a esto se han realizado varias investigaciones con el objetivo de superar esta resistencia a TRAIL dando lugar a estrategias como su tratamiento en combinación con DIABLO⁵, antagonistas de proteínas antiapoptóticas de la familia de BCL2⁵ o inhibidores del proteosoma como bortezomib ¹⁵.

Los ensayos clínicos con TRAIL como eje central se están realizando a partir de dos vertientes, el uso de TRAIL recombinantes o el uso de anticuerpos Anti-DR4/DR5¹⁴. (Figura 3).

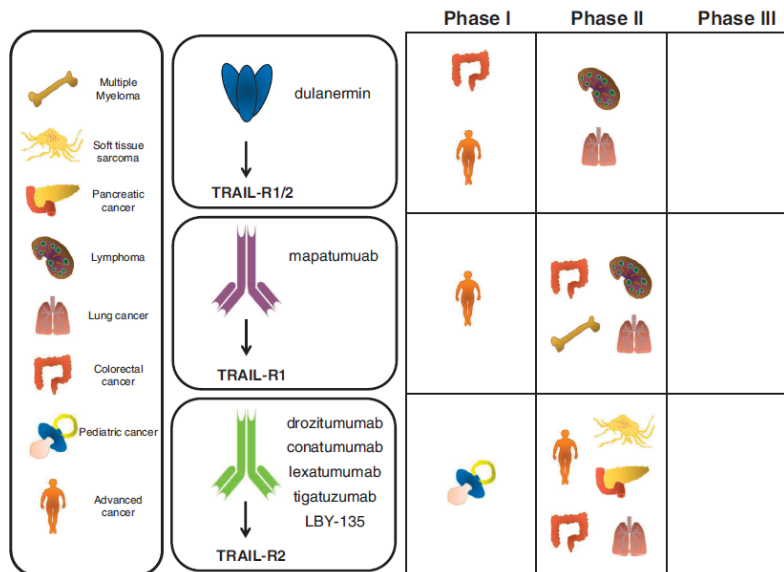


Figura 3. Ensayos clínicos elaborados cuya diana eran los receptores de TRAIL.

Se describe tanto el tipo de cáncer diana, como el nombre del tratamiento, tipo de anticuerpo y fase límite donde han cesado.¹⁰

Las modificaciones realizadas en los ligandos recombinantes abarcan desde la fusión de TRAIL con la porción Fc de la IgG humana¹⁷ hasta la fusión con albumina¹⁸. Los resultados obtenidos en la mayoría de los ensayos demostraron reducción en el tamaño tumoral pero no lo suficiente como para superar la fase 2 de ensayo clínico, siendo la mayoría de los ensayos mediante anticuerpos completos frente a los receptores⁵ (Figura 3).

Solo se ha realizado un ensayo clínico con un anticuerpo parcial, dulanermin, que tenía como ventaja que podía activar tanto TRAIL-R1 (DR4) como a TRAIL-R2 (DR5) pero no superó la fase clínica 2 por falta de eficacia antitumoral.

Las principales causas detrás de los fallos en los ensayos son: ligera toxicidad en la fase 1 o falta de efectos antitumorales en la fase 2 dando lugar a supervivencia fraccionada y al rebrote en el crecimiento tumoral. Entre las opciones que se barajan como origen de estos resultados son un corto tiempo de vida dando lugar a una baja eficacia, desarrollo de resistencias o problemas de localización hacia el tumor. Las soluciones que se han planteado para superar estas barreras son desde el uso de nanopartículas o transportadores biológicos para facilitar la localización o el uso de terapias en combinación que inhiba la actuación de FLIP permitiendo así una eficacia mayor de la ruta^{19 20 21 22}. Una de las estrategias más prometedoras para la sensibilización de células resistentes a TRAIL es mediante la inhibición de la quinasa 9

dependiente de ciclinas (CDK9), esta estrategia provoca que una inhibición de CDK9 provoca a su vez una disminución en los niveles de MCL-1 y FLIP, dos inhibidores clave frente a la apoptosis²³. Las terapias basadas en anticuerpos podrían situarse como las predilectas frente a las de ligandos recombinantes ya que estas primeras no solo provocarían la activación de la vía extrínseca al unirse a DR4/DR5, sino que podría inducir tanto la toxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) como la citotoxicidad del complemento dependiente de anticuerpo (CDC) facilitando así la actuación del sistema inmune frente a las células tumorales. Estos tipos de estudios han dado pie a no usar TRAIL como monoterapia, y ha abierto una nueva estrategia basada en el uso de TRAIL en modo terapia combinada. Este último punto nos está llevando a estudiar nuevas dianas que en combinación con TRAIL aumenten su eficacia (Figura 3).

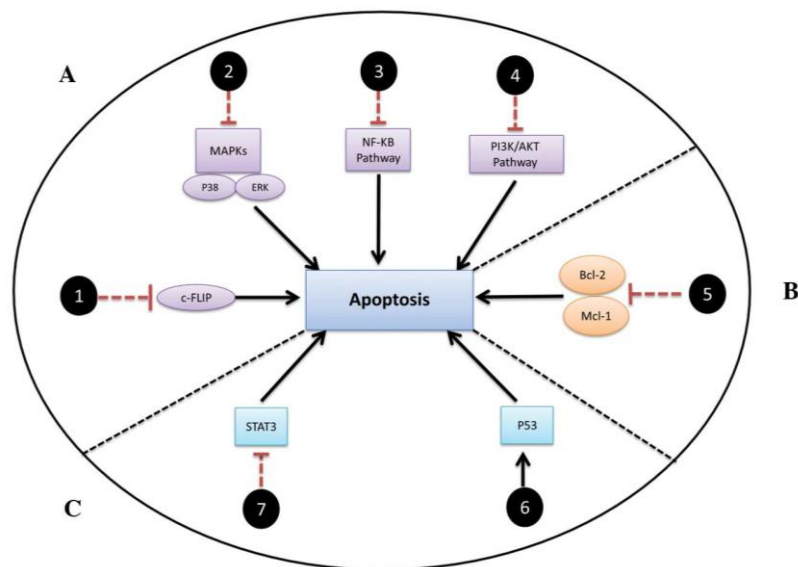


Figura 4. Posibles nuevas dianas de la ruta de la apoptosis para tratamientos anticancerígenos.

A) cFLIP u otros factores de supervivencia celular como diana. B) Familia Bcl-2. C) p53 y STAT3.²⁴

Uno de los aspectos, a nuestro juicio, que es clave en la falta de eficacia de la quimioterapia es la falta de buenos biomarcadores que sean capaces de predecir la resistencia de cada tipo de tumor a la quimioterapia. El microambiente tumoral puede tener una gran influencia en el metabolismo del tumor y en la resistencia o sensibilidad que tenga este a distintos tratamientos antitumorales. Por ello, creemos que estudios del microambiente del tumoral en cada paciente facilitaría la prescripción del tratamiento adecuado a cada condición. Esta idea es la que ha dado pie a este trabajo de TFM.

Para una correcta clasificación de los tumores es necesario realizar estudios donde se relacionen condiciones microambientales tumorales con desarrollo de resistencias a la quimioterapia. En este trabajo estudiaremos como las condiciones de obtención de la energía, así como la disponibilidad de Oxígeno influyen en la respuesta a TRAIL y Camptotecina, ya que dentro de los tumores sólidos encontramos diferentes microambientes con variaciones en la disponibilidad de nutrientes y de oxígeno. en su uso como monoterapia o en la necesidad de estudiar nuevas posibles dianas en combinación con el uso de TRAIL (Figura 4).

2. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son:

- Determinar si los medios de cultivo influyen en la sensibilización de las células tumorales a tratamientos proapoptóticos tanto por la vía intrínseca como la extrínseca.
- Determinar si las condiciones de normoxia e hipoxia influyen en la sensibilización de las células tumorales a tratamientos proapoptóticos tanto por la vía intrínseca como la extrínseca.
- Establecer si a partir del estudio del microambiente tumoral sería posible clasificar los tumores en función de su sensibilidad a distintos tratamientos proapoptóticos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. Análisis de time-lapse mediante microscopía confocal de cultivos de células HeLa en 3 medios distintos.

3.1.1 Cultivos celulares

Con el fin de obtener células HeLa acondicionadas a vivir en medios usando diferente fuente de energía, usamos 3 formulaciones.

1.- Medio completo: DMEM (Glutamax) con 4,5 g/L glucosa, 2 mM glutamina, penicilina/estreptomicina 100x (10000 unidades/mL penicilina, 10000 µg/mL estreptomicina) y suero bovino fetal 10%.

2.- Medio Glutamina: DMEM sin glucosa suplementado con 2 mM glutamina, penicilina/estreptomicina 100x (10000 unidades/mL penicilina, 10000 µg/mL estreptomicina), Galactosa 10 mM y FBS 10%.

3.- Medio Glucosa: DMEM suplementado con glucosa 4,5 g/l, penicilina/estreptomicina 100x (10000 unidades/ml penicilina, 10000 µg/mL estreptomicina), Aminoácidos no esenciales 100X (AANEE), FBS 10%.

Los cultivos se desarrollaron en los 3 medios (completo, glucosa y glutamina) y en 2 condiciones distintas (normoxia e hipoxia).

1.- Normoxia: 20% O₂ y 5% CO₂.

2.- Hipoxia: 1% O₂, 5% CO₂, 95% N.

Las células fueron cultivadas en frascos de 75cm² (Falcon) a 37 °C. Una vez acondicionadas se realizaron subcultivos en placas p24 nunc (Falcon) y las placas correspondientes a normoxia se cultivaron en estufa a 37°C con 5% de CO₂ durante un periodo de 3 días mientras que las placas correspondientes a hipoxia se cultivaron en las mismas condiciones de presión y temperatura pero con un 1% de oxígeno durante un mínimo de 3 días también, dicho periodo de tiempo estaba calculado para que, con el número de células que habíamos sembrado (500000 células en medio control, 1000000 en medio suplementado con glucosa y 1100000 en medio suplementado con glutamina) obtuviéramos una confluencia de un 80-90% a los 3 días.

Durante y tras el periodo de cultivo se llevaron a cabo observaciones microscópicas periódicamente, para asegurarnos que las células crecían correctamente. En los experimentos de hipoxia tan solo llevamos a cabo dos observaciones, al inicio y al final del experimento. Los tratamientos se llevaron a cabo por duplicado (ver disposición de los pocillos en figura 6).

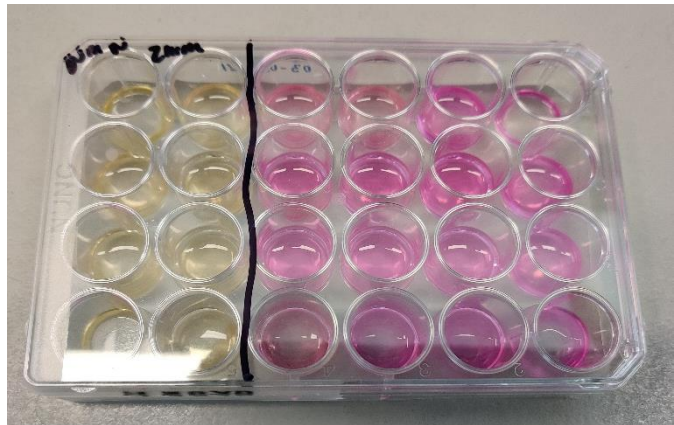


Figura 5. Placa p24 con los cultivos celulares.

Medio control (1^o y 2^o columna), medio suplementado con glucosa (3^o y 4^o columna) y suplementado con glutamina (5^o y 6^o columna)

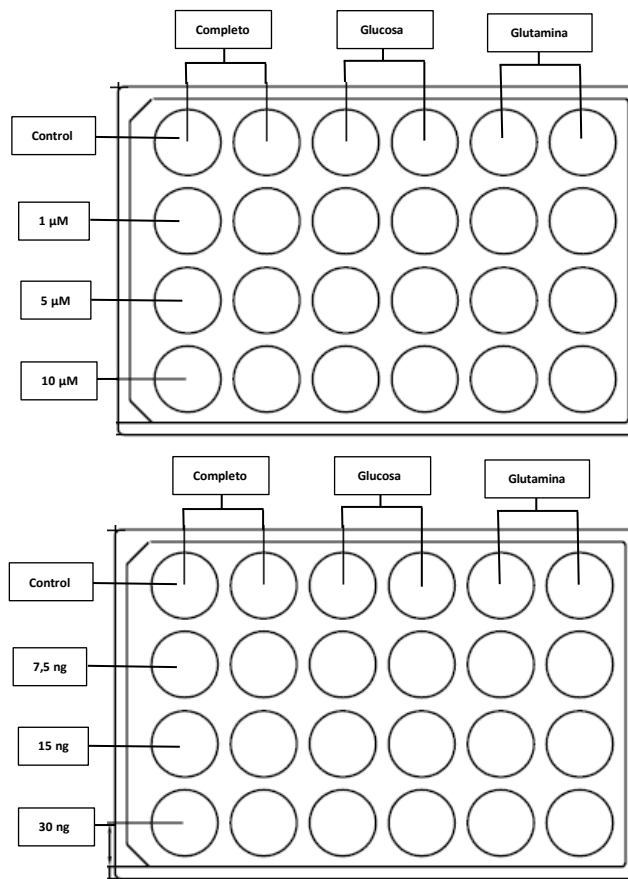


Figura 6. Diagrama de la disposición de los cultivos en las placas p24 en función del medio y tratamiento.

3.1.2 Tratamiento con camptotecina y TRAIL.

A las 24 h de haber sembrado las células en la placa p24 se trataron las células. Para el tratamiento con camptotecina se usaron las concentraciones de 1, 5 y 10 μM . En el caso de TRAIL se usaron las concentraciones de: 7.5, 15 y 30 ng/ml. En todos los casos usamos células sin tratar que usamos como control de nuestros experimentos.

3.1.3 Videomicroscopia.

Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio LeicaDMi8 (Leica MicroSystem) con una magnificación 20x y equipado con una cámara digital Hamamatsu Orca-R2 CCD mediante el programa LAS X Core 3.5.7. Este microscopio está equipado con una cámara climática fabricada por OKOLAB que garantiza el mantenimiento de la temperatura a 37 °C y la correcta mezcla de gases. Los videos tan sólo se llevaron a cabo en condiciones de normoxia durante 24h con un intervalo de 30 minutos. Obtuvimos 5 posiciones diferentes por pocillo.

En el caso de las muestras en hipoxia, tan solo llevamos el a cabo el análisis de la foto final tras 24h de tratamiento, un ejemplo se muestra en figura 10.

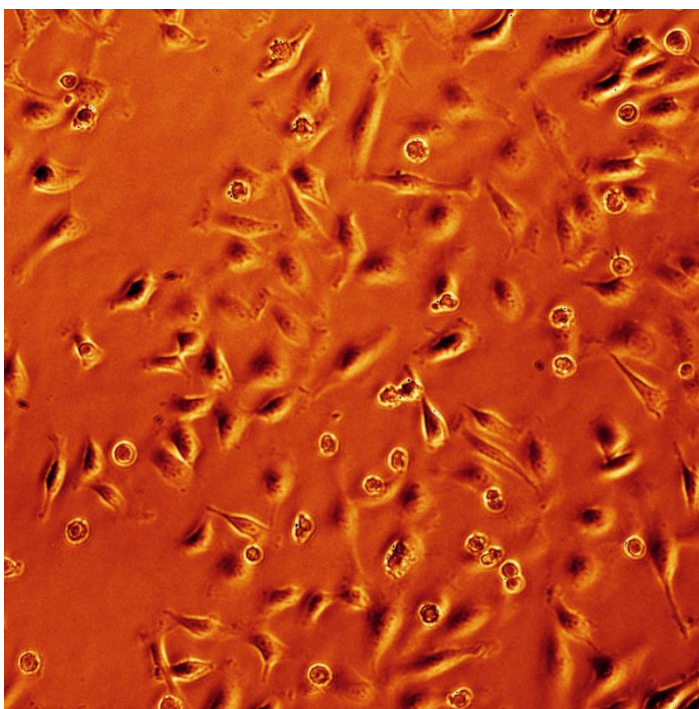


Figura 7. Captura del fotograma 5 (2 horas 30 minutos) del time-lapse del cultivo control en normoxia tratado con 30 ng de TRAIL.

