

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA MÉDICA Y BIOFÍSICA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA



**QUIMIOSENSIBILIZACIÓN DEL CÁNCER UROTELIAL
MÚSCULO-INVASIVO: BLOQUEO DE DIFERENTES
VÍAS DE SUPERVIVENCIA CELULAR**

Rocío Jiménez Guerrero

Graduada en Bioquímica

Tesis doctoral

Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS)

Sevilla, 2021



Dra. Carmen Sáez Torres y Dr. Miguel Ángel Japón Rodríguez,

CERTIFICAN:

Que el trabajo experimental presentado en esta memoria para optar al título de Doctor en Biología Molecular, Biomedicina e Investigación Clínica por la Universidad de Sevilla titulado **“Quimiosensibilización del cáncer urotelial músculo-invasivo: bloqueo de diferentes vías de supervivencia celular”** ha sido realizado por Rocío Jiménez Guerrero en el grupo de Señalización y Muerte celular en Cáncer del área de Oncohematología y Genética del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS) bajo la dirección de la Dra. Carmen Sáez Torres y el Dr. Miguel Ángel Japón Rodríguez, y bajo la tutela académica de la Dra. Miriam Echevarría Irusta.

Fdo. Rocío Jiménez Guerrero

Fdo. Carmen Sáez Torres

Fdo. Miguel Ángel Japón Rodríguez

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
RESUMEN.....	XI
ABREVIATURAS.....	XV
INTRODUCCIÓN.....	1
1. Cáncer	3
2. Cáncer de vejiga.....	3
2.1. Epidemiología del cáncer de vejiga.....	3
2.2. Clasificación del cáncer de vejiga	4
2.3. Tratamiento del cáncer de vejiga	6
3. Quimioterapia basada en platinos	7
3.1. Mecanismos de reparación del ADN.....	8
4. Quimioterapia basada en taxanos.....	10
4.1. Microtúbulos como diana farmacológica	10
4.2. Fármacos antimitóticos: taxanos.....	11
4.3. Fármacos dirigidos a microtúbulos y parada del ciclo celular.....	12
5. Apoptosis	14
5.1. Vía apoptótica extrínseca o de receptores de muerte	15
5.2. Vía apoptótica intrínseca o mitocondrial	15
6. Células madre tumorales.....	18
6.1. Marcadores de CSCs	19
6.2. Vía Wnt/ β -catenina.....	20
7. Degradación de proteínas	22
7.1. Autofagia	22
7.2. Proteasoma	23
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS	31
1. Cultivo de líneas celulares.....	33
1.1. Líneas celulares	33
1.2. Congelación y descongelación de células	34
1.3. Tripsinización.....	34

2.	Ensayos celulares	34
2.1.	Tratamiento con fármacos.....	34
2.2.	Ensayos de citotoxicidad	35
2.3.	Ensayos de silenciamiento y sobreexpresión génica transitoria.....	35
2.4.	Ensayos de formación de tumoresferas.....	36
3.	Citometría de flujo (FACS)	36
3.1.	Análisis de ciclo celular	36
3.2.	Análisis de marcadores de células madre.....	37
4.	Hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH).....	37
5.	Técnicas de análisis del flujo autofágico	37
5.1.	Análisis del flujo autofágico mediante inmunofluorescencia	38
5.2.	Análisis del flujo autofágico por citometría de flujo	38
6.	Técnicas de análisis de expresión a nivel de ARNm	38
6.1.	Extracción de ARN total	38
6.2.	Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).....	38
6.3.	PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR).....	39
7.	Técnicas de análisis de expresión a nivel de proteínas.....	39
7.1.	Anticuerpos.....	39
7.2.	Extracción de proteínas total.....	41
7.3.	Inmunodetección de proteínas o <i>western blot</i>	42
7.4.	Ensayos de co-inmunoprecipitación.....	43
7.5.	Análisis de Inmunofluorescencia	43
8.	Muestras y datos de pacientes.....	44
8.1.	Cohortes de pacientes.....	44
8.2.	Estudio inmunohistoquímico	44
9.	Estudio comparativo de los perfiles de expresión	45
9.1.	<i>Microarrays</i> génicos de expresión.....	45
9.2.	Validación por RT-PCR	46
10.	Análisis estadístico	46
	RESULTADOS	47
1.	Obatoclax y paclitaxel inducen apoptosis y bloqueo del flujo autofágico en cáncer de vejiga.....	49

1.1.	Caracterización de la respuesta a paclitaxel en líneas celulares de cáncer de vejiga músculo-invasivo.....	49
1.2.	Estudio de la expresión de Mcl-1 en muestras clínicas de cáncer de vejiga	52
1.3.	Sensibilización al tratamiento quimioterápico mediante la combinación de obatoclax y paclitaxel.....	53
1.4.	Estudio del mecanismo de sensibilización al tratamiento combinado	57
2.	La vía Wnt/ β -catenina induce resistencia a paclitaxel a través de un fenotipo CSC en cáncer de vejiga.....	67
2.1.	Caracterización del papel de β -catenina en la respuesta a paclitaxel	67
2.2.	El inhibidor farmacológico de la vía Wnt/ β -catenina XAV939 sensibiliza a la apoptosis inducida por paclitaxel en la línea celular HT1197.....	71
2.3.	Las tumoresferas derivadas de la línea celular 5637 muestran mayores niveles de β -catenina y resistencia a paclitaxel	73
2.4.	Análisis de expresión inmunohistoquímica de β -catenina, ALDH1A1 y Sox-2 en tejidos de pacientes con CVMI	76
3.	SCF $^{\beta$ -TrCP y las proteínas de reparación BRCA1 y CtIP pueden estar relacionadas en la respuesta a cisplatino	78
3.1.	La sobreexpresión de proteínas que participan en las vías de recombinación homóloga (HR) está implicada en la adquisición de resistencia a cisplatino	78
3.2.	El sistema de degradación de proteínas SCF $^{\beta$ -TrCP está implicado en la respuesta a cisplatino	82
3.3.	β -TrCP podría regular la degradación de BRCA1 y CtIP	89
4.	Identificación de genes diferencialmente expresados en el cáncer de vejiga músculo-invasivo	91
4.1.	Análisis de expresión diferencial con <i>microarray</i> de <i>Affymetrix</i>	91
4.2.	Validación de los análisis de <i>microarrays</i> mediante RT-qPCR.....	94
	DISCUSIÓN.....	97
1.	Mecanismos de resistencia al tratamiento con paclitaxel	99
1.1.	Mcl-1 como diana terapéutica	99
1.2.	Vía Wnt/ β -catenina como diana terapéutica	105
2.	Mecanismos de resistencia al tratamiento con cisplatino	108
3.	Identificación de biomarcadores de respuesta a la quimioterapia en el carcinoma de vejiga.....	112
	CONCLUSIONES.....	115

BIBLIOGRAFÍA.....	119
ANEXOS.....	141
1. Datos suplementarios.....	143
2. Recetas.....	147
3. Contribuciones científicas.....	149
3.1. Publicaciones científicas	149
3.2. Contribuciones a congresos.....	149

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características comunes de las células tumorales.....	3
Figura 2. Vías de reparación de las DSBs en las células eucariotas.	9
Figura 3. Estructura de los microtúbulos.....	11
Figura 4. Respuesta celular ante el tratamiento con fármacos antimitóticos.	13
Figura 5. Esquema de las vías apoptóticas intrínseca o mitocondrial y extrínseca o de receptores de muerte.	16
Figura 6. Esquema de la vía canónica de señalización Wnt.	21
Figura 7. Representación esquemática del proceso de ubiquitilación de proteínas.....	24
Figura 8. Las líneas celulares 5637 y HT1197 presentan diferente sensibilidad ante el tratamiento con paclitaxel.....	50
Figura 9. Las líneas celulares 5637 y HT1197 realizan deslizamiento mitótico tras el tratamiento con paclitaxel.....	52
Figura 10. La expresión de Mcl-1 en pacientes se correlaciona con la invasión y progresión tumoral.....	53
Figura 11. Determinación de las dosis y tiempos de administración del tratamiento combinado entre obatoclax y paclitaxel.....	55
Figura 12. El tratamiento combinado del inhibidor de Mcl-1 obatoclax y paclitaxel induce apoptosis en la línea celular HT1197.....	56
Figura 13. Obatoclax induce un bloqueo eficiente del flujo autofágico en la línea celular 5637, pero no en la HT1197.....	58
Figura 14. La combinación de obatoclax y paclitaxel induce bloqueo del flujo autofágico en las líneas celulares 5637 y HT1197.....	59
Figura 15. La rotura de Beclina-1 es dependiente de caspasa 3 e induce bloqueo del flujo autofágico y apoptosis.....	60
Figura 16. El bloqueo del flujo autofágico se correlaciona con la muerte celular por apoptosis.....	62
Figura 17. Obatoclax induce parada en fase S, y retraso en la progresión del ciclo celular en combinación con paclitaxel.	64
Figura 18. Las combinaciones de obatoclax y paclitaxel promueven la apoptosis en la línea celular HT1376 resistente al paclitaxel.	65
Figura 19. La combinación de obatoclax y paclitaxel inhibe el deslizamiento mitótico en la línea celular HT1376.	66
Figura 20. La línea celular HT1197 presenta un enriquecimiento de la vía Wnt/ β -catenina y del fenotipo de célula madre.	68

Figura 21. La activación de la vía Wnt/ β -catenina y el fenotipo de célula madre podría controlar la respuesta a paclitaxel.	69
Figura 22. β -catenina regula la resistencia a paclitaxel.	70
Figura 23. El inhibidor farmacológico XAV939 sensibiliza a la línea celular HT1197 a la apoptosis inducida por paclitaxel a través de la inhibición de la vía de señalización Wnt/ β -catenina.	72
Figura 24. Generación de la línea celular 5637R resistente a paclitaxel.	73
Figura 25. β -catenina promueve la resistencia a paclitaxel y la proliferación de tumoresferas en el cáncer de vejiga.	75
Figura 26. Expresión inmunohistoquímica de β -catenina, ALDH1A1 y Sox-2 en pacientes con CVMI.	76
Figura 27. Expresión endógena de proteínas implicadas en HR en líneas celulares de cáncer de mama, vejiga y ovario.	79
Figura 28. Caracterización de la respuesta a cisplatino en líneas celulares de cáncer de vejiga, mama y ovario.	81
Figura 29. BRCA1 regula la respuesta a cisplatino en la línea celular HT1376.	82
Figura 30. Niveles de expresión del gen β -TrCP en líneas celulares de cáncer de mama, vejiga y ovario.	83
Figura 31. Generación de las líneas celulares HT1376 HA- β -TrCP y HT1376 HA- β -TrCP Δ F..	84
Figura 32. β -TrCP regula la respuesta a cisplatino en líneas celulares de cáncer de vejiga.	86
Figura 33. β -TrCP provoca un retraso en la reparación del daño al ADN tras el tratamiento con cisplatino.	88
Figura 34. β -TrCP provoca un retraso en la eliminación de los focos de γ H2AX ^{Ser139} tras el tratamiento con cisplatino.	89
Figura 35. BRCA1 y CtIP podrían ser nuevos sustratos de β -TrCP.	90
Figura 36. Análisis de las vías de señalización enriquecidas en los estudios de expresión diferencial.	92
Figura 37. Genes comunes en las comparativas alto grado vs bajo grado e infiltrantes vs no infiltrantes.	94
Figura 38. Gráfico Volcano de los 31 genes expresados diferencialmente en los tumores infiltrantes vs superficiales.	95
Figura 39. Red de interacciones proteína-proteína.	96
Figura 40. Modelo celular de los mecanismos de sensibilización al tratamiento combinado con obatoclastax y paclitaxel.	105
Figura 41. Modelo celular propuesto para la regulación de la degradación de BRCA1 y CtIP por β -TrCP en respuesta a cisplatino.	112

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación clínica del cáncer de vejiga basada en el sistema TNM.....	5
Tabla 2. Fármacos utilizados.	35
Tabla 3. Cebadores utilizados.....	39
Tabla 4. Anticuerpos utilizados.	40
Tabla 5. Correlación entre la expresión de β -catenina y ALDH1A1	77
Tabla 6. Genes seleccionados para la validación del <i>microarray</i> por RT-qPCR.....	94
Tabla S1. Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio de expresión de Mcl-1.....	143
Tabla S2. Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio de expresión diferencial y posterior validación.....	144
Tabla S3. Genes diferencialmente expresados comunes en las comparativas alto grado vs bajo grado e infiltrantes vs no infiltrantes.....	146

RESUMEN

El cáncer de vejiga constituye una de las enfermedades oncológicas de mayor morbilidad y mortalidad. En sus estadios avanzados, este tipo de tumor suele requerir el uso de quimioterapia con cisplatino en primera línea o con paclitaxel en segunda línea; pero con frecuencia los pacientes se vuelven resistentes al tratamiento y las expectativas de supervivencia decaen drásticamente. Por ello, estudiar los mecanismos de resistencia de las células tumorales puede ayudar a desarrollar estrategias que incrementen la sensibilidad al cisplatino o al paclitaxel y eviten la progresión del cáncer de vejiga músculo-invasivo (CVMI).

En primer lugar, hemos demostrado que los niveles de la proteína antiapoptótica Mcl-1 condicionan la respuesta al tratamiento con paclitaxel, ya que se encuentra sobreexpresada y no disminuye tras el tratamiento en las líneas celulares resistentes, mientras que sí lo hace en las células sensibles cuando el paclitaxel induce apoptosis. Además, hemos descrito su sobreexpresión en la mayoría de las biopsias de CVMI, y hemos comprobado su relación con una menor supervivencia libre de enfermedad y un mayor riesgo de recurrencia en los pacientes, por lo que consideramos a Mcl-1 como una importante diana terapéutica con potencial de ser buen marcador pronóstico de la agresividad del tumor en el entorno clínico del CVMI. En este sentido, hemos demostrado que la inhibición farmacológica de Mcl-1 con obatoclax favorece la respuesta al tratamiento con paclitaxel, de forma que la combinación de ambos fármacos sensibiliza a las células resistentes e induce apoptosis. En cuanto a los mecanismos celulares de resistencia y/o sensibilización al tratamiento, hemos comprobado que en las células sensibles obatoclax disminuye los niveles de Mcl-1 e induce la rotura proteolítica de Beclina-1 mediada por la caspasa 3, provocando un bloqueo eficiente del flujo autofágico que se acompaña de apoptosis. En cambio, en las células resistentes los niveles de Mcl-1 se mantienen elevados y Beclina-1 no se rompe, por lo que la autofagia inducida por obatoclax es completa y actúa como mecanismo de resistencia. Sin embargo, la combinación de obatoclax y paclitaxel en estas mismas células retrasa la progresión del ciclo celular e inhibe el deslizamiento mitótico, provocando una parada eficiente en G2/M. Este hecho facilita la degradación de Mcl-1 y la rotura de Beclina-1 mediada por la caspasa 3, permitiendo el bloqueo eficiente del flujo autofágico y la inducción de apoptosis que sensibiliza al tratamiento.

En segundo lugar, hemos descrito que las líneas celulares resistentes a paclitaxel también poseen una mayor activación de la vía Wnt/ β -catenina, así como un aumento claro en las propiedades y el fenotipo de célula madre tumoral (CSC) que podrían estar reguladas por esta vía de señalización. Hemos comprobado que β -catenina está implicada en la adquisición de resistencia a paclitaxel, ya que su silenciamiento en las células resistentes aumenta la apoptosis y su sobreexpresión en las células sensibles la disminuye en respuesta al tratamiento. En relación a esta idea, hemos demostrado que el inhibidor farmacológico XAV939 sensibiliza a las líneas celulares resistentes a la apoptosis inducida por paclitaxel a través de la inhibición de la vía de señalización Wnt/ β -catenina. Además, la expresión de β -catenina citosólica o nuclear (y, por tanto, activa) en los pacientes con CVMI coincide con la expresión positiva de los marcadores

de CSCs ALDH1A1 y Sox-2, corroborando nuestros resultados y recalcando la importancia de su uso como biomarcadores en la clínica.

En tercer lugar, hemos demostrado que las líneas celulares resistentes al tratamiento con cisplatino poseen una mayor capacidad para reparar el daño al ADN generado por el fármaco debido a la sobreexpresión de proteínas implicadas en la reparación del ADN por recombinación homóloga (HR) como BRCA1 y CtIP. De hecho, el silenciamiento de BRCA1 revierte este efecto y aumenta la apoptosis inducida por cisplatino en algunas líneas celulares. Por otro lado, hemos descrito a β -TrCP como tumor supresor en líneas celulares de CVMI, ya que la sobreexpresión de la proteína silvestre aumenta el daño al ADN y mejora la apoptosis inducida por cisplatino, mientras que la sobreexpresión de la proteína mutada o la disminución de sus niveles mediante siARN reduce la aparición del daño y confiere resistencia al tratamiento. Además, hemos comprobado que BRCA1 y CtIP interaccionan con β -TrCP, y que la expresión de ambas proteínas aumenta o disminuye cuando modulamos los niveles de ésta, por lo que postulamos que BRCA1, y probablemente también CtIP, podrían ser nuevos sustratos de β -TrCP. De esta forma, la falta de regulación en la degradación de estas proteínas permitiría una reparación más eficiente del daño al ADN y con ello la adquisición de resistencia al tratamiento con cisplatino en el CVMI.

Por último, hemos comprobado la relevancia de las proteínas y vías de señalización analizadas durante esta tesis mediante un estudio transcriptómico diferencial entre muestras de pacientes con CVMI y CVNMI. En los resultados de este estudio, la mayoría de los genes que se encuentran sobreexpresados en las muestras de pacientes con CVMI están relacionados con las rutas de señalización que hemos considerado objeto de estudio, entre ellos BRCA1. Además, hemos validado la sobreexpresión de algunos de estos genes mediante RT-qPCR en un grupo más amplio de pacientes, abriendo paso a nuevos estudios para confirmar su papel como posibles dianas terapéuticas y/o biomarcadores de pronóstico y respuesta al tratamiento con cisplatino y paclitaxel en el cáncer urotelial músculo-invasivo.

ABREVIATURAS

A

- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- ADNasa: Desoxirribonucleasa
- ADNc: ADN complementario
- AJCC: *American Joint Commitee on Cancer*
- ALDH: Enzima aldehído deshidrogenasa
- APC/C: Complejo promotor de la anafase/ciclosoma
- APS: Persulfato amónico
- ARN: Ácido ribonucleico
- ARNasa: Ribonucleasa A
- ARNm: ARN mensajero

B

- BafA1: Bafilomicina A1
- BCG: Bacilo de Calmette-Guerin
- β TrCP: Proteína β -transducina contenedora de repeticiones F-box

C

- CDK: Quinasa dependiente de ciclina
- CSC: Células madre tumorales
- CVMI: Carcinoma de vejiga músculo-invasivo
- CVNMI: Carcinoma de vejiga no músculo-invasivo

D

- DAB: 3,3'-diaminobencidina
- DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- DSB: Rotura de doble cadena
- DUB: Enzima desubcuitinasa

E

- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

F

- Fw: Cebador iniciador hacia delante (del inglés, *forward*)
- FBS: Suero fetal bovino
- FC: *Fold-Change*
- FDA: *Food and Drug Administration*
- FISH: Hibridación fluorescente *in situ*

H

- H&E: Tinción de Hematoxilina-Eosina
- HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazine-etanosulfónico
- HR: Recombinación homóloga

I

- IC50: Concentración inhibitoria media
- IF: Inmunofluorescencia
- IgG: Inmunoglobulina G
- IHQ: Inmunohistoquímica
- IP: Inmunoprecipitación

K

- kDa: kiloDalton

M

- MTOC: Centro organizador de microtúbulos
- MVAC: Quimioterapia con metotrexato, vinblastina, adriamicina y cisplatino

N

- NAC: Quimioterapia neoadyuvante
- NHEJ: Recombinación no homóloga clásica
- NP40: Nonidet P-40
- NRS: Suero normal de conejo

O

- OBT: Obatoclastax

P

- PARP: Poli-(ADP-ribosa)-polimerasa
- Pb: Pares de bases
- PBD: Detergente en tampón fosfato
- PBS: Tampón fosfato salino
- PTX: Paclitaxel

Q

- qPCR: PCR cuantitativa

R

- Rv: cebador iniciador reverso (del inglés, *reverse*)
- RT-PCR: transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa
- RT-qPCR: transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

S

- SAC: Punto de control de ensamblaje del huso
- SCF: Complejo SKP1-CUL1-F-box
- SD: Desviación estándar
- SDS: Dodecil sulfato sódico
- SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS
- siARN: ARN pequeño de interferencia
- SSC: Citrato sódico salino
- ssDNA: ADN de una sola hebra

T

- TBS: Tampón tris salino
- TEMED: N,N,N',N'-tetraetilendiamina
- Tm: Temperatura de *melting* o de fusión
- TMA: del inglés *Tissue MicroArray*
- TURBT: Resección transuretral del tumor de la vejiga

U

- UCSC: Célula madre tumoral urotelial
- UPS: Sistema de degradación dependiente de ubiquitina

W

- WB: *Western-blot*

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer

El cáncer es uno de los problemas de salud que más preocupa a nivel mundial, constituyendo una de las principales causas de muerte en casi todos los países independientemente de su grado de desarrollo económico. Su incidencia aumenta con la edad, por lo que se espera que debido al crecimiento y envejecimiento de la población se convierta en un problema cada vez más severo. El término cáncer engloba un conjunto heterogéneo de enfermedades de origen multifactorial cuyas principales características son el crecimiento celular descontrolado y la invasión de tejidos sanos adyacentes y a distancia. Todo ello ocurre como consecuencia de alteraciones en los tres procesos fundamentales que mantienen la homeostasis tisular: proliferación celular, muerte celular programada (apoptosis) y senescencia. A día de hoy, Douglas Hanahan y Robert Weinberg han descrito diez alteraciones esenciales en la fisiología celular durante la tumorigénesis (**Figura 1**). Sin embargo, a pesar del incremento en el conocimiento del proceso de tumorigénesis producido en las últimas décadas, el desconocimiento parcial de la biología del cáncer sigue constituyendo en la actualidad la mayor barrera para el diseño de nuevas terapias^{1,2}.



Figura 1. Características comunes de las células tumorales. Adaptado de D. Hanahan y R. Weinberg, 2000 y 2011^{1,2}.

2. Cáncer de vejiga

2.1. Epidemiología del cáncer de vejiga

De entre los diferentes tipos de cáncer, el cáncer de vejiga es la novena neoplasia maligna más común a nivel global, con una alta tasa de mortalidad y recurrencia. Su incidencia lo sitúa como el séptimo tumor más frecuente en hombres y el decimoséptimo en mujeres. Sólo en 2018 hubo 549.393 nuevos casos diagnosticados y casi 200.000 muertes en todo el mundo. Europa, con un 35,9% de incidencia y un 32,5% de mortalidad, es el continente con las tasas más elevadas. Entre los países europeos, España tiene la mayor tasa de incidencia y la segunda

mayor tasa de mortalidad de cáncer de vejiga en varones. En 2018, en España se produjeron 5.680 muertes y se diagnosticaron 18.268 nuevos casos, lo cual supone el 9,5% del total de tumores de sexo masculino y el 3% del total de tumores de sexo femenino³⁻⁵.

Las tasas de incidencia y mortalidad varían entre los distintos países debido a las diferencias en los factores de riesgo, las prácticas de diagnóstico y la disponibilidad de tratamiento. El agente causante más importante es el consumo de tabaco, responsable del 50-65% de los casos masculinos y del 20-30% de los casos femeninos. Otros factores de riesgo son la exposición a sustancias químicas, y en menor medida la radioterapia pélvica. El impacto de la dieta, la susceptibilidad genética y el género siguen siendo controvertidos, aunque las mujeres parecen estar asociadas a un peor pronóstico⁶.

2.2. Clasificación del cáncer de vejiga

El sistema que se emplea con más frecuencia para clasificar el cáncer de vejiga es el sistema TNM del *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*, basado en tres piezas clave de información:

- La **letra T** describe cuán lejos ha crecido el tumor primario y si ha crecido hacia tejidos adyacentes.
 - TX: No se puede evaluar el tumor primario.
 - T0: No hay evidencia de tumor primario.
 - Ta: Carcinoma papilar no invasivo.
 - Tis: Carcinoma *in situ* (tumor plano).
 - T1: El tumor invade el tejido conectivo subepitelial.
 - T2: El tumor invade la muscularis propia (2a mitad interna; 2b mitad externa).
 - T3: El tumor invade el tejido perivesical (3a microscópicamente; 3b macroscópicamente).
 - T4: El tumor invade cualquiera de los siguientes (4a próstata, útero, vagina; 4b pared pélvica, pared abdominal).
- La **letra N** indica si existe propagación del cáncer a los ganglios o nódulos linfáticos adyacentes a la vejiga.
 - NX: No se pueden evaluar los ganglios linfáticos adyacentes.
 - N0: No hay metástasis en los nódulos linfáticos.
 - N1: Metástasis de un solo ganglio linfático en la pelvis renal.
 - N2: Metástasis de múltiples ganglios linfáticos en la pelvis renal.
 - N3: Metástasis en los nódulos linfáticos ilíacos comunes.
- La **letra M** indica si el cáncer se ha propagado haciendo metástasis a otros órganos o ganglios linfáticos que no están cerca de la vejiga.
 - M0: No hay metástasis a distancia.
 - M1: Metástasis a distancia.