3.1.4 Análisis de los videos y las fotos finales.

Los videos fueron analizados mediante el programa LASX, analizando cada fotograma individualmente. Para cada posición estudiada contamos el número de células totales y el de células muertas, lo que nos permitió poder generar curvas de tiempo de muerte. Para los experimentos de hipoxia se contó el número total de células, porcentaje de células vivas y porcentaje de células muertas en las imágenes finales.

De cada pocillo se analizaron 3 posiciones distintas, 6 posiciones por tratamiento.

3.2. Análisis transcriptómico

3.2.1 Extracción RNA y secuenciación

El RNA total se extrajo mediante el uso del RNeasy Mini Kit (QIAGEN) siguiendo los pasos recomendados por el fabricante para su uso, y se analizó su calidad mediante el uso del Bioanalyzer buscando valores de RIN (RNA Integrity Number) superiores a 8. Una vez analizada la calidad del RNA se enviaron 3µg de RNA total por cada muestra y condición con 3 réplicas biológicas de cada una para la secuenciación de mRNA al Centro nacional de Análisis Genómico (CNAG) (Barcelona, España). La secuenciación se realizó con un secuenciador Illumina NovaSeq 6000. Las lecturas obtenidas fueron de 100pb paired-end y un mínimo de 50 millones de lecturas por muestras.

3.2.2. RNA-seq y procesamiento de los datos

La calidad de las lecturas mediante el software FastQC v0.11.9 en busca de secuencias restantes de adaptador. A continuación del análisis cualitativo realizamos el mapeo de las lecturas utilizando el software STAR utilizando como genoma de referencia la versión GRCh38 del genoma de *Homo sapiens* proveniente del Ensembl. El resultado del mapeo se analizó con el software Qualimap. Por último, la cuantificación se realizó con el programa HTSeq-counts.

El resto de análisis posteriores al análisis del alineamiento de secuencias se realizaron con R v4.1, y los datos adicionales que fueron necesarios se obtuvieron mediante la herramienta de Ensembl BioMat. Para el análisis de la expresión diferencial se utilizó el paquete Limma con la transformación Voom para datos de RNASeq. Los genes obtenidos fueron cribados tanto a nivel de CPM, siendo el umbral mínimo 2, como a nivel del log₂fc, siendo el umbral mínimo 0,5. Los heatmaps se realizaron mediante R con el paquete gplots.

3.3. Inmunohistoquímica celular para el estudio de los niveles de proteínas relacionadas con la ruta de apoptosis intrínseca y extrínseca.

3.3.1 Cultivo celular.

Se realizaron cultivos celulares en los 3 medios utilizados hasta ahora, (control, suplementado con glucosa y suplementado con glutamina), en placas p100 (Falcon) con cubreobjetos cubriendo el fondo de la placa, permitiendo así el crecimiento celular sobre el cubreobjetos.

3.3.2 Fijación de las células.

La fijación se realizó usando como fijador 4% de paraformaldehído (stock 16%) en PBS. Se dejó incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente para posteriormente retirar el fijador, realizar dos lavados con PBS y mantener a 4°C, hasta su uso.

3.3.3 Inmunohistoquímica

Para que los anticuerpos accedieran a los antígenos intracelulares las células fueron permeabilizadas con Triton X-100 al 1%, a temperatura ambiente durante 10 min. Tras la permeabilización las células fueron lavadas dos veces (5 minutos cada vez). Posteriormente se bloquearon los sitios de unión inespecífica de los anticuerpos mediante la incubación con la solución de bloqueo (PBS suplementado con suero bovino fetal al 4%) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

El siguiente paso fue la incubación con los anticuerpos primarios. Los anticuerpos utilizados y sus diluciones fueron 1:200 a excepción de FADD que fue 1:50 ya que se encontraba más diluida. Los anticuerpos primarios usados fueron: DR5 (ab8416, abcam), Cas8 (APA005688, Sigma), BID (ab114051, abcam), BCL2 (B317, Sigma), FADD (ab24533, abcam), MCL-1 (AMAB90859, Sigma), COX IV (11967, Cell signaling), FLIP (ab167409, abcam), DIABLO (15108, Cell signaling), AIF (ab110327, abcam), Cas9 (HPA001473, Sigma), BCL10 (CSBPA002608ESR2HV, Cusabio), XIAP (ab137392, abcam), BAX (ab7977, abcam). Todas las diluciones se realizaron con la misma solución de bloqueo y se cultivan en gotas de 50 µL sobre parafilm y los cubreobjetos sobre estas, manteniendo las gotas en contacto con la cara del cubreobjetos con células en su superficie durante 1 hora a temperatura ambiente. Se prosiguió con 2 lavados de 10 minutos en PBS y se adicionó el anticuerpo secundario que en función de los anticuerpos primarios utilizados sería Donkey antimouse alexafluor 546nm (a10036, invitrogen) que marca con fluorescencia roja o Donkey antirabbit alexafluor 488nm (a21206, invitrogen) que marca con fluorescencia verde o ambos. Para finalizar, tras el cultivo del anticuerpo secundario se realizaron 2 lavados

de 10 minutos con PBS a temperatura ambiente y se incubaron las células en una gota de 50 μ L de DAPI (1:1000) con el mismo método que los otros dos anticuerpos durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras esto se realizaron los últimos dos lavados de 10 minutos con PBS y se montan los cubreobjetos en la estación de montaje, siendo esta un portaobjetos con una gota de 3 μ L de medio de montaje VECTASHIELD Antifade Mounting Medium (Vector Laboratories) y manteniendo el cubreobjetos boca abajo para que las células estén en contacto con el medio de montaje.

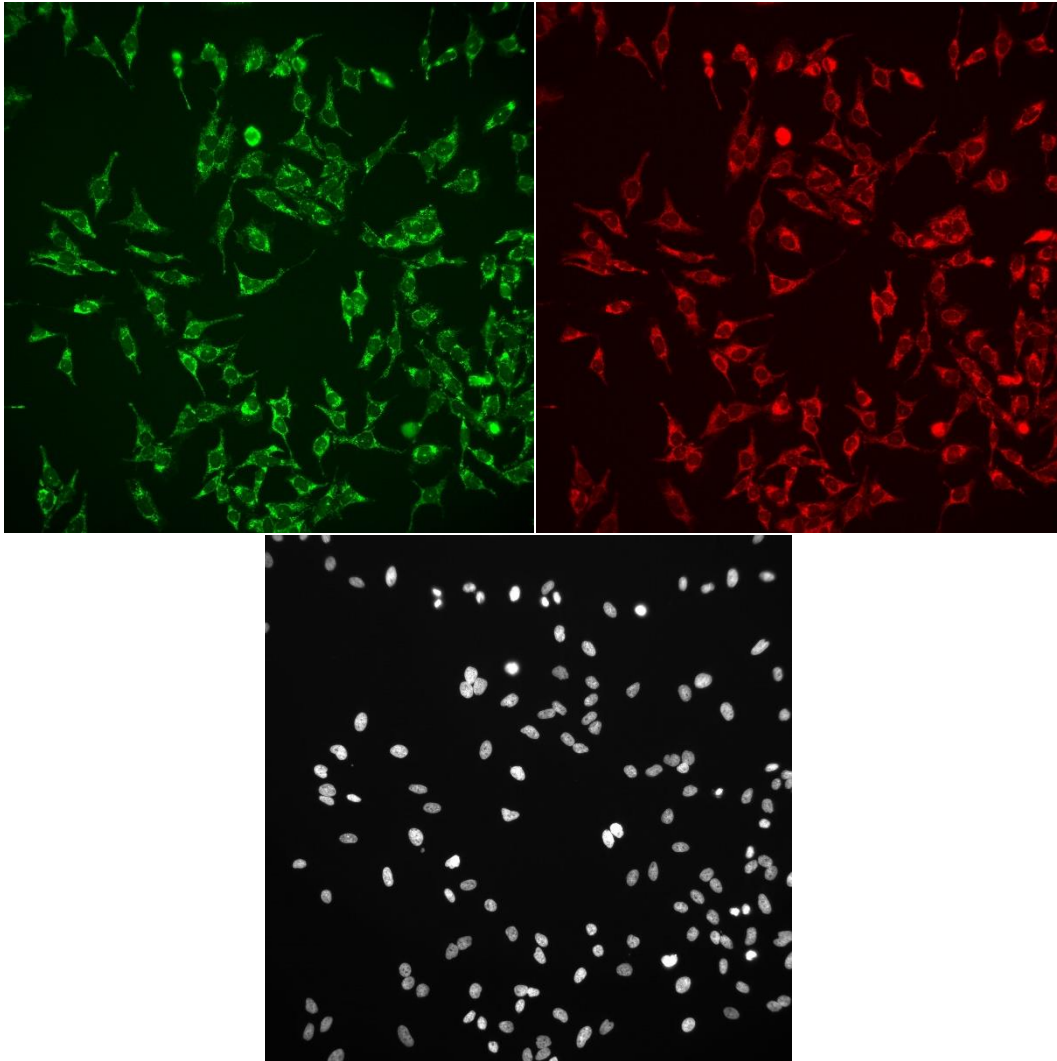


Figura 8. Inmunohistoquímica Cas8 (verde), BCL2 (rojo), DAPI (blanco) de células HeLa en medio control.

3.3.4 Análisis inmunohistoquímica mediante microscopía de fluorescencia

Las imágenes fueron obtenidas usando un microscopio de fluorescencia LeicaDM8 (Leica MicroSystem) con un objetivo 20x y equipado con una cámara digital Hamamatsu Orca-R2 CCD mediante el programa LAS X Core 3.5.7. Se tomaron 12 fotos de 12 posiciones distintas para cada uno de los canales de fluorescencia correspondientes a

los anticuerpos utilizados. Dichas fotos fueron analizadas mediante el programa Fiji donde se tomaron los valores de intensidad de cada uno de los canales, se les resto el valor de intensidad del fondo y se dividieron por el valor de intensidad de DAPI para obtener un valor medio de intensidad por célula.

3.4. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se ejecutó en el programa Excel donde se realizaron tanto análisis ANOVA para comparaciones entre varias muestras como t-student para comparaciones entre parejas de muestras. Durante todo el trabajo se fijó como p-valor estadísticamente significativo aquel por debajo de 0,05.

4.RESULTADOS

En pos de cumplir los objetivos anteriormente mentados buscábamos, no solo que existieran diferencias entre los medios en aspectos como porcentajes de supervivencia, expresión de distintos genes o niveles de distintas proteínas participantes en el programa de apoptosis, sino ver si dichos resultados encajan entre ellos siendo así que el fenotipo obtenido en los time-lapse se pudiera explicar con los niveles de proteínas obtenidos en los análisis inmunohistoquímico.

4.1 Análisis de los videos.

Todos los valores obtenidos con el análisis de los videos se muestran en varios tipos de gráficas: gráficas de porcentaje de supervivencia y muerte por tratamiento, gráficas de supervivencia frente a tiempo y violín plot donde se representan frecuencia de casos apoptóticos según el tiempo, medio y tratamiento. Esto se decidió porque cada tipo de gráfico incide en un aspecto diferente de los resultados. Todos estos datos sirvieron para comparar como los cambios en el medio y ambiente pueden alterar muchos de los factores que rodean a la ruta de la apoptosis.

Las gráficas de porcentaje de supervivencia las agrupamos en función del tratamiento y del ambiente. Las células más sensibles al tratamiento con camptotecina en normoxia fueron las crecidas en medio con glucosa con unos porcentajes de supervivencia del 23% (Tabla 3.), seguido de las células sembradas en medio completo con un porcentaje de supervivencia del 61% (Tabla 2.), a máxima concentración de camptotecina; y por último las más resistentes fueron las células cultivadas en medio con glutamina dando lugar a tasas de supervivencia en la máxima concentración de tratamiento del 82% (Tabla 4.). Las células se comportaron como esperábamos: a mayor concentración de camptotecina menor supervivencia (Figura 9.).

En hipoxia las células mostraron un comportamiento muy diferente al de normoxia. El más llamativo es el caso de las células cultivadas en glutamina que pasaron de ser las más resistentes a camptotecina (82% supervivencia en 10 μ M) en normoxia a ser las más sensibles en hipoxia (0% supervivencia en 10 μ M) (Tabla 7). En las células cultivadas en glucosa también observamos una disminución en la supervivencia en hipoxia respecto a normoxia (6% frente al 23% respectivamente en 10 μ M) (Tabla 6). Por último, las muestras sembradas en medio control mostraron una reducción de hasta el 40% (Tabla 5.) de supervivencia en hipoxia 10 μ M respecto a su contraparte en normoxia (Figura 9.).

Las células respondieron de la manera esperada a las diferentes concentraciones de TRAIL, aumentando el porcentaje de muerte a medida que aumenta la concentración de TRAIL.

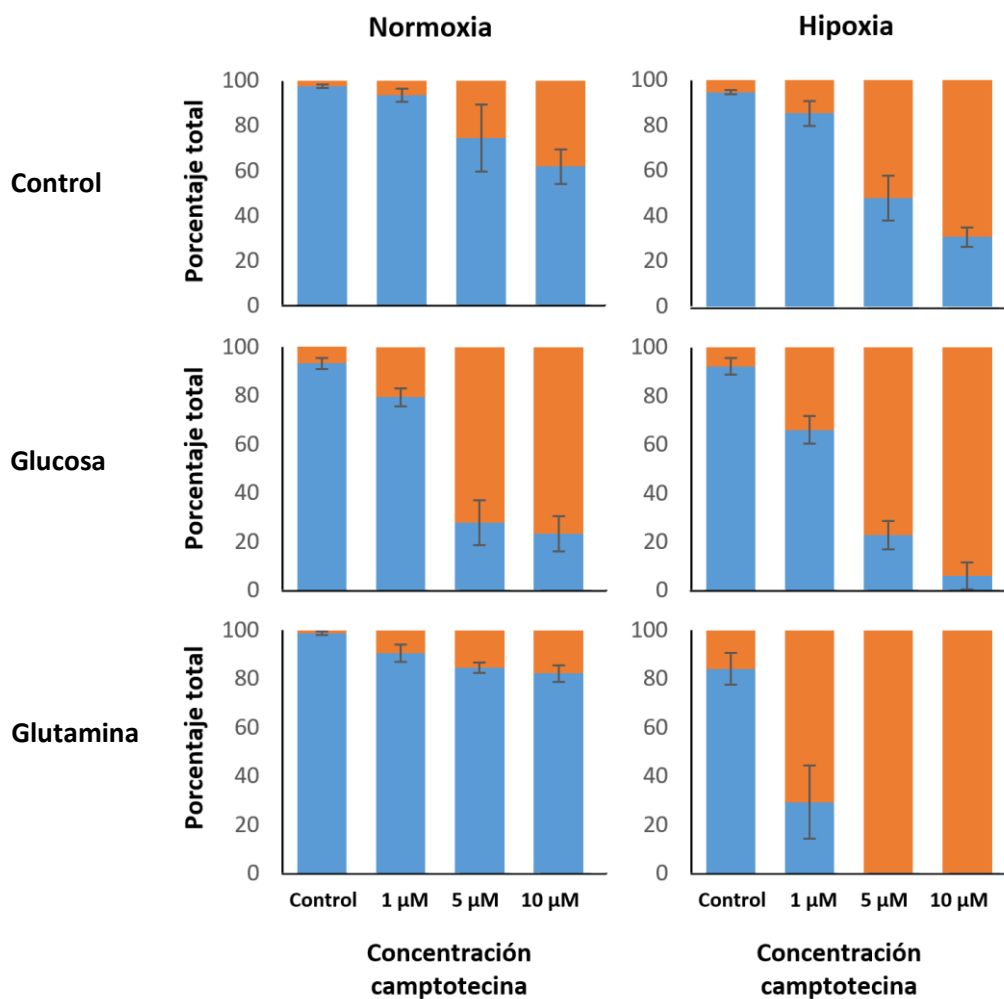


Figura 9. Supervivencia en Camptotecina

Medio completo (fila superior), suplementado con glucosa (fila intermedia) y suplementado con glutamina (fila inferior) en normoxia (primera columna) e hipoxia (segunda columna) en cada uno de los tratamientos de camptotecina (Control, 1 µM, 5 µM, 10 µM). **Supervivencia (azul) y muerte (naranja)**. Los valores mostrados son la media de muerte celular más/menos la desviación estándar.

Los valores de supervivencia observados en normoxia muestran porcentajes de supervivencia a máxima concentración de TRAIL muy similares entre las células control y las células suplementadas con glucosa (65% y 70% respectivamente) (Figura 10) (Tabla 8.) (Tabla 9.), mientras que las células suplementadas con glutamina muestran cierta resistencia aumentando dicho porcentaje hasta un 87% de supervivencia.