El carcinoma urotelial o carcinoma de células transicionales es el tipo más común de cáncer de vejiga, representando aproximadamente el 90% de los casos. En contraposición, el 10% restante lo componen los cánceres de vejiga no uroteliales, que incluyen el carcinoma de células escamosas, el adenocarcinoma, el carcinoma de células pequeñas y los tumores de histología mixta⁷. En el momento del diagnóstico, la extensión patológica de la enfermedad y el posterior estadiaje clínico de acuerdo al sistema TNM nos va a permitir distinguir entre carcinoma de vejiga superficial no invasivo al músculo (CVNMI) y carcinoma de vejiga músculo-invasivo (CVMI), ambos con tratamientos y pronósticos muy diferentes. Aproximadamente el 70% de los pacientes presentan CVNMI, mientras que el 30% restante son diagnosticados como CVMI. Además, en torno al 10-20% de los CVNMI progresarán a CVMI, un tumor mucho más agresivo que está asociado a un peor pronóstico, cuya tasa de supervivencia a los 5 años es del 50%. En el caso de los diagnosticados como CVMI, el 50% recaerá a enfermedad metastásica, y el 90% de estos pacientes podrían fallecer en los primeros 5 años a pesar de las opciones terapéuticas^{8,9}. Según toda esta información, podemos hacer la siguiente estadificación clínica:

Tabla 1. Clasificación clínica del cáncer de vejiga basada en el sistema TNM. Adaptada de K. De George *et al.*, 2017⁷.

CVNMI	Estadio 0a	Ta	N0	M0
	Estadio 0is	Tis	N0	M0
	Estadio I	T1	N0	M0
CVMI	Estadio II	T2a	N0	M0
		T2b	N0	M0
	Estadio III	T3a	N0	M0
		T3b	N0	M0
		T4a	N0	M0
		T4b	N0	M0
	Estadio IV	Cualquier T	N1	M0
			N2	M0
			N3	M0
			Cualquier N	M1

2.3. Tratamiento del cáncer de vejiga

2.3.1. Tratamiento del CVNMI

Dentro de los tumores de vejiga no músculo-invasivos, el 60-70% serán carcinomas papilares no invasivos (estado Ta), entre el 20-30% mostrarán invasión al tejido conectivo subepitelial (estado T1), y alrededor del 10% se presentarán como carcinoma *in situ* (estado Tis). En cualquier caso, el tratamiento primario es la resección transuretral del tumor de la vejiga (TURBT, del inglés *transurethral resection of bladder tumor*); normalmente seguida de terapia intravesical que variará en función de la profundidad y el grado de invasión del tumor, la integridad de la resección y la estimación de la probabilidad de recurrencia. En los tumores Ta de bajo grado sólo se suele hacer TURBT, mientras que en los Ta y T1 de alto grado se requiere además una resección adicional junto con inmunoterapia intravesical con el bacilo atenuado de Calmette-Guerin (BCG) o quimioterapia intravesical con mitomicina, epirrubicina o doxorubicina (adriamicina). En estos pacientes, la supervivencia a 10 años tras la TURBT e inmunoterapia con BCG es de alrededor del 80%. En el caso del carcinoma de vejiga *in situ*, al considerarse un precursor de la enfermedad invasiva se recomienda la TURBT seguida de BCG intravesical una vez por semana durante seis semanas^{7,10}.

2.3.2. Tratamiento del CVMI

Debido a la naturaleza más agresiva del cáncer de vejiga músculo-invasivo, el estándar actual de tratamiento es la cistectomía radical con linfadenectomía pélvica bilateral precedida por quimioterapia neoadyuvante (NAC) basada en cisplatino. Sólo con la cistectomía la tasa de supervivencia a 5 años es de alrededor del 50%, mientras que junto con la quimioterapia neoadyuvante se obtiene un beneficio de entre el 5-8%. En el caso de enfermedad metastásica, el tratamiento de elección es la quimioterapia basada en combinaciones de cisplatino bien con gemcitabina o bien con metotrexato, vinblastina y adriamicina (MVAC). Sin embargo, aunque un alto porcentaje de los pacientes muestran una respuesta inicial importante, esta respuesta raramente es duradera, con una supervivencia libre de progresión de aproximadamente 8 meses y una supervivencia global a 5 años del 15%^{7,8}.

Una vez que los pacientes progresan o sufren una recaída, no existe un tratamiento estándar en segunda línea. Por un lado, la quimioterapia basada en taxanos como el paclitaxel, en combinación sobre todo con gemcitabina, ha demostrado tasas de respuesta que llegan hasta el 60% y una supervivencia global que alcanza los 14 meses. Además, en el año 2009 se aprobó en Europa la vinflunina, un nuevo agente inhibidor de microtúbulos que demostró un aumento de la supervivencia global¹¹. Por otro lado, en 2016 se aprobó el uso de inmunoterapia con atezolizumab, un anti-PD-L1 que ha conseguido mejorar el curso de la enfermedad, aunque la respuesta es mayor en pacientes con niveles más altos de expresión de PD-L1¹². Recientemente se ha propuesto la combinación de la inmunoterapia con inhibidores de poli(ADP-ribosa)-polimerasa (PARP) o con agentes epigenéticos, que parecen ser bien tolerados y demuestran

actividad antitumoral en algunos tipos tumorales entre los que podría encontrarse la vejiga¹³. Sin embargo, los tratamientos con inmunoterapia tampoco han demostrado el éxito previsto al inicio de los primeros ensayos clínicos¹⁴ como sí sucede en otros tumores como el melanoma, observando en el mejor de los casos un aumento de 3 meses en la supervivencia respecto a otros tratamientos en segunda línea¹⁵.

Los estudios mediante técnicas ómicas han permitido observar alteraciones en genes implicados en vías de señalización como la angiogénesis (VEGFR, FGFR, receptor de angiotropoyetina 1 y 2), supervivencia (vía PI3K/AKT/mTOR, PTEN, p53), y proliferación (MAPK/ERK, EGFR, HER2, JAK-STAT), que con frecuencia se pueden asociar a un peor pronóstico, constituyendo así posibles dianas terapéuticas para el cáncer urológico¹⁶. Además, parece haber diferencias entre los CVNMI, que presentan mutaciones más frecuentemente en los oncogenes FGFR3, HRAS o PI3K, y los CVMI, en los que las mutaciones suelen darse en los genes supresores de tumores p53, Rb y PTEN¹⁷. La identificación de todos estos mecanismos permite establecer las bases para el desarrollo de nuevas terapias específicas; sin embargo, los estudios todavía se encuentran en sus etapas iniciales, y los mecanismos de resistencia que desarrollan las células tumorales hacen necesaria una búsqueda continua de nuevas alternativas para el tratamiento del cáncer de vejiga avanzado.

3. Quimioterapia basada en platinos

Aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) por primera vez en 1978 para el tratamiento del cáncer de vejiga¹⁸, los agentes basados en platino son el pilar de la quimioterapia para varios tipos de tumores, entre los que se incluyen también el de testículo, ovario, pulmón, esófago, estómago y cabeza y cuello^{19,20}. El cisplatino es un agente bifuncional que, tras su activación por acuación, reacciona con los compuestos nucleófilos como los grupos sulfhídricos de las proteínas o los ácidos nucleicos, provocando que se formen enlaces entre las dos cadenas de la molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) y entre moléculas diferentes de ADN, lo que genera roturas de doble cadena (DSBs, del inglés *double-strand break*). Generalmente se une en el N7 de las bases púricas del ADN genómico o mitocondrial para crear lesiones de ADN, bloqueando la producción de ADN, de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y de proteínas. A nivel celular, el cisplatino provoca la inhibición de la replicación y de la transcripción, la parada del ciclo celular y la muerte celular por apoptosis^{21,22}.

A pesar de esto, su uso está limitado por dos factores: la quimiorresistencia (ya sea intrínseca o adquirida con el tiempo tras el tratamiento) y los efectos secundarios en los pacientes. En el caso del tratamiento con cisplatino, la resistencia puede deberse a mecanismos pre-diana (unión a proteínas en la sangre que provocan su inactivación, disminución de la expresión del transportador de cobre CTR1 responsable del influjo de cisplatino, inactivación en el citoplasma por unión al glutatión, etc), mecanismos diana (potenciación de los mecanismos de reparación para evitar la acumulación de daños en el ADN), mecanismos post-diana (evasión de la apoptosis, parada del ciclo celular) e incluso mecanismos fuera de diana (aumento de otras vías

de señalización como la autofagia)²²⁻²⁴. Algunos autores también han observado que los fibroblastos asociados al tumor podrían regular la resistencia al tratamiento con cisplatino en líneas celulares de cáncer de vejiga²⁵. Con respecto a los efectos secundarios en los pacientes, se trata sobre todo de nefrotoxicidad, ototoxicidad, neurotoxicidad, náuseas y vómitos, aunque últimamente se están desarrollando agentes quelantes como el GMDTC capaces de disminuir la toxicidad sin afectar a su actividad antitumoral²⁶.

3.1. Mecanismos de reparación del ADN

Como se ha comentado anteriormente, el daño en el ADN producido por el cisplatino no siempre da como resultado la muerte de las células ya que, de un modo natural, dependiendo del paciente, o tras repetidos ciclos de terapia, se potencian los mecanismos de reparación evitando la acumulación de daños letales en el ADN producido por los agentes genotóxicos. Además, se ha determinado que la respuesta a los daños en el ADN no solo se activa como consecuencia de la quimioterapia, sino que también es una barrera natural antitumoral en las primeras etapas de la tumorigénesis. Estas observaciones son la base del uso de inhibidores de la reparación para mejorar los efectos terapéuticos de los fármacos que dañan el ADN^{27,28}.

Las células eucariotas utilizan dos mecanismos de reparación principales para las DSBs, la recombinación homóloga (HR, del inglés *Homologous Recombination*) y la recombinación no homóloga clásica (NHEJ, del inglés *Non-Homologous DNA End Joining*), aparte de varias vías secundarias (**Figura 2**). Mientras que el mecanismo de NHEJ está activo durante la interfase, la HR ocurre principalmente después de la replicación en las fases S y G2 del ciclo celular, cuando una cromátida hermana idéntica está disponible como plantilla para la reparación, por lo que este mecanismo, a diferencia del anterior, generalmente está libre de errores.

En la NHEJ, los extremos rotos son rápidamente unidos y protegidos por el heterodímero Ku70/Ku80, que proporciona una plataforma de reclutamiento para la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de ADN (DNA-PK). La fosforilación realizada por esta quinasa provoca, a su vez, la incorporación de factores de procesamiento entre los que se incluyen la nucleasa Artemis, que corta los extremos del ADN haciéndolos compatibles para la ligación. La unión final se logra mediante un complejo ligasa formado por la ADN ligasa IV, XRCC4 y una serie de componentes asociados. Aunque este mecanismo es muy eficiente, es propenso a cometer errores debido a la propia naturaleza de los recortes de los extremos rotos.

Por el contrario, la ruta de señalización del sistema HR se ejecuta mediante el reclutamiento secuencial de varias nucleasas que catalizan la resección final del ADN para generar regiones extendidas de ADN de una sola hebra (ssDNA, del inglés *single-stranded DNA*). El sensor primario de las DSBs es el complejo altamente conservado MRN (MRE11-RAD50-NBS1), que se une a ambos lados de las roturas para señalarlas, permitiendo la resección mediada por CtIP. Posteriormente se producen tramos más largos de ssDNA que son rápidamente recubiertos por la proteína de replicación A (RPA), teniendo lugar la acumulación de proteínas reguladas por

un complejo mecanismo que emplea la fosforilación y la ubiquitilación mediada por diversas quinasas, incluidas BRCA1/2 y RAD51. De esta manera, el filamento resultante RAD51-ssDNA realiza entonces la búsqueda de homología que permite reparar el ADN para terminar el proceso y restaurar los cromosomas^{29,30}.

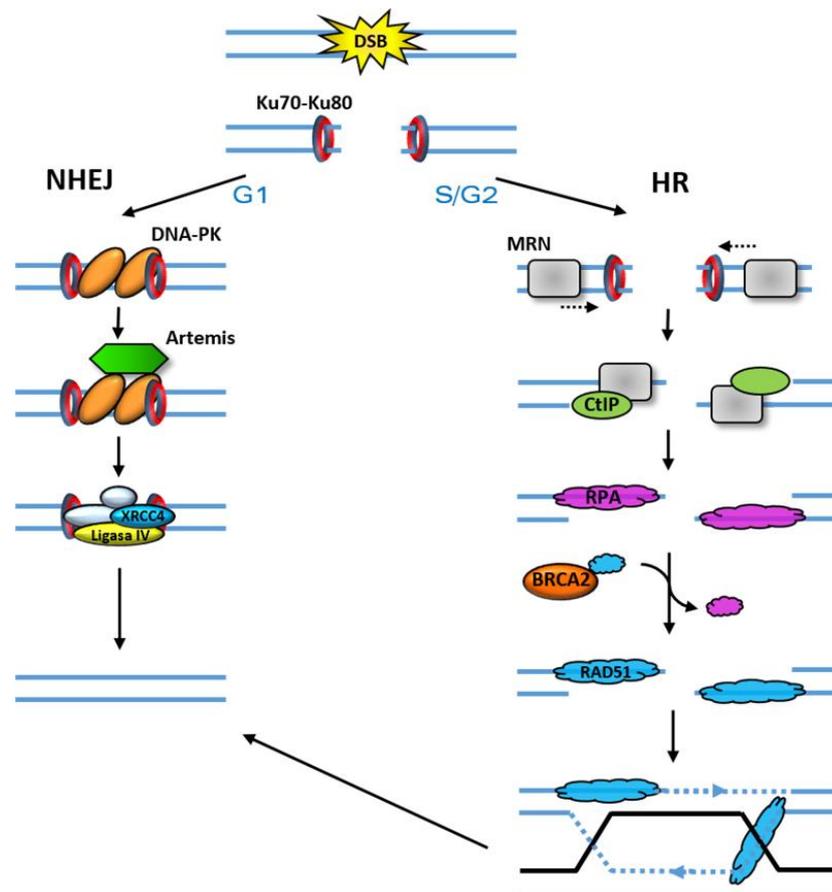


Figura 2. Vías de reparación de las DSBs en las células eucariotas. Adaptado de P. Schwertman *et al.*, 2016²⁹.

Por ello, aunque mantener la maquinaria de reparación intacta es crítico para proteger a las células del daño en el ADN y prevenir procesos tumorales, la integridad de estas vías también puede ser negativa para el tratamiento del cáncer. Existe una gran evidencia preclínica que sugiere cómo las alteraciones de los mecanismos de reparación del ADN se asocian con la sensibilidad o resistencia a los quimioterápicos derivados de platino^{31,32}. Así, se ha demostrado que las células deficientes de BRCA1 y BRCA2 tienen menor capacidad para reparar las DSBs mediante HR y, en consecuencia, son hipersensibles a los agentes que dañan el ADN, incluido el cisplatino. Sin embargo, con el tiempo las células tumorales se vuelven capaces de reparar el daño al ADN por otras vías y con ello se hacen resistentes al tratamiento. En estos casos, se ha visto que la combinación de cisplatino y los inhibidores de PARP pueden revocar esta resistencia. Este efecto es conocido como letalidad sintética, que hace referencia a la muerte selectiva de las células tumorales en las que se dan dos condiciones específicas, en este caso la presencia

de mutación en BRCA y la inhibición de PARP³³. De manera paralela, se ha demostrado que en los tumores de mama con mutaciones en la línea germinal de BRCA1/2 el tratamiento neoadyuvante con platinos tiene mayor efectividad³⁴.

Además, parece ser que no sólo son importantes las mutaciones, ya que las células con baja o nula expresión de BRCA1 (fenotipo *BRCAness*) también responden al tratamiento. Estudios en líneas celulares de cáncer de mama demuestran que niveles de expresión diferenciada de BRCA1 poseen diferente quimiosensibilidad³⁵. Las pacientes con cáncer ovárico con baja expresión de BRCA1 presentan susceptibilidad a cisplatino y resistencia a paclitaxel y docetaxel; en cambio, aquellas pacientes con alta expresión de BRCA1 muestran resistencia a cisplatino y susceptibilidad a paclitaxel y docetaxel³⁶. Debido a esto, la regulación de la estabilidad de BRCA1 ha sido abordada desde varios puntos de vista. Inicialmente se observó en 6 líneas tumorales de diferente origen que la inhibición de la vía de la autofagia/lisosoma impedía la degradación de BRCA1³⁷, y posteriormente se determinó que BRCA1 era degradada también por el proteasoma³⁸. Recientemente se ha utilizado un inhibidor de desubicitinasas en la regulación de la citotoxicidad del cisplatino en carcinoma de pulmón de células no pequeñas³⁹. Estos hallazgos nos hacen pensar que el diseño de pequeñas moléculas que faciliten la degradación de las proteínas podría contribuir a mejorar los efectos terapéuticos de la quimioterapia basada en cisplatino en el cáncer de vejiga.

4. Quimioterapia basada en taxanos

4.1. Microtúbulos como diana farmacológica

Los microtúbulos son estructuras proteicas que forman parte esencial del citoesqueleto celular y la organización interna de todas las células eucariotas. Entre sus principales funciones destaca el papel que desempeñan en la división celular, ya que dirigen el correcto posicionamiento de los cromosomas durante la mitosis. Principalmente están compuestos por tubulina, una proteína globular que forma un heterodímero constituido por las isoformas α y β , ambas con estructuras tridimensionales similares y un peso molecular en torno a 50 kDa. Estos dímeros de tubulina van a interaccionar entre sí de manera cabeza a cola para formar protofilamentos rectos que posteriormente se asocian de forma paralela y con cierto desplazamiento, estableciendo contactos laterales entre ellos para formar los microtúbulos, unas estructuras cilíndricas huecas de 25 nm de diámetro y longitud variable⁴⁰.

La polimerización en tándem de los heterodímeros de la tubulina da como resultado una heterogeneidad inherente entre los dos extremos del microtúbulo, de manera que por un lado tendremos un extremo positivo compuesto por β -tubulina y por otro lado un extremo negativo compuesto por α -tubulina. Además, los heterodímeros se van a añadir con mayor afinidad a la β -tubulina, por lo que el extremo positivo va a ser a su vez el extremo de crecimiento del microtúbulo y en el que predomine la polimerización, mientras que en el extremo negativo predominará la despolimerización (**Figura 3**). Dentro de una célula, los microtúbulos están

anclados por sus extremos negativos en el centro organizador de microtúbulos (MTOC), disponiendo sus extremos positivos en la periferia de la célula⁴¹. Cuando un microtúbulo comienza a formarse, la incorporación de nuevos dímeros de tubulina hace que crezca en longitud; sin embargo, este proceso puede detenerse e incluso revertirse, de manera que el microtúbulo comienza a despolimerizarse. Esta alternancia entre polimerización y despolimerización es el fenómeno conocido como inestabilidad dinámica, el cual es dependiente del aporte continuo de energía procedente de la hidrólisis de GTP⁴².

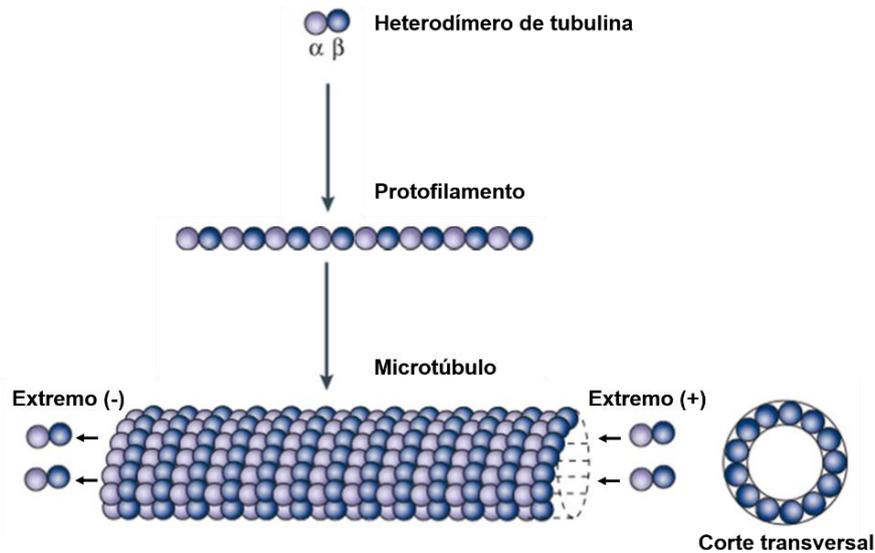


Figura 3. Estructura de los microtúbulos. Las subunidades de α -tubulina (azul claro) y β -tubulina (azul oscuro) forman heterodímeros que interaccionan para constituir protofilamentos, y éstos el microtúbulo. Se representan los extremos negativo (despolimerización) y positivo (polimerización) del microtúbulo delimitados por α -tubulina y β -tubulina respectivamente. Adaptado de M.A. Jordan y L. Wilson, 2004⁴³.

Estas propiedades dinámicas son cruciales en la división celular, por lo que cualquier interferencia en su proceso perturba el desarrollo de la división y puede llegar a causar la muerte celular por apoptosis. Por ello, debido al crítico papel de los microtúbulos en la división celular y a la elevada tasa de crecimiento de las células tumorales, es lógico pensar en la tubulina como una diana importante para el desarrollo de fármacos quimioterápicos⁴³.

4.2. Fármacos antimetabólicos: taxanos

Los fármacos dirigidos a microtúbulos, también conocidos como fármacos antimetabólicos, interaccionan con la tubulina e inhiben la dinámica de microtúbulos, lo que impide la correcta formación del huso mitótico y el alineamiento de los cromosomas durante la metafase, provocando el bloqueo de la mitosis y en consecuencia la inhibición de la proliferación celular. En la actualidad, numerosos compuestos de este tipo se usan satisfactoriamente para el tratamiento de diversos tipos de cáncer o están siendo objeto de ensayos clínicos⁴⁴. Convencionalmente, los fármacos dirigidos a microtúbulos se han clasificado en dos grandes grupos:

- Desestabilizadores de microtúbulos (alcaloides de la Vinca, colchicina, PEITC), que inhiben la polimerización de los microtúbulos.
- Estabilizadores de microtúbulos (taxanos, epotilonas), que promueven la polimerización de los microtúbulos⁴⁵.

El paclitaxel pertenece al grupo de los taxanos y fue el primer compuesto estabilizador de microtúbulos descubierto^{46,47}. Concretamente se une a la tubulina en la subunidad β , en la superficie interna del microtúbulo. Esta unión estabiliza el microtúbulo y aumenta la polimerización del mismo, presumiblemente induciendo un cambio conformacional en la tubulina que, por un mecanismo desconocido, aumenta su afinidad por las moléculas de tubulina vecinas⁴³. En la actualidad, tanto paclitaxel como su análogo semisintético docetaxel se utilizan con éxito en el tratamiento de gran cantidad de tumores sólidos como mama, ovario, pulmón, próstata o sarcoma de Kaposi. A pesar de ello, desventajas como la neurotoxicidad o el desarrollo de resistencias de las células tumorales limitan su aplicabilidad^{48,49}.

4.3. Fármacos dirigidos a microtúbulos y parada del ciclo celular

El ciclo celular eucariota se divide en dos etapas; interfase y mitosis (M). En la primera etapa se encuentra la fase G1, donde la célula puede o bien dejar de proliferar y pasar a un estado quiescente (G0), o bien realizar un ciclo completo de división a través de la fase S, en la que se produce la replicación del material hereditario. A continuación, durante la fase G2, la célula se prepara para la etapa final del ciclo, la mitosis. En esta última etapa, el material genético se distribuye entre las dos células hijas gracias a una serie de fases; pro-metáfase, metáfase, anafase, telofase y finalmente citocinesis^{50,51}.

Este ciclo celular está controlado por mecanismos de fosforilación/desfosforilación y síntesis/degradación de proteínas fundamentales como las Ciclinas o las quinasas dependientes de Ciclinas (CDKs), que regulan el paso de una fase a otra a través de puntos de control (*checkpoints*), impidiendo la entrada en la siguiente fase antes de tiempo. A lo largo de todo el ciclo existen tres puntos de control principales:

- Punto de control de daño en el ADN, que puede dar lugar a la parada de la célula en G1, S, G2 o M.
- Punto de control de replicación del ADN, que impide la entrada en mitosis si el genoma no está correctamente duplicado.
- Punto de control de ensamblaje del huso o SAC (del inglés *Spindle Assembly Checkpoint*), que impide la entrada en anafase hasta que los cromosomas estén correctamente unidos al huso mitótico a través de los cinetocoros^{50,51}.

Durante la fase G2 se expresan las Ciclinas A y B, que dan lugar a la formación del complejo Ciclina A/B-CDK1. La activación de este complejo dirige la mitosis hacia la metáfase, pero avanzar en las siguientes fases requiere la desfosforilación, ubicuitilación y degradación de sustratos como la Ciclina B, lo que provocará la inactivación de CDK1. El sistema E3 ligasa

encargado de la degradación de esta Ciclina B es el complejo promotor de la anafase/ciclosoma (APC/C) unido a *cdc20*, su principal co-activador durante la mitosis. A su vez, el APC/C está controlado por el SAC, de manera que cuando se encuentra el SAC activo, varias proteínas que forman parte del complejo, entre ellas BUBR1, secuestran a *cdc20*. La función ubiquitina ligasa del APC/C queda entonces inhibida, impidiendo así la degradación de Ciclina B y con ello la segregación de los cromosomas. Sólo cuando el punto de control del SAC queda satisfecho (correcta alineación de los cromosomas en la placa metafásica), APC/C-*cdc20* actúa degradando a Ciclina B y permitiendo el progreso del ciclo celular y la salida de mitosis^{52,53}.