Si comparamos estos valores con los obtenidos de las muestras en hipoxia observamos un cambio en la supervivencia con 30 ng de TRAIL, reduciéndose desde un 65% a un 30% en las muestras control, de un 70% a un 6% en las muestras suplementadas con glucosa y de un 87% a un 0% en las muestras suplementadas con glutamina (Figura 10.) (Tabla 10.). Esta reducción tan drástica en el caso de las muestras de glutamina se puede observar en concentraciones más bajas de TRAIL obteniendo el 0% de supervivencia en las muestras tratadas con 15 ng de TRAIL en hipoxia mientras que en normoxia con la misma concentración de TRAIL el porcentaje de supervivencia ascendía hasta el 95% (Figura 10.) (Tabla 9.)

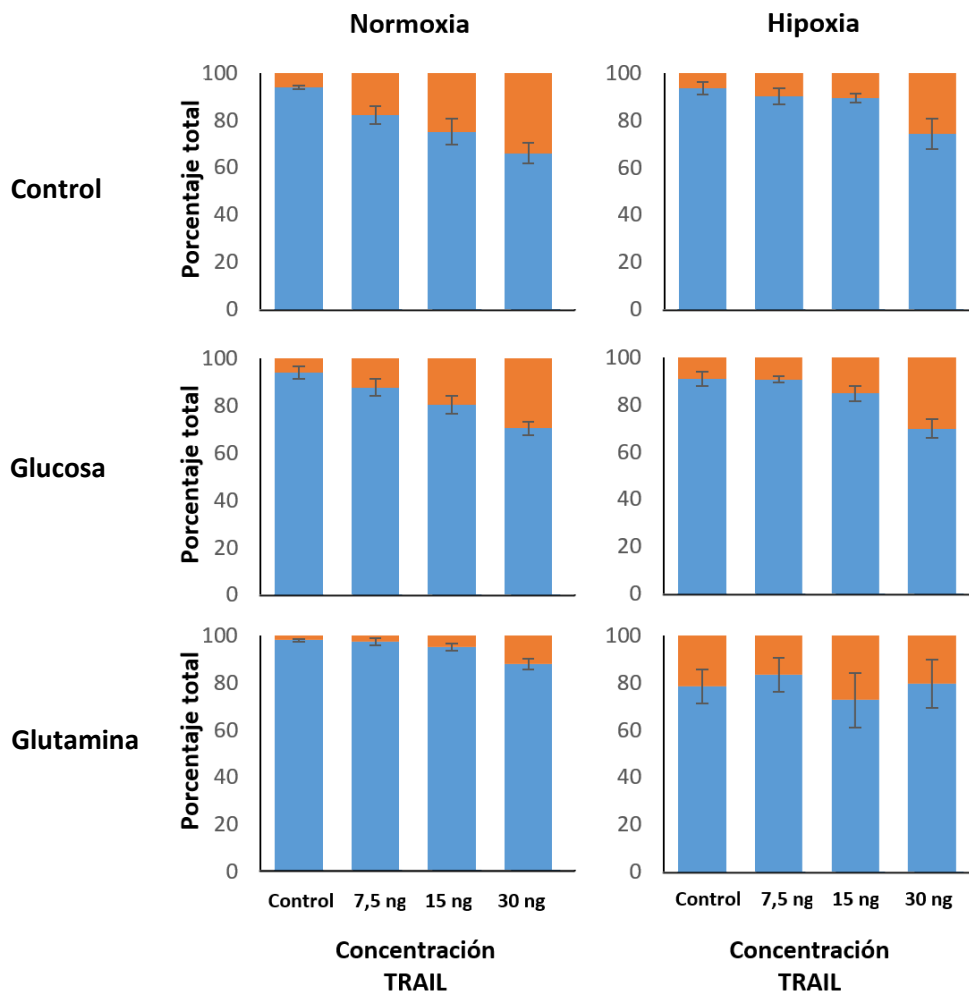


Figura 10. Supervivencia en TRAIL.

Medio completo (fila superior), suplementado con glucosa (fila intermedia) y suplementado con glutamina (fila inferior) en normoxia (primera columna) e hipoxia (segunda columna) en cada uno de los tratamientos de TRAIL (Control, 7,5 ng, 15 ng, 30 ng). Supervivencia (azul) y muerte (naranja).

El tratamiento en condiciones de hipoxia no difirió tanto con normoxia como ocurrió en el caso de la camptotecina. Junto a los porcentajes de supervivencia otro dato que consideramos importante en el estudio fueron los distintos tiempos de muerte y como estos se podían ver afectados en función de los tratamientos, medios o condiciones. Por ello analizamos las curvas de supervivencia en función del tiempo. Dichas representaciones solo se realizaron con las muestras en normoxia.

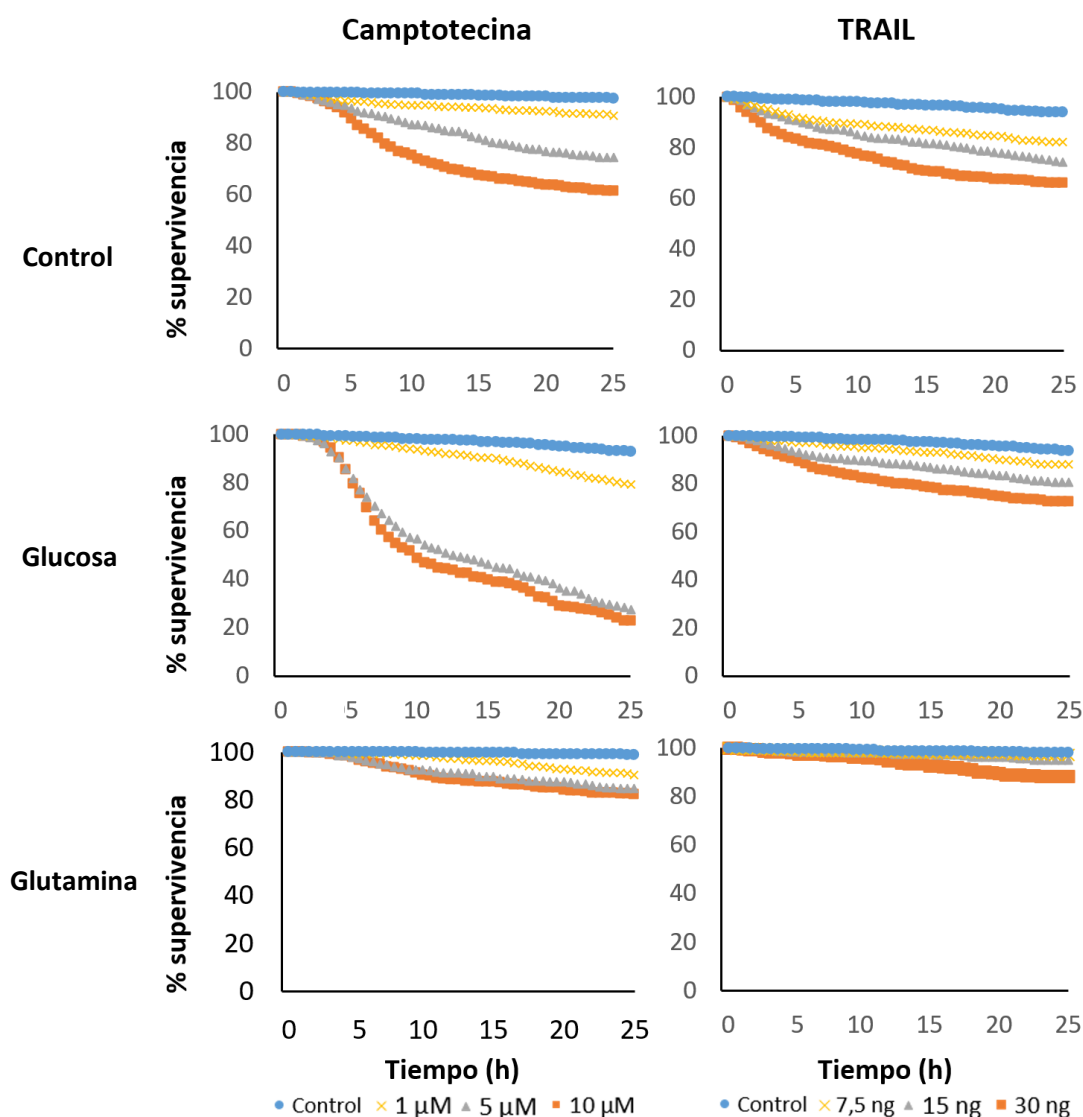


Figura 11. Curvas de supervivencia frente al tiempo.

Medio completo (fila superior), suplementado con glucosa (fila intermedia) y suplementado con glutamina (fila inferior) tratadas con camptotecina (primera columna) y TRAIL (segunda columna) en cada uno de los tratamientos de camptotecina: Control (Azul), 1 μM (Amarillo), 5 μM (Gris), 10 μM (Naranja); y en cada uno de los tratamientos de TRAIL: Control (Azul), 7,5 ng (Amarillo), 15 ng (Gris), 30 ng (Naranja). No se adjuntaron las desviaciones estándar por motivos estéticos.

Las células tratadas con TRAIL mostraron una mayor resistencia que las muestras tratadas con camptotecina. A su vez, respecto a las condiciones de cultivo, las células crecidas con glutamina resultaron ser las más resistentes (Figura 11).

Las células crecidas en glucosa mostraron la mayor sensibilidad, con un 23% de supervivencia, en un patrón bifásico donde en las concentraciones más bajas de camptotecina (Figura 11). Por último, analizamos los tiempos de muerte en función tanto de la concentración de la droga como el medio de cultivo usado.

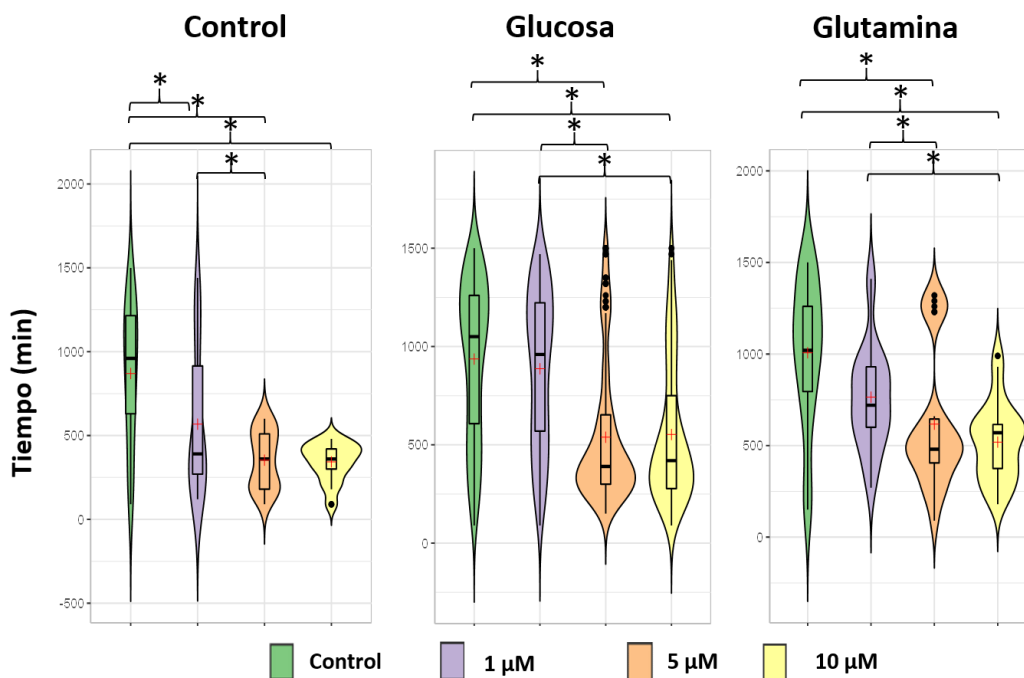


Figura 12. Tiempo de muerte en función de la concentración de camptotecina en diferentes medios (control, glucosa y glutamina) en normoxia.

Control (verde), 1 µM (morado), 5 µM (naranja), 10 µM (amarillo) para cada medio (completo, glucosa y glutamina). Box plot donde la franja interior indica la mediana de los datos. * indica que la diferencia es estadísticamente significativa.

El análisis de los tiempos de muerte en función de la concentración de camptotecina mostro en el caso del medio control una mediana practicamente identica para todas las concentraciones de camptotecina usadas (1µM, 5µM, 10µM) y una desviación estándar que disminuyó a medida que la concentración aumentaba. El análisis estadístico de los datos fue significativo (p-valor < 0,05), probablemente debido a la diferencia en la dispersión de los datos en cada una de las concentraciones usadas. Las células cultivadas en glucosa mostraron una mayor diferencia en los tiempos de muerte en función de la concentración de la droga usada. Este efecto también se pudo observar

en las células cultivadas con glutamina. En ambos casos, a la concentración intermedia de camptotecina (5 μ M) observamos la existencia de un grupo de células que muestran un tiempo más largo de muerte (Figura 12) (Tabla 2.) (Tabla 3.) (Tabla 4.). Este resultado sugiere la existencia en glucosa y glutamina de al menos dos poblaciones celulares con diferente sensibilidad a camptotecina. La existencia de estas dos poblaciones también se puede inferir del análisis de las curvas de muerte (Figura 11), que tiene un aspecto claramente bifásico (Figura 19).

Respecto a las muestras tratadas con TRAIL, el análisis de los tiempos de muerte mostró, en el caso del medio control, tanto una mediana como una desviación estándar que disminuyó en cuanto más aumentaba la concentración de TRAIL (Control, 7,5 ng, 15 ng, 30 ng). En el medio con glucosa se observa el mismo patrón descendente de la mediana respecto al aumento de la concentración de TRAIL, sin embargo este no aparece en las muestras de glutamina donde se mantiene estable. El análisis estadístico de los datos fue significativo (p -valor < 0,05), en el caso de la muestra control y glucosa, por la reducción visible en las medianas, mientras que en el caso de las muestras de glutamina sea probablemente debido a la diferencia en la dispersión de los datos en cada una de las concentraciones usadas.

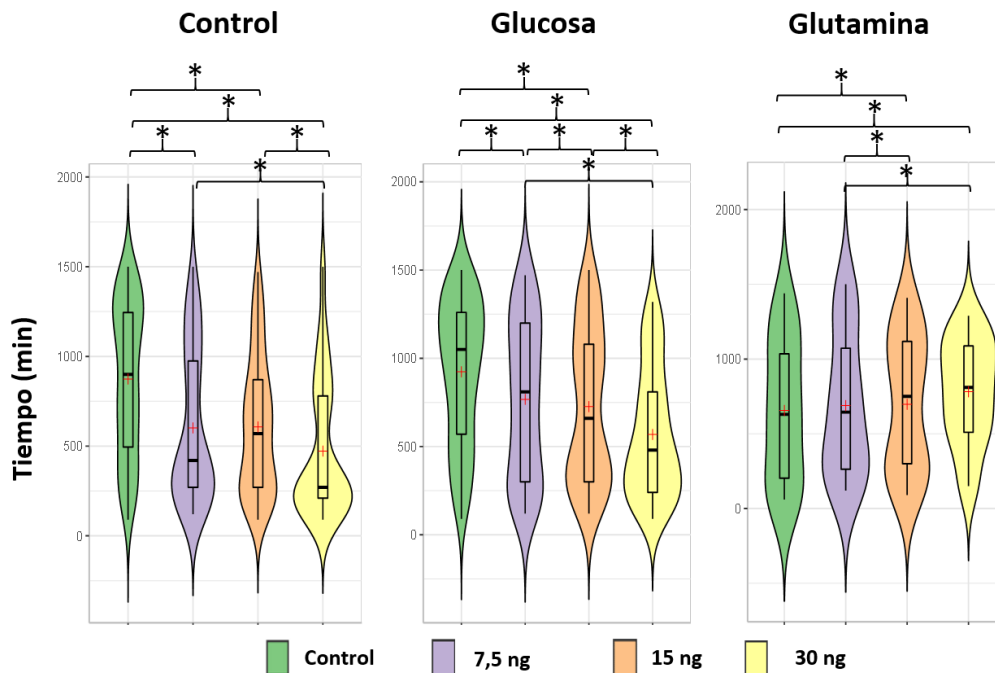


Figura 13. Tiempo de muerte en función de la concentración de TRAIL en diferentes medios (control, glucosa y glutamina) en normoxia.