Los antimitóticos provocan la activación del SAC, por lo que la célula queda retenida en la fase G2/M. Cuando el fármaco actúa, se produce la muerte en mitosis de manera eficiente. Sin embargo, uno de los problemas que se observan ante el tratamiento con antimitóticos es la tendencia de la célula tumoral a sufrir un proceso conocido como *slippage* o deslizamiento en el que escapan del bloqueo en mitosis saltándose el SAC y pasando a la fase G1 como células tetraploides. Este deslizamiento se caracteriza porque a pesar de existir estímulos que mantienen el SAC activo (taxanos), se produce la degradación de Ciclina B mediante otras vías y la salida de mitosis sin citocinesis^{54,55}. En este estado, la célula puede morir, pararse en G1 o iniciar un nuevo ciclo celular (**Figura 4**)⁵⁶.

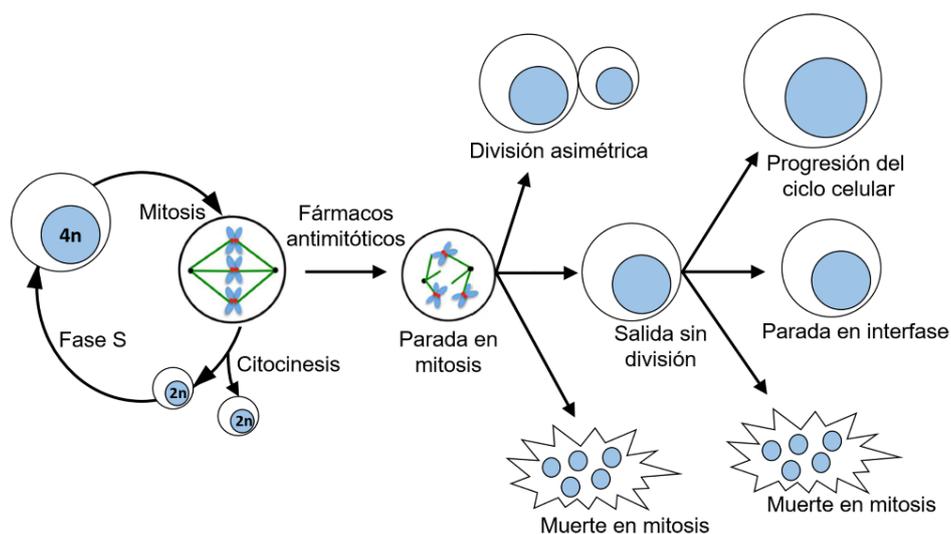


Figura 4. Respuesta celular ante el tratamiento con fármacos antimitóticos. La exposición a fármacos antimitóticos provoca la activación crónica del SAC y el consiguiente bloqueo del ciclo celular en mitosis. Tras la parada en mitosis, las células pueden morir durante la mitosis, dividirse de manera asimétrica generando células hijas aneuploides o salir de la mitosis sin citocinesis mediante deslizamiento. Así mismo, tras el deslizamiento las células pueden morir, quedar bloqueadas en G1 durante un tiempo indefinido o iniciar un nuevo ciclo celular. Adaptado de K.E. Gascoigne & S.S. Taylor, 2009⁵⁶.

La existencia de diferentes posibilidades refleja que el bloqueo de la división celular evita la proliferación, pero no necesariamente implica muerte celular. Hasta ahora, se conoce bastante bien el mecanismo por el que los antimitóticos provocan la parada en mitosis; sin embargo, no es del todo conocido cómo responden las células a un retraso prolongado del ciclo celular. Se ha propuesto un modelo en el que dos redes con diferentes umbrales de activación compiten entre sí durante la parada en mitosis; una de ellas induce las rutas de muerte celular, mientras que la otra controla la degradación de Ciclina B y la salida de mitosis. De este modo, si lo primero que ocurre es que los niveles de Ciclina B caen por debajo del umbral, la célula saldrá de mitosis por deslizamiento; mientras que si el umbral de muerte es el que se alcanza en primer lugar, la célula morirá durante la parada en mitosis^{56,57}.

5. Apoptosis

Ya sea mediante el uso de platinos o taxanos, el objetivo principal de cualquier tratamiento quimioterápico persigue inducir apoptosis en las células tumorales. La apoptosis es un proceso fisiológico de muerte celular programada en respuesta a diferentes estímulos que permite el desarrollo normal del organismo, el control de la homeostasis de los tejidos y la eliminación de células potencialmente peligrosas, dañadas o infectadas^{58,59}.

Al tratarse de un proceso esencial, resulta sencillo entender la necesidad de una regulación precisa y estricta, de manera que su desregulación puede ser la causa de diversas patologías entre las que se encuentra el cáncer⁶⁰. Durante el proceso apoptótico la célula sufre una serie de cambios morfológicos como son la alteración de la membrana plasmática, la reducción del volumen celular y nuclear, la condensación de la cromatina y diversos orgánulos celulares, y por último la fragmentación del núcleo y del citoplasma, que dan lugar a lo que se denominan cuerpos apoptóticos. Estos cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos o por células vecinas, evitando así la respuesta inflamatoria local ocasionada en la necrosis en la que la célula, al romperse, libera su contenido al medio extracelular⁶¹.

En función de la naturaleza del estímulo generador de muerte se conocen dos vías de inducción de apoptosis: la vía extrínseca o de receptores de muerte y la vía intrínseca o mitocondrial, aunque en ambos casos el proceso siempre resulta en la activación de una cascada intracelular de caspasas. Estas caspasas son una familia de cisteín-proteasas sintetizadas como zimógenos que, en respuesta al estímulo, hidrolizan a su sustrato junto a un residuo de aspártico para conducir finalmente a la muerte celular. Dependiendo de la función que desempeñen, las caspasas se pueden clasificar como inflamatorias o apoptóticas, las cuales a su vez se dividen en caspasas iniciadoras (se estimulan en respuesta a las señales y activan a las efectoras, como por ejemplo la caspasa 9) o caspasas efectoras (responsables de la proteólisis directa de diversos sustratos celulares que provocará la desorganización celular y los cambios morfológicos típicos de la apoptosis, como por ejemplo la caspasa 3)^{60,62-64}.

5.1. Vía apoptótica extrínseca o de receptores de muerte

La vía extrínseca implica la activación de la apoptosis a través de la interacción entre diferentes ligandos y los denominados receptores de muerte situados en la membrana plasmática, la mayoría de ellos pertenecientes a la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR). Dichos receptores poseen en común dominios de muerte citoplásmicos (dominios DD), que tras la unión ligando-receptor transmiten la señal a través del complejo señalizador de inducción de muerte (DISC) para producir la activación de caspasas y la propagación de la cascada apoptótica al citosol (**Figura 5**)⁶⁵⁻⁶⁷.

5.2. Vía apoptótica intrínseca o mitocondrial

La vía intrínseca se activa por diversos tipos de estrés como privación de factores de crecimiento o daños intracelulares, y está controlada principalmente mediante las interacciones que se producen entre las distintas proteínas de la familia Bcl-2, constituida por miembros antiapoptóticos y proapoptóticos que pueden suprimir o promover la apoptosis, respectivamente⁶⁸. De manera general, estas proteínas se identifican por la presencia en su estructura de al menos uno de los cuatro dominios de homología con Bcl-2 descritos (dominios BH1-BH4), de los cuales el dominio BH3 parece estar directamente relacionado con una función proapoptótica⁶⁹. Así, de acuerdo a los dominios BH y a su función, las proteínas de la familia Bcl-2 se clasifican en tres grupos:

- Proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, Bcl-xL o Mcl-1 entre otras, que poseen un dominio transmembrana y cuatro dominios BH de homología.
- Proteínas proapoptóticas multidominio o efectoras como Bax, Bak, y Bok, que poseen un dominio transmembrana y tres dominios BH.
- Proteínas proapoptóticas “sólo BH3” como Bad, Noxa, Bid o Bim (entre otras), que sólo poseen un dominio transmembrana y el dominio de homología BH3^{70,71}.

En condiciones normales, los miembros antiapoptóticos interaccionan con el dominio BH3 de los miembros proapoptóticos, inhibiéndolos y favoreciendo la supervivencia celular. Sin embargo, cuando aparece el estímulo de muerte las proteínas proapoptóticas “sólo BH3” se activan, inhibiendo a las antiapoptóticas y activando a otras proapoptóticas. En concreto, la proteína Bax forma un heterodímero con Bak que se inserta en la membrana mitocondrial y provoca que ésta se permeabilice⁷². Estos eventos promueven la liberación del citocromo c al citoplasma para unirse a Apaf-1 (factor activador de proteasas apoptóticas), que tras sufrir un cambio conformacional recluta a la procaspasa 9 y forma un complejo denominado apoptosoma. Éste favorece la activación de la caspasa 9, que a su vez activa a las caspasas ejecutoras 3 y 7, produciéndose la rotura de diversos sustratos (**Figura 5**)^{60,70,73}. Entre ellos, la rotura de la proteína PARP por la caspasa 3 en las fases finales del proceso apoptótico se utiliza frecuentemente como marcador de apoptosis^{63,74}. En la literatura científica se encuentra

ampliamente documentado que la apoptosis inducida tras el tratamiento con taxanos o platinos ocurre por la vía intrínseca mitocondrial.

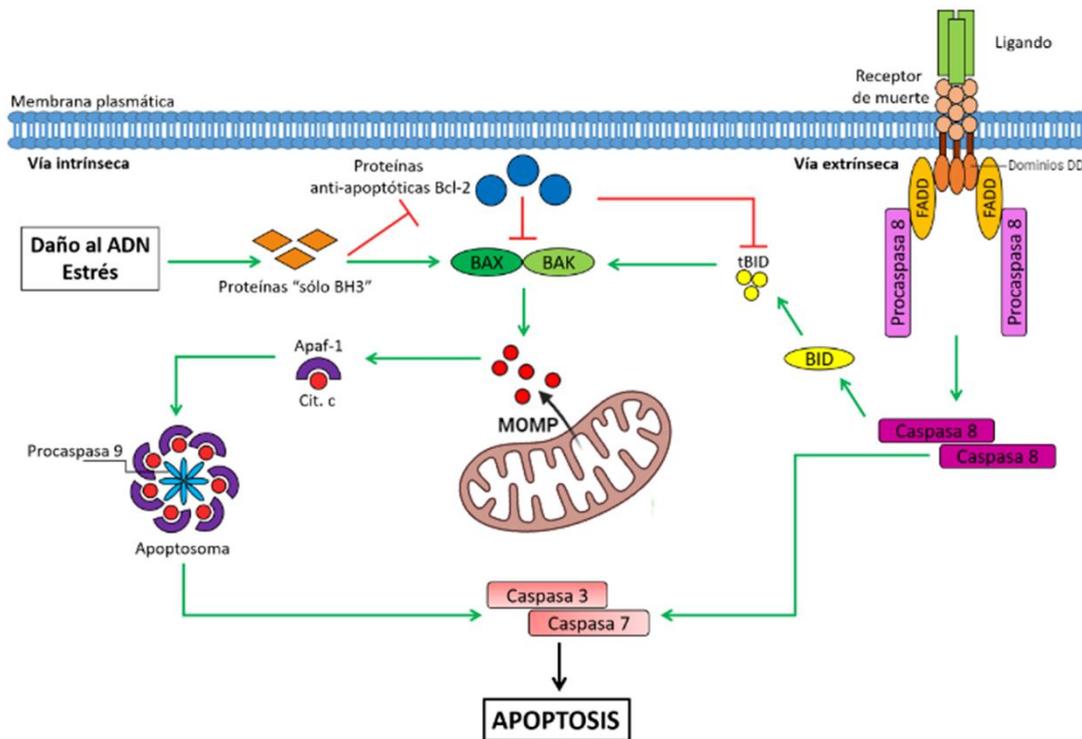


Figura 5. Esquema de las vías apoptóticas intrínseca o mitocondrial y extrínseca o de receptores de muerte. Las flechas verdes indican activación y las rojas inhibición.

5.2.1. Proteínas de la familia Bcl-2 y resistencia a quimioterapia

El equilibrio entre las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas determina la susceptibilidad de las células a la apoptosis, por lo que alteraciones del mismo pueden contribuir a la progresión del cáncer, además de que puede estar implicado en la aparición de resistencia a quimioterápicos^{75,76}. La sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas y su relación con la resistencia a la quimioterapia se ha visto ya en muchos tipos de cánceres hematológicos (mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica y aguda o leucemia mielocítica aguda)⁷⁷, así como en tumores sólidos (cáncer de mama^{78,79}, de pulmón⁸⁰, melanoma⁸¹, o carcinoma de próstata⁸²⁻⁸⁴, entre otros). Es por esta razón que los dominios BH3 específicos de estas proteínas parecen ser una diana perfecta para el diseño de nuevos fármacos inhibidores⁸⁵.

Más concretamente, Mcl-1 tiene un papel crucial en la adquisición de resistencia a terapias antitumorales⁸⁶⁻⁸⁹ y es una de las proteínas más estudiadas en nuestro laboratorio. Previamente, hemos observado que los niveles de Mcl-1 son determinantes para que el paclitaxel promueva la apoptosis en células de cáncer de próstata tras inducir una parada robusta en mitosis⁹⁰, y que los carcinomas de próstata más agresivos tienen unos niveles de expresión de Mcl-1 muy elevados⁹¹. Además, no sólo es importante conocer la función de esta proteína sino también estudiar la regulación de su degradación por el proteasoma, ya que hemos visto que la pérdida de ciertas ubiquitininas ligasas está relacionada con la adquisición de resistencia a los taxanos en

cáncer de mama⁹². Por tanto, Mcl-1 podría ser una potente diana terapéutica cuyo bloqueo con inhibidores específicos sensibilizaría al tratamiento con taxanos en aquellos tumores de vejiga donde Mcl-1 esté sobreexpresada.

5.2.2. Obatoclax

En este sentido aparece obatoclax (GX15-070), descrito como una molécula BH3 mimética que actúa en la membrana mitocondrial provocando la rotura de las interacciones entre Mcl-1 y Bak, liberando a Bak e induciendo muerte celular por apoptosis en algunos tumores hematológicos⁹³. Ensayos clínicos en fase I han probado la seguridad y tolerabilidad para el uso de obatoclax como agente individual para el tratamiento tanto de tumores hematológicos como de tumores sólidos^{94,95}. Además, se han realizado algunos estudios *in vitro* e *in vivo* donde este fármaco parece ser efectivo en combinación con cisplatino⁹⁶, sorafenib⁹⁷, bortezomib⁹⁸, lapatinib⁹⁹ o citarabina (Ara-C)⁹³ en diversos tipos tumorales. Estos resultados positivos han apoyado la realización de nuevos ensayos clínicos de fase II usando obatoclax como agente único o en combinación con otros quimioterápicos para el tratamiento de pacientes con mielofibrosis o linfoma de Hodgkin clásico⁷¹. Sin embargo, su papel sensibilizador en tumores sólidos tratados con taxanos aún no es del todo conocido.

La estructura química del obatoclax incluye un núcleo de pirrolilpirometano que, en ciertas condiciones, puede potenciar la generación de especies reactivas de oxígeno que consigan abrir poros en las membranas de las mitocondrias, explicando por qué este agente puede a veces ser citotóxico en ausencia de Bax/Bak⁹⁸. Así mismo, se ha identificado que obatoclax podría abolir el crecimiento celular de manera independiente al efecto apoptótico, induciendo parada celular en fase S-G2, lo cual sugiere que esta droga tiene múltiples dianas⁹³. Otro de los mecanismos de obatoclax es la inducción de autofagia, aunque este tema sigue siendo un poco controvertido¹⁰⁰. Por un lado, se ha visto que obatoclax promueve la acumulación de autofagosomas y la interacción de ATG5 (una proteína clave en el proceso de autofagia) con componentes del necrosoma induciendo la muerte por necroptosis, lo cual puede ser una nueva línea de tratamiento para tumores resistentes a apoptosis¹⁰¹. Sin embargo, otros autores defienden que obatoclax induce autofagia citoprotectora, ya que la inhibición farmacológica de la autofagia inducida por este fármaco favorece la apoptosis¹⁰². En células de cáncer esofágico sensibles y resistentes al cisplatino, obatoclax bloquea el flujo autofágico provocando la acumulación de lisosomas y proteínas poliubiquitiladas que dan lugar a la inhibición del proteasoma y finalmente al efecto citotóxico¹⁰³. Por todo ello, es necesario un estudio profundo a nivel bioquímico para conocer en mejor medida el mecanismo de acción de esta molécula, así como la dosis y los tiempos de administración, para optimizar los resultados de este fármaco en la clínica.

6. Células madre tumorales

Al igual que ocurre en los tejidos normales, los tumores presentan una heterogeneidad celular que se traduce en la presencia de diferentes tipos celulares como son las propias células cancerígenas, fibroblastos, células vasculares o células inflamatorias, entre otras. De entre ellas, las células cancerígenas son las responsables de la progresión tumoral, debido a que han sufrido mutaciones que les hacen crecer de manera descontrolada, mientras que el resto de poblaciones conforman el llamado microambiente tumoral encargado del mantenimiento del mismo. Esto sugiere que los tumores podrían estar sustentados por una pequeña subpoblación de células madre tumorales (CSC, del inglés *cancer stem cells*), las cuales tienen la capacidad de autorrenovarse y dar lugar a los linajes heterogéneos de células que componen el tumor original¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.

Estas células se caracterizan por presentar propiedades similares a las células madre normales específicas de tejido, como las capacidades de autorrenovación y diferenciación, la presencia de marcadores específicos de superficie y el uso de rutas de señalización comunes, con la diferencia de que dichos mecanismos se encuentran desregulados, de manera que aunque se trate de una población pequeña (menos del 1%), son el componente crucial que conduce a la recurrencia del tumor, la resistencia al tratamiento y el desarrollo de la metástasis. En cuanto a su origen, las CSCs podrían proceder o bien de una célula madre normal, o bien a partir de células progenitoras o diferenciadas que debido a la presencia de mutaciones se han transformado y han adquirido la capacidad de autorrenovarse a través de mecanismos de desdiferenciación y reprogramación celular^{105,107,108}.

Se sabe que las células madre normales son relativamente quiescentes y resistentes a los fármacos y toxinas debido a la alta expresión de bombas de eflujo, a su capacidad de reparación del ADN y a su resistencia a la apoptosis. Por ello no es de extrañar que, si las CSCs comparten muchas de sus propiedades con las células madre normales, sean también resistentes a los tratamientos anticancerígenos convencionales de quimio y radioterapia, los cuales se dirigen principalmente al tumor inhibiendo la síntesis de ADN o la división celular de las células que se dividen más rápidamente^{109,110}. Terapias como las basadas en taxanos o platinos normalmente conducen a una reducción de la masa tumoral gracias a la eliminación de la progenie de las CSCs, pero a su vez producen un aumento en la proporción de CSCs que genera recidivas y metástasis¹¹¹. Por lo tanto, para tratar eficazmente el cáncer y lograr una mejora en la tasa de supervivencia de los pacientes, es importante encontrar combinaciones de tratamientos que se centren no sólo en el grueso del tumor sino también en la erradicación de estas CSCs, para lo cual es necesario el desarrollo de nuevos métodos que nos permitan aislar e identificar las CSCs, conociendo así su origen, marcadores celulares y mecanismos biológicos.

En este sentido, el primer tumor sólido en el que se consiguió aislar y propagar las CSCs *in vivo* e *in vitro* fue el de mama, donde se demostró la existencia de una pequeña población de células CD44⁺/CD24⁻ que presentaban propiedades de células madre y que fueron capaces de

formar nuevos tumores cuando se inyectaban en ratones inmunodeprimidos^{112,113}. Las CSCs de vejiga o CSCs uroteliales (también llamadas UCSCs) fueron identificadas por primera vez en 2009¹¹⁴ y podrían ser una de las razones del fracaso del tratamiento adyuvante y de los malos resultados de control oncológico, por lo que es necesario el desarrollo de un protocolo de tratamiento optimizado basado en un panel de marcadores específicos de CSCs¹¹⁵⁻¹¹⁹.

6.1. Marcadores de CSCs

Desde su descubrimiento, todos los esfuerzos se han centrado en la identificación de marcadores de las CSCs; sin embargo, aunque se han descrito muchos marcadores útiles, ninguno de ellos ha demostrado ser exclusivo de éstas, ya que se expresan también en las células madre normales, que en el caso de la vejiga son las células madre uroteliales basales¹¹⁵.

Por un lado, en cuanto a los marcadores de superficie celular, se ha sugerido que las UCSCs están enriquecidas en una subpoblación de células MUC1-CD44v6⁺¹²⁰, que se correlaciona con la expresión de CD44v6 en líneas celulares de cáncer de vejiga con propiedades de células madre¹²¹. Independientemente de los subtipos, la expresión de CD44 también se ha postulado como marcador junto con KRT5, cuya coexpresión parece indicar un fenotipo basal en el que se sobreexpresan varios oncogenes implicados en autorrenovación como CTNNB1 (β -catenina), BMI1, STAT3, GLI1, POU5F1 (Oct-4) y NANOG¹¹⁴. Además, en los tumores uroteliales primarios se ha identificado una subpoblación KRT17⁺67LR⁺CAECAM⁻ con un patrón de diferenciación similar al de las células basales uroteliales normales, en la que los genes de la cascada de señalización Wnt y otros implicados en quimiorresistencia están regulados al alza, pudiéndose encontrar una correlación con la progresión tumoral¹²². En 2012, Huang et al.¹²³ describió una subpoblación de células de cáncer de vejiga CD133⁺ que mostraban características de CSCs *in vitro* e *in vivo*, proponiendo así a CD133 como posible marcador de UCSCs.

Por otro lado, en cuanto a proteínas intracelulares asociadas con autorrenovación y resistencia a fármacos, se ha observado que la expresión del marcador de células madre embrionarias Oct-4 se da en muestras de pacientes con cáncer de vejiga y que su sobreexpresión en líneas celulares promueve la migración e invasión *in vitro* e *in vivo*^{124,125}. Previamente se había descrito que la proteína aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1) estaba implicada en la formación de metástasis y se asociaba con peor pronóstico en algunos tumores sólidos como el carcinoma de mama¹²⁶ o de próstata¹²⁷. Posteriormente, en relación con las UCSCs, se ha demostrado que la subpoblación ALDH1A1⁺ posee mayor capacidad tumorigénica *in vitro* y mayor eficiencia en la formación de tumores *in vivo*. Además, en los pacientes con cáncer de vejiga, la alta expresión de ALDH1A1 se correlaciona con los grados y estadios del tumor, así como con la progresión, metástasis y menor supervivencia global¹²⁸. Cabe señalar también a los miembros de la familia Sox, sobre todo Sox-2 y Sox-4, cuya alta expresión ha sido utilizada en los últimos años para reconocer la presencia de CSCs en varios tipos de tumores entre los que se encuentra el carcinoma urotelial^{129,130}.

Por último, uno de los ensayos funcionales que se han utilizado para el aislamiento de UCSCs hace uso de la capacidad de resistencia a múltiples fármacos de las mismas debido a la expresión de transportadores ABC (del inglés *ATP-binding cassette*) que permite efluir eficazmente a los fármacos. Concretamente, en líneas celulares de cáncer de vejiga se ha utilizado la capacidad de bombeo de los colorantes Hoechst 33342 y DyeCycle Violet para aislar las denominadas “*side-populations*” mediante citometría de flujo. Estas células han demostrado tener una mayor capacidad de formación de colonias y autorrenovación, así como características de diferenciación que son típicas de las CSCs y que están ausentes en las células “*non-side-populations*”^{131,132}. A pesar de todo, como se ha comentado anteriormente aún no hay un consenso en los marcadores moleculares expresados exclusivamente por las UCSCs, por lo que son necesarios también ensayos funcionales que incluyan xenotrasplantes para confirmar el fenotipo de las poblaciones de CSCs aisladas.

6.2. Vía Wnt/ β -catenina

Es ampliamente conocido que la cascada de señalización mediada por la vía Wnt/ β -catenina es importante para impulsar la autorrenovación y la diferenciación, ambos mecanismos importantes tanto para las células madre normales como para las tumorales^{133,134}. En apoyo de esta hipótesis está el hecho de que muchos marcadores utilizados para identificar y aislar poblaciones de CSC, como los marcadores de superficie LGR5/GPR49, CD44, CD24 o Epcam, u otras enzimas como la ALDH1A1^{135,136} son en sí mismos genes diana de Wnt/ β -catenina.

La señalización de Wnt engloba un grupo de tres vías evolutivamente conservadas, siendo la vía canónica la que está más relacionada con la proliferación y el cáncer. Esta vía presenta dos estados de activación, inactivo (“OFF”) (**Figura 6A**) o activo (“ON”) (**Figura 6B**), y es β -catenina la proteína citoplasmática que juega un papel central, por lo que su estabilidad está finamente regulada. De manera resumida, el estado inactivo se produce en ausencia de ligandos Wnt. En este contexto, dos proteínas de andamiaje del complejo de destrucción (APC y Axina) están constantemente unidas a β -catenina en el citoplasma para permitir que ésta sea fosforilada secuencialmente en su extremo amino por las quinasas de serina/treonina caseína quinasa 1 (CK1) y glucógeno sintasa quinasa 3 beta (GSK3 β). Estas fosforilaciones son responsables del reconocimiento de β -catenina por β -TrCP (proteína β -transducina contenedora de repeticiones F-box), una subunidad de ubiquitina ligasa E3 que dirige a β -catenina junto a todo el complejo hacia su degradación proteasomal. En el estado activo, la señalización se inicia cuando los ligandos Wnt se unen a su receptor correspondiente, provocando su asociación con el complejo intacto. Tras ello, el complejo de destrucción sigue capturando y fosforilando a β -catenina, pero la posterior ubiquitilación por β -TrCP queda bloqueada, por lo que la β -catenina recién sintetizada se acumula en el citoplasma y se desplaza al núcleo, donde se unirá a las proteínas de la familia Tcf/Lef (factor de células T/factor potenciador linfocitario) convirtiéndolas en activadores transcripcionales para permitir la expresión de los genes diana de la vía Wnt^{137–139}.

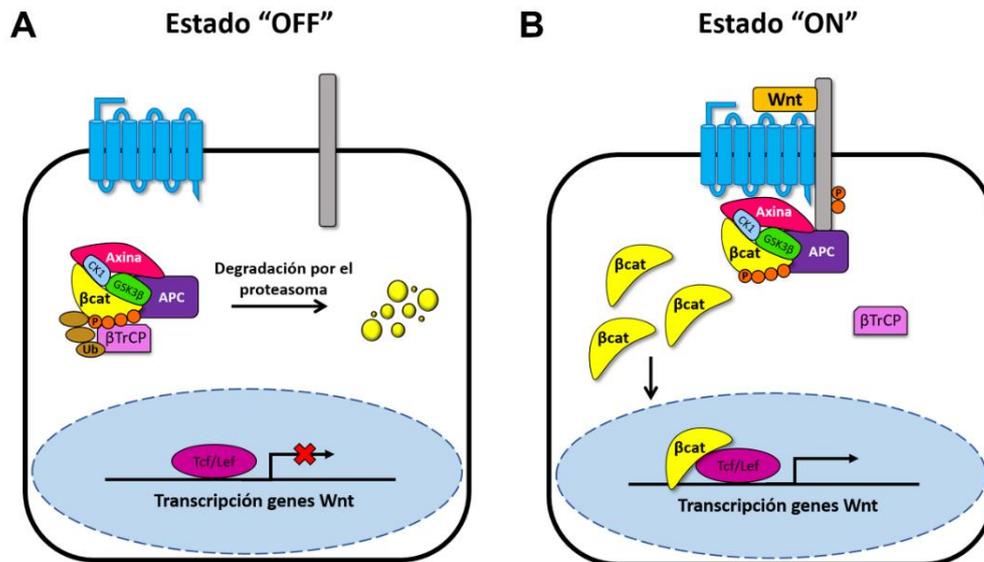


Figura 6. Esquema de la vía canónica de señalización Wnt. **A.** Estado "OFF" o inactivo. En ausencia de Wnt el complejo de destrucción formado por APC, Axina, y las quinasas CK1 y GSK3β reside en el citoplasma, donde se unen, fosforilan y ubiquitinan a β-catenina por β-TrCP provocando su degradación por el proteasoma. **B.** Estado "ON" o activo. En presencia de Wnt se induce la asociación del complejo de destrucción intacto con el receptor. Tras esta unión, el complejo de destrucción sigue capturando y fosforilando a β-catenina, pero la ubiquitinación por β-TrCP está bloqueada, por lo que la nueva β-catenina recién sintetizada se acumula y transloca al núcleo. Adaptado de Vivian S.W. Li *et al.*, 2012¹⁴⁰.

La sobreexpresión de Wnt y/o la acumulación de β-catenina se ha visto en numerosos tumores, y la desregulación de la vía, principalmente por mutaciones inactivadoras del supresor tumoral APC o por mutaciones oncogénicas de β-catenina, conduce a la proliferación maligna, sobre todo en cáncer de colon. En las CSCs, la señalización Wnt desempeña un papel fundamental en procesos como la autorrenovación, la dediferenciación, la inhibición de la apoptosis o la metástasis en distintos tipos de cáncer^{105,134,137,141}. La activación de la vía de señalización de β-catenina se da frecuentemente en tumores hematológicos, permitiendo el establecimiento de las propiedades de resistencia a fármacos de las CSCs¹⁴², y se ha demostrado que promueve la autorrenovación de éstas en cáncer de próstata¹⁴³. En cáncer de mama se ha visto que las CSCs presentan niveles más altos de señalización Wnt/β-catenina que el resto del tumor, lo cual parece estar asociado a una mayor recurrencia y peor pronóstico^{144,145}. Sin embargo, aunque estas pruebas son bastante convincentes, se necesitan más estudios para caracterizar qué diferencias, si las hay, existen entre la regulación mediada por Wnt de las células madre normales y las CSCs.

La vía Wnt/β-catenina es necesaria para la regeneración del urotelio normal tras una lesión, por lo que parece lógico que también esté implicada en la patogénesis del cáncer de vejiga. De hecho, se ha demostrado que β-catenina está sobreexpresada en muestras de cáncer de vejiga humano en comparación con el urotelio normal, y que la señalización Wnt se activa y contribuye a la progresión tumoral^{122,146,147}. Además, en un estudio del polimorfismo en 40 genes de la vía de señalización Wnt/β-catenina se ha sugerido que las variantes podrían tener un papel en la etiología del cáncer de vejiga¹⁴⁸. Sin embargo, aunque se ha propuesto su implicación en el

comportamiento maligno¹⁴⁹, la eficacia terapéutica de la inhibición de la señalización Wnt en las UCSCs aún no está bien estudiada.

7. Degradación de proteínas

Para el correcto funcionamiento de los distintos procesos celulares es tan importante la generación de nuevas proteínas como la eliminación de las que ya no son útiles, ya sea porque han dejado de ser funcionales o porque se requiera de su eliminación para evitar la interferencia con otros procesos que han de suceder. Para ello, la célula eucariota dispone de dos sistemas: la autofagia, mediada por el lisosoma, y el sistema de degradación dependiente de ubiquitina (UPS).

7.1. Autofagia

La autofagia o macroautofagia hace referencia al proceso por el que el material intracelular a degradar es transportado en vesículas denominadas autofagosomas que se fusionarán posteriormente con los lisosomas, permitiendo el reciclaje de componentes para regular la homeostasis celular y mantener el metabolismo energético de la célula. Esta autofagia puede ser selectiva, si va dirigida a proteínas de vida media larga, orgánulos dañados, agregados de proteínas o patógenos intracelulares; o no selectiva, si porciones aleatorias del citosol son envueltas en vesículas¹⁵⁰.

La formación y procesamiento de los autofagosomas consta de cuatro etapas (iniciación, nucleación, maduración y fusión con el lisosoma), y está mediada por la familia de proteínas ATG (del inglés *autophagy-related protein*). El proceso se inicia con la aparición de una estructura de doble membrana que envuelve el material citoplásmico denominada fagóforo, cuya formación requiere del complejo de iniciación ULK1 regulado a su vez por el complejo mTOR (receptor de la rapamicina de los mamíferos), y de la interacción del complejo de nucleación Beclina-1/VSP34. A continuación, la elongación, cierre y maduración del fagóforo para originar el autofagosoma requiere de dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina: el complejo ATG5-ATG12-ATG16 y la proteína de cadena ligera asociada a microtúbulos LC3. Cuando LC3 se lipida, pasa de su forma soluble en citoplasma (LC3-I) a su forma asociada a los autofagosomas (LC3-II) unida a la doble membrana del fagóforo, siendo ésta la etapa limitante de la velocidad del proceso debido a que media el cierre de la membrana del autofagosoma. Finalmente, este autofagosoma maduro se fusiona con un lisosoma formando un autolisosoma donde se degradará el material englobado, seleccionado gracias a los receptores específicos de autofagia como p62/SQSTM1. Estos receptores son capaces de reconocer proteínas ubiquitiladas y formar agregados reconocidos por LC3-II para reclutarlos en el interior del autofagosoma, donde ellos mismos también son degradados mediante este proceso para reciclarse¹⁵⁰⁻¹⁵².

La regulación de la autofagia se ha postulado recientemente como una posible estrategia terapéutica contra el cáncer. Sin embargo, numerosos estudios han demostrado que esta autofagia desempeña un papel dual dependiendo de las características del tumor y del estado

de desarrollo del mismo. Generalmente, se ha sugerido que la autofagia puede funcionar como supresor tumoral en las primeras etapas al asegurar la integridad del genoma eliminando estructuras dañadas y evitando la formación de tumores. En cambio, una vez que la transformación maligna se ha producido, la autofagia puede tener un efecto citoprotector permitiendo el suministro continuo de precursores de macromoléculas para abastecer la gran demanda energética de las células tumorales o actuando como mecanismo de resistencia a la quimioterapia. Por ello, es necesario identificar qué factores causan este comportamiento diferencial para comprender mejor los efectos de la autofagia, especialmente en el cáncer de vejiga¹⁵³⁻¹⁵⁵.

7.2. Proteasoma

El sistema ubiquitina proteasoma es el encargado de la degradación selectiva de una gran variedad de proteínas implicadas en numerosos procesos como la progresión del ciclo celular, la transducción de señales o la regulación transcripcional, por lo que un sistema defectuoso puede conducir a patologías como la transformación neoplásica. Esta degradación de proteínas por el proteasoma tiene lugar si éstas están previamente ubiquitiladas, y consta de dos etapas bien diferenciadas: el marcaje de la proteína sustrato mediante la unión covalente de moléculas de ubiquitina y la degradación de la proteína poliubiquitilada por el complejo 26S del proteasoma^{156,157}.

De manera simplificada, el primer paso está mediado por una cascada de reacciones en la que participan al menos tres enzimas; una enzima activadora de ubiquitina (E1) que activa la molécula de ubiquitina mediante la formación de un enlace tioéster en su sitio activo, una enzima conjugante de la ubiquitina (E2) que la transfiere y una enzima ligasa de ubiquitina (E3) que finalmente une la molécula de ubiquitina a la proteína sustrato. Además, esta ubiquitilación puede ser revertida por las enzimas desubiquitinasas (DUBs), que eliminan las ubiquitinas de las proteínas proporcionando una regulación adicional a la degradación y son fundamentales para el mantenimiento de las moléculas de ubiquitina de la célula (**Figura 7A**)¹⁵⁷⁻¹⁵⁹. De entre los tres tipos de enzimas que participan en el proceso, las ligasas E3 se caracterizan por la presencia de al menos dos dominios funcionales: uno que media la interacción con las enzimas E2 y otro responsable del reconocimiento específico de las proteínas sustrato. De esta forma, según la identidad del dominio implicado en la interacción con las enzimas E2, estas ligasas E3 se pueden clasificar en dos grandes familias:

- Las que poseen dominio HECT (del inglés *Homologous to E6-associated proteína C Terminus*), que forman un enlace tioéster con la ubiquitina y la transfieren directamente al sustrato.
- Las que poseen dominio RING (del inglés *Really Interesting New Gene*) o *RING-like*, que actúan como proteínas andamio entre los sustratos y las E2 para que éstas le transfieran las ubiquitinas al mismo. Esta familia de ligasas es la más numerosa, y está dividida a su vez en dos subfamilias según consten de una o múltiples subunidades. Es en esta

última subfamilia donde encontramos a las ligasas de tipo RING-culina (CRL), que incluye dos enzimas estructuralmente similares implicadas en la degradación de proteínas clave en la regulación del ciclo celular: el complejo SCF (SKP1-CUL1-F-box) y el APC/C^{159,160}.

7.2.1. Complejo SCF (SKP1-CUL1-F-box)

Respecto a lo que nos atañe en este apartado, cabe destacar al complejo SCF como el principal complejo implicado en la degradación de proteínas desde la fase G1 del ciclo hasta el inicio de la mitosis. Este complejo presenta tres componentes invariables: una proteína RBX1 con estructura RING que se une a la enzima E2, una proteína adaptadora SKP1 y una proteína de andamiaje CUL1 que sustenta el complejo uniendo a RBX1 y SKP1; y un componente variable, la proteína F-box, que se asocia a todo el complejo a través de SKP1 mediante su extremo N-terminal y cuya función es reconocer los sustratos por su región C-terminal a través de secuencias específicas fosforiladas presentes en ellos (fosfodegrones) (**Figura 7B**). Basándonos en los dominios de unión a los sustratos, las proteínas F-box se pueden clasificar en tres categorías: FBXW (presentan repeticiones WD40), FBXL (presentan repeticiones ricas en leucina) y FBXO (con otros dominios estructurales diferentes). Las ligasas SCF que tienen los papeles más importantes en el control del ciclo celular contienen como F-box a FBXW7 y β -TrCP de la categoría FBXW, y SKP2, perteneciente a la clase FBXL¹⁵⁸⁻¹⁶¹.

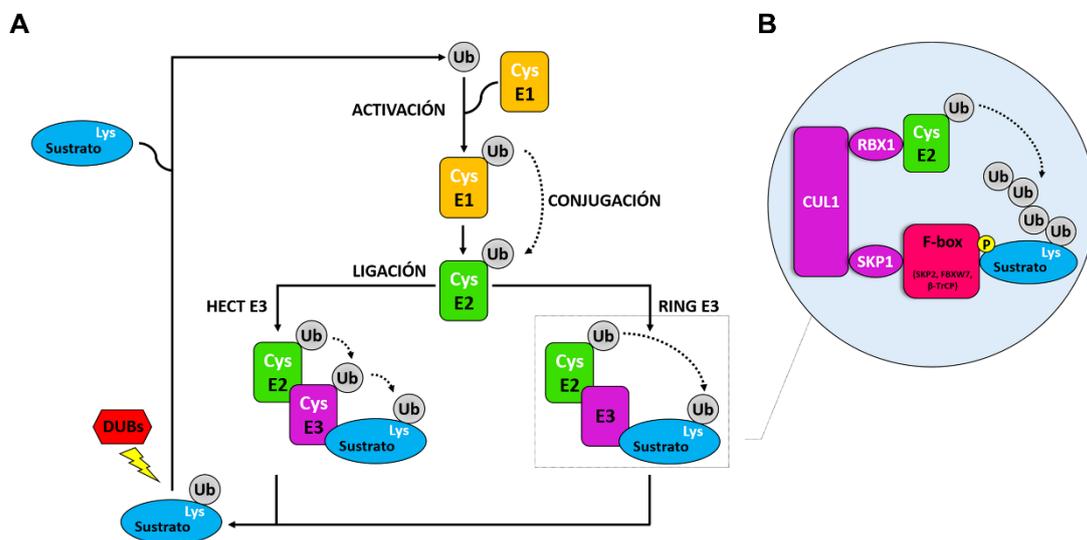


Figura 7. Representación esquemática del proceso de ubiquitinación de proteínas. A. Maquinaria de conjugación de la ubiquitina. Primeramente, la ubiquitina es activada por la E1, tras lo cual queda unida a ésta mediante un enlace tioéster altamente energético. Después, la ubiquitina es transferida a la cisteína del sitio activo de una E2. En el siguiente paso la ubiquitina es transferida desde la E2 hasta el sustrato, bien de forma directa (E3 de tipo RING), o bien a través de la formación de un intermediario en el que la ubiquitina se une a la E3 y de ahí pasa al sustrato (E3 de tipo HECT). Esta ubiquitinación es revertida por las DUBs, que eliminan las moléculas de ubiquitina de las proteínas y rompen las cadenas de poliubiquitina. **B.** Representación esquemática del complejo SKP1-CUL1-F-box (SCF). Se representan los tres componentes invariables (RBX1, SKP1 y CUL1) así como el componente variable F-box (destacando SKP2, FBXW7 y β -TrCP), que reconoce secuencias específicas fosforiladas presentes en los sustratos (fosfodegrones), ubiquitinándolos y mediando su degradación.

En esta tesis merece mención especial la E3 ubiquitina ligasa SCF β -TrCP, que reconoce un amplio rango de proteínas celulares con papeles antagonistas en distintos procesos biológicos, de manera que puede comportarse como oncogén y como supresor tumoral dependiendo del contexto celular o del tipo de tejido específico del que se trate. En cuanto a su regulación, se sabe que β -TrCP se expresa a niveles bajos de manera endógena, y que su función puede verse alterada por diversos mecanismos. Las propias isoformas β -TrCP1 y β -TrCP2 también son ubiquitiladas y degradadas vía UPS. En este sentido, parece ser que la homodimerización de β -TrCP1 o β -TrCP2 promueve su actividad E3 ligasa, mientras que su heterodimerización media la autodegradación. Además, ambas pueden ser reconocidas y degradadas por la otra bajo determinadas circunstancias¹⁶².

Algunos autores defienden que β -TrCP desempeña un papel principalmente oncogénico, ya que se ha demostrado su sobreexpresión (tanto a nivel de ARNm como de proteína) y correlación con mal pronóstico clínico en una gran variedad de carcinomas humanos diferentes como el cáncer colorrectal, hepatoblastoma, melanoma o cáncer de páncreas. Esta función oncogénica podría explicarse a través de la degradación de ciertos sustratos conocidos como I κ B (regulador negativo de la señalización NF κ B), PDCD4 (supresor tumoral que inhibe a eIF4A), o CHK1 tras daño al ADN (cuya degradación permite que las células sigan ciclando, lo que conduce a la inestabilidad genómica y progresión tumoral). Es importante destacar que, tras la recuperación del daño en el ADN, la β -TrCP restaura la actividad de CDK1 mediante la degradación de WEE1. Por lo tanto, la alteración de la degradación de los reguladores del ciclo celular es claramente un factor que contribuye a la proliferación desenfrenada típica en las células cancerosas^{161,163,164}.

Por otro lado, se han identificado mutaciones somáticas de β -TrCP en diversas neoplasias humanas como el cáncer gástrico, de próstata o mama que facilitarían la activación de la vía de señalización Wnt al estabilizarse su sustrato β -catenina, promoviendo así el desarrollo de tumores. De hecho, los altos niveles de β -catenina en muchos cánceres suelen deberse a su estabilización, aunque ésta, más que por alteraciones de la β -TrCP, con frecuencia ocurre por mutaciones en el APC o la Axina. Otro ejemplo sería la degradación de MDM2 mediada por β -TrCP tras daño al ADN, lo que normalmente resultaría en la estabilización de p53 para evitar la progresión tumoral. Si la mutación provoca una inactivación de β -TrCP, ésta estaría exhibiendo características de supresor tumoral. En el mismo sentido tenemos a los sustratos CDC25 y EMI1, cuyos niveles se encuentran elevados debido a su estabilización en muchos tipos de tumores como mama, ovario o colon, aunque la relación entre ellos y la expresión o mutaciones en β -TrCP es aún desconocida^{161,163,164}.

También se ha visto que β -TrCP podría estar implicada en la resistencia a fármacos en distintos tipos tumorales. El mecanismo molecular subyacente a esta resistencia o sensibilidad a los fármacos aún debe ser dilucidado; sin embargo, teniendo en cuenta que una sola E3 ligasa se dirige a múltiples sustratos, así como el contexto celular específico de cada caso, β -TrCP podría convertirse en una diana terapéutica para superar esta resistencia a fármacos y mejorar la sensibilidad de las células tumorales¹⁶⁵.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En la actualidad, cisplatino y paclitaxel son agentes quimioterápicos comunes en la primera o segunda línea de tratamiento del carcinoma urotelial músculo-invasivo y/o metastásico. Sin embargo, aunque aportan beneficios a la supervivencia de estos pacientes, los efectos secundarios y la adquisición de resistencia hacen necesaria la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas. Por ello, la hipótesis general de esta investigación se basa en que el análisis de los mecanismos de resistencia a cisplatino y paclitaxel permitirá el desarrollo y el uso efectivo de estos agentes quimioterápicos en combinación con otros fármacos, para evitar la quimiorresistencia y la progresión del cáncer de vejiga. Con este fin, se plantean los siguientes objetivos concretos:

1. Estudiar el papel de la proteína antiapoptótica Mcl-1 en la resistencia a paclitaxel en líneas celulares de cáncer de vejiga músculo-invasivo, analizar su potencial como marcador pronóstico en muestras clínicas de cáncer de vejiga e investigar si la inhibición farmacológica de Mcl-1 con obatoclasta es capaz de favorecer la respuesta al tratamiento con paclitaxel.
2. Caracterizar el papel de la vía Wnt/ β -catenina en la regulación del fenotipo de célula madre tumoral y la adquisición de resistencia a paclitaxel en líneas celulares de cáncer de vejiga músculo-invasivo, determinar si su inhibición con XAV939 puede ser un mecanismo de sensibilización a paclitaxel y analizar la expresión de β -catenina y marcadores de célula madre tumoral en muestras clínicas de cáncer de vejiga.
3. Investigar la influencia de las proteínas implicadas en la reparación del ADN mediante recombinación homóloga, BRCA1 y CtIP, en la adquisición de resistencia a cisplatino en líneas celulares de cáncer de vejiga músculo-invasivo, estudiando el posible papel del sistema de degradación de proteínas SCF ^{β -TrCP} en su regulación y en la respuesta a cisplatino.
4. Comprobar la relevancia de estas vías de apoptosis, Wnt/ β -catenina, reparación del ADN y otras relacionadas, en un análisis transcriptómico diferencial entre muestras clínicas de pacientes con cáncer de vejiga músculo-invasivo y no músculo-invasivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivo de líneas celulares

1.1. Líneas celulares

La línea celular de cáncer de vejiga 5637, así como las líneas celulares de cáncer de mama T47D, MDA-MB-468 y MDA-MB-231 se obtuvieron de la colección de células de *Interlab Cell Line Collection* (Génova, Italia). De manera rutinaria, las células se cultivaron en medio RPMI 1640 (Lonza) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% (Sigma), glutamina 2 mM (Gibco), tampón HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazine-etanosulfónico) 10 mM (Gibco), y un 1% de una mezcla de penicilina y estreptomycin que contiene 10.000 unidades de penicilina y 10 mg de estreptomycin/ml (Sigma).

Las líneas celulares de cáncer de vejiga HT1376 y HT1197 se obtuvieron de la colección de células de Sigma y fueron cultivadas en medio MEM/EBSS con glutamina estable (HyClone) suplementado con FBS al 10% (Biowest), un 1% de la mezcla de penicilina y estreptomycin (Sigma) y una solución de aminoácidos no esenciales 1 mM (Sigma). La línea celular de cáncer de ovario SKOV3 se obtuvo de la colección de células de Sigma. En este caso, las células fueron cultivadas en medio McCoy's 5A con HEPES y glutamina estable (Lonza) suplementado con FBS al 10% (Sigma), un 1% de la mezcla de penicilina y estreptomycin (Sigma) y una solución de aminoácidos no esenciales 1 mM (Sigma).

Todas las líneas celulares se mantuvieron en un incubador humidificado a 37°C y 5% de CO₂ (Thermo Scientific). Los experimentos se realizaron usando células que no habían excedido los primeros diez pases tras ser descongeladas, y que habían sido testadas para contaminación por *Mycoplasma*. Todas las manipulaciones se hicieron en una campana de flujo laminar de Clase II Bio-II-A (nivel de seguridad biológica 2, Telstar).

1.1.1. Generación de la línea celular 5637 resistente a paclitaxel

Las células de la línea 5637 se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado al que se le adicionaba paclitaxel 4 nM durante dos meses. A continuación, se seleccionaron aquellos clones que se mantuvieron viables y se redujo la concentración de paclitaxel a 2 nM para mantener las células en estas condiciones durante un mes. Posteriormente, se redujo de nuevo la concentración de paclitaxel a 1 nM y se continuó con el cultivo de las células un mes más. Finalmente, las células viables se cultivaron sin paclitaxel añadido durante 30 días. A la línea celular generada se le denominó 5637R.

1.1.2. Generación de líneas celulares transfectadas

Las células de la línea HT1376 fueron transfectadas de manera estable mediante el método de infección con lentivirus con los plásmidos pCS2 HA-β-TrCP y pCS2 HA-β-TrCP ΔF proporcionados por el Dr. F. Romero (Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla). Para ello, las células se sembraron en placas de 6 pocillos (Nunc) y cuando alcanzaron una

confluencia del 70-80% se trataron con 10 μ l virus diluidos en 1 ml medio/pocillo. Tras 24 horas, se cambió el medio y se añadió blasticidina 20 μ g/ml (Invivogen) durante el tiempo necesario para que las células sin transfectar muriesen y se formasen clones aislados con las células transfectadas. Finalmente, las células viables se cultivaron sin adición de blasticidina y se amplificaron para su congelación. A las líneas celulares generadas se les denominó HT1376 HA- β -TrCP y HT1376 HA- β -TrCP Δ F respectivamente.

1.2. Congelación y descongelación de células

Entre 4 y 6 horas previas a la congelación, a los cultivos celulares subconfluentes se les cambió el medio por medio nuevo suplementado. En el momento de la congelación, las células se tripsinizaron y se resuspendieron en 1,5 ml de medio de congelación con aproximadamente 5×10^6 células/criotubo. Este medio se preparó a partir de su medio de cultivo rutinario añadiendo dimetil-sulfóxido (DMSO, Calbiochem). Los criotubos se mantuvieron a 4°C durante una hora, se pasaron a -80°C durante 24-48 horas y posteriormente se conservaron en un contenedor de nitrógeno líquido de manera indefinida. Para la descongelación de células se transfirieron los criotubos del nitrógeno líquido a un baño a 37°C en agitación. Una vez descongeladas, las células se resuspendieron en su medio de cultivo habitual suplementado, se sembraron en un frasco de cultivo y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂.