Control (verde), 7,5 ng (morado), 15 ng (naranja), 30 ng (amarillo) para cada medio (completo, glucosa y glutamina). Box plot donde la franja interior indica la mediana de los datos. * indica que la diferencia es estadísticamente significativa.

Los resultados obtenidos muestran un patrón en los tiempos muy similar entre las muestras control y glucosa ligado a una sensibilidad similar al tratamiento mientras que la estabilidad de la mediana de las muestras de glutamina frente a todas las concentraciones denota un fenotipo más resistente al tratamiento. Las células control mostraron la mayor sensibilidad, con un 65% de supervivencia seguidas muy de cerca de las células con glucosa con un 70% (Figura 13) (Tabla 8.) (Tabla 9.) (Tabla 10.). A su vez no son observables subpoblaciones celulares claramente diferenciadas entre las células que se mueren como en el caso del tratamiento con camptotecina.

4.2 Análisis transcriptómico.

Tras el procesamiento de los datos se representaron los CPMs de cada proteína en un heatmap donde las tonalidades rosas muestran valores de CPMs más altos mientras que las tonalidades verdes muestran valores de CPMs más bajos.

Se realizaron 3 análisis, en el primero se analizaron los niveles de los transcritos correspondientes a las proteínas que posteriormente íbamos a analizar mediante inmunohistoquímica, en el segundo se analizaron los transcritos que, en la base de datos del Kegg, aparecieron relacionados con la apoptosis; y por último se analizaron genes relacionados con la reparación del DNA mediante recombinación homóloga.

En el análisis del primer conjunto de genes se puede observar que aparece un bloque de genes (*BCL10*, *CFLAR*, *CASP8*, *TNFRSF10D*, *CASP9*, *AIFM2*, *MCL-1*, *FADD*, *BID*) con menor expresión en las muestras de glutamina y sobreexpresados en el resto de muestras. Adicionalmente aparecen 3 genes altamente expresados en glutamina normoxia respecto al resto de muestras y condiciones, estos son *XIAP*, *BCL2* y *AIFM1*. Los genes correspondientes al primer bloque con menor expresión en las muestras suplementadas con glutamina son la mayoría proapoptóticos con la excepción de *MCL-1* y *CFLAR (FLIP)*. Por otro lado, los genes correspondientes al bloque sobreexpresado en las muestras suplementadas con glutamina en normoxia son genes antiapoptóticos a excepción de *AIFM1*. Estos perfiles podrían denotar un fenotipo antiapoptótico en las muestras suplementadas con glutamina (Figura 14).

Respecto al resto de muestras aparecen perfiles muy similares entre las muestras tratadas con glucosa y las muestras control, con muchos de los genes que se encontraban con menor expresión en las muestras suplementadas con glutamina aparecen sobreexpresados en dichas muestras.

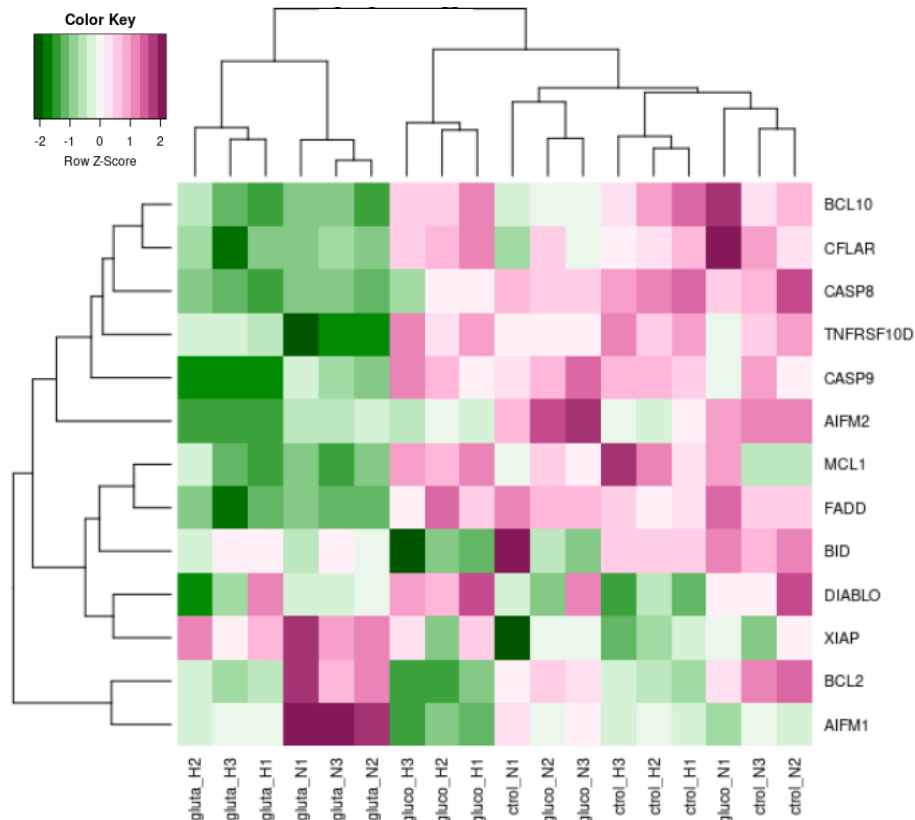


Figura 14. Heatmap de los valores de CPMs para cada tipo de muestra y gen.

Genes analizados: *BCL10*, *CFLAR*, *CASP8*, *TNFRSF10D*, *CASP9*, *AIFM2*, *MCL-1*, *FADD*, *BID*, *DIABLO*, *XIAP*, *BCL2*, *AIFM1*. Las muestras analizadas fueron en las 2 condiciones (normoxia e hipoxia), en cada tipo de medio (control, suplementado con glucosa y suplementado con glutamina) y por triplicado. Las tonalidades verdes indican valores menores de CPMs y las tonalidades rosas indican valores mayores de CPMs.

Analizando los log₂ FC de varios de los genes analizados aparece un aumento en los niveles de *BCL2* de un 50% y de *AIFM1* de un 52% en las muestras en normoxia respecto a su contraparte en hipoxia. Se puede observar también un aumento en la expresión tanto de *TNFRSF10D* (*DR5*), como de *AIFM2*, de un 48% y 43% respectivamente en las muestras suplementadas con glutamina en hipoxia respecto a normoxia. Respecto a los niveles de *CFLAR* (*FLIP*) y *FADD* estos primeros aparecen con menor expresión en las muestras suplementadas con glutamina siendo las diferencias más amplias al comparar las muestras suplementadas con glutamina en hipoxia con las muestras suplementadas con glucosa en hipoxia (42% menos) y al comparar las muestras suplementadas con glutamina en hipoxia con las muestras control en hipoxia (33% menos). En cuanto a *FADD* también aparece con menor expresión en las muestras con glutamina en comparación con el resto de muestras

siendo la comparación con mayor porcentaje de diferencia glutamina con glucosa en normoxia donde la primera se sitúa con niveles de *FADD* un 31% menores que las muestras suplementadas en glucosa. Pese a que esta diferencia no es muy alta, es significativa a nivel estadístico y acompaña al resto de genes del bloque cuyos niveles son menores en las muestras suplementadas con glutamina.

El análisis del segundo conjunto de genes muestra una diferenciación por bloques muy similar al anterior que nos permite separar a las muestras suplementadas con glutamina del resto, a su vez, existen dos genes que permiten la separación entre las muestras de glutamina hipoxia y glutamina normoxia (*AVEN* y *Bok*). *AVEN* muestra unos niveles de expresión en las células suplementadas con glutamina en hipoxia superiores en un 30% frente a su contraparte en normoxia (Figura 15).

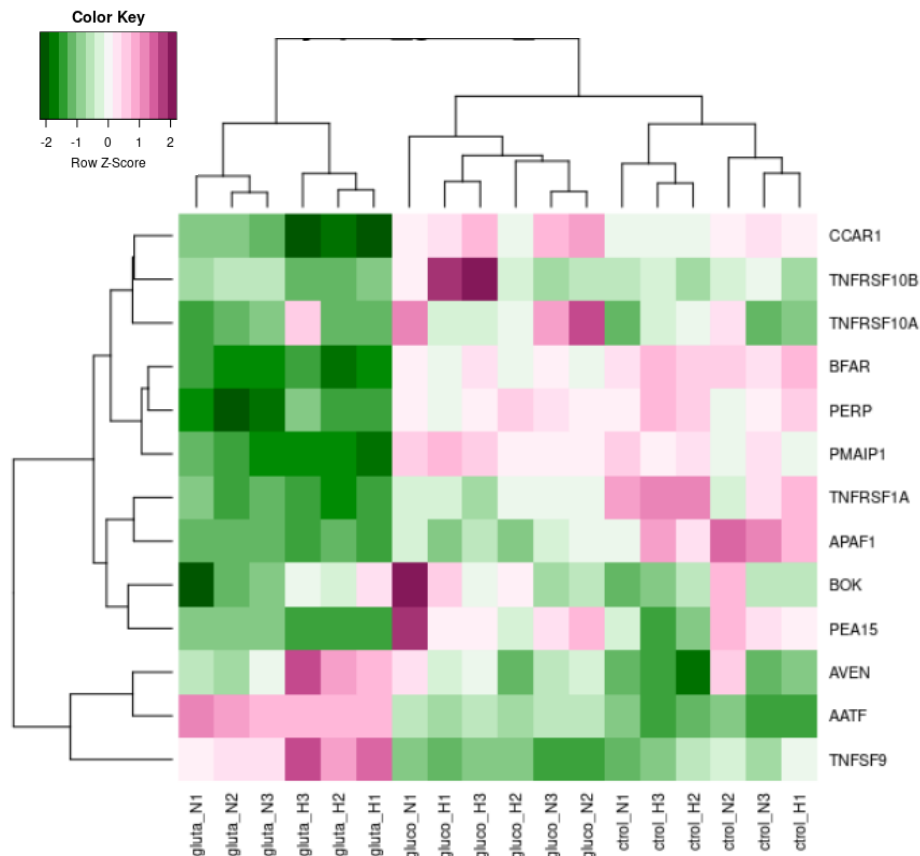


Figura 15. Heatmap de los valores de CPMs para cada tipo de muestra y gen.

Genes analizados: *CCAR1*, *TNFRSF10B*, *TNFRSF10A*, *BFAR*, *PERP*, *PMAIP1*, *TNFRSF1A*, *APAF1*, *BOK*, *PEA15*, *AVEN*, *AATF*, *TNFSF9*. Las muestras analizadas fueron en las 2 condiciones (normoxia e hipoxia), en cada tipo de medio (control, suplementado con glucosa y suplementado con glutamina) y por triplicado. Las tonalidades verdes indican valores menores de CPMs y las tonalidades rosas indican valores mayores de CPMs.

Bok también muestra niveles más altos en las células con glutamina en hipoxia, siendo estos de un 33% respecto a las muestras en glutamina normoxia. Estos genes poseen funciones contrarias siendo *AVEN* una proteína antiapoptótica y *Bok* una proteína proapoptótica de la familia de *BCL2*. Respecto a los niveles de *TNFRSF10A (DcR1)* y *TNFRSF10B (DcR2)* su expresión al compararla entre muestras no aparece como estadísticamente significativa en prácticamente ningún caso a excepción de la comparación de *DcR2* de las muestras de glutamina frente a las muestras de glucosa en hipoxia donde la diferencia es de un 30% mayor en las muestras de glucosa; y la comparación de los niveles de *DcR1* entre las muestras de glutamina frente a las muestras de glucosa en normoxia donde la diferencia es de un 26% mayor en las muestras de glucosa.

Adicionalmente se puede observar varias proteínas proapoptóticas que expresan niveles bajos en las muestras suplementadas con glutamina respecto al resto de muestras, como es el caso de *APAF-1*, *CCAR*, *PERP* y *PMAIP1*; mientras que *AATF*, proteína antiapoptótica muestra los niveles más altos en las muestras suplementadas con glutamina llegando a tener hasta un 70% más de expresión en la comparación con más diferencia entre muestras (glutamina frente a control en hipoxia).

Por último, realizamos un tercer análisis de genes relacionados con la recombinación homóloga del DNA buscando si disminuciones o aumentos en los niveles de expresión de dichos genes pueden dar lugar a fenotipos más o menos sensibles al tratamiento con camptotecina. En dichos análisis no se pudo obtener ningún bloque de genes que nos permitiera diferenciar entre muestras con distintos medios, pero si apareció un conjunto de 4 genes que permitía diferenciar entre las muestras de glutamina hipoxia con las muestras de glutamina normoxia. Los genes (*XRCC3*, *XRCC2*, *RAD51* y *HELQ*) se encuentran sobre expresados en normoxia respecto a hipoxia (Tabla 1).

Tabla 1. Datos del análisis transcriptómico en los genes relacionados con la recombinación homóloga.

En la tabla aparecen los 4 genes (*XRCC3*, *XRCC2*, *RAD51* y *HELQ*) con sus correspondientes promedios de CPMs por condición (normoxia e hipoxia) en las muestras suplementadas con glutamina, el log2FC y el FDR.

Gen	Promedio CPMs Glutamina Normoxia	Promedio CPMs Glutamina Hipoxia	log2FC Glutamina Hipoxia vs Normoxia	FDR
<i>XRCC3</i>	28,08741676	22,62161763	-0,310917118	0,014326397
<i>XRCC2</i>	36,62547355	32,44614449	-0,169179762	0,177468363
<i>RAD51</i>	22,53700404	17,23757735	-0,387670356	0,000774817
<i>HELQ</i>	9,54921694	7,85145802	-0,284945832	0,012712189

En los 4 genes las diferencias de expresión entre muestras no son muy altas, siendo el máximo de un 30% (*RAD51*). A su vez de los 4 genes en *XRCC2* el FDR no es estadísticamente significativo con una diferencia en la expresión del 11%.

4.3 Análisis inmunohistoquímica mediante microscopía de fluorescencia.

Los valores de intensidad obtenidos para cada proteína fueron normalizados respecto a su control tomando este como valor 1. Se analizaron 13 proteínas distintas de las cuales solo XIAP no mostró ningún tipo de diferencia significativa (p -valor $< 0,05$) entre ningún medio. Respecto al resto, comenzando con caspasa 8 se presentan niveles mayores de dicha proteína en las células crecidas en glutamina, respecto a los valores de control (19% mayores en las células crecidas en glutamina); siendo dicha diferencia estadísticamente significativa. Las intensidades obtenidas en DR5 y BID siguen el mismo patrón ascendente siendo la media de intensidad menor el control, la intermedia las muestras suplementadas con glucosa (+74% en DR5 y +39% en BID respecto al control) y las células crecidas en glutamina aquellas que muestran niveles más altos tanto de DR5 como de BID respecto al control (+97% y +79% respectivamente) (Tabla 20) (Tabla 21) (Figura 16), siendo todas las diferencias estadísticamente significativas entre todas las muestras. Caspasa 9 también presenta un patrón ascendente siendo la muestra control aquella con menor intensidad media mientras que glutamina es la muestra con mayor intensidad media (+67% respecto a control), pero a diferencia del caso de DR5 y BID no todas las diferencias entre todas las muestras son significativas, tan solo las que se comparan con la muestra control (control-glucosa y control-glutamina) mientras que la diferencia entre glucosa (+42% respecto a control) y glutamina (+67% respecto a control) no lo es (Tabla 20) (Tabla 21) (Figura 16).