1.3. Tripsinización

Los cultivos fueron diluidos de forma periódica mediante tripsinización para mantenerlos siempre en subconfluencia. Las células se lavaron con tampón fosfato salino (PBS, Sigma) y posteriormente se añadió una solución de tripsina-ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 0,05% (Lonza). A continuación, las células se incubaron a 37°C durante el tiempo mínimo necesario para despegarlas, diferente para cada una de las líneas celulares. Una vez despegadas, se neutralizó la tripsina añadiendo un volumen de medio suplementado cuatro veces superior al volumen de tripsina utilizado. Finalmente, las células se centrifugaron durante 5 minutos a 1800 rpm, se resuspendieron en medio suplementado y se sembraron de nuevo en frascos de cultivo. Este mismo procedimiento se usó para recoger los experimentos realizados con dichas líneas celulares.

2. Ensayos celulares

2.1. Tratamiento con fármacos

Las soluciones stock de los distintos fármacos se prepararon a 10 mM en DMSO o a 1 mM en H₂O destilada, se alicuotaron y se conservaron a -20°C. Para los diferentes tratamientos, las células se sembraron en subconfluencia y se incubaron durante 24 horas para permitir su adhesión. A continuación, se añadió DMSO o H₂O a las células usadas como control y los diferentes fármacos o combinaciones de fármacos indicados en cada caso a las concentraciones que aparecen en la **Tabla 2**. Para los tratamientos secuenciales se adicionó el primer fármaco y

transcurridas 8, 12 o 24 horas se añadió el segundo tratamiento hasta completar el tiempo final de 24 o 48 horas.

Tabla 2. Fármacos utilizados.

Fármaco	Casa Comercial	Mecanismo de acción	Concentración (μM)
Bafilomicina A1	Selleck Chemicals	Inhibidor de autofagia	0,4
Cisplatino	Selleck Chemicals	Agente alquilante	5
Cloroquina	Enzo LifeSciences	Inhibidor de autofagia	50
Obatoclastax	Selleck Chemicals	BH3 mimético	1
Paclitaxel	Calbiochem	Estabilizador de microtúbulos	0,1
Rapamicina	Enzo LifeSciences	Inductor de autofagia	0,8
XAV939	Selleck Chemicals	Inhibidor de tanquirasas	10
Z-VAD-fmk	Selleck Chemicals	Inhibidor pan-caspasas	20

2.2. Ensayos de citotoxicidad

Se sembraron entre 5×10^3 y 2×10^4 células/pocillo dependiendo de la línea celular, en placas de 96 pocillos (Nunc). La cantidad celular óptima se calculó previamente mediante curvas de dilución de las diferentes líneas celulares. Tras la adhesión celular, se añadió medio que contenía diferentes concentraciones de fármacos, en pocillos por cuadruplicado. Se realizaron diluciones seriadas para poder abarcar el rango de dosis apropiado para los análisis. Las células se expusieron al fármaco durante 48 horas y los ensayos de citotoxicidad se realizaron usando *AlamarBlue® Cell Viability Reagent* (Thermo Scientific) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El reactivo AlamarBlue se adicionó al 10% del volumen del pocillo y se incubó a 37°C durante 4 horas. A continuación, se midió la fluorescencia con el equipo CLARIOstar (BMG Labtech) a una longitud de onda de excitación de 540 nm y una longitud de onda de emisión de 585 nm. Los datos se normalizaron con el tratamiento control con DMSO y la concentración inhibitoria media (IC50) se calculó usando el software Prism 7.0 (GraphPad).

2.3. Ensayos de silenciamiento y sobreexpresión génica transitoria

Para los ensayos de silenciamiento génico transitorios mediante ARN de interferencia pequeño (siARN) se utilizaron *pools* validados de CTNNB1-, BRCA1- siARN y siARN control negativo obtenidos de GE Dharmacon (ON-TARGET plus SMART pools L-003482, L-003461, y

ON-TARGET plus Non-targeting pool D-001810, respectivamente). En el caso del silenciamiento transitorio de β -TrCP se utilizaron los oligonucleótidos S: 5' AAGUGGAAUUUGUGGAACAUC 3' y R: 3' GAUGUCCACAAAUCCACUU 3' (Sigma). Las transfecciones se llevaron a cabo usando el reactivo DharmaFECT 2 (GE Dharmacon) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todos los siARNs se usaron a 50 nM. Las células se sometieron a los diferentes tratamientos tras 24 horas de silenciamiento.

Para los ensayos de sobreexpresión génica transitoria se utilizaron los plásmidos pCMV6-XL5 como control vacío y pCMV6-XL5-CTNNB1 (Origene). Las transfecciones se llevaron a cabo usando el reactivo FuGENE (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las células se transfectaron con 2 μ g de plásmido, y se sometieron a los diferentes tratamientos tras 24 horas de transfección.

2.4. Ensayos de formación de tumoresferas

Para estudiar la capacidad de las células de formar tumoresferas se sembraron 6×10^3 células por triplicado en placas de 24 pocillos de baja adherencia (Corning). Para ello, las células fueron resuspendidas en 1 ml de su medio rutinario o en 1 ml de medio MammoCult suplementado (StemCell Technologies), compuesto por medio basal MammoCult, 10% de suplemento de proliferación MammoCult, 4 μ g/ml de heparina, 0,48 μ g/ml de hidrocortisona, y un 1% de una mezcla de penicilina y estreptomina (Sigma). Las células se cultivaron durante 5 días, se tomaron fotos de las esferas formadas en un microscopio invertido (Olympus IX-71) y se cuantificó el número total de esferas de cada pocillo.

3. Citometría de flujo (FACS)

3.1. Análisis de ciclo celular

Tras realizar los diferentes tratamientos, las células se tripsinizaron, se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm y se lavaron en 1 ml de PBS. Después de una nueva centrifugación de 10 minutos a 3000 rpm, se retiró el sobrenadante y las células se fijaron en etanol frío al 70% durante 1 hora a 4°C. Tras este tiempo, se volvieron a centrifugar las células durante 10 minutos a 3.000 rpm, se realizaron dos lavados en PBS y se incubaron con una solución de 0,2 mg/ml de ARNasa A (Sigma) durante una hora a 37°C. Para el marcaje de células, se añadió 5 μ l de yoduro de propidio 1 mg/ml (Sigma) y finalmente, se incubaron durante 15 minutos a 4°C en oscuridad. En algunas ocasiones, principalmente en aquellos experimentos más delicados, se utilizó el kit *CycleTest Plus DNA reagent kit* (BD Biosciences) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para analizar el contenido de ADN se utilizó el citómetro de flujo (FACScan, BD Biosciences), así como los programas informáticos CellQuestPro (BD Biosciences) y ModFit LT2 (Verity Software) que permitieron la adquisición de datos y la cuantificación de los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular, respectivamente.

3.2. Análisis de marcadores de células madre

Para estudiar la expresión de los marcadores CD44 y CD24, 1×10^6 células previamente tripsinizadas se resuspendieron en 125 μ l de PBS y se bloquearon con 12,5 μ l de tampón de bloqueo (Blocking Reagent, Roche) incubándose 10 minutos en hielo. A continuación, se añadieron 5 μ l de cada anticuerpo: CD44 conjugado con el fluoróforo APC y CD24 conjugado con el fluoróforo PE (Miltenyi Biotec), poniendo como controles un tubo sin anticuerpos, un tubo con el marcaje simple CD44-APC y otro tubo con el marcaje simple CD24-PE. El marcaje con los anticuerpos se incubó durante 30 minutos en hielo y luego se hicieron 2 lavados con PBS. Las células se centrifugaron 10 minutos a 3000 rpm y se resuspendieron finalmente en 500 μ l de PBS para examinarlas mediante un citómetro de flujo analítico FACS Canto II (BD Biosciences). Los resultados se analizaron mediante el software Diva.

4. Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)

Después de someterlas a los diferentes tratamientos, las células se tripsinizaron y se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm. Posteriormente, se resuspendieron en PBS y se realizaron improntas celulares sobre portaobjetos silanizados. A continuación, se fijaron en metanol-ácido acético glacial (3:1) durante 10 minutos a -20°C y se secaron al aire. Los portaobjetos se sumergieron durante 30 minutos en una solución de citrato sódico salino (SSC) 2x/Nonidet P-40 (NP40) 0,3% a 37°C , se deshidrataron en una serie gradada de etanoles de concentración creciente (70%, 80% y 96%) y se secaron nuevamente. Sobre las improntas se añadió la sonda centromérica para el cromosoma 17 (Vysis) y tras sellar la zona de hibridación con un cubreobjeto y adhesivo (Fixogum Rubber Cement, Marabu) se incubaron durante 5 minutos a 72°C para llevar a cabo la codesnaturalización del ADN celular y las sondas. La hibridación se realizó en cámara húmeda durante toda la noche a 37°C . Tras la hibridación, los portaobjetos se lavaron en una solución SSC 2x/NP40 0,3% durante 5 minutos a 72°C . A continuación, los cristales se introdujeron en una solución de detergente tampón fosfato 1x (PBD, MP Biomedicals) durante 5 minutos a temperatura ambiente y se dejaron secar antes de la contratinción de los núcleos con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Finalmente, se visualizaron en un microscopio de fluorescencia equipado con los filtros adecuados (Leica) y con una cámara digital y se contabilizó el número de señales para los cromosomas en al menos 100 células de cada condición. Por último, se calculó el porcentaje de células con ploidía normal y el porcentaje de células con ploidía superior a la normal en cada caso.

5. Técnicas de análisis del flujo autofágico

Para detectar el flujo autofágico se utilizó el kit *Cyto-ID™ Autophagy Detection kit* (Enzo), que mediante microscopía de fluorescencia y/o citometría de flujo permite una aproximación rápida, específica y cuantitativa para monitorizar la autofagia en células vivas. Además de los diferentes tratamientos utilizados en cada caso, como control positivo para bloquear o inducir el

flujo autofágico se utilizó cloroquina 50 μM o rapamicina 800 nM durante 18 horas, respectivamente. Como control negativo se utilizó DMSO.

5.1. Análisis del flujo autofágico mediante inmunofluorescencia

Tras el tratamiento, las células se tiñeron con el reactivo Cyto-ID™ Green dye según las instrucciones del fabricante, y se visualizaron y fotografiaron usando un microscopio de fluorescencia directo (Olympus BX-61). Mediante este método podemos analizar la formación de diferentes compartimentos autofágicos, ya que el reactivo Cyto-ID™ Green dye marca los autofagosomas con una tinción mínima de endosomas y lisosomas, revelando la formación de autofagosomas que no se han fusionado con el lisosoma mediante la aparición de *puncta* perinucleares o citoplásmicos. Además, la contratinción con el reactivo Hoeschst 33342 nos permite ver la fragmentación nuclear y la formación de cuerpos apoptóticos.

5.2. Análisis del flujo autofágico por citometría de flujo

Tras el tratamiento, las células se marcaron con el reactivo Cyto-ID™ Green dye durante 30 minutos a 37° C en oscuridad de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y se analizaron por citometría de flujo. Mediante este método, la intensidad de fluorescencia se correlaciona con la acumulación de vesículas autofágicas que resultan de la inhibición del flujo autofágico. De esta manera, la media de la intensidad de fluorescencia para cada condición se expresó como el nivel de cambio (*Fold-Change*, FC) en comparación al DMSO. Las células analizaron en el citómetro FACScan (BD Biosciences) usando el software CellQuest Pro.

6. Técnicas de análisis de expresión a nivel de ARNm

6.1. Extracción de ARN total

El ARN total de las muestras utilizadas se extrajo mediante el kit de extracción *AllPrepR DNA/RNA/miRNA* (Quiagen), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ARN aislado se cuantificó con NanoDrop One (Thermo Fisher) y se prepararon alícuotas con 1 μg de ARN para la transcripción reversa.

6.2. Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

A continuación, la obtención de ADN complementario (ADNc) se realizó mediante la transcripción reversa del ARN de las muestras con el kit *First Strand cDNA Synthesis* (Roche), de acuerdo con el protocolo del fabricante. De manera resumida, se mezcló en hielo 4 μl de tampón de retrotranscripción 5X, 1 μl de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), 1 μl Oligo dT, 0,5 μl de inhibidor de ARNasa, 0,5 μl de la enzima retrotranscriptasa y 2 μl de agua libre de nucleasas. Esta mezcla se adicionó a un tubo de PCR en el que previamente se había diluido 1 μg de ARN total en agua libre de nucleasas para completar el volumen de la reacción. Se mezcló el volumen de reacción en un vórtex durante unos segundos y se centrifugó brevemente. A

continuación, se incubaron los tubos 10 minutos a temperatura ambiente para permitir la unión del Oligo dT-Poli A, 1 hora a 50°C para permitir la síntesis de ADNc y 5 minutos a 85°C para inactivar la enzima. Una vez finalizada la reacción se guardó el ADNc a -20°C hasta su uso.

6.3. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

La detección de cambios en la expresión génica se realizó mediante PCR cuantitativa a tiempo real con ADNc procedente de la retrotranscripción reversa (RT-qPCR). Las qPCR se realizaron por triplicado en un volumen de 25 µl utilizando el kit *SensiFAST™ SYBR No-ROX kit* (BioLine) siguiendo las instrucciones del fabricante y con los oligonucleótidos cebadores específicos detallados en la **Tabla 3**. Estos cebadores se diseñaron mediante la herramienta Primer3 (<https://primer3.ut.ee/>) y se mandaron a fabricar a Sigma. La reacción de PCR se realizó en un sistema de PCR a tiempo real SmartCycler II (Cepheid) de acuerdo a las siguientes condiciones: 150 segundos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos a 72°C. La expresión de los genes analizados se calculó aplicando el método de cuantificación relativa $2^{-\Delta Ct}$, utilizando el gen HPRT1 como control endógeno (gen constitutivo o *housekeeping*).

Tabla 3. Cebadores utilizados. Fw: *forward*, cebador iniciador hacia delante; Rv: *reverse*, cebador iniciador reverso. Tm: temperatura de *melting* o de fusión.

Cebador	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)	Producto PCR (pb)
β-TrCP	Fw: CATTGTTTCTGCATCTGGGGAT	67,00	231
	Rv: TCAAATCGAATACAACGCACCA	67,20	
HPRT1	Fw: CGTCTTGCTCGAGATGTGAT	58,00	63
	Rv: GAGCACACAGAGGGCTACAA	60,00	

7. Técnicas de análisis de expresión a nivel de proteínas

7.1. Anticuerpos

Los anticuerpos primarios utilizados en esta tesis, su clonicidad, procedencia, aplicaciones y diluciones empleadas se detallan en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Anticuerpos utilizados. WB: *western blot*; IP: inmunoprecipitación; IF: inmunofluorescencia; IHQ: inmunohistoquímica.

Anticuerpo	Clonicidad	Casa comercial	Dilución			
			WB	IP	IF	IHQ
ALDH1A1	Ratón monoclonal	Santa Cruz	1:500			1:1000
Bak	Conejo policlonal	BD Biosciences	1:3000			
Bax	Conejo policlonal	BD Biosciences	1:2000			
Bcl-xL	Ratón monoclonal	Santa Cruz	1:1000			
Beclina-1	Ratón monoclonal	BD Biosciences	1:500			
BRCA1	Conejo policlonal	Abcam	1:2000	1:100		
Caspasa 3 activa (Asp175)	Conejo policlonal	Cell Signaling	1:750			
Caspasa 9 activa (Asp315)	Conejo policlonal	Cell Signaling	1:500			
CDK1	Ratón monoclonal	Santa Cruz	1:4000			
Ciclina B1	Conejo policlonal	Santa Cruz	1:500			
CtIP	Ratón monoclonal	Santa Cruz	1:1000			
LC3B	Conejo policlonal	Sigma	1:2000			
Mcl-1	Conejo policlonal	Santa Cruz	1:1000			1:1500

Oct-4	Conejo policlonal	Santa Cruz	1:2000			
p62	Conejo policlonal	Sigma	1:2000			
PARP	Ratón monoclonal	BD Biosciences	1:750			
p-GSK3β^{Ser9}	Conejo policlonal	Cell Signaling	1:1000			
p-Histona H3^{Ser10}	Conejo policlonal	Santa Cruz	1:1000			
RAD51	Ratón monoclonal	Santa Cruz	1:500			
Sox-2	Conejo policlonal	Santa Cruz	1:3000			1:200
β-actina	Ratón monoclonal	Sigma	1:20000			
β-catenina activa	Ratón monoclonal	Millipore	1:500			
β-catenina total	Ratón monoclonal	BD Biosciences	1:10000			1:1000
β-TrCP	Conejo policlonal	Cell Signaling	1:500	1:100		
γ-H2AX^{Ser139}	Ratón monoclonal	Millipore	1:5000		1:500	

7.2. Extracción de proteínas total

Las células sometidas a los diferentes tratamientos se tripsinizaron, se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm y se lavaron en 1 ml de PBS. De manera general se lisaron y resuspendieron en el volumen adecuado de tampón de lisis NP40 con inhibidores de proteasas (1:100) (Cocktail de inhibidores de proteasas; Sigma) y fosfatasa (1:100) (Cocktail de inhibidores de fosfatasa; Roche) y homogeneizándolas en rotación a 4°C durante 45-60

minutos. Para la extracción de proteínas nucleares, las células se homogeneizaron en el volumen adecuado de tampón RIPA 1X con inhibidores de proteasas (1:100) y fosfatasa (1:100), y a continuación se sonicaron durante 3 ciclos de 5 segundos al 40% de potencia. En ambos casos, tras la homogeneización las células se centrifugaron a 12000 rpm durante 30 minutos y 4°C y se recogió el sobrenadante, que contenía las proteínas. La concentración de proteínas de los lisados se cuantificó mediante ensayo colorimétrico usando el método BCA (*BCA Protein Assay Kit*, Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante. La medida de la absorbancia se realizó en el espectrofotómetro Pharmacia-Lkb Ultrospec III y los valores obtenidos se analizaron con el programa informático Prism 7.0 software (GraphPad).

7.3. Inmunodetección de proteínas o *western blot*

La inmunodetección de proteínas se realizó siguiendo un protocolo estándar. Para ello, a las proteínas se les añadió tampón de carga Laemmli 1X y se desnaturalizaron a 98°C durante 5 minutos. Para la separación de las proteínas se emplearon entre 10-20 µg de las mismas que, junto a varios patrones de pesos moleculares (BioRad o Amersham), se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 6-10% dependiendo del tamaño de la proteína a detectar. La migración se realizó a 100-120 mV en cubetas con el sistema de BioRad (Mini-PROTEAN® 3), y se utilizó tampón Tris-Glicina 1X como electrolito. Seguidamente, se realizó la electrotransferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa (Amersham™ Hybond™-ECL, GE Healthcare) usando tampón de transferencia y aplicando un voltaje constante de 100 V durante 90-120 minutos en cubetas de BioRad (Mini-PROTEAN® 3). Con el fin de visualizar si la carga de las proteínas era comparable, las membranas se incubaron con solución rojo Ponceau S 1X.

Para la inmunodetección, los sitios de unión inespecíficos de las membranas se bloquearon incubándolas durante una hora en tampón de bloqueo (Blocking Reagent, Roche) a temperatura ambiente y en agitación suave. A continuación, se incubaron a 4°C durante toda la noche con el anticuerpo primario específico preparado a la dilución apropiada en PBS. Al día siguiente, las membranas se sometieron a dos lavados de 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación suave con tampón tris salino (TBS)-Tween 20 1X. Seguidamente, se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, cabra anti-ratón o cabra anti-conejo (ECL™ anti-mouse IgG o ECL™ anti-rabbit IgG, GE Healthcare) diluidos en tampón Tris 0,05 M (1:20.000) durante una hora, a temperatura ambiente y en agitación suave. Tras la incubación, se realizaron de nuevo dos lavados de 15 minutos con tampón TBS-Tween 20 1X, y se les añadió la solución ECL™ Prime o ECL™ Select (Amersham™ ECL™ Western blotting chemiluminescence detection system, GE Healthcare) de acuerdo con el protocolo descrito por el fabricante. Para la detección de la señal por quimioluminiscencia se utilizó o bien el equipo de visualización *Chemidoc Touch* (BioRad) o bien películas de autorradiografía (Amersham Hyperfilm™-ECL, GE Healthcare) junto con las soluciones de revelado y fijación (Film Developer y Rapid Fixer, ILFORD). En este último caso, las placas autorradiográficas se escanearon para

su cuantificación. En el Anexo II (Recetas) se detalla la composición de todos los tampones utilizados.

7.4. Ensayos de co-inmunoprecipitación

Entre 1 y 2 mg de proteínas de los lisados se incubaron con 2 μ l de suero normal de conejo (NRS, Calbiochem) de una dilución previa 1/10 y se incubaron durante al menos 45 minutos en rotación a 4°C. Tras este tiempo se añadieron 20 μ l de bolas de proteína A-sefarosa (GE Healthcare) y se incubaron de nuevo durante 30 minutos, en rotación a 4°C. A continuación, se centrifugaron durante 2 minutos a 5000 rpm a temperatura ambiente. El botón de células resultante se utilizó como control negativo, mientras que los sobrenadantes se incubaron con los anticuerpos policlonales anti- β -TrCP (Cell Signaling) o anti-BRCA1 (Abcam) según el caso, durante toda la noche en rotación a 4°C. Al día siguiente, se añadieron nuevamente 20 μ l de bolas de proteína A-sefarosa y tras la incubación durante 30 minutos en rotación a 4°C, los inmunocomplejos se precipitaron centrifugando 2 minutos a 5000 rpm. Tanto las inmunoprecipitaciones como los controles negativos obtenidos el día previo se lavaron 6 veces en tampón NP40. Tras el último lavado, se añadieron 15 μ l de tampón de carga Laemmli 1X y se calentaron a 98°C durante 5 minutos en un termobloque para separar los inmunocomplejos de las bolas. Finalmente, se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% utilizando el tampón Tris-Glicina 1X como electrolito y se analizaron mediante *western blot*, con la única diferencia de que, en este caso, las diluciones de los anticuerpos secundarios fueron 1:40000.

7.5. Análisis de Inmunofluorescencia

Los experimentos de inmunofluorescencia se realizaron en portaobjetos de cultivo celular con cámaras de 8 compartimentos (BD Biosciences). Tras los distintos tratamientos, los portaobjetos se lavaron 3 veces con tampón PBS, y se fijaron las células con para-formaldehído (PFA) al 3,8% durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se volvieron a lavar 3 veces con PBS y se permeabilizaron las células con Tritón al 0,25% (Sigma) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se lavaron de nuevo con PBS y se bloquearon 1 hora con tampón de bloqueo (Blocking Reagent, Roche), tras lo cual se volvieron a lavar con PBS para finalmente incubarlos con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, los portaobjetos volvieron a lavarse con PBS y se incubaron las células con el anticuerpo secundario conjugado con FITC (Sigma) durante 2 horas (1:200) a temperatura ambiente. Tras la incubación, se volvieron a lavar los portaobjetos con PBS y se contratiñeron los núcleos con DAPI (Thermo Fisher) 300 nM diluido a 1:1000 durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se volvieron a lavar con PBS y H₂O y se procedió al montaje con medio *Fluorescent Mounting Medium* (DAKO). Las imágenes se visualizaron en un microscopio de fluorescencia confocal (Leica THUNDER) con un aumento del 40X y los focos de cada núcleo se contaron con el programa ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>), utilizando al menos 100 células de cada condición.

8. Muestras y datos de pacientes

Los estudios realizados con los datos y muestras de pacientes se aprobaron por el Comité Ético del Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla).

8.1. Cohortes de pacientes

Para el estudio de expresión de Mcl-1 se seleccionaron 72 biopsias de pacientes con carcinoma de vejiga obtenidos entre 2009 y 2010 de forma consecutiva (53 CVNMI, 19 CVMI). Las características clínicas de los pacientes se detallan en la **Tabla Suplementaria S1** (Anexo I). Se construyeron dos TMAs (del inglés *Tissue MicroArray*) con estas muestras de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina. Se realizó el seguimiento de estos pacientes para valorar el tiempo libre de enfermedad, definido como el tiempo en meses desde el diagnóstico hasta la aparición de recaída clínica, la aparición de un segundo cáncer o la muerte, independientemente de qué evento ocurriera en primer lugar.

Para el estudio de expresión de β -catenina y los marcadores de célula madre tumoral se seleccionaron 140 biopsias de pacientes con CVMI. Se construyeron 2 TMAs con estas muestras de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina.

Por último, para el estudio de expresión diferencial en *microarrays* de *Affymetrix* se seleccionaron muestras de 22 pacientes con carcinoma de vejiga (11 CVNMI y 11 CVMI). Posteriormente, para la validación de los resultados del mismo, estos grupos de pacientes se ampliaron incluyendo 29 pacientes más. Las características clínicas de los pacientes se detallan en la **Tabla Suplementaria S2** (Anexo I).

8.2. Estudio inmunohistoquímico

Las secciones de 5 μ m de los bloques de parafina con las matrices de biopsias de cáncer de vejiga se desparafinaron en xilol y posteriormente se rehidrataron en una serie gradada de alcoholes. Se bloqueó la actividad peroxidasa endógena introduciendo las secciones en una solución acuosa de H₂O₂ al 3% durante 30 minutos, y después se bloquearon los sitios de unión inespecíficos incubando con tampón de bloqueo (reactivo de bloqueo al 1%, Roche). Se realizó la recuperación antigénica con tampón EDTA 1mM pH 9 (Target Retrieval Solution pH 9 10x, Dako) en microondas de 10 a 20 minutos dependiendo del anticuerpo a detectar.

Las secciones se incubaron con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C y tras varios lavados en tampón TBS, se incubó con el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (EnVision™ Peroxidase-labelled polymer-linked secondary antibodies, Dako). La visualización de la inmunorreacción se realizó usando 3,3'-diaminobencidina (DAB) como sustrato cromogénico de la peroxidasa (DAB Buffered Substrate y EnVision™ Flex DAB+Chromogen, Dako). El siguiente paso fue la contratinción de las secciones con hematoxilina y el montaje en DPX (BDH

Laboratories). Dos patólogos evaluaron independientemente y de manera semicuantitativa la expresión de las distintas proteínas en los tejidos en al menos 10 campos.

9. Estudio comparativo de los perfiles de expresión

9.1. *Microarrays* génicos de expresión

Para llevar a cabo el análisis de expresión génica diferencial se realizó la extracción de ARN de las muestras de los pacientes mediante el kit *AllPrepR DNA/RNA/miRNA kit* (Qiagen), según las instrucciones del fabricante. Para la cuantificación de ARN se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo Fisher). El análisis de la calidad de las muestras de ARN se realizó con el *2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies), cuyo software incorpora un algoritmo denominado RIN (*RNA Integrity Number*) que permite determinar la calidad de las muestras de ARN total en base a un rango numérico (de 1 a 10), siendo 1 el valor para una muestra de ARN totalmente degradada y 10 el valor obtenido para una muestra intacta. Para la realización de un chip de *Affymetrix* el RIN debe estar comprendido entre los valores 8-10. Todas las muestras mostraron valores dentro de este rango.

A continuación, se realizó un primer estudio comparativo de los perfiles de expresión mediante el chip *PrimeView™ Human Gene Expression Array* de *Affymetrix* en colaboración con la empresa CAEBI (Centro Andaluz de Estudios Bioinformáticos). En este estudio se analizaron las muestras de 22 pacientes con carcinoma de vejiga agrupados según sus características clínicas en alto grado vs bajo grado, o infiltrante vs no infiltrante. El chip incluía más de 40.000 sondas para unos 36.000 transcritos generados por más de 20.000 genes anotados en la base de datos RefSeq (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>). Los archivos crudos de resultados generados por el sistema *Affymetrix* (archivos *.CEL) fueron procesados y analizados por la misma empresa utilizando el algoritmo *Robust Multi-chip Average* (RMA), el cual está incluido en el paquete de R Bioconductor *Simpleaffy* (<https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/simpleaffy.html>) y realiza una corrección de la señal de fondo y la normalización de las intensidades detectadas.

Para determinar los genes diferencialmente expresados entre los grupos de interés (alto grado vs bajo grado, infiltrante vs no infiltrante), se aplicó el test *t de Student* con la corrección FDR (*False Discovery Rate*) para comparaciones múltiples. Las diferencias entre grupos se cuantificaron mediante el FC o número de veces que un gen se expresa en una condición respecto a la otra, o bien mediante el logaritmo en base 2 de esta cantidad (\log_2 FC). Se consideraron significativos los cambios de expresión que presentaron un P-valor $< 0,05$ y \log_2 FC ≥ 1 o \log_2 FC ≤ -1 . Los genes diferencialmente expresados en los dos análisis se compararon mediante diagramas de Venn usando la herramienta VennDiagram (<https://cran.r-project.org/web/packages/VennDiagram/index.html>). Los gráficos *Heatmaps* de los genes diferencialmente expresados comunes a ambas comparaciones se generaron empleando Pheatmap (<https://cran.r-project.org/web/packages/pheatmap/index.html>).

Para el estudio de las vías de señalización y categorías ontológicas relacionadas con estos genes diferencialmente expresados se utilizó el programa *gProfiler* (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>). Para eliminar redundancias de categorías GO (<http://geneontology.org/>), se empleó la herramienta REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>), manteniendo solo las categorías con dispensabilidad inferior a 0,2 para la generación de los plots con la herramienta ggplot2.

9.2. Validación por RT-PCR

Posteriormente, se eligieron algunos de los genes diferencialmente expresados en el análisis anterior para validarlos por RT-qPCR en un grupo de pacientes con CVMI o CVNMI ampliado. Dicha validación se llevó a cabo en los servicios de genómica y secuenciación y de apoyo a las investigaciones biomédicas del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), utilizando unas tarjetas TaqMan customizadas o *TaqMan Array Cards* (Thermo Fisher) y el equipo ViiA 7 Real-Time PCR System, y usando el gen RPL13A como control endógeno o *housekeeping*. Los genes validados se representaron en los *Volcano Plots* empleando ggplot2 (<https://cran.r-project.org/web/packages/ggplot2/index.html>), y se analizaron con la herramienta STRING <https://string-db.org/> para determinar las redes de interacción proteína-proteína (PPI, del inglés *protein-protein interaction*).

10. Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron al menos tres veces y el análisis densitométrico de las proteínas estudiadas por *western blot* se realizó con los programas informáticos ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>), QuantiScan (Biosoft) e ImageLab (BioRad), usando la proteína β -actina como control de carga. Para el análisis estadístico de todos los experimentos se utilizó el programa informático Prism 7.0 software (GraphPad). El análisis de las diferencias entre dos condiciones se realizó mediante el test *t de Student* de muestras pareadas. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el P-valor < 0,05.

Las correlaciones entre la expresión de las proteínas y las variables clinicopatológicas se analizaron mediante el test χ^2 o el test exacto de Fisher. Las curvas de tiempo libre de enfermedad se calcularon mediante el método de Kaplan-Meier y la comparación de las curvas de supervivencia se realizó mediante el test log-rank de Mantel-Cox. Se utilizaron los programas informáticos Prism 7.0 (GraphPad) y el programa SPSS (IBM). En todos los casos las diferencias se consideraron significativas cuando el P-valor < 0,05.

RESULTADOS

1. Obatoclox y paclitaxel inducen apoptosis y bloqueo del flujo autofágico en cáncer de vejiga.

1.1. Caracterización de la respuesta a paclitaxel en líneas celulares de cáncer de vejiga músculo-invasivo

En esta primera parte del estudio utilizamos las líneas celulares de cáncer de vejiga infiltrante 5637 y HT1197 para investigar los diferentes mecanismos de respuesta a los taxanos. Para seleccionar la dosis más apropiada de paclitaxel, determinamos la IC50 de este fármaco en la línea celular 5637 mediante ensayos de citotoxicidad. Nuestros resultados mostraron que las células presentaban un valor de IC50 para paclitaxel de 0,0018 μM (**Figura 8A**), sin embargo, con esta concentración no observamos ningún efecto en el ciclo celular o en la muerte celular. Por ello, tras este estudio preliminar y una exhaustiva revisión de las publicaciones de otros grupos de investigación, elegimos una dosis de paclitaxel mayor (0,1 μM) que indujese una fuerte respuesta en esta línea celular, ya que se ha demostrado que este fármaco induce apoptosis tanto a dosis bajas (nM) como altas (μM)¹⁶⁶ y que ambas son clínicamente relevantes¹⁶⁷.

Una vez seleccionada la dosis, las células se trataron con DMSO como control negativo o con paclitaxel 0,1 μM durante 24 y 48 horas, y se analizó la sensibilidad al fármaco en ambas líneas mediante ensayos de *western blot*. Tras el tratamiento, la inducción de apoptosis era evidente en la línea celular 5637, como indica la aparición del fragmento de 85 kDa de la proteína PARP. Sin embargo, en la línea celular HT1197 no se observó inducción de apoptosis, apareciendo únicamente la banda de 116 kDa correspondiente a la PARP intacta. De acuerdo con la rotura de PARP observada, la activación de caspasas 3 y 9 fue también mayor en las células de la línea 5637 que en las de la línea HT1197. Asimismo, en la línea celular 5637 el tratamiento con paclitaxel disminuyó los niveles de Mcl-1 e indujo la fosforilación de Bcl-xL, inhibiendo así las propiedades antiapoptóticas de esta proteína. Los niveles de las proteínas proapoptóticas Bax y Bak no se vieron alterados tras el tratamiento. Por el contrario, es importante señalar que en las células de la línea HT1197 tratadas con paclitaxel, los niveles de Mcl-1 no disminuyeron y no se observó fosforilación de Bcl-xL, lo que sugiere que estos mecanismos podrían contribuir a la resistencia al tratamiento con paclitaxel (**Figura 8B**).

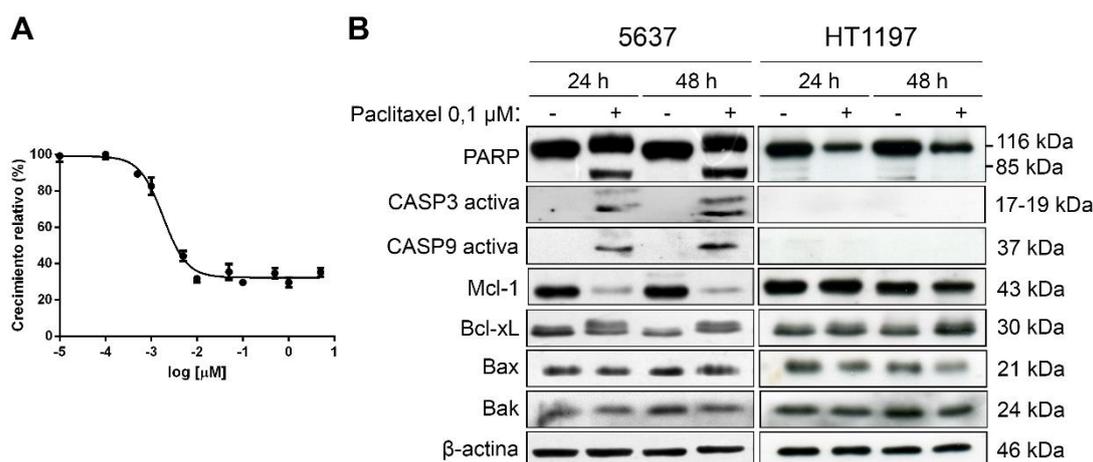


Figura 8. Las líneas celulares 5637 y HT1197 presentan diferente sensibilidad ante el tratamiento con paclitaxel. **A.** Curva de viabilidad de la línea celular 5637 tratada con paclitaxel. Los datos se presentan como la media \pm SD. **B.** Las líneas celulares de cáncer de vejiga avanzado 5637 y HT1197 se trataron con paclitaxel 0,1 μ M durante 24 y 48 horas, utilizando DMSO como control. Los niveles de PARP, caspasa 3 y 9 activas, Mcl-1, Bcl-xL, Bax y Bak se analizaron por *western blot*, usando β -actina como control de carga. Los experimentos se realizaron al menos por triplicado.

Para examinar si las diferencias observadas en la inducción de apoptosis tras la administración de paclitaxel estaban relacionadas con cambios en la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular, se trataron las células con DMSO o paclitaxel 0,1 μ M durante 24 y 48 horas, y se analizó el contenido de ADN mediante citometría de flujo de las células marcadas con yoduro de propidio. Como podemos observar, tanto tras 24 como tras 48 horas de tratamiento con paclitaxel el perfil de ciclo celular cambiaba drásticamente en las dos líneas estudiadas en comparación con el DMSO. En ambos casos, el paclitaxel provocaba una disminución del porcentaje de células en fases G1 y S asociado a un aumento del porcentaje de células en fase G2/M (**Figura 9A**).

Sin embargo, tanto las células bloqueadas en mitosis (2n-2c) como las células que han sufrido deslizamiento (4n) poseen el mismo contenido de ADN, por lo que ambos procesos contribuirían al acúmulo de células en el pico de G2/M. Para discernir si el tratamiento con paclitaxel estaba provocando un bloqueo eficiente en mitosis o si las células estaban escapando de la mitosis mediante deslizamiento, analizamos los niveles de Ciclina B1 y de Histona H3 fosforilada (p-Histona H3^{Ser10}) mediante *western blot*, ambos marcadores de parada en mitosis. A pesar de la aparente parada en G2/M inducida por este fármaco a ambos tiempos, en las células 5637 sensibles los niveles de expresión de Ciclina B1 y p-Histona H3^{Ser10} aumentaron a las 24 horas y disminuyeron después de 48 horas de tratamiento. Curiosamente, las células de la línea resistente HT1197 se comportaron de manera similar, con un aumento de los niveles de estas proteínas a las 24 horas y una disminución a las 48 horas (**Figura 9B**). Estos datos indicaban que en ambas líneas celulares podría estar ocurriendo una parada en mitosis seguida de un proceso de deslizamiento mitótico para continuar con el ciclo celular sin citocinesis, lo cual explicaría la elevada proporción de células en G2/M a 48 horas según los perfiles de ciclo.

Una de las características típicas de las células que han sufrido deslizamiento mitótico es el aumento de la ploidía, por lo que para confirmar esta hipótesis se analizó mediante FISH la ploidía de las células tratadas con paclitaxel 0,1 μ M durante 48 horas. La mayoría de las células de ambas líneas tratadas con paclitaxel tenían una ploidía superior a la ploidía normal (que corresponde a la ploidía que presentan las líneas tratadas con DMSO), concretamente el 88% en el caso de la línea celular 5637 y el 97% en el caso de la línea celular HT1197. Además, casi todas las células con mayor ploidía mostraron también una morfología multinucleada, típica de las células que han escapado de la mitosis por deslizamiento (**Figura 9C**). Estos resultados indican que las células 5637 y HT1197 comparten mecanismos comunes para escapar de la parada mitótica inducida por paclitaxel, pero sólo las células de la línea 5637 sufren apoptosis después del deslizamiento mitótico.

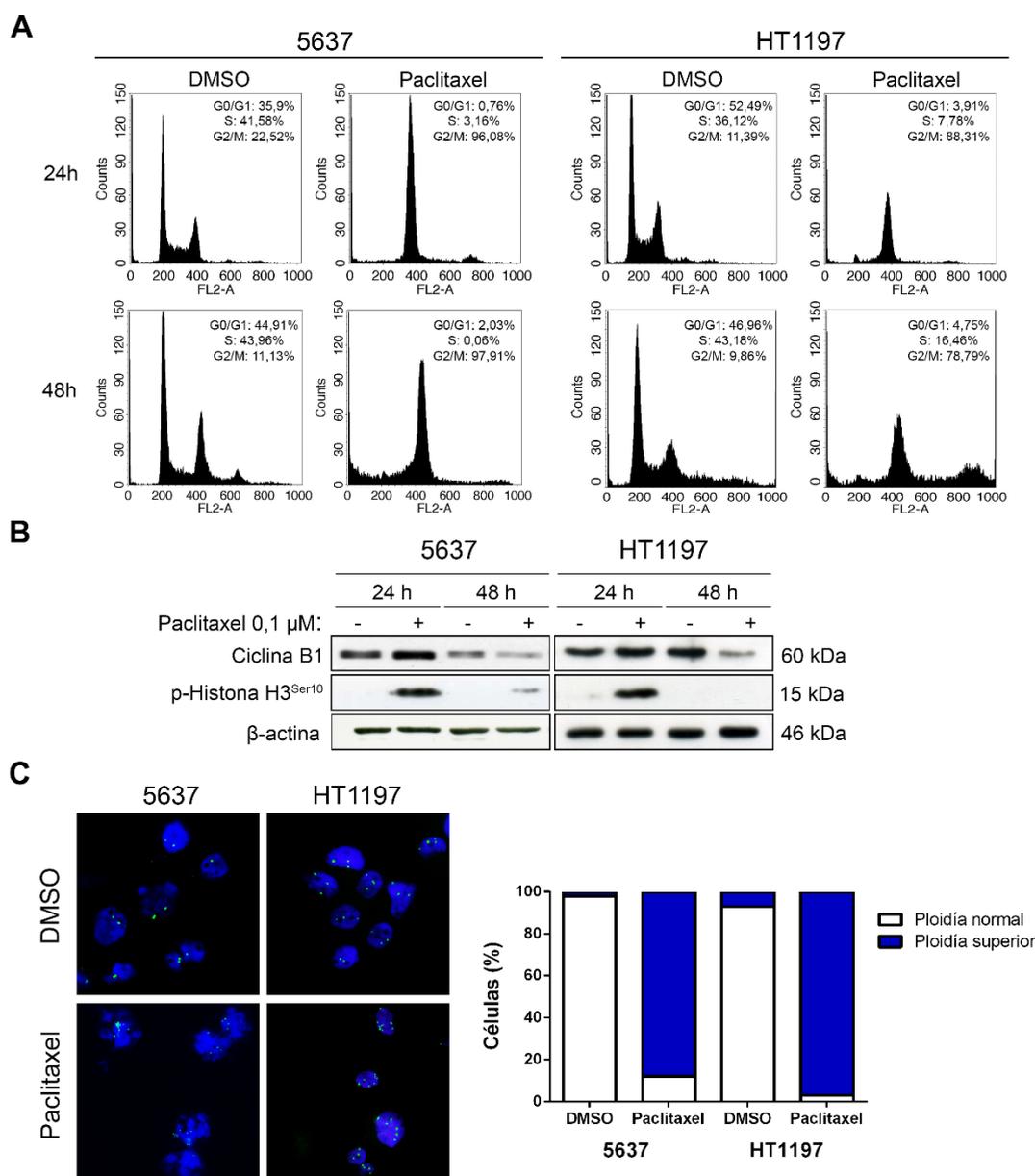


Figura 9. Las líneas celulares 5637 y HT1197 realizan deslizamiento mitótico tras el tratamiento con paclitaxel. Las células se trataron con paclitaxel 0,1 μ M durante 24 y 48 horas, utilizando DMSO como control. **A.** Citometría de flujo de las células marcadas con yoduro de propidio. El porcentaje de células en cada fase del ciclo celular representa la media de 3 experimentos realizados. **B.** Los niveles de Ciclina B1 y p-Histona H3^{Ser10} se analizaron por *western blot*, usando β -actina como control de carga. Los experimentos se realizaron al menos por triplicado. **C.** Análisis de la ploidía por FISH con una sonda centromérica específica para el cromosoma 17 (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Se contaron al menos 100 células de cada condición, representando en el histograma el porcentaje de células con ploidía normal o con ploidía superior. Se muestran imágenes representativas.

1.2. Estudio de la expresión de Mcl-1 en muestras clínicas de cáncer de vejiga

Mcl-1 podría tener un papel importante en las distintas respuestas al paclitaxel en líneas celulares de cáncer de vejiga y, por lo tanto, sería un buen candidato para predecir la respuesta a este quimioterápico en el entorno clínico. En consecuencia, analizamos la expresión de Mcl-1 mediante un estudio inmunohistoquímico en dos TMA's de tejidos parafinados con biopsias de 72 pacientes con carcinomas de vejiga (53 CVNMI, 19 CVMI). Las características de los pacientes incluidos se detallan en la **Tabla Suplementaria S1** (Anexo I). Las muestras fueron recogidas entre 2009 y 2010 de forma consecutiva, y en ellas se valoró la expresión del marcador Mcl-1 asignándole un valor numérico del rango 0-3 en función de su expresión:

- 0: Ausencia de expresión.
- 1: Menos del 10% de las células expresan Mcl-1.
- 2: Entre el 10-50% de las células expresan Mcl-1.
- 3: Más del 50% de las células expresan Mcl-1.

Se tomaron los valores 0 y 1 como baja expresión de Mcl-1, y los valores 2 y 3 como alta expresión de Mcl-1. Valorando la expresión de Mcl-1 en cada tejido, los resultados indicaron que el 96,2% de los CVNMI tenían baja expresión de Mcl-1 y sólo el 3,8% tenía alta expresión de Mcl-1. En el caso opuesto, el 63,2% de los CVMI tenía alta expresión de Mcl-1, mientras que el 36,8% expresaba Mcl-1 de manera débil (**Figura 10A**). Los resultados obtenidos mostraron que la relación entre la expresión de Mcl-1 y la infiltración tumoral era estadísticamente significativa.

En cuanto al papel pronóstico de la expresión de Mcl-1, se realizó un análisis de curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en el que se observó que los niveles altos de Mcl-1 estaban relacionados con una menor supervivencia libre de enfermedad y un mayor riesgo de recurrencia de los pacientes, lo que indica que Mcl-1 podría ser un buen marcador pronóstico de la agresividad del tumor (**Figura 10B**).

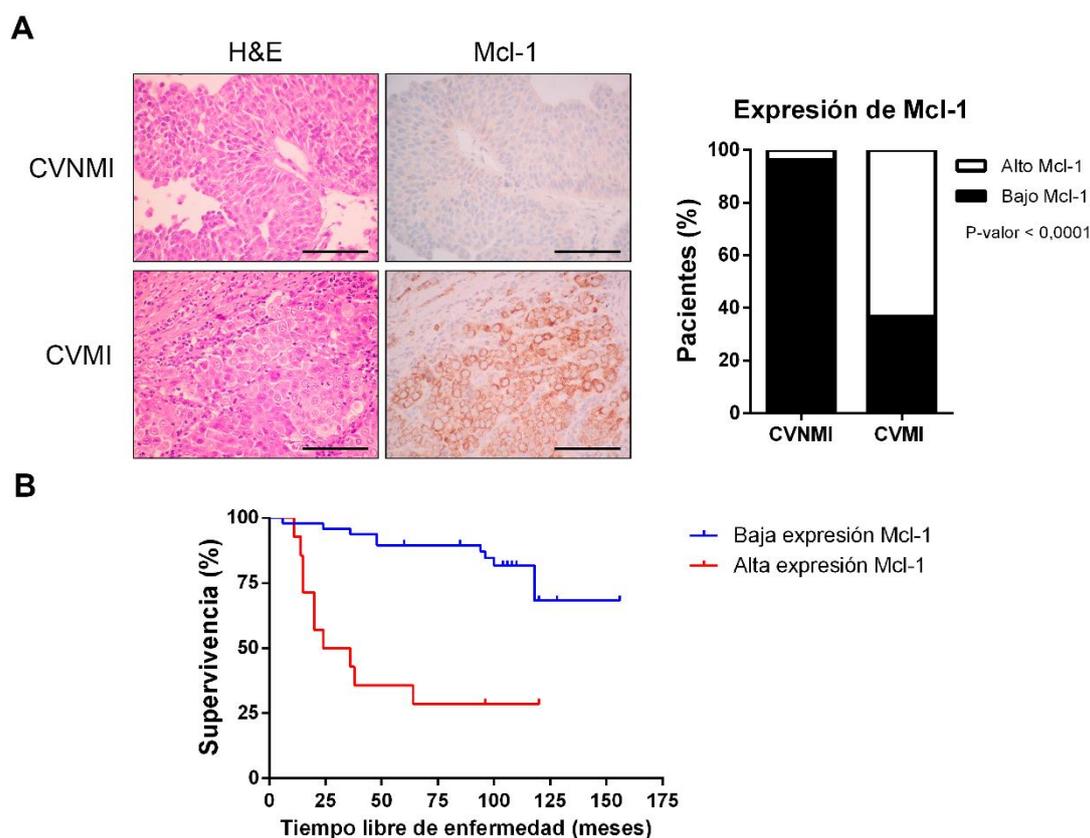


Figura 10. La expresión de Mcl-1 en pacientes se correlaciona con la invasión y progresión tumoral.
A. Análisis de la expresión inmunohistoquímica de la proteína antiapoptótica Mcl-1 en 72 pacientes con cáncer de vejiga músculo invasivo (CVMI) o no músculo invasivo (CVNMI). En las imágenes se muestran casos representativos. Las barras representan 100 μ m. P-valor < 0,05 obtenido del test exacto de Fisher. H&E: hematoxilina-eosina. **B.** Análisis de Kaplan-Meier del tiempo libre de enfermedad en pacientes con expresión de Mcl-1 baja (azul) o alta (rojo). Los *ticks* representan los pacientes censurados. P-valor < 0,05 obtenido del test log-rank de Mantel-Cox.

1.3. Sensibilización al tratamiento quimioterápico mediante la combinación de obatoclax y paclitaxel

En consonancia con los resultados obtenidos anteriormente, Mcl-1 se presenta como una proteína de considerable valor pronóstico y predictivo de respuesta a taxanos, y que además parece estar relacionada con el desarrollo de resistencia a paclitaxel. Además, nuestro laboratorio tiene un amplio bagaje en el estudio de esta proteína, ya que como hemos descrito previamente, se ha demostrado que los niveles de Mcl-1 son determinantes para que paclitaxel promueva la apoptosis en células de cáncer de próstata tras inducir una parada en mitosis, y que los carcinomas de próstata más agresivos tienen unos niveles de expresión de Mcl-1 mayores⁹¹. Por otro lado, no sólo es importante el papel de esta proteína sino también la regulación de su degradación por el proteasoma, ya que hemos visto que la pérdida de ciertas ubiquitin ligasas está relacionada con la adquisición de resistencia a tratamientos quimioterápicos⁹². Por tanto, Mcl-1 podría ser una diana terapéutica importante cuyo bloqueo con inhibidores específicos sensibilizaría al tratamiento con taxanos en aquellos tumores de vejiga donde Mcl-1 se encuentre

sobreexpresada. Obatoclax antagoniza a Mcl-1 e induce muerte celular en tumores hematológicos^{94,168}, por lo que decidimos estudiar los efectos del obatoclax en líneas celulares de cáncer de vejiga avanzado sensibles y resistentes a paclitaxel.

1.3.1. Determinación de dosis y tiempos

Nuestros resultados anteriores nos permitieron conocer el comportamiento que presentaban estas células tras la administración de 0,1 μM de paclitaxel durante 48 horas, por lo que se mantuvo dicha concentración en los siguientes experimentos. Para seleccionar la dosis más apropiada de obatoclax, determinamos la IC₅₀ de este fármaco en la línea celular 5637 mediante ensayos de citotoxicidad. En este caso, las células presentaban un valor de IC₅₀ para obatoclax de 0,427 μM (**Figura 11A**), pero como a esta concentración no observamos ningún tipo de respuesta, y como en otros estudios *in vitro* con células en cultivo se han usado concentraciones de obatoclax que varían entre 0,1 y 10 μM ^{98,102}, decidimos elegir finalmente una dosis de obatoclax de 1 μM tanto para los experimentos en monoterapia como en combinación con paclitaxel.