En cuanto a BCL2 no se observa dicho patrón ascendente respecto a control, sino que, en este caso, la muestra suplementada con glucosa aparece como la muestra con menor intensidad media seguida de las muestras control y por último las muestras suplementadas con glutamina. Dichas diferencias son significativas en cualquier comparación entre todas las muestras. Por último, observamos un patrón descendente en las intensidades referentes a la proteína BCL10, donde el control se posiciona como

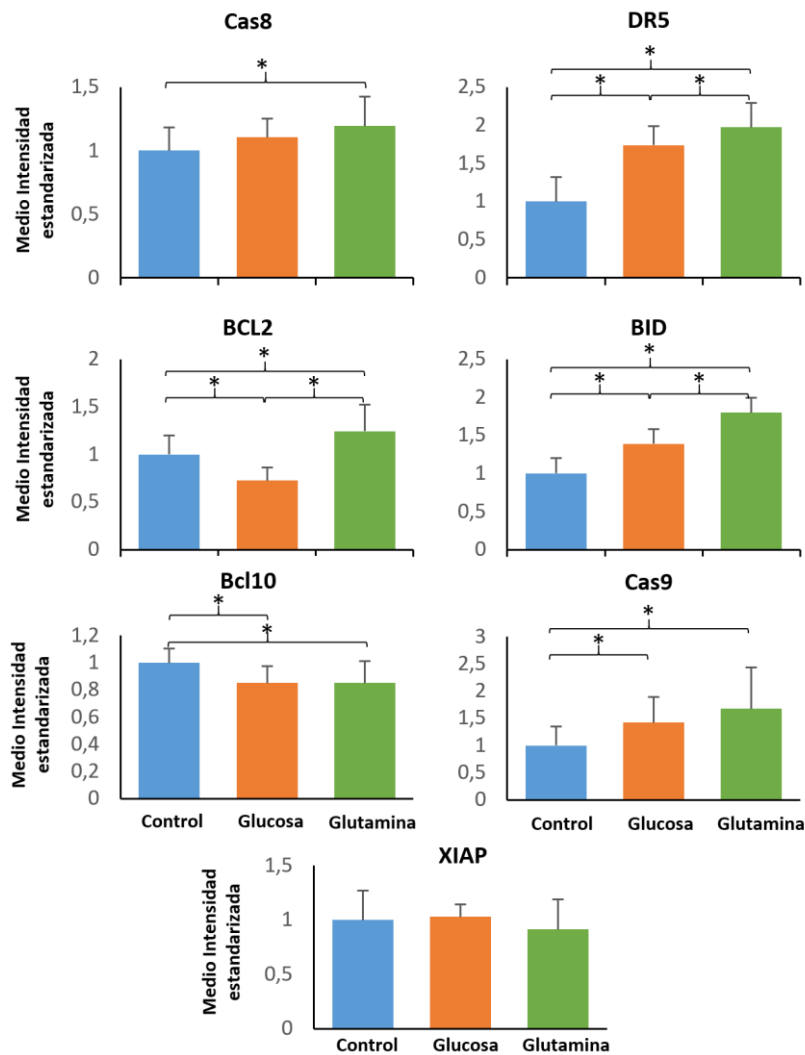


Figura 16. Medias de las intensidades respecto al control obtenidas del análisis inmunohistoquímico para cada proteína.

Proteínas analizadas: Ca8 (superior izquierda), DR5 (superior derecha), BCL2 (medio izquierda), BID (medio derecha), BCL10 (inferior izquierda), Cas9 (inferior derecha), XIAP (inferior centro). * indica que la diferencia es estadísticamente significativa. Todos los valores están normalizados respecto a su control, tomando este como valor 1.

la muestra con mayor intensidad seguido de las muestras suplementadas con glucosa (-15% respecto a control) y glutamina (-15% respecto a control) que aparecen con intensidades medias muy similares, todo ello se complementa con la aparición de diferencias significativas únicamente en las comparaciones relacionadas con la muestra control (control-glucosa y control-glutamina) (Tabla 20) (Tabla 21) (Figura 16).

Respecto al resto de proteínas podemos observar el patrón ascendente desde control hasta las muestras suplementadas con glutamina (+56% respecto a control) en las intensidades de FLIP siendo todas las diferencias significativas a excepción de la comparación entre glucosa y glutamina (Tabla 20) (Tabla 21) (Figura 17).

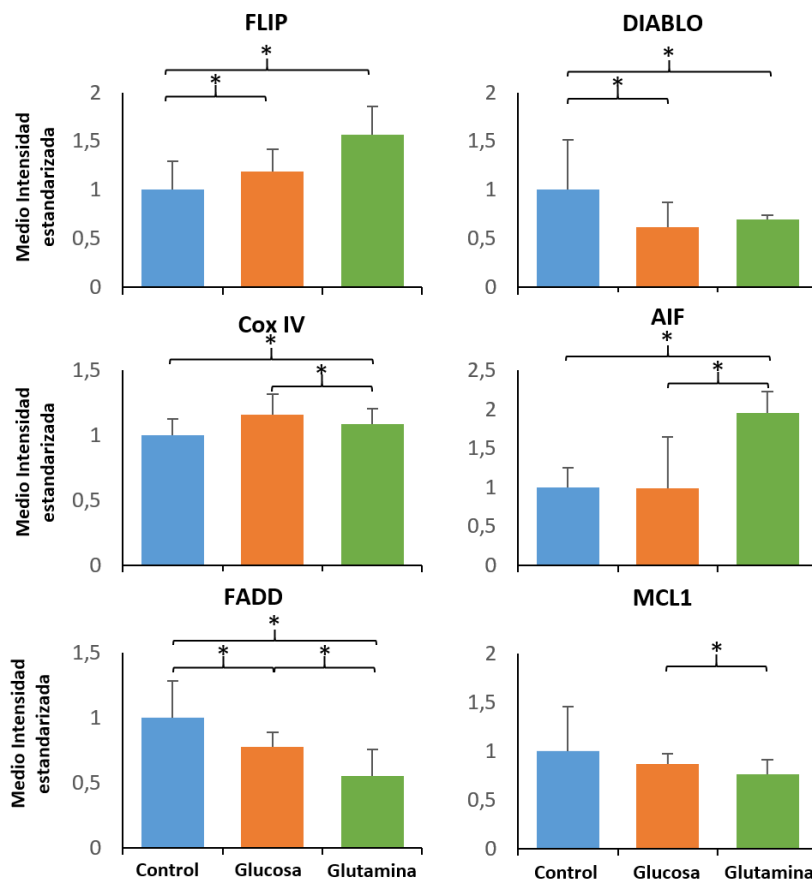


Figura 17. Medias de las intensidades estandarizadas respecto al control obtenidas del análisis inmunohistoquímico para cada proteína.

Proteínas analizadas: Cox IV (superior izquierda), DIABLO (superior derecha), FLIP (medio izquierda), AIF (medio derecha), FADD (inferior izquierda), MCL-1 (inferior derecha). * indica que la diferencia es estadísticamente significativa. Todos los valores están normalizados respecto a su control, tomando este como valor 1.

En DIABLO aparece la muestra control como la que posee mayor intensidad seguida de las muestras suplementadas con glutamina (-31% respecto a control) y las muestras suplementadas con glucosa (-39% respecto a control) con niveles más bajos que control, pero similares entre sí, todo ello se confirma al analizar si dichas diferencias son significativas ya que las únicas con p-valor < 0,05 son aquellas que comparan tanto las muestras suplementadas con glucosa como las muestras suplementadas con glutamina con el control (Tabla 20) (Tabla 21) (Figura 17).

Las medias de intensidad obtenidas en Cox IV son las únicas en las que las muestras suplementadas con glucosa (+16% respecto a control) aparecen como las primeras en cuanto a media de intensidad, tras ella se encuentran las muestras suplementadas con glutamina (+8% respecto a control) y por último las muestras control (Tabla 20) (Tabla 21) (Figura 17), siendo únicamente estadísticamente significativas las diferencias entre glucosa-glutamina y glutamina-control.

Una de las diferencias más grandes en las intensidades entre muestras aparece en la proteína AIF donde, mientras que control y suplementadas con glucosa aparecen con niveles similares glutamina aumenta hasta casi un 95% más, siendo dichas diferencias entre control con las muestras suplementadas con glutamina y glucosa con las muestras suplementadas con glutamina las únicas diferencias estadísticamente significativas (Tabla 20) (Tabla 21) (Figura 17). Por último, tanto en FADD como en MCL-1, aparece el mismo patrón descendente partiendo desde control hasta las muestras suplementadas con glutamina. Dicho patrón es más agudo en FADD (-45% en glutamina respecto a control) dando lugar a diferencias significativas entre todas las medias de intensidad de todas las muestras, mientras que en el caso de MCL-1 al ser diferencias más pequeñas (-25% en glutamina respecto a control) únicamente encontramos una diferencia significativa entre las muestras suplementadas con glucosa y las muestras suplementadas con glutamina (Tabla 20) (Tabla 21) (Figura 17).

Para concluir se puede observar como, por un lado, las células crecidas en glutamina muestran en normoxia un fenotipo más resistente a los tratamientos que actúan sobre las dos vías de la apoptosis que podría estar relacionado con niveles de expresión de proteínas anti y proapoptóticas como los que hemos observado. Por otro lado las células crecidas en glucosa muestran en normoxia un fenotipo más sensible al tratamiento con camptotecina que se exagera aún más en hipoxia que actúan sobre las dos vías de la apoptosis. Respecto a TRAIL no vemos diferencias significativas con las condiciones de cultivo (glucosa, glutamina) ni con respecto a la oxigenación.

5. DISCUSIÓN

Los tratamientos basados en quimioterapia y radioterapia aparecen como una de las primeras opciones a la hora de luchar contra la mayoría de casos de cáncer. Dichos tratamientos conllevan dos principales desventajas, por un lado, el gran número de efectos secundarios que generan en el paciente, y, por otro lado, una efectividad reducida debido a la generación de quimioresistencias en ciertos tumores. Uno de los componentes que más influye en el correcto desarrollo y supervivencia de un tumor es su microambiente tumoral es por ello que el estudio del mismo no permitiría conocer si estos podrían facilitar una mayor resistencia a ciertos tratamientos. Todo ello justifica la necesidad de analizar cada caso específico, clasificar cada tumor y su microambiente, y decidir el tratamiento pertinente en vez de aplicar el mismo procedimiento para todos los pacientes. La medicina personalizada, implica un conocimiento específico de los tumores de cada paciente de manera individualizada, y parte de esta estrategia pasa por conocer como el microambiente influye en la respuesta del tumor a los tratamientos convencionales. En ese sentido, este estudio servirá para comenzar a sentar las bases en esta nueva área de investigación para nuestro grupo. En nuestro trabajo hemos analizado las rutas de la apoptosis, que son el principal objetivo de muchos de los tratamientos anticancerígenos, y ver si estas se ven alteradas por distintos microambientes tumorales. La razón detrás de esta elección es que en dichas rutas convergen tanto los tratamientos anticancerígenos más novedosos (TRAIL), como los más establecidos (Camptotecina); es por ello por lo que estudiamos tanto la ruta intrínseca como la ruta extrínseca de la apoptosis y los componentes que la forman para analizar si las condiciones del medio pueden alterar como estas responden a los distintos tratamientos.

Los primeros datos de supervivencia obtenidos en las muestras tratadas con camptotecina indican que el medio suplementado con glutamina genera un fenotipo más resistente frente a los tratamientos de activación de la vía intrínseca respecto al control, por otro lado, un metabolismo celular inducido al uso de la glucosa como principal forma de energía da lugar a una sensibilidad mayor en dicha ruta. La resistencia a la activación de la ruta intrínseca no solo se encuentra influenciada por el medio sino también por las condiciones de cultivo dando lugar a una sensibilidad mucho más pronunciada en todas las muestras, pero especialmente las muestras de glutamina, al cultivarlas en condiciones de hipoxia. Al analizar los niveles de las principales proteínas de la ruta intrínseca de la apoptosis en normoxia y comparar dichos niveles entre los distintos medios se puede observar que uno de los componentes que participa en la ruta

intrínseca y más puede diferenciar a las muestras suplementadas con glutamina con las del resto son los altos niveles de BCL2 que poseen (24% más que control y 52% más que glucosa). BCL2 interacciona con Bid bloqueándola y evitando que esta active tanto a Bax como a Bak, las principales proteínas encargadas del MOMP (permeabilización de la membrana externa mitocondrial), punto sin retorno de la ruta intrínseca de la apoptosis. Los niveles altos de BCL2 coinciden con niveles altos de Bid mostrándose estos primeros como una posible adaptación a un aumento en los niveles de Bid por un metabolismo celular influenciado por la glutamina. Otros dos elementos a remarcar sería tanto los niveles de Cox IV como los niveles de AIF. Cox IV fue analizado debido a que sus niveles están muy ligados a los niveles de mitocondrias en la célula, y, por lo tanto, nos sirve para evaluar si hay una alteración en el número de mitocondrias en función del medio, ya que, niveles altos o bajos de mitocondrias podrían alterar la efectividad de la ruta intrínseca al ser parte clave en el misma. Los niveles obtenidos entre las distintas muestras indican que, aunque las diferencia son estadísticamente significativas, las medias no se alteran mucho entre muestras (8% más que en control y 8% menos que en glucosa) llegando a situarse las muestras suplementadas con glutamina únicamente por detrás de las muestras suplementadas con glucosa en cuanto a nivel de Cox IV, por lo tanto, la aparente resistencia a la activación de la ruta intrínseca no se debe a niveles bajos de mitocondrias. Por otro lado, AIF es una proteína pro-apoptótica que se activa a través de una ruta alternativa dependiente de daño en el DNA y que da lugar a la condensación de la cromatina y fragmentación del DNA de manera independiente a la activación de caspasas. Los niveles de esta proteína son especialmente altos en las muestras suplementadas con glutamina (95% más altos que control y 96% más altos que glucosa) por lo que parte del porcentaje de muerte que aparecen en dichas muestras en normoxia puede deberse a esta ruta alternativa. Los altos niveles de supervivencia en las muestras de glutamina indican que la ruta donde AIF participa se ubicaría como una ruta complementaria que no daría lugar a la mayoría de los eventos apoptóticos dentro de una población celular tratada con camptotecina. El cambio drástico en los porcentajes de supervivencia en las muestras de glutamina al ser cultivadas en condiciones de hipoxia pensamos que pueden deberse a alteraciones en los niveles de BCL2. Una reducción drástica en los mismos desbloquearía las interacciones de Bid con el resto de los componentes de la ruta dando lugar a una activación drástica de la ruta intrínseca y provocando esa reducción en los porcentajes de supervivencia. Por otro lado, las muestras suplementadas con glutamina son aquellas que poseen mayores niveles de caspasa 9 (67% más que control y 25% más que glucosa) y bajos niveles de DIABLO (31% menos que control y 7 % más que glucosa), elementos clave del final de la ruta intrínseca y que, debido al bloqueo de

puntos anteriores en la ruta, no tendría relevancia en normoxia pero que, al ser desbloqueado Bid amplificarían aún más la activación de la ruta. La principal proteína antagonista de la caspasa 9 es XIAP, pero debido a que hay niveles muy parejos entre las muestras y las diferencias no son estadísticamente significativas no la tenemos en cuenta en el razonamiento. DIABLO se ubicaría en la ruta como bloqueador de la interacción entre XIAP y Cas9, liberando a esta última y permitiendo su actividad en el apoptosoma.

Respecto a las muestras suplementadas con glucosa, su alta sensibilidad pensamos

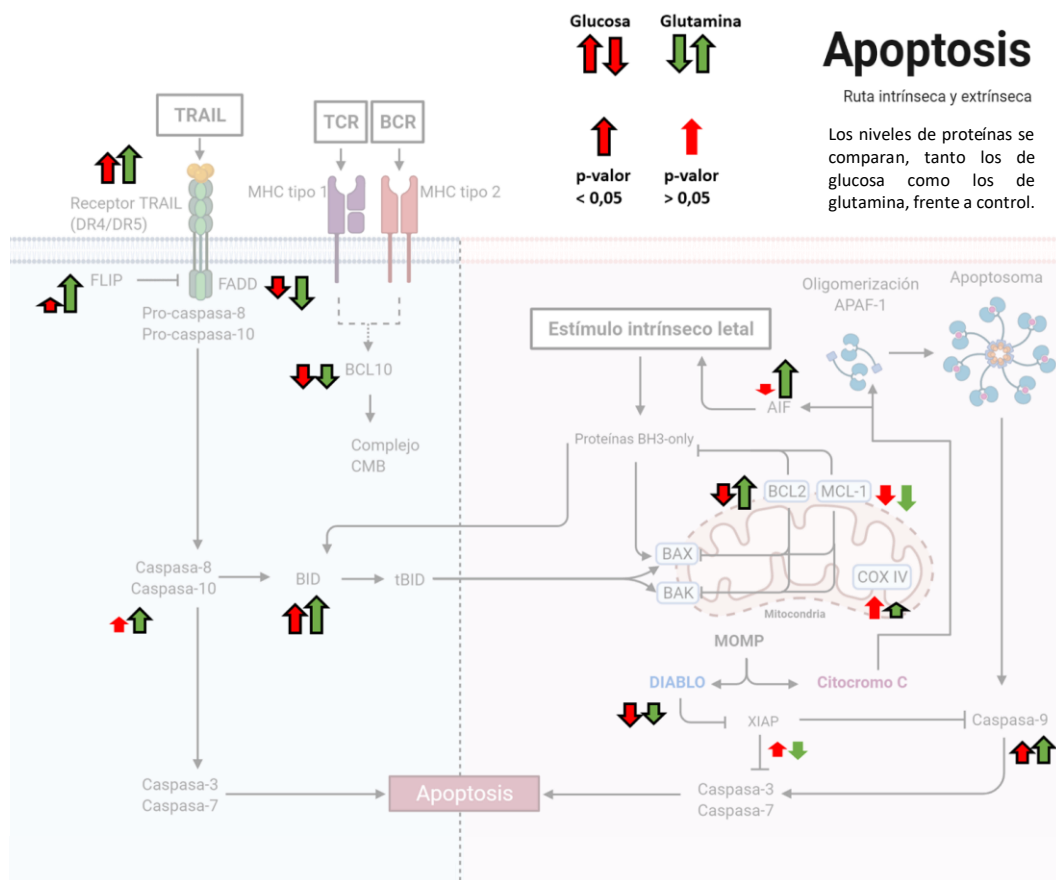


Figura 18. Rutas de apoptosis intrínseca y extrínseca.