Otro de los factores que consideramos para realizar los experimentos posteriores, fue el tiempo comprendido entre la administración de ambos fármacos. Para poder determinar el período de tiempo entre la administración de un fármaco y otro que permitía una reducción en la viabilidad celular más significativa, realizamos un rastreo inicial en la línea celular 5637 mediante ensayos de viabilidad tras la administración de paclitaxel seguido de obatoclax y a la inversa, con periodos de 8, 12 o 24 horas entre la administración de los dos fármacos, siendo en todos los casos el tiempo final de 48 horas (**Figura 11B**). Los resultados de estos experimentos nos permitieron observar en primer lugar una reducción de la viabilidad celular de la línea 5637 después de los tratamientos simples o combinados en comparación con el control. Cuando se administraba primero paclitaxel, no se encontraron diferencias significativas en la viabilidad celular entre los diferentes puntos de tiempo. Sin embargo, cuando se trataron las células con obatoclax en primer lugar, la condición de obatoclax seguido de paclitaxel tras 8 horas mostró una mayor disminución de la viabilidad. Por esta razón, decidimos utilizar estos puntos de tiempo en ambos tratamientos secuenciales.

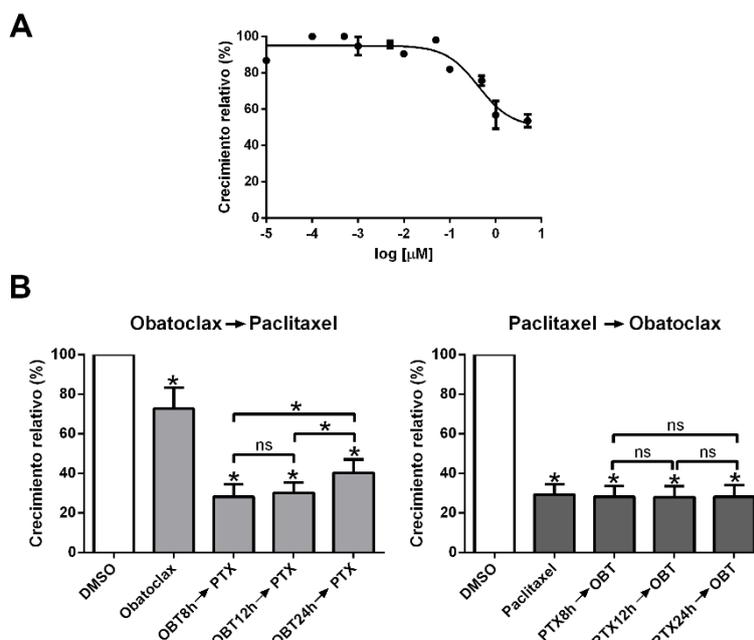


Figura 11. Determinación de las dosis y tiempos de administración del tratamiento combinado entre obatocclax y paclitaxel. A. Curva de viabilidad de la línea celular 5637 tratada con obatocclax. Los datos se presentan como la media \pm SD. **B.** Ensayos de viabilidad en la línea celular 5637 tras el tratamiento combinado a diferentes puntos de tiempo. Los datos se representan como la media \pm SD. *P-valor < 0,05 y ns (no significativo) obtenidos del t-test de Student ($n \geq 3$). OBT: obatocclax; PTX: paclitaxel.

1.3.2. Caracterización de la respuesta al tratamiento combinado

A continuación, se realizó un análisis de *western blot* para el cual las células se trataron con paclitaxel 0,1 μM , obatocclax 1 μM o combinaciones de ambas, utilizando DMSO como control. Las combinaciones utilizadas fueron: obatocclax tras paclitaxel, paclitaxel tras obatocclax, y ambas a la vez, añadiendo el segundo fármaco 8 horas después de haber añadido el primero, y recogiendo las células tras 48 horas de tiempo final en todas las condiciones.

Las células 5637 sensibles a paclitaxel respondieron también a obatocclax de la misma manera ya fuese solo o en las distintas combinaciones, como se muestra con la aparición del fragmento de 85 kDa de PARP y la activación de caspasa 3 en todas las condiciones. Además, los niveles de Mcl-1 disminuyeron enormemente después de todos los tratamientos, mientras que los niveles de Bak no mostraron ningún cambio (**Figura 12A**).

Por el contrario, en el caso de la línea celular HT1197 observamos que no había rotura de PARP, activación de caspasa 3, o disminución de Mcl-1 tras la administración de obatocclax o paclitaxel en monoterapia. Sin embargo, las tres combinaciones de obatocclax y paclitaxel provocaron la disminución de la expresión de Mcl-1 e indujeron muerte celular apoptótica (**Figura 12B**). Por lo tanto, la combinación de paclitaxel con obatocclax consiguió revertir la resistencia a paclitaxel en las células HT1197.

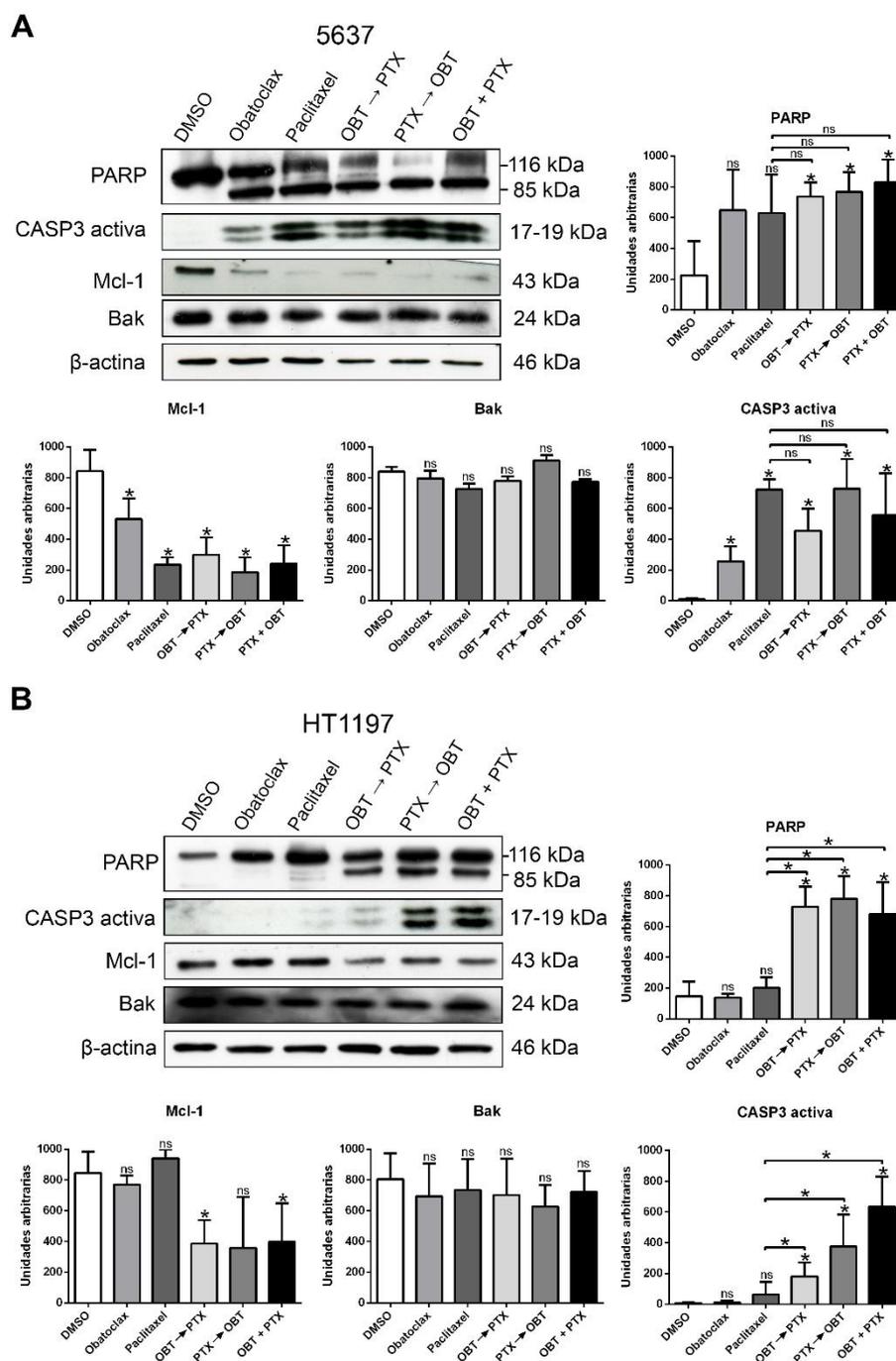


Figura 12. El tratamiento combinado del inhibidor de Mcl-1 obatoclox y paclitaxel induce apoptosis en la línea celular HT1197. Las líneas celulares (A) 5637 y (B) HT1197 se trataron con obatoclox 1 μ M, paclitaxel 0,1 μ M, y las siguientes combinaciones de ambos fármacos: obatoclox durante 8 horas seguido de paclitaxel, paclitaxel durante 8 horas seguido de obatoclox, o ambos fármacos a la vez, con un tiempo final en todos los casos de 48 horas y utilizando DMSO como control. Los niveles de expresión de las proteínas PARP, caspasa 3 activa, Mcl-1 y Bak se analizaron mediante *western blot*, usando β -actina como control de carga. Los histogramas muestran el análisis densitométrico de las proteínas indicadas. Los datos se presentan como la media \pm SD, y cada tratamiento fue comparado con el DMSO como control o entre diferentes tratamientos cuando se indica. *P-valor < 0,05 y ns (no significativo) obtenidos del t-test de Student (n \geq 3). OBT: obatoclox; PTX: paclitaxel.

1.4. Estudio del mecanismo de sensibilización al tratamiento combinado

1.4.1. Efectos en la autofagia

La citotoxicidad mediada por obatoclax ha sido asociada con procesos de autofagia. El método convencional de monitorizar la actividad autofágica hasta hace poco era medir el aumento en el número de autofagosomas que se forman en la célula en respuesta a un estímulo. Sin embargo, la formación de estos autofagosomas es un estado intermedio dentro del proceso dinámico de la autofagia, por lo que su acumulación podría representar tanto un aumento en la generación como un bloqueo de su conversión en autolisosomas. Por ello, para distinguir entre estas dos posibilidades, se recomienda monitorizar el flujo autofágico. Durante el proceso autofágico, LC3 se lipida y pasa de su forma soluble en el citoplasma (LC3-I) a su forma asociada a los autofagosomas (LC3-II). Además, la proteína p62, que a su vez también es degradada vía autofagia, se asocia a LC3-II para introducir el cargo en el interior del lisosoma, por lo que ambos constituyen marcadores bastante consolidados^{169,170}.

De esta manera, procedimos a estudiar el flujo autofágico en las células 5637 y HT1197 tratadas con obatoclax o combinaciones de obatoclax y paclitaxel, y su relación con la muerte o supervivencia de las células. Primero, las células fueron tratadas con obatoclax 1 μ M durante 48 horas en presencia o ausencia de bafilomicina A1 (BafA1) 0,4 μ M, un inhibidor del flujo autofágico, añadido durante las últimas 4 horas de tratamiento. El flujo autofágico fue monitorizado mediante el estudio por *western blot* de las proteínas LC3B y p62 (**Figura 13**). En las células de la línea 5637, obatoclax indujo una acumulación de LC3-II (banda de 16 kDa de la proteína LC3) y p62 mayor que tras la adición de BafA1, reflejando que por sí solo este fármaco era capaz de causar un bloqueo eficiente del flujo autofágico en estas células tumorales. En contraste, en la línea celular HT1197 los niveles de LC3-II y p62 tras la administración de obatoclax en monoterapia no eran tan elevados como en las 5637 o como en esta misma línea tras la adición de BafA1, indicando un bloqueo del flujo autofágico mucho menos eficiente.

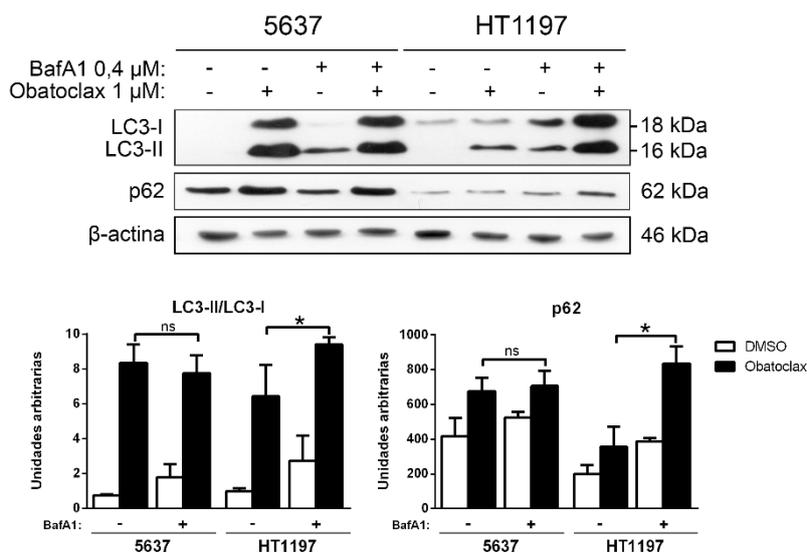


Figura 13. Obatoclox induce un bloqueo eficiente del flujo autofágico en la línea celular 5637, pero no en la HT1197. Las células de la línea 5637 y HT1197 se trataron con obatoclox 1 μM durante 48 horas en presencia o ausencia de bafilomicina A1 0,4 μM durante las últimas 4 horas de tratamiento, utilizando DMSO como control. Los niveles de expresión de las proteínas LC3B y p62 se analizaron mediante *western blot*, usando β-actina como control de carga. Los histogramas muestran el análisis densitométrico de las proteínas indicadas. Los datos se presentan como la media ± SD. *P-valor < 0,05 y ns (no significativo) obtenidos del t-test de Student ($n \geq 3$). BafA1: bafilomicina A1.

A continuación, ambas líneas fueron tratadas con obatoclox, paclitaxel y las tres posibles combinaciones de ambos fármacos para estudiar el flujo autofágico mediante *western blot* (Figuras 14A y 14B). Como podemos observar, el tratamiento con paclitaxel no aumentó los niveles de LC3-II y p62 en las células 5637 o HT1197. En cambio, las tres combinaciones de obatoclox y paclitaxel indujeron la acumulación de LC3-II y p62 en las células de la línea 5637 y, curiosamente, también en las células de la línea HT1197. Como se muestra en esta misma figura, la proporción LC3-II/LC3-I aumentaba significativamente tras el tratamiento con las tres combinaciones de fármacos en ambas líneas, lo que apuntaba a una acumulación en el número de autofagosomas, por lo que el bloqueo del flujo autofágico podría actuar como mecanismo de sensibilización al paclitaxel.

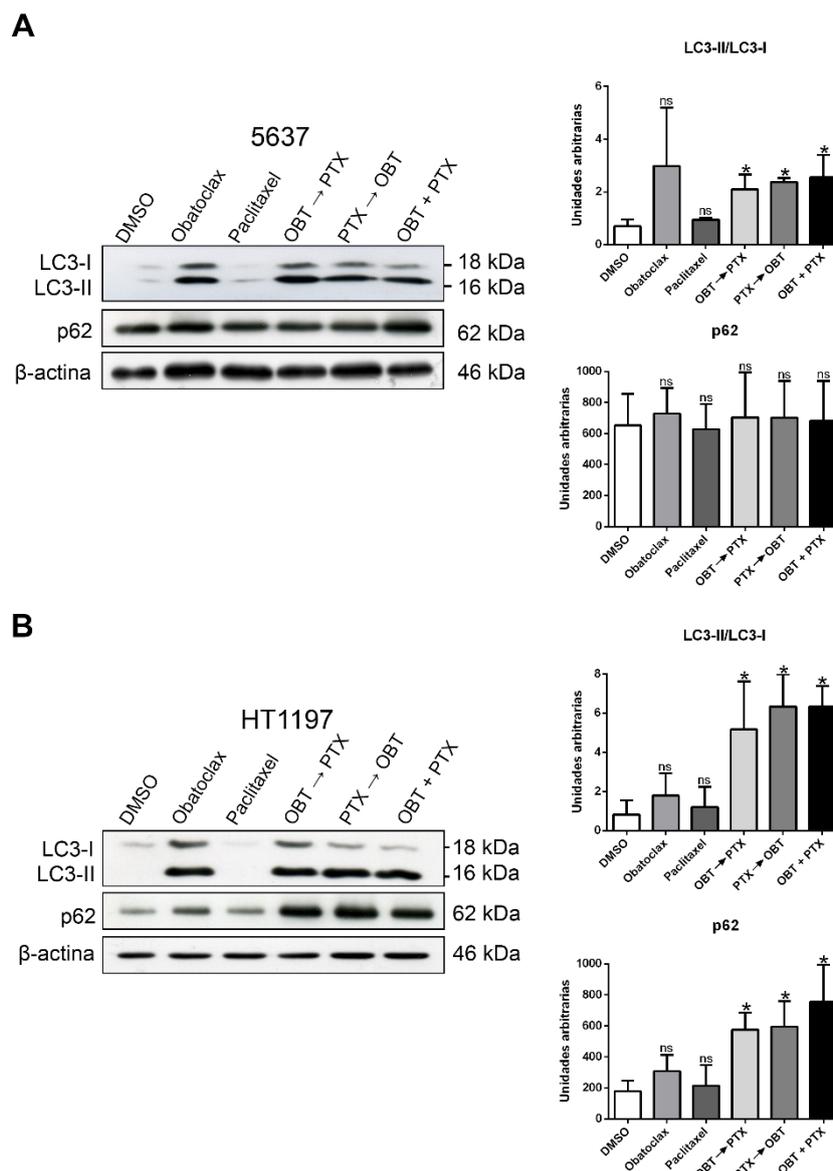


Figura 14. La combinación de obatoclax y paclitaxel induce bloqueo del flujo autofágico en las líneas celulares 5637 y HT1197. Las células de las líneas (A) 5637 y (B) HT1197 se trataron con obatoclax $1 \mu\text{M}$, paclitaxel $0,1 \mu\text{M}$, y las siguientes combinaciones de ambos fármacos: obatoclax durante 8 horas seguido de paclitaxel, paclitaxel durante 8 horas seguido de obatoclax, o ambos fármacos a la vez, con un tiempo final en todos los casos de 48 horas y utilizando DMSO como control. Los niveles de expresión de las proteínas LC3B y p62 se analizaron mediante *western blot*, usando β -actina como control de carga. Los histogramas muestran el análisis densitométrico de las proteínas indicadas. Los datos se presentan como la media \pm SD, y cada tratamiento fue comparado con el DMSO como control. *P-valor $< 0,05$ y ns (no significativo) obtenidos del t-test de Student ($n \geq 3$). OBT: obatoclax; PTX: paclitaxel.

La proteína Beclina-1 comparte un dominio similar al dominio BH3 con los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2. Se ha descrito previamente que su interacción con Bcl-2 o Bcl-xL tiene acciones inhibitorias sobre la autofagia, y que su rotura mediada por caspasa 3 modula los procesos de apoptosis y autofagia^{171,172}. Por ello, quisimos analizar el papel de Beclina-1 en el bloqueo del flujo autofágico, así como en la inducción de apoptosis en las células tratadas con obatoclax o con una de las combinaciones de obatoclax y paclitaxel.

Primero, las células de la línea 5637 fueron tratadas con obatoclax 1 μM en presencia o ausencia del pre-tratamiento con el inhibidor de pan-caspasas Z-VAD-fmk durante una hora, y la expresión de la proteína Beclina-1 fue analizada por *western blot* (**Figura 15A**). El tratamiento con obatoclax provocó la rotura de Beclina-1, como se demuestra por la aparición de los fragmentos de 35 y 37 kDa. Además, esta rotura de Beclina-1 era dependiente de caspasas, ya que en presencia del inhibidor de éstas Z-VAD-fmk, los fragmentos no se observaron.

A continuación, comparamos la fragmentación de Beclina-1 en ambas líneas celulares tratadas con obatoclax en monoterapia o en combinación con paclitaxel (**Figura 15B**). Una vez más, en la línea celular 5637 se observó la rotura de Beclina-1 tras la administración de obatoclax tanto en monoterapia como en combinación. Por el contrario, en la línea celular HT1197 sólo el tratamiento combinado fue capaz de inducir la rotura de Beclina-1, como indica la aparición de los fragmentos de 35 y 37 kDa en el *western blot*. Por tanto, este mecanismo de rotura de Beclina-1 dependiente de caspasa 3 podría ayudar a bloquear el flujo autofágico e inducir apoptosis en líneas celulares resistentes cuando son tratadas con la combinación de obatoclax y paclitaxel.

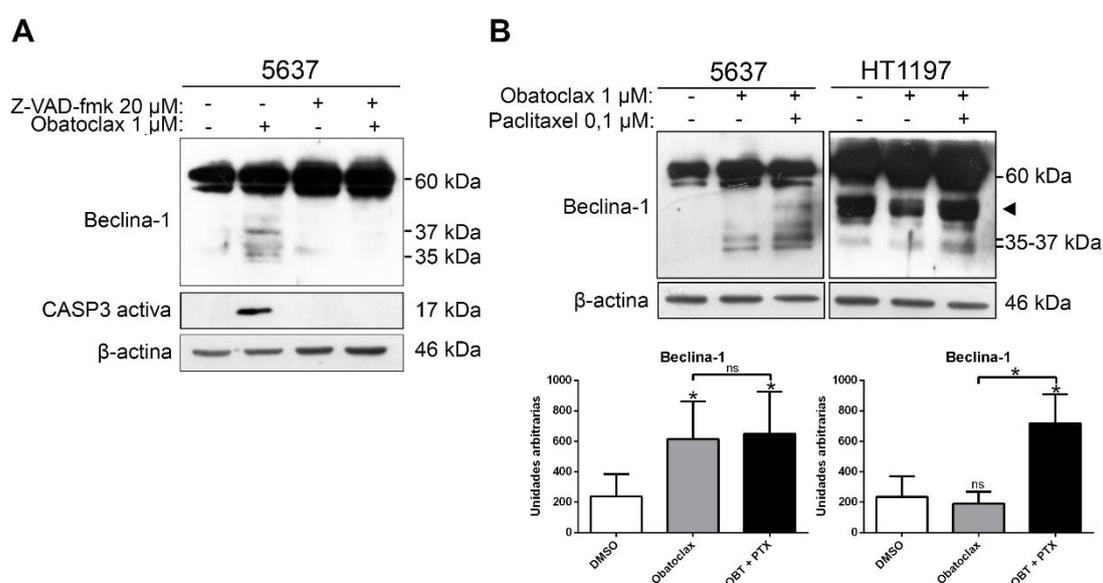


Figura 15. La rotura de Beclina-1 es dependiente de caspasa 3 e induce bloqueo del flujo autofágico y apoptosis. **A.** La línea celular 5637 fue tratada con obatoclax 1 μM durante 48 horas en presencia o ausencia del pre-tratamiento con Z-VAD-fmk 20 μM durante una hora, utilizando DMSO como control. **B.** Las células de las líneas 5637 y HT1197 se trataron con obatoclax 1 μM en monoterapia o en combinación con paclitaxel 0,1 μM durante 48 horas, utilizando DMSO como control. Los niveles de expresión de las proteínas Beclina-1 y caspasa 3 activa se analizaron mediante *western blot*, usando β -actina como control de carga. Los histogramas muestran el análisis densitométrico de las proteínas indicadas. Los datos se presentan como la media \pm SD, y cada tratamiento fue comparado con el DMSO como control o entre diferentes tratamientos cuando se indica. *P-valor $< 0,05$ y ns (no significativo) obtenidos del t-test de Student ($n \geq 3$). OBT: obatoclax; PTX: paclitaxel. El símbolo ◀ indica una banda inespecífica de 50 kDa de la proteína Beclina-1.

De manera paralela, para evaluar la inhibición del flujo autofágico, ambas líneas celulares se trataron con obatoclax 1 μM en monoterapia o en combinación con paclitaxel 0,1 μM durante 48 horas, usando rapamicina 800 nM como control para la inducción del flujo autofágico y cloroquina 50 μM como control para la inhibición del flujo autofágico (como control negativo se utilizó DMSO). Tras el tratamiento, las células se marcaron con el kit de estudio de flujo autofágico *Cyto-ID™ Autophagy Detection kit* (Enzo) y se analizaron por citometría de flujo (**Figura 16A**) y microscopía de fluorescencia (**Figura 16B**). Usando este método, la intensidad del fluorescente en citometría se correlaciona con la acumulación de vesículas autofágicas como resultado de la inhibición del flujo autofágico. La intensidad media de la fluorescencia para cada condición se normalizó con respecto al DMSO.

En la línea celular 5637, tanto tras el tratamiento con obatoclax solo como con la combinación de obatoclax y paclitaxel se observó una intensidad de fluorescencia mayor que la inducida por la cloroquina, reflejando un bajo flujo autofágico o un flujo autofágico bloqueado. En el caso de la línea celular HT1197, el hecho de que la intensidad de fluorescencia fuera similar tras el tratamiento con obatoclax en monoterapia y tras el tratamiento con rapamicina, sugería un alto flujo autofágico o un bloqueo autofágico menos eficiente, lo que permitía que se completase la autofagia. Sin embargo, en estas mismas células la intensidad de fluorescencia observada tras el tratamiento combinado de obatoclax y paclitaxel fue similar a la observada con la cloroquina, poniendo de manifiesto la capacidad del tratamiento combinado para bloquear el flujo autofágico (**Figura 16A**).