Las flechas (Glucosa – rojo, glutamina - verde) indican los niveles de proteína respecto al control. Se analizan los niveles de proteínas de DR5, FLIP, FADD, BCL10, CAS8, BID, DIABLO, XIAP, CAS9, COV IV, BACL2, MCL-1 y AIF. La flecha con contorno negro indica que el p-valor < 0,05. Creado con BioRender.com⁸.

que puede estar relacionada con sus bajos niveles de BCL2, siendo esta, de entre todas las muestras, aquella con menores niveles de forma significativa respecto al resto (28% menos respecto a control y 52% menos respecto a glutamina). A su vez posee niveles

intermedios de Bid respecto al resto de muestras por lo que estos amplificarían la activación de la ruta intrínseca junto al mayor número de mitocondrias que posee como así denotan los altos niveles de Cox IV. Otra proteína que podría afectar sería DIABLO, siendo las muestras con metabolismo glucídico las que poseen menores niveles del mismo. En un ambiente hipóxico todo este fenotipo se incrementa pasando a ser aún más sensible al tratamiento con camptotecina, esto pensamos que puede deberse o a una reducción de los bajos niveles de BCL2 al igual que en el caso de las muestras suplementadas con glutamina o, debido a que la reducción en el porcentaje de supervivencia no es muy drástica, podría deberse a un mortalidad más ligada a la presión ambiental generada por las condiciones de hipoxia y como estas afectan a todas las rutas metabólicas más que por alteraciones en los niveles de proteínas específicas.

En las muestras control su porcentaje de supervivencia al ser tratadas con 10 μ M de camptotecina descendió hasta el 61%, situándose a media tabla en cuanto a sensibilidad al tratamiento. Al analizar los niveles de las proteínas relacionadas con la ruta intrínseca de la apoptosis que hemos estudiado mediante inmunohistoquímica observamos que los niveles de Bid son los más bajas respecto al resto de muestras, siendo estos un 38% menor que las muestras suplementadas con glucosa y un 79% menor que las muestras suplementadas con glutamina, Adicionalmente posee niveles más bajos de COX IV (16% más bajos que glucosa y 8% más bajos que glutamina), y niveles más bajos de caspasa 9 (42% más bajo que glucosa y 67% más bajo que glutamina). Todo ello apuntaría hacia un fenotipo más resistente al tratamiento de camptotecina debido a la posible baja actividad de caspasa 9 y Bid a su vez que el menor número de mitocondrias también podría afectar a la efectividad del tratamiento pese a que las diferencias no son muy grandes. Si analizamos otras proteínas de la ruta como DIABLO observamos que los niveles de este se encuentran los más altos respecto al resto de muestras, siendo un 39% más altos que glucosa y un 31% más altos que glutamina; esto permitiría la liberación de caspasa 9 de la interacción con XIAP permitiendo así la amplificación de la ruta pese a que los niveles de caspasa 9 sean bajos. Por otro lado, los niveles de BCL2 no son muy altos situándose un 28% más altos que glucosa, pero un 24% más bajos que glutamina por lo que su función antiapoptótica al bloquear Bid no sería tan alta como en el caso de las muestras suplementadas con glutamina permitiendo así una ligera activación de la ruta. Todo ello pensamos que podría compensar la ruta dando lugar al fenotipo que hemos obtenido en los time-lapse.

En un ambiente con hipoxia observamos que los porcentajes se desploman hasta el 21% de supervivencia. Esto pensamos que podría ocurrir por alteraciones en los niveles

de Bid ya que altas acumulaciones de Bid podrían dar lugar a activaciones mucho más pronunciadas de la ruta intrínseca.

Una de las proteínas que estudiamos y que no se activa ni mediante la ruta intrínseca ni mediante TRAIL es Bcl-10. Bcl-10 es parte fundamental en la ruta de la apoptosis mediada por el sistema inmune, por lo tanto, alteraciones en los niveles de esta puede influir en la efectividad de los tratamientos anticancerígenos basados en CCDA (muerte celular dependiente de anticuerpos). Los niveles obtenidos son bastante similares entre las muestras suplementadas con glucosa y las muestras suplementadas con glutamina, siendo estos dos inferiores en alrededor de un 20% respecto al control de forma estadísticamente significativa. Esto podría indicar que las células tumorales que poseen un metabolismo glucolítico o dependiente de glutamina pueden desarrollar cierta resistencia a los tratamientos anticancerígenos que involucren al sistema inmune como principal agente.

En el estudio de la vía extrínseca mediante el tratamiento con TRAIL los porcentajes de supervivencia son muy diferentes. En condiciones de normoxia se pueden observar medias de supervivencia más altas en todas las muestras respecto a su contraparte tratadas con camptotecina, indicando así que estas células HeLa muestran una mayor resistencia a la activación de la apoptosis mediante la vía extrínseca. Adicionalmente hay que tener en cuenta que durante la activación de la vía extrínseca ocurre la activación de la vía intrínseca ya que caspasa 8 y 10 interaccionan con Bid transformándola en tBid y conectando así la activación simultánea de ambas vías. Si comparamos cada una de las muestras en normoxia con su contraparte observamos que las muestras suplementadas con glutamina se mantienen como las que mayor resistencia tienen al tratamiento con TRAIL, al igual que en el tratamiento con camptotecina, y con porcentajes similares (82% supervivencia camptotecina, 87% supervivencia TRAIL). Esta alta resistencia al tratamiento con TRAIL puede deberse a tanto los bajos niveles de FADD, proteína clave en la transducción de la señal proveniente de los receptores DR4 y DR5 cuando estos interaccionan con TRAIL a su vez que promueve la activación de procaspasa 8 en caspasa 8 activa; y por otro lado los altos niveles de FLIP, proteína antagonista de la interacción entre FADD y procaspasa 8 ya que posee una estructura muy similar a la procaspasa 8 y bloquea dicha interacción al sustituir a la procaspasa 8 y secuestrar a FADD. En cuanto a los niveles de FADD se puede observar que la diferencia es significativa entre todas las muestras siendo las muestras suplementadas con glutamina aquellas con una intensidad media menor de hasta un 46% respecto al control y un 23% menor respecto a glucosa; por otro lado, los niveles de FLIP aparecen hasta un 56% más altos en las

muestras suplementadas con glutamina respecto al control de manera estadísticamente significativa, y un 35% más alta respecto a glucosa siendo en este caso estadísticamente no significativa. También vemos necesario destacar que en dichas muestras aparecen niveles altos tanto de DR5 (97% respecto a control y 23% más altos respecto las muestras suplementadas con glucosa siendo ambas diferencias estadísticamente significativas) como de caspasa 8 (19% respecto a control y 9% más altos respecto las muestras suplementadas con glucosa siendo únicamente la primera diferencia estadísticamente significativa), pero debido a que los niveles tanto de FADD como de FLIP bloquearían que la señal de DR5 diera lugar a la activación de la caspasa 8 explicaría como los niveles de estos últimos acabarían sin verse reflejados en los porcentajes de supervivencia.

Al alterar las condiciones de cultivo hacia un ambiente de hipoxia observamos que los porcentajes de supervivencia en las muestras suplementadas con glutamina se alteran muy levemente, siendo en el tratamiento con 30 ng de TRAIL de un 87% en normoxia y un 79% en hipoxia. Esto pensamos que nos podría indicar que los elementos que creemos condicionan los porcentajes de supervivencia en las muestras suplementadas con glutamina (FADD y FLIP) se ven muy poco alterados en el ambiente hipóxico dando lugar a porcentajes muy similares.

FLIP (cFLAR) según la literatura es una proteína clave en la regulación de la vía extrínseca activada mediante TRAIL, algunas de las distintas isoformas de esta proteína se han visto sobreexpresadas en varios tipos de cáncer, como el cáncer cervical, el linfoma no de Hodgkin o el cáncer colorectal ²⁴ siendo este el principal factor causal de la evasión del sistema inmune por parte de las células tumorales. Por todo ello se encuentra en el punto de mira como diana en tratamientos de combinación cuyos resultados han mostrado una sensibilización del tumor a tratamientos basados en la vía extrínseca al reducir los niveles de FLIP. Algunos ejemplos serían desde el uso de ARNs pequeños de interferencia que redujeron drásticamente los niveles de FLIP y sensibilizaron las células a TRAIL ^{19 20 21 25}.

En cuanto a las muestras suplementadas con glucosa el patrón en los porcentajes de supervivencia en normoxia es el que más cambia respecto a su contraparte tratada con camptotecina, obteniendo porcentajes del 70% de supervivencia en la máxima concentración de TRAIL, mientras que en la máxima concentración de camptotecina el porcentaje de supervivencia es de un 23%. Al estudiar los niveles de las distintas proteínas de la ruta en normoxia podemos observar que en el caso de DR5 se encuentra en uno niveles intermedios respecto al resto de muestras, teniendo niveles un 74% más

altos que las muestras control pero un 23% más bajos respecto a las muestras suplementadas con glutamina; dicho evento ocurre muy similar al analizar los niveles de FADD donde tiene unos niveles medios menores que las muestras control en un 23% pero superiores a las muestras con glutamina en un 23% más. Por último, respecto a la proteína FLIP sus niveles se encuentran también a mitad de tabla, siendo un 19% más altos que control, pero un 37% menores que las muestras suplementadas con glutamina. Todos estos valores pensamos que resultan en el fenotipo que se observa en la muestra, un fenotipo ligeramente resistente pero no tanto como el fenotipo de las muestras suplementadas con glutamina, debido a que los niveles de las proteínas se compensan entre ellas dentro de la ruta dando lugar a una activación moderada de la misma. Por un lado, los altos niveles de DR5 respecto al control deberían dar lugar a una mayor activación que se puede ver reducida por unos niveles de FLIP ligeramente altos y unos niveles de FADD bajos respecto al control.

El fenotipo que aparece al realizar el cultivo en hipoxia es muy similar alterando tan solo un 1% la media de supervivencia respecto a normoxia. Al igual que en el caso de las muestras suplementadas con glutamina creemos que los niveles de DR5, FADD y FLIP no deben de alterarse mucho por el ambiente hipóxico prolongando así el mismo fenotipo. Por supuesto, debemos de analizar los valores de todas las proteínas de la ruta extrínseca en condiciones de hipoxia, que por razones de tiempo no hemos podido realizar para poder acabar este TFM en tiempo y forma.

En cuanto a las muestras control se puede observar que son aquellas que más sufren el tratamiento con TRAIL, observándose porcentajes de supervivencia del 65% a 30 ng de TRAIL, si comparamos dichos valores con los porcentajes de supervivencia a máxima concentración de camptotecina (10 μ M) estos primeros son ligeramente superiores. Centrándonos en los niveles de las proteínas que hemos analizado en normoxia para la muestra control aparecen niveles muy altos de FADD, siendo estos un 23% más altos que las muestras suplementadas con glucosa y un 46% más altos que las muestras suplementadas con glutamina; a su vez aparecen los niveles más bajos de FLIP siendo estos un 19% más bajos que las muestras suplementadas con glucosa y un 56% más bajos que las muestras suplementadas con glutamina. Debido al bajo bloqueo que generaría FLIP y a la alta capacidad que tendría FADD de interactuar con procaspasa 8 debería dar lugar a una sobre-activación de la ruta, no obstante, todo esto se ve compensado con niveles bajos de DR5 (74% menores que las muestras suplementadas con glucosa y 97% menores que las muestras suplementadas con glutamina) y niveles bajos de caspasa 8 (10% menores que las muestras suplementadas con glucosa y 19% menores que las muestras suplementadas con glutamina). Estas

compensaciones en la activación de la ruta podrían explicar el fenotipo de ligera resistencia muy similar al que ocurre en las muestras de glucosa, teniendo estas dos a su vez porcentajes de supervivencia a 30 ng de TRAIL muy similares (65% control, 70% glucosa).

Al cambiar al ambiente con hipoxia el porcentaje de supervivencia sube hasta el 74%, esta ligera subida pensamos que puede deberse a pequeñas variaciones de alguna proteína de la ruta, pero al ser de menos de un 10% no podemos asegurar que esto se deba a factores adicionales intrínsecos del propio cultivo.

Entre todas las muestras tratadas con TRAIL ha ocurrido un patrón similar, en todas ellas su fenotipo encajaba con los valores obtenidos de DR5, FADD, FLIP y caspasa 8 tanto compensándose unos a otros dando lugar a un fenotipo ligeramente resistente, como bloqueando la ruta dando lugar a un fenotipo muy resistente. A su vez, por la posición de dichas proteínas en la ruta, explicaría como aparecen unos porcentajes tan altos de supervivencia cuando la ruta extrínseca también activa la ruta intrínseca y esta se ha observado en las muestras tratadas con camptotecina que genera porcentajes de supervivencia mucho menores. La ruta intrínseca, en las muestras tratadas con TRAIL, pensamos que se activa tan solo parcialmente ya que la ruta se bloquea en niveles anteriores a la ruta intrínseca, siendo estos FADD y FLIP principalmente.

De entre todas las proteínas analizadas los niveles de MCL-1 son, junto a XIAP, los que menos información nos ha aportado respecto a la ruta. MCL-1 es una proteína antiapoptótica ubicada en la vía intrínseca de la apoptosis. Los resultados obtenidos muestran un ligero descenso en los niveles de MCL-1 entre las muestras control y el resto de muestras siendo dicha diferencia no significativa mientras que la pequeña diferencia entre los niveles de MCL-1 en las muestras de glucosa y glutamina sí que es significativa. Dicha diferencia no pensamos que no se traduce en grandes cambios en el fenotipo ya que, por un lado, no concuerdan con el fenotipo obtenido siendo las de glutamina las que deberían ser más sensibles a camptotecina en normoxia, pero a su vez obteniendo los porcentajes de supervivencia más altos, y, por otro lado, al ser cambios tan pequeños no creemos que altere mucho la efectividad de la ruta en contra de grandes cambios en los niveles de varias proteínas como es BCL2. Este aspecto no concuerda con algunos artículos, como es el estudio de Mei *et al.* (2007) ²⁶ en cuyo estudio se analiza la importancia de MCL-1 en la capacidad de apoptosis de camptotecina en las células HeLa siendo dicha proteína clave en interaccionar y bloquear a Noxa, proteína clave en la activación de la ruta intrínseca. Demostraron como bloqueos en los niveles de MCL-1 daban lugar a mayores ratios de apoptosis y bloqueos

en los niveles de MCL-1 daban lugar a menores ratios confirmando que existe un balance entre las dos proteínas que determina el destino de la célula al ser tratada con camptotecina. En nuestro estudio los niveles de MCL-1 no aparecen como eje central de la ruta mientras que los niveles de BCL2 o Bid si lo son. Otro aspecto para tener en cuenta es que en ciertos estudios ²⁶ se ha demostrado con los niveles de MCL-1 aumentan en respuesta a camptotecina por lo que los niveles de MCL-1 podrían ser los niveles base que se alterarían al contacto con el tratamiento y adquirirían esa importancia dentro la ruta. Adicionalmente pensamos que en un futuro estudio vemos pertinente estudiar los niveles de Noxa en los distintos medios ya que si estos niveles fueran muy altos explicaría como las pequeñas alteraciones en los niveles de MCL-1 no se traducen en cambios en el fenotipo. También es importante hacer notar que MCL-1 es un gen con una regulación muy compleja, tanto a nivel de transcripción, traducción, estabilidad como procesamiento alternativo del mRNA, ²⁶, se ha descrito variantes de splicing con fenotipo pro-apoptótico, contraria a la función canónica (antiapoptotica). Por las razones expuestas anteriormente los tratamientos y las condiciones de cultivo pueden influir dramáticamente en la expresión de dicho gen y cambiar el fenotipo celular. MCL-1 es un gen que deberemos estudiar en profundidad en un futuro.

Si tenemos en cuenta los datos obtenidos en los análisis de transcriptómica observamos que varios de los niveles de expresión de algunos genes coinciden a nivel inmunohistoquímico y complementan al fenotipo aparecido en los time-lapse. En el caso de BCL2, lo altos niveles de este en las muestras suplementadas con glutamina en normoxia encajan perfectamente con los niveles a nivel proteico y adicionalmente se puede observar una reducción del 50% en dichos niveles en las muestras e hipoxia por lo que confirmaría nuestra teoría de que una reducción drástica en los niveles de BCL2 podría ser uno de los principales causantes de la hipersensibilidad a la camptotecina en hipoxia por parte de las muestras suplementadas en glutamina. Adicionalmente las proteínas XRCC3, RAD51 y HELQ relacionadas con la reparación y recombinación homóloga del DNA ven reducida su expresión en un 23%, 30% y 21% respectivamente en las muestras en hipoxia respecto a normoxia ayudarían a explicar la sensibilización de las muestras a camptotecina al cambiar las condiciones de cultivo. Respecto al cambio de fenotipo en los tratamientos con TRAIL en las muestras de glutamina al cambiar de normoxia a hipoxia teorizamos que esto puede ocurrir por ligeros cambios en los niveles de FLIP o FADD que al analizarlos en el heatmap no se aprecian grandes diferencias entre las dos condiciones. En las muestras suplementadas con glucosa se observó un cambio en los porcentajes de supervivencia en el tratamiento con camptotecina al cambiar las condiciones de normoxia a hipoxia dando lugar a una

reducción en la supervivencia, nosotros achacamos dicho cambio a posibles alteraciones en los niveles de caspasa 9 o BCL2, al observar la expresión de dichos genes se puede ver como BCL2 se encuentra ligeramente sobreexpresado en glucosa normoxia mientras que en glucosa hipoxia se reduce mucho su expresión de forma estadísticamente significativa (58% menos) apoyando así la teoría que la reducción de los niveles de BCL2 es el encargado de la sensibilización a camptotecina en las muestras suplementadas con glucosa, por otro lado, los niveles de caspasa 9 no se ven prácticamente alterados entre las distintas condiciones.

En el tratamiento con TRAIL en las muestras de glucosa no observamos cambios en los porcentajes de supervivencia entre normoxia e hipoxia, si analizamos los niveles de expresión de 3 de las proteínas clave en la ruta extrínseca entre las dos condiciones se puede ver que los niveles de FADD y FLIP son bastante estables entre las dos condiciones mientras que los niveles de DR5 aumentan ligeramente en hipoxia (17% más) pero dicha diferencia no es estadísticamente significativa.

En las muestras control observamos una sensibilización al tratamiento con camptotecina al alterar las condiciones de normoxia a hipoxia atribuyéndolo a alteraciones en los niveles de DIABLO. Si comparamos los niveles de este entre las dos condiciones observamos que en 2 de las 3 muestras del triplicado de control en normoxia aparece sobreexpresado mientras que en hipoxia aparece con una expresión menor, por lo que esta alteración podría explicar el cambio en el porcentaje de supervivencia. Analizando los datos la diferencia en los niveles de expresión de DIABLO entre normoxia e hipoxia es tan solo de un 17% y no es estadísticamente significativo por lo que no podemos asignar la reducción en el porcentaje de supervivencia únicamente a la posible reducción en los niveles de DIABLO.

En el caso del tratamiento con TRAIL también observamos una ligera sensibilización en hipoxia frente a normoxia, pero los niveles de expresión de DR5 y FADD son muy similares entre las muestras de hipoxia y normoxia por lo que no serían los causantes de la sensibilización. Vemos necesario indicar que los niveles de expresión no están relacionaos con el fenotipo de forma lineal y que existen alteraciones a nivel de traducción y post-traduccionales que alteren dichos niveles. Sería necesario un estudio inmunohistoquímico de dichas proteínas en hipoxia que confirmará que los cambios en los fenotipos en los distintos medios al alterar las condiciones de normoxia a hipoxia se deben a las alteraciones en la expresión de los genes anteriormente mentados.

El análisis de otros genes que están involucrados en la ruta de la apoptosis ha mostrado que varios de ellos encajan con los fenotipos que aparecen en los time-lapse, los altos

niveles de expresión de APAF-1, CCAR, PERP y PMAIP1 en todas las muestras excepto las suplementadas con glutamina encaja con el fenotipo resistente a la apoptosis observado en ambas vías en normoxia ya que todos estos genes son proapoptóticos. A su vez AATF, proteína antiapoptótico, muestra sus niveles más altos en glutamina (diferencias de hasta un 70% entre muestras) o que ayudaría a confirmar la relación entre estos genes y el fenotipo final. Junto a esto aparecen dos genes que permiten diferenciar glutamina en normoxia e hipoxia, AVEN y Bok, genes pro y antiapoptóticos respectivamente y cuyos niveles aparecen más altos en glutamina hipoxia en alrededor de un 30%. Debido a sus funciones contrarias no nos permite esclarecer si estos influyen en la diferencia en el fenotipo entre las dos condiciones. Adicionalmente hemos observado que los niveles de los dos receptores señuelo (DcR1 y DcR2) no son especialmente altos y prácticamente en ninguna comparación son estadísticamente significativos por lo que pensamos que no tienen tanta importancia a la hora de influir en el bloqueo de la ruta extrínseca o que su nivel de expresión se ve altamente ligado al contacto con el tratamiento TRAIL y es por eso que los niveles no son muy elevados en nuestras muestras.

Los cambios de fenotipo entre muestras no solo se pueden observar a nivel transcriptómico o proteómico sino también con los resultados obtenidos tras calcular las LD50. En las muestras analizadas se puede observar que, en el caso del tratamiento con camptotecina la sensibilidad a este está influenciada por las condiciones de hipoxia a normoxia reduciéndose el LD50 de las muestras de glucosa en normoxia de 3,2135 μM a 2,0126 μM .

Adicionalmente los valores de LD50 muestran también como el medio afecta a la respuesta frente a camptotecina habiendo una diferencia de 4,417 μM de camptotecina entre la muestra del medio aparentemente más resistente a camptotecina en hipoxia, el medio control, con el medio aparentemente más sensible a camptotecina en hipoxia, el medio suplementado con glutamina, una diferencia del 83,35%.

El análisis detallado de las cinéticas de muerte de las células crecidas en medio con glucosa y tratadas con camptotecina, mostro la existencia de dos patrones de muerte, unas células que se mueren rápidamente y otra población que se muere más lentamente. Este resultado es interesante y requiere ser explorado en profundidad.

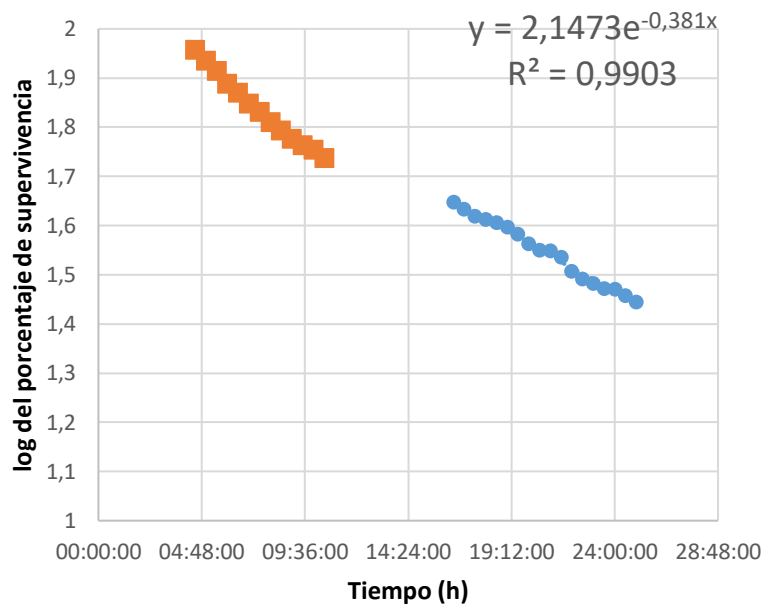


Figura 19. Logaritmo del porcentaje de supervivencia frente al tiempo.

Logaritmo en base 10 de los porcentajes de supervivencia en las muestras suplementadas con glucosa y tratadas con camptotecina 10 μ M frente al tiempo (horas).

Al representar el logaritmo en base 10 del porcentaje de supervivencia frente al tiempo observamos dos tendencias, la primera de ellas encajaría con una población celular que fuera más sensible al tratamiento con camptotecina y por ello muriera antes y con mayor velocidad mientras que la segunda población tendría cierta resistencia los que provocaría que muriera más tarde y más lento. Todo ello se puede observar con los valores de las vidas medias donde el valor de la primera subpoblación es 8h aprox mientras que el de la segunda subpoblación es de 12 h aprox. Este resultado, inesperado, será investigado en un futuro.

La sensibilidad o resistencia al tratamiento puede deberse a muchos factores, desde el número de mitocondrias ²⁷ hasta niveles de expresión de proteínas encargadas de la reparación del DNA; y es por ello que vemos pertinentes estudios adicionales sobre la adquisición de resistencias a tratamientos proapoptóticos en distintas subpoblaciones dentro de un cultivo. Los resultados obtenidos muestran como en el caso de la ruta intrínseca el medio suplementado con glutamina da lugar a un fenotipo más resistente mientras que el medio suplementado con glucosa da lugar a un fenotipo más sensible respecto al control. Al cambiar las condiciones a hipoxia se pierde toda la resistencia en las muestras de glutamina y se sensibilizan aún más tanto el control como las muestras

de glucosa. Adicionalmente en los resultados obtenidos en el estudio de la ruta extrínseca las muestras con glutamina vuelven a presentar el fenotipo más resistente seguidas de las muestras de glucosa cuyo fenotipo también da lugar a cierta resistencia respecto al control. Al alterar dichas condiciones a ambiente hipóxico ocurre una ligera sensibilización general pero la resistencia a la ruta extrínseca se mantiene en las muestras de glucosa y glutamina respecto al control. Todas estas alteraciones en el fenotipo encajan con cambios en los niveles de proteínas involucradas en la apoptosis y que explican el fenotipo obtenido, a su vez también encaja con muchos de los niveles de expresión a nivel de RNA de dichas proteínas. Por lo tanto, se ha podido observar como el microambiente tumoral influye y mucho en la resistencia o sensibilidad del cultivo al medio por lo que estudios previos del microambiente tumoral en pacientes nos permitiría ajustar el tratamiento hacia aquel cuyo microambiente le provoque mayor sensibilidad aumentando la eficacia, disminuyendo el tiempo de tratamiento general y reduciendo los posibles efectos secundarios. Vemos necesarios más estudios en este ámbito que, siguiendo esta metodología o similar, permita clasificar distintos microambientes tumorales de cada tipo de tumor y como en estos se sensibilizan o se hagan resistentes distintos tratamientos.

6. CONCLUSIONES

1. Las condiciones de cultivo, tanto a nivel de composición del medio, como a nivel de si se encuentran en un ambiente de hipoxia o normoxia afectan en los niveles de varias proteínas participantes en la ruta de la apoptosis.
2. Estas alteraciones dan lugar a fenotipos más sensibles o más resistentes a tanto tratamientos dirigidos a la vía extrínseca como a la vía intrínseca, siendo las células crecidas en glutamina las que mayor resistencia poseen a ambos tratamientos en normoxia.
3. Las condiciones de cultivo de normoxia e hipoxia pueden alterar notablemente el fenotipo resistente, como ocurre en el caso de las células crecidas en glutamina cuya resistencia a camptotecina se pierde totalmente al cambiar de un ambiente en normoxia a hipoxia.
4. El medio suplementado con glucosa da lugar al fenotipo más sensible a los tratamientos que afectan a la vía intrínseca y a la par que las condiciones control en los tratamientos que afectan a la vía extrínseca.
5. Con los datos de los fenotipos obtenidos y como estos se correlacionan con los distintos niveles de proteínas de la ruta de la apoptosis tanto a nivel transcriptómico como proteómico concluimos que, si es posible clasificar los tumores en función de su microambiente tumoral y su correspondiente sensibilidad a distintos tratamientos, y así dirimir el tratamiento adecuado para cada caso

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Xu, X., Lai, Y., & Hua, Z. C. (2019). Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience reports*, 39(1), BSR20180992. <https://doi.org/10.1042/BSR20180992>
2. Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
3. Kerr, J., Wyllie, A. & Currie, A. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239–257 (1972). <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>
4. Zhong, H. H., Wang, H. Y., Li, J., & Huang, Y. Z. (2019). TRAIL-based gene delivery and therapeutic strategies. *Acta pharmacologica Sinica*, 40(11), 1373–1385. <https://doi.org/10.1038/s41401-019-0287-8>
5. von Karstedt, S., Montinaro, A., & Walczak, H. (2017). Exploring the TRAILs less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy. *Nature reviews. Cancer*, 17(6), 352–366. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.28>
6. Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
7. Johnstone, R. W., Frew, A. J., & Smyth, M. J. (2008). The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nature reviews. Cancer*, 8(10), 782–798. <https://doi.org/10.1038/nrc2465>
8. Truneh, A., Sharma, S., Silverman, C., Khandekar, S., Reddy, M. P., Deen, K. C., McLaughlin, M. M., Srinivasula, S. M., Livi, G. P., Marshall, L. A., Alnemri, E. S., Williams, W. V., & Doyle, M. L. (2000). Temperature-sensitive differential affinity of TRAIL for its receptors. DR5 is the highest affinity receptor. *The Journal of biological chemistry*, 275(30), 23319–23325. <https://doi.org/10.1074/jbc.M910438199>
9. Modificado desde “Apoptosis Extrinsic and Intrinsic Pathways”, por BioRender.com (2020). Obtenido desde: <https://app.biorender.com/biorender-templates>
10. Lemke, J., von Karstedt, S., Zingrebe, J., & Walczak, H. (2014). Getting TRAIL back on track for cancer therapy. *Cell death and differentiation*, 21(9), 1350–1364. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.81>
11. Kojima, Y., Nakayama, M., Nishina, T., Nakano, H., Koyanagi, M., Takeda, K., Okumura, K., & Yagita, H. (2011). Importin β 1 protein-mediated nuclear localization of death receptor 5 (DR5) limits DR5/tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced cell death of human tumor cells. *The Journal of biological chemistry*, 286(50), 43383–43393. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.309377>

12. Wong, S., Kong, W. Y., Fang, C. M., Loh, H. S., Chuah, L. H., Abdullah, S., & Ngai, S. C. (2019). The TRAIL to cancer therapy: Hindrances and potential solutions. *Critical reviews in oncology/hematology*, 143, 81–94. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2019.08.008>
13. Twomey, J. D., Kim, S. R., Zhao, L., Bozza, W. P., & Zhang, B. (2015). Spatial dynamics of TRAIL death receptors in cancer cells. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 19, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2015.02.001>
14. Pal, S., Amin, P. J., Sainis, K. B., & Shankar, B. S. (2016). Potential Role of TRAIL in Metastasis of Mutant KRAS Expressing Lung Adenocarcinoma. *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society*, 9(2-3), 77–84. <https://doi.org/10.1007/s12307-016-0184-3>
15. de Wilt, L. H., Kroon, J., Jansen, G., de Jong, S., Peters, G. J., & Kruyt, F. A. (2013). Bortezomib and TRAIL: a perfect match for apoptotic elimination of tumour cells?. *Critical reviews in oncology/hematology*, 85(3), 363–372. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2012.08.001>
16. Dianat-Moghadam, H., Heidarifard, M., Mahari, A., Shahgolzari, M., Keshavarz, M., Nouri, M., & Amoozgar, Z. (2020). TRAIL in oncology: From recombinant TRAIL to nano- and self-targeted TRAIL-based therapies. *Pharmacological research*, 155, 104716. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104716>
17. Wang, H., Davis, J. S., & Wu, X. (2014). Immunoglobulin Fc domain fusion to TRAIL significantly prolongs its plasma half-life and enhances its antitumor activity. *Molecular cancer therapeutics*, 13(3), 643–650. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0645>
18. Müller, N., Schneider, B., Pfizenmaier, K., & Wajant, H. (2010). Superior serum half life of albumin tagged TNF ligands. *Biochemical and biophysical research communications*, 396(4), 793–799. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.04.134>
19. Safa, A. R., Day, T. W., & Wu, C. H. (2008). Cellular FLICE-like inhibitory protein (C-FLIP): a novel target for cancer therapy. *Current cancer drug targets*, 8(1), 37–46. <https://doi.org/10.2174/156800908783497087>
20. Sharp, D. A., Lawrence, D. A., & Ashkenazi, A. (2005). Selective knockdown of the long variant of cellular FLICE inhibitory protein augments death receptor-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 280(19), 19401–19409. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413962200>
21. White, S. J., Lu, P., Keller, G. M., & Voelkel-Johnson, C. (2006). Targeting the short form of cFLIP by RNA interference is sufficient to enhance TRAIL sensitivity in PC3 prostate carcinoma cells. *Cancer biology & therapy*, 5(12), 1618–1623. <https://doi.org/10.4161/cbt.5.12.3352>

22. Dianat-Moghadam, H., Heidarifard, M., Mahari, A., Shahgolzari, M., Keshavarz, M., Nouri, M., & Amoozgar, Z. (2020). TRAIL in oncology: From recombinant TRAIL to nano- and self-targeted TRAIL-based therapies. *Pharmacological research*, 155, 104716. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104716>
23. Lemke, J., von Karstedt, S., Abd El Hay, M., Conti, A., Arce, F., Montinaro, A., Papenfuss, K., El-Bahrawy, M. A., & Walczak, H. (2014). Selective CDK9 inhibition overcomes TRAIL resistance by concomitant suppression of cFlip and MCL-1. *Cell death and differentiation*, 21(3), 491–502. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.179>
24. Refaat, A., Abd-Rabou, A., & Reda, A. (2014). TRAIL combinations: The new 'trail' for cancer therapy (Review). *Oncology letters*, 7(5), 1327–1332. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.1922>
25. Safa A. R. (2012). c-FLIP, a master anti-apoptotic regulator. *Experimental oncology*, 34(3), 176–184.
26. Mei, Y., Xie, C., Xie, W., Tian, X., Li, M., & Wu, M. (2007). Noxa/MCL-1 balance regulates susceptibility of cells to camptothecin-induced apoptosis. *Neoplasia (New York, N. Y.)*, 9(10), 871–881. <https://doi.org/10.1593/neo.07589>
27. Márquez-Jurado, S., Díaz-Colunga, J., das Neves, R. P., Martínez-Lorente, A., Almazán, F., Guantes, R., & Iborra, F. J. (2018). Mitochondrial levels determine variability in cell death by modulating apoptotic gene expression. *Nature communications*, 9(1), 389. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02787-4>

8. ANEXOS

Tabla 2. Tabla con los datos del time-lapse de las células control en normoxia con camptotecina.

Tabla donde se muestran los valores respecto al promedio de tiempo entre posiciones, el promedio de los porcentajes de células vivas y muertas entre posiciones, y el promedio del número de células entre posiciones; para cada tratamiento de camptotecina en las células cultivadas en medio completo en normoxia.

Tratamiento	Promedio tiempo control	Promedio % vivas control	Promedio % muertas control	Promedio número células
Control	836,524	97,618	2,382	332
1 μ M	642,365	93,518	6,482	167
5 μ M	683,111	74,552	25,448	145
10 μ M	576,567	61,872	38,077	164

Tabla 3. Tabla con los datos del time-lapse de las células crecidas en glucosa en normoxia con camptotecina

Tabla donde se muestran los valores respecto al promedio de tiempo entre posiciones, el promedio de los porcentajes de células vivas y muertas entre posiciones, y el promedio del número de células entre posiciones; para cada tratamiento de camptotecina en las células sembradas en medio suplementado con glucosa en normoxia.

Tratamiento	Promedio tiempo glucosa	Promedio % vivas glucosa	Promedio % muertas glucosa	Promedio número células
Control	932,396	93,354	6,967	224
1 μ M	882,121	79,459	20,541	147
5 μ M	639,910	27,861	72,139	135
10 μ M	603,885	23,184	76,816	142

Tabla 4. Tabla con los datos del time-lapse de las células crecidas en glutamina en normoxia con camptotecina.

Tabla donde se muestran los valores respecto al promedio de tiempo entre posiciones, el promedio de los porcentajes de células vivas y muertas entre posiciones, y el promedio del número de células entre posiciones; para cada tratamiento de camptotecina en las células sembradas en medio suplementado con glutamina en normoxia.

Tratamiento	Promedio tiempo glutamina	Promedio % vivas glutamina	Promedio % muertas glutamina	Promedio número células
Control	981,500	98,700	1,300	181
1 μ M	932,050	90,516	9,484	143
5 μ M	703,810	84,601	15,399	101
10 μ M	689,521	82,262	17,738	110

Tabla 5. Tabla con los datos del time-lapse de las células control en hipoxia con camptotecina.

Tabla donde se muestran los valores respecto al promedio de los porcentajes de células vivas y muertas entre posiciones, y el promedio del número de células entre posiciones; para cada tratamiento de camptotecina en las células sembradas en medio completo en hipoxia.

Tratamiento	Promedio % vivas control	Promedio % muertas control	Promedio número células control
Control	94,59	5,41	369,6
1 mM	85,25	14,75	322,8
5 mM	47,83	52,17	359,8
10 mM	30,72	69,28	286,5

Tabla 6. Tabla con los datos del time-lapse de las células crecidas en glucosa en hipoxia con camptotecina.

Tabla donde se muestran los valores respecto al promedio de los porcentajes de células vivas y muertas entre posiciones, y el promedio del número de células entre posiciones; para cada tratamiento de camptotecina en las células sembradas en medio suplementado con glucosa en hipoxia.

Tratamiento	Promedio % vivas glucosa	Promedio % muertas glucosa	Promedio número células glucosa
Control	92,27	7,73	297,6
1 mM	66,11	33,89	166,4
5 mM	22,93	77,07	219,8
10 mM	6,02	93,98	179,5

Tabla 7. Tabla con los datos del time-lapse de las células crecidas en glutamina en hipoxia con camptotecina.

Tabla donde se muestran los valores respecto al promedio de los porcentajes de células vivas y muertas entre posiciones, y el promedio del número de células entre posiciones; para cada tratamiento de camptotecina en las células sembradas en medio suplementado con glutamina en hipoxia.

Tratamiento	Promedio % vivas glutamina	Promedio % muertas glutamina	Promedio número células glutamina
Control	84,15	15,85	223,4
1 mM	29,31	70,69	182,3
5 mM	0	100	100
10 mM	0	100	100

Tabla 8. Tabla con los datos del time-lapse de las células control en normoxia con TRAIL.

Tabla donde se muestran los valores respecto al promedio de tiempo entre posiciones, el promedio de los porcentajes de células vivas y muertas entre posiciones, y el promedio del número de células entre posiciones; para cada tratamiento de TRAIL en las células cultivadas en medio completo en normoxia.

Tratamiento	Promedio tiempo control	Promedio % vivas control	Promedio % muertas control	Promedio número células
Control	874,415	93,840	6,160	261
7,5 ng	658,827	82,134	17,866	237
15 ng	662,336	74,936	25,064	209
30 ng	543,571	65,895	34,105	186

Tabla 9. Tabla con los datos del time-lapse de las células crecidas en glucosa en normoxia con TRAIL.

Tabla donde se muestran los valores respecto al promedio de tiempo entre posiciones, el promedio de los porcentajes de células vivas y muertas entre posiciones, y el promedio del número de células entre posiciones; para cada tratamiento de TRAIL en las células sembradas en medio suplementado con glucosa en normoxia.

Tratamiento	Promedio tiempo glucosa	Promedio % vivas glucosa	Promedio % muertas glucosa	Promedio número células
Control	919,268	94,018	5,982	212
7,5 ng	827,290	87,678	12,322	230
15 ng	709,109	80,402	19,598	228
30 ng	617,751	70,517	29,483	181

Tabla 10. Tabla con los datos del time-lapse de las células crecidas en glutamina en normoxia con TRAIL.

Tabla donde se muestran los valores respecto al promedio de tiempo entre posiciones, el promedio de los porcentajes de células vivas y muertas entre posiciones, y el promedio del número de células entre posiciones; para cada tratamiento de TRAIL en las células sembradas en medio suplementado con glutamina en normoxia.

Tratamiento	Promedio tiempo glutamina	Promedio % vivas glutamina	Promedio % muertas glutamina	Promedio número células
Control	827,917	97,944	2,056	156
7,5 ng	833,714	97,286	2,714	165
15 ng	776,861	95,049	4,951	143
30 ng	836,810	87,906	12,094	137

Tabla 11. Tabla con los datos del time-lapse de las células control en hipoxia con TRAIL.

Tabla donde se muestran los valores respecto al promedio de los porcentajes de células vivas y muertas entre posiciones, y el promedio del número de células entre posiciones; para cada tratamiento de TRAIL en las células sembradas en medio completo en hipoxia.

Tratamiento	Promedio % vivas control	Promedio % muertas control	Promedio número células control
Control	93,62	6,38	269,4
7,5 ng	90,05	9,95	243,3
15 ng	89,35	10,65	284,5
30 ng	74,19	25,81	207,7

Tabla 12. Tabla con los datos del time-lapse de las células crecidas en glucosa en hipoxia con TRAIL.

Tabla donde se muestran los valores respecto al promedio de los porcentajes de células vivas y muertas entre posiciones, y el promedio del número de células entre posiciones; para cada tratamiento de TRAIL en las células sembradas en medio suplementado con glucosa en hipoxia.

Tratamiento	Promedio % vivas glucosa	Promedio % muertas glucosa	Promedio número células glucosa
Control	91,01	8,99	192,5
7,5 ng	90,67	9,33	190,8
15 ng	84,71	15,29	239,3
30 ng	69,83	30,17	156,8

Tabla 13. Tabla con los datos del time-lapse de las células crecidas en glutamina en hipoxia con TRAIL.

Tabla donde se muestran los valores respecto al promedio de los porcentajes de células vivas y muertas entre posiciones, y el promedio del número de células entre posiciones; para cada tratamiento de TRAIL en las células sembradas en medio suplementado con glutamina en hipoxia.

Tratamiento	Promedio % vivas glutamina	Promedio % muertas glutamina	Promedio número células glutamina
Control	78,36	21,64	204,3
7,5 ng	83,19	16,81	154,1
15 ng	72,66	27,34	219,8
30 ng	79,43	20,57	195,9

Tabla 14. Tabla donde se muestran los p-valor entre los tiempos de muerte entre las distintas concentraciones de camptotecina en medio control.

Medio -Tratamiento	Medio completo Control	Control 1 μM	Control 5 μM	Control 10 μM
Control Medio Normal	x	x	x	x
Control 1 μM	0,005708611	x	x	x
Control 5 μM	0,012504234	0,192224442	x	x
Control 10 μM	0,000569337	0,060008431	0,000149184	x

Tabla 15. Tabla donde se muestran los p-valor entre los tiempos de muerte entre las distintas concentraciones de camptotecina en medio suplementado con glucosa.

Medio -Tratamiento	Glucosa Control	Glucosa 1 μM	Glucosa 5 μM	Glucosa 10 μM
Glucosa Control	x	x	x	x
Glucosa 1 μM	0,08642552	x	x	x
Glucosa 5 μM	2,53437E-17	5,25371E-20	x	x
Glucosa 10 μM	1,35207E-19	4,46861E-24	0,160963033	x

Tabla 16. Tabla donde se muestran los p-valor entre los tiempos de muerte entre las distintas concentraciones de camptotecina en medio suplementado con glutamina.

Medio - Tratamiento	Glutamina Control	Glutamina 1 μM	Glutamina 5 μM	Glutamina 10 μM
Glutamina Control	x	x	x	x
Glutamina 1 μM	0,218569768	x	x	x
Glutamina 5 μM	0,002013862	1,02414E-05	x	x
Glutamina 10 μM	0,000543446	7,59312E-09	0,22611657	x

Tabla 17. Tabla donde se muestran los p-valor entre los tiempos de muerte entre las distintas concentraciones de TRAIL en medio control.

Medio - Tratamiento	Medio completo Control	Control 7,5 ng	Control 15 ng	Control 30 ng
Control Control	x	x	x	x
Control 7,5 ng	5,84728E-06	x	x	x
Control 15 ng	2,75718E-05	0,245836308	x	x
Control 30 ng	1,17963E-10	0,00248515	6,64326E-05	x

Tabla 18. Tabla donde se muestran los p-valor entre los tiempos de muerte entre las distintas concentraciones de TRAIL en medio suplementado con glucosa.

Medio -Tratamiento	Glucosa Control	Glucosa 7,5 ng	Glucosa 15 ng	Glucosa 30 ng
Glucosa Control	x	x	x	x
Glucosa 7,5 ng	0,020429625	x	x	x
Glucosa 15 ng	4,97471E-05	0,010190871	x	x
Glucosa 30 ng	1,56284E-09	5,03527E-08	0,000445856	x

Tabla 19. Tabla donde se muestran los p-valor entre los tiempos de muerte entre las distintas concentraciones de TRAIL en medio suplementado con glutamina.

Medio - Tratamiento	Glutamina Control	Glutamina 7,5 ng	Glutamina 15 ng	Glutamina 30 ng
Glutamina Control	x	x	x	x
Glutamina 7,5 ng	0,340194594	x	x	x
Glutamina 15 ng	0,096275324	0,197501583	x	x
Glutamina 30 ng	0,049485862	0,125694954	0,412722695	x

Tabla 20. Tabla donde se muestran los p-valor entre las intensidades de fluorescencia obtenidas de cada proteína al comparar los distintos medios.

Proteína	Control-Glucosa	Control-Glutamina	Glucosa-Glutamina
Cas8	0,064099902	0,023161085	0,158046724
BCL2	0,000415924	0,016953872	6,24161E-05
DR5	8,73324E-05	3,7509E-06	0,030846102
BID	0,000269277	1,31339E-07	1,74311E-05
BCL10	0,004985602	0,013218473	0,498631657
Cas9	0,018646194	0,012561325	0,195622097
XIAP	0,389144693	0,256839925	0,120629518
FLIP	0,052891111	4,69287E-05	0,00068197
COX IV	0,007102205	0,047591802	0,097089049
DIABLO	0,017250155	0,029935894	0,187918068
AIF	0,485889377	5,24131E-09	0,000145073
FADD	0,012038003	0,000121497	0,002305558
MCL1	0,178593015	0,056287387	0,031025754

Tabla 21. Tabla donde se muestran los valores de intensidad de fluorescencia obtenidos de cada proteína ajustados respecto al control junto a su desviación estándar.

	Control	Glucosa	Glutamina
Media Cas8 ± SD	1 ± 0,182	1,106 ± 0,144	1,193 ± 0,231
Media BCL2 ± SD	1 ± 0,199	0,724 ± 0,139	1,243 ± 0,277
Media DR5 ± SD	1 ± 0,319	1,740 ± 0,251	1,972 ± 0,319
Media BID ± SD	1 ± 0,199	1,390 ± 0,188	1,798 ± 0,198
Media BCL10 ± SD	1 ± 0,106	0,851 ± 0,125	0,851 ± 0,161
Media Cas9 ± SD	1 ± 0,355	1,423 ± 0,474	1,674 ± 0,763
Media XIAP ± SD	1 ± 0,273	1,03 ± 0,111	0,913 ± 0,279
Media FLIP ± SD	1 ± 0,294	1,190 ± 0,227	1,565 ± 0,288
Media COX IV ± SD	1 ± 0,127	1,161 ± 0,156	1,084 ± 0,123
Media DIABLO ± SD	1 ± 0,51	0,613 ± 0,26	0,69 ± 0,045
Media AIF ± SD	1 ± 0,253	0,993 ± 0,656	1,956 ± 0,275
Media FADD ± SD	1 ± 0,282	0,777 ± 0,113	0,549 ± 0,208
Media MCL1 ± SD	1 ± 0,459	0,87 ± 0,099	0,763 ± 0,152