A continuación, utilizamos el microscopio de fluorescencia para analizar la formación de los diferentes compartimentos celulares implicados en el proceso autofágico, ya que el reactivo Cyto-ID™ es capaz de marcar los autofagosomas de manera específica sin marcar los lisosomas o endosomas. Como podemos observar en la **Figura 16B**, el marcaje de las células 5637 tratadas con obatoclax u obatoclax y paclitaxel reveló la formación de autofagosomas que no se estaban fusionando con los lisosomas, como indica la aparición de *puncta* perinucleares o citoplásmicos. Además, la contratinción con Hoechst 33342 mostraba la formación de cuerpos apoptóticos y fragmentación nuclear en esta línea bajo ambos tratamientos, características típicas de las células en apoptosis. Por el contrario, en la línea HT1197 obatoclax solo no formaba *puncta*, sino más bien autofagolisosomas oscuros, indicando que la autofagia inducida era completa. De hecho, la contratinción nuclear con Hoechst 33342 no mostró ningún daño apoptótico. No obstante, la combinación de obatoclax y paclitaxel fue capaz de inducir la acumulación de autofagosomas y la fragmentación apoptótica de los núcleos, lo que refleja que la sensibilización con obatoclax bloquea el flujo autofágico y facilita la apoptosis inducida por paclitaxel en estas células.

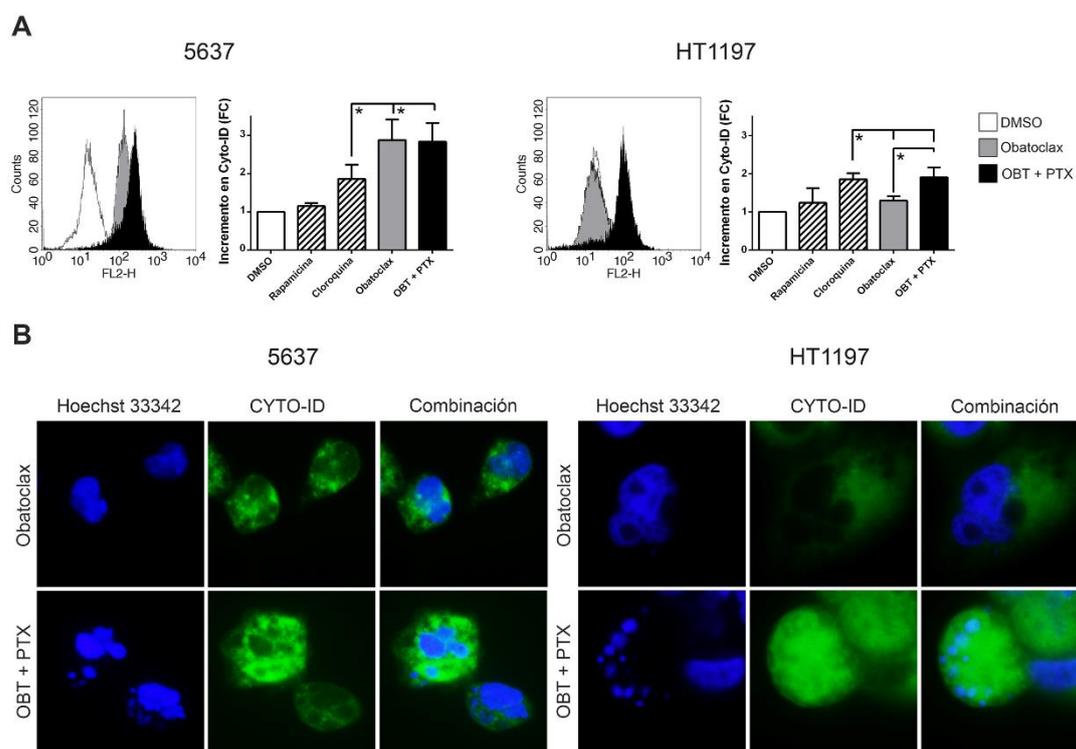


Figura 16. El bloqueo del flujo autofágico se correlaciona con la muerte celular por apoptosis. Las células de las líneas 5637 y HT1197 se trataron con obatoclastax 1 μ M en monoterapia o en combinación con paclitaxel 0,1 μ M durante 48 horas. Como controles se utilizaron DMSO, rapamicina 800 nM y cloroquina 50 μ M. **A.** El bloqueo del flujo autofágico se analizó por citometría de flujo. Los datos se presentan como la media \pm SD. *P-valor < 0,05 y ns (no significativo) obtenidos del t-test de Student ($n \geq 3$). **B.** Análisis del bloqueo del flujo autofágico por inmunofluorescencia. Las células se tiñeron con el colorante Hoechst 33342 (control nuclear, azul) y con el colorante verde Cyto-ID, y se tomaron fotografías a un objetivo del 100X con un microscopio de fluorescencia invertido. ObT: obatoclastax; PTX: paclitaxel.

1.4.2. Efectos en el ciclo celular

El siguiente paso en la investigación fue estudiar los efectos en el ciclo celular de obatoclastax, paclitaxel, y las combinaciones de ambos fármacos en las dos líneas celulares. El contenido de ADN se analizó por citometría de flujo 24 y 48 horas después de las diferentes combinaciones de tratamientos, y para estudiar los efectos en el deslizamiento mitótico realizamos un análisis de ploidía mediante FISH del cromosoma 17 (**Figura 17**).

En la línea celular 5637 se observó un incremento del porcentaje de células en fase S tras el tratamiento con obatoclastax en monoterapia tanto a 24 como a 48 horas, siendo mayor dicho porcentaje tras 48 horas de tratamiento (**Figura 17A**). Por el contrario, las células de la línea HT1197 mostraron un porcentaje similar de células en esta fase en ambos tiempos (**Figura 17B**). Por su parte, el tratamiento con paclitaxel indujo un fuerte incremento del porcentaje de células en fase G2/M en ambas líneas celulares y a ambos tiempos, aunque previamente hemos demostrado que este porcentaje está enriquecido con células de mayor ploidía. En cuanto a las combinaciones, todas ellas provocaron un aumento del porcentaje de células en fase G2/M a ambos tiempos en la línea 5637, aunque cuando se administraba obatoclastax en primer lugar se observó un leve incremento en fase S tras 24 horas (**Figura 17A**). En contraste, las mismas

combinaciones tuvieron un efecto diferente en las células de la línea HT1197, donde el ciclo sufrió un ligero retraso con un mayor porcentaje de células en fase G1 (**Figura 17B**).

Como mencionamos anteriormente, el tratamiento con paclitaxel induce deslizamiento mitótico tanto en las células 5637 como en las HT1197, pero asociado a diferentes efectos finales, es decir, a muerte celular apoptótica y a supervivencia, respectivamente. En las células de la línea 5637, obatoclax por sí solo no alteró la ploidía, a diferencia del paclitaxel, que provocaba un aumento de la misma. Cabe destacar que la combinación de paclitaxel y obatoclax en esta línea celular tuvo diferentes efectos dependiendo de la secuencia de tratamiento: obatoclax seguido de paclitaxel tuvo un efecto similar al de obatoclax solo, mientras que la administración de paclitaxel seguido de obatoclax o ambos fármacos a la vez indujeron un aumento de la ploidía. Esto significa que obatoclax en monoterapia o cuando se añade en primer lugar es capaz de inducir muerte celular en las células de la línea 5637 antes de llegar a mitosis; sin embargo, cuando el paclitaxel se añade primero o cuando ambos fármacos se administran al mismo tiempo, las células mueren tras deslizamiento mitótico (**Figura 17A**).

En la línea celular HT1197, el obatoclax en monoterapia no indujo cambios en la ploidía en comparación con el DMSO. Por su parte, el paclitaxel indujo un aumento de la ploidía en esta línea, signo del deslizamiento mitótico como mecanismo de resistencia. De manera curiosa, ninguna de las tres combinaciones de paclitaxel y obatoclax indujo cambios en la ploidía en las células HT1197, reflejando que tras los tratamientos combinados se inhibe el deslizamiento mitótico inducido por paclitaxel en monoterapia y se produce una parada eficiente en G2/M (**Figura 17B**).

Por último, para confirmar estos resultados, analizamos la línea celular de cáncer de vejiga HT1376, que es resistente al paclitaxel pero, en contraposición a la línea celular HT1197, es más sensible a obatoclax en monoterapia. Estas células fueron tratadas con 1 μ M de obatoclax, 0,1 μ M de paclitaxel, o las combinaciones de ambos fármacos descritas anteriormente, utilizando DMSO como control y recogiendo los experimentos tras 48 horas de tratamiento en todas las condiciones. El análisis de la rotura de PARP y de la activación de caspasa 3 mediante *western blot* demostró que las tres combinaciones de obatoclax y paclitaxel fueron capaces de inducir niveles más altos de apoptosis que cualquiera de los fármacos por separado, ya que tanto la banda de 85 kDa de PARP como la caspasa 3 activa aparecían con mayor intensidad en estas condiciones. Además, los niveles de Mcl-1 disminuían tras los distintos tratamientos, siendo esta disminución menor en el caso del tratamiento con paclitaxel, lo cual podría explicar la resistencia de esta línea celular a dicho fármaco. En cambio, este descenso de nuevo era mucho mayor tras los tratamientos combinados, indicando su papel en la sensibilización al mismo. En cuanto al flujo autofágico, se observó que todas las combinaciones de obatoclax y paclitaxel bloqueaban el flujo autofágico de manera eficiente, al igual que ocurría con el tratamiento con obatoclax en monoterapia en esta línea celular (**Figura 18**).

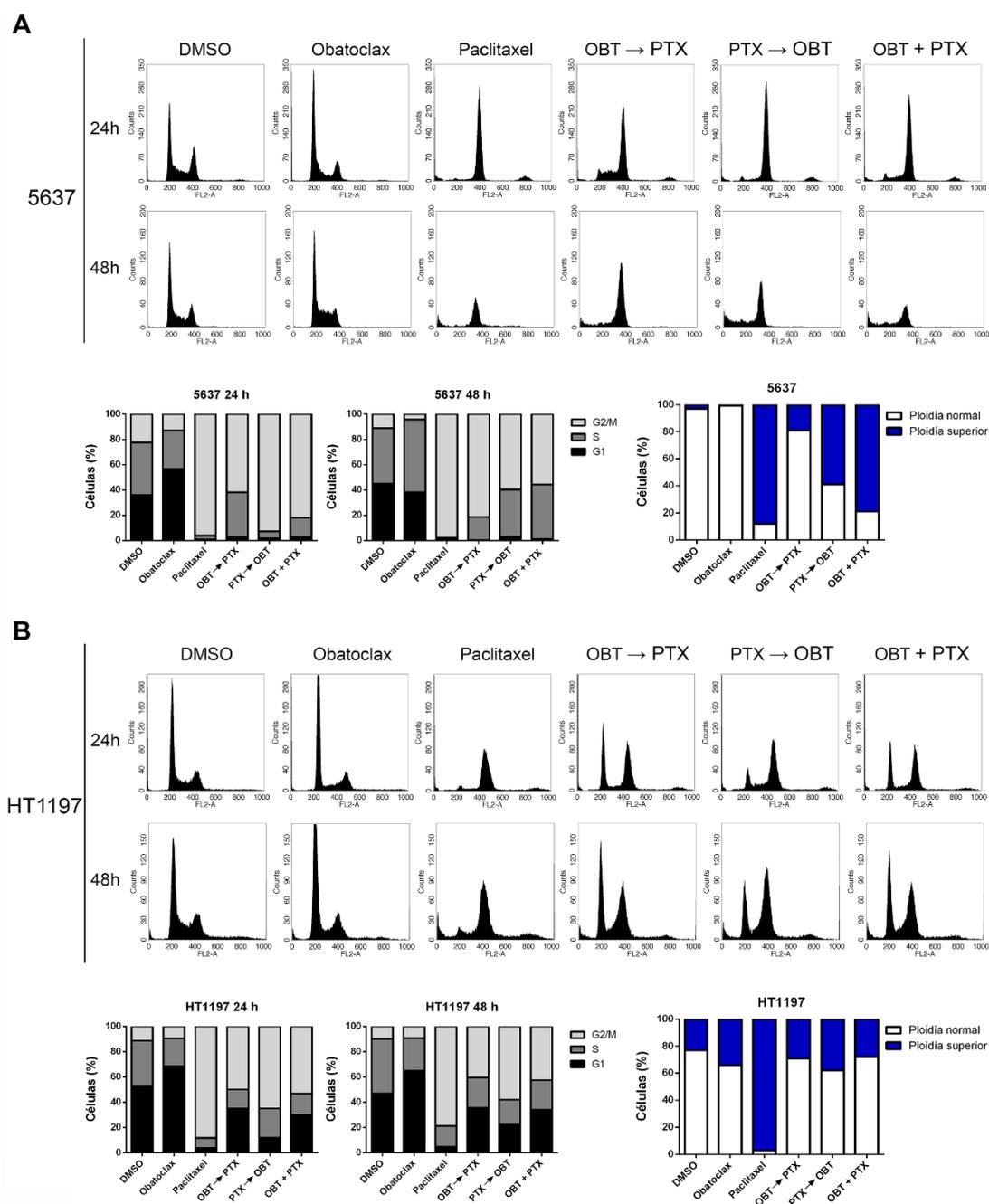


Figura 17. Obatoclox induce parada en fase S, y retraso en la progresión del ciclo celular en combinación con paclitaxel. Las líneas celulares **(A)** 5637 y **(B)** HT1197 se trataron con obatoclox 1 μM y paclitaxel 0,1 μM en monoterapia o con las tres posibles combinaciones durante 24 y 48 horas, utilizando DMSO como control. Se realizó citometría de flujo de las células marcadas con yoduro de propidio, mostrándose en los histogramas la cuantificación de cada fase del ciclo. Se analizó la ploidía por FISH con una sonda centromérica para el cromosoma 17. Se contaron al menos 100 células de cada condición, representando en el histograma el porcentaje de células con ploidía normal o con ploidía superior. OBT: obatoclox; PTX: paclitaxel.

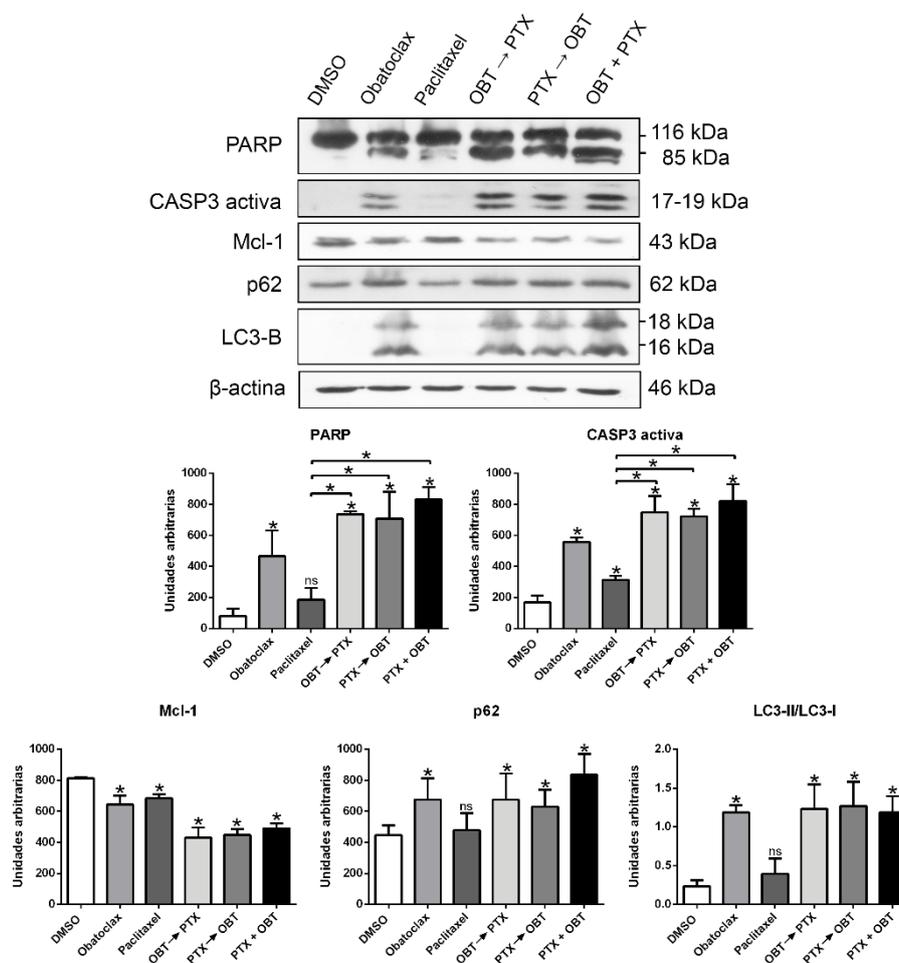


Figura 18. Las combinaciones de obatoclox y paclitaxel promueven la apoptosis en la línea celular HT1376 resistente al paclitaxel. Las células de la línea HT1376 se trataron con obatoclox 1 μ M, paclitaxel 0,1 μ M, y las siguientes combinaciones de ambos fármacos: obatoclox durante 8 horas seguido de paclitaxel, paclitaxel durante 8 horas seguido de obatoclox, o ambos fármacos a la vez, con un tiempo final en todos los casos de 48 horas y utilizando DMSO como control. Los niveles de expresión de las proteínas PARP, caspasa 3 activa, Mcl-1, p62 y LC3B se analizaron mediante *western blot*, usando β -actina como control de carga. Los histogramas muestran el análisis densitométrico de las proteínas indicadas. Los datos se presentan como la media \pm SD, y cada tratamiento fue comparado con el DMSO como control o entre diferentes tratamientos cuando se indica. *P-valor < 0,05 y ns (no significativo) obtenidos del t-test de Student (n \geq 3). OBT: obatoclox; PTX: paclitaxel.

Por otro lado, con objeto de profundizar en el mecanismo mediante el cual obatoclox revierte la resistencia a paclitaxel en esta línea celular, realizamos un análisis del contenido de ADN mediante citometría de flujo y un análisis de la ploidía mediante FISH (**Figura 19**). En el análisis del ciclo celular pudimos observar que el tratamiento con obatoclox no mostraba efectos drásticos con respecto al DMSO a las 24 o a las 48 horas, tal y como observamos previamente en la línea celular HT1197, aunque en este caso las células HT1376 son más sensibles al tratamiento. Además, en esta línea celular el tratamiento con paclitaxel también inducía una parada del ciclo celular en fase G2/M a las 24 horas, la cual persiste a las 48 horas. En el caso de las combinaciones de obatoclox y paclitaxel, se produjo un aumento de la fase S, en particular cuando obatoclox se añadía antes que el paclitaxel o cuando ambos fármacos eran añadidos al mismo tiempo (**Figura 19A**). Finalmente, el análisis de la ploidía mediante FISH demostró que

obatoclax en monoterapia no inducía cambios en la ploidía de la línea celular HT1376, mientras que tras el tratamiento con paclitaxel se observó un aumento de la ploidía en el 72% de las células, signo de deslizamiento mitótico. Sin embargo, y al igual que observamos en la línea celular HT1197, las combinaciones de obatoclax y paclitaxel pudieron revertir el porcentaje de células con ploidía alta, reflejando que la inhibición del deslizamiento mitótico también podría explicar la sensibilización al tratamiento, ya que se produce una parada en mitosis más eficiente (**Figura 19B**).

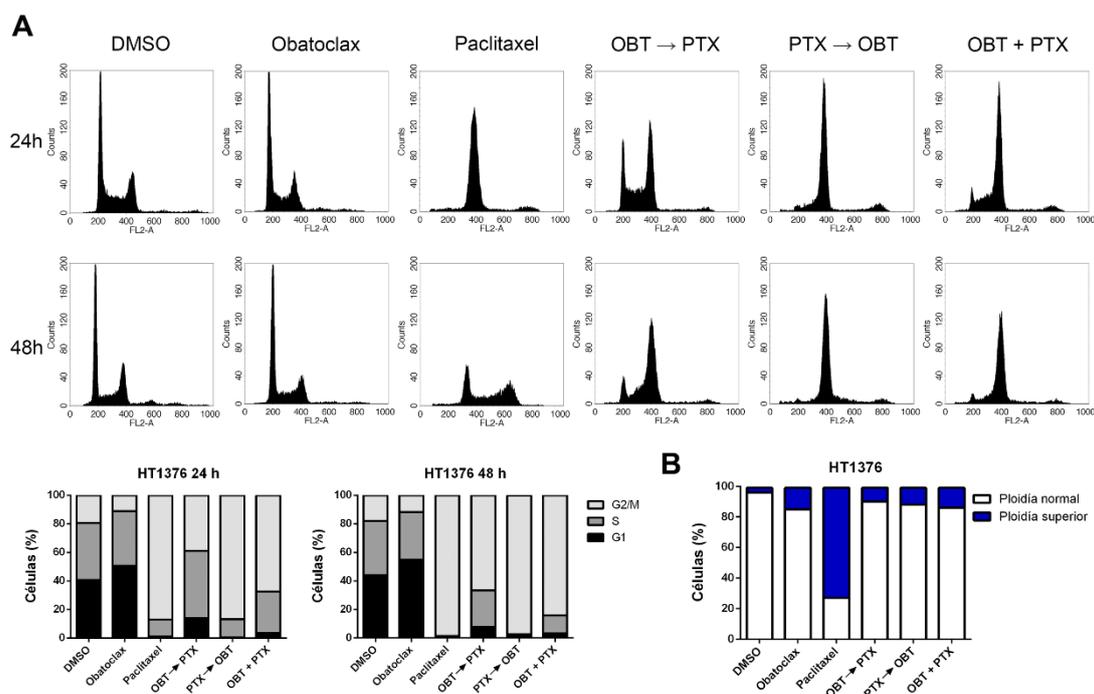


Figura 19. La combinación de obatoclax y paclitaxel inhibe el deslizamiento mitótico en la línea celular HT1376. Las células de la línea HT1376 se trataron con obatoclax 1 μ M y paclitaxel 0,1 μ M en monoterapia o en las tres posibles combinaciones durante 48 horas, utilizando DMSO como control negativo. **A.** Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo de células marcadas con yoduro de propidio. Los histogramas muestran la cuantificación de cada fase del ciclo. **B.** Análisis de la ploidía mediante FISH con una sonda centromérica para el cromosoma 17. Se contaron al menos 100 células de cada condición, y el porcentaje de células con ploidía normal o ploidía superior se representa en los histogramas. OBT: obatoclax; PTX: paclitaxel.

2. La vía Wnt/ β -catenina induce resistencia a paclitaxel a través de un fenotipo CSC en cáncer de vejiga

2.1. Caracterización del papel de β -catenina en la respuesta a paclitaxel

En la segunda parte de esta tesis, quisimos estudiar el papel de la vía Wnt/ β -catenina en relación con el fenotipo de células madre y la respuesta al tratamiento con taxanos en líneas celulares de cáncer de vejiga. Para ello, utilizamos de nuevo las líneas celulares de cáncer de vejiga infiltrante 5637 y HT1197, además de generar una línea celular resistente a paclitaxel derivada de la 5637 a la que llamamos 5637R.

2.1.1. La línea celular HT1197 presenta mayores niveles de la vía Wnt/ β -catenina activa y de los marcadores de UCSCs

En primer lugar, quisimos comprobar mediante ensayos de *western blot* el estado basal de las proteínas implicadas en la vía Wnt/ β -catenina, así como de algunos de los marcadores de UCSCs más comunes, en las células de las líneas 5637 y HT1197 (**Figura 20A**). Como podemos observar, los niveles de la proteína β -catenina fueron mayores en las células de la línea HT1197 que en las de la línea 5637, tanto en su forma total como en su forma activa. En consecuencia, estos altos niveles de β -catenina se correlacionaron con un aumento de la proteína GSK3 β fosforilada (p-GSK3 β ^{Ser9}), forma inactiva de la proteína que participa en la degradación de la β -catenina. Además, la línea celular HT1197 expresaba niveles más altos de marcadores de UCSCs como ALDH1A1, Sox-2 y Oct-4 que la línea celular 5637.

Adicionalmente, quisimos corroborar la existencia de poblaciones celulares con propiedades de células madre tumorales mediante el análisis de la expresión de marcadores de superficie específicos de células madre. Las células CD44⁺/CD24⁻ se han descrito en cáncer de mama como células iniciadoras del cáncer con propiedades de células madre tumorales^{112,113}. Además, en cáncer de vejiga la expresión de CD44 también se ha postulado como posible marcador de CSC, y parece indicar un fenotipo basal en el que también se sobreexpresan varios oncogenes implicados en autorrenovación como CTNNB1 (β -catenina) o POU5F1 (Oct-4)¹¹⁴. Por ello, medimos el porcentaje de células CD44⁺/CD24⁻ en nuestras líneas celulares mediante citometría de flujo, y observamos que este porcentaje era llamativamente mayor en las células de la línea HT1197, donde un 37,7% de las células eran CD44⁺/CD24⁻, mientras que en la línea celular 5637 sólo un 1,9% de las células presentaban este perfil (**Figura 20B**). En conjunto, estos datos sugieren que la línea celular HT1197 presenta una mayor activación de la vía Wnt/ β -catenina que se correlaciona con un aumento de las propiedades relacionadas con el fenotipo de célula madre.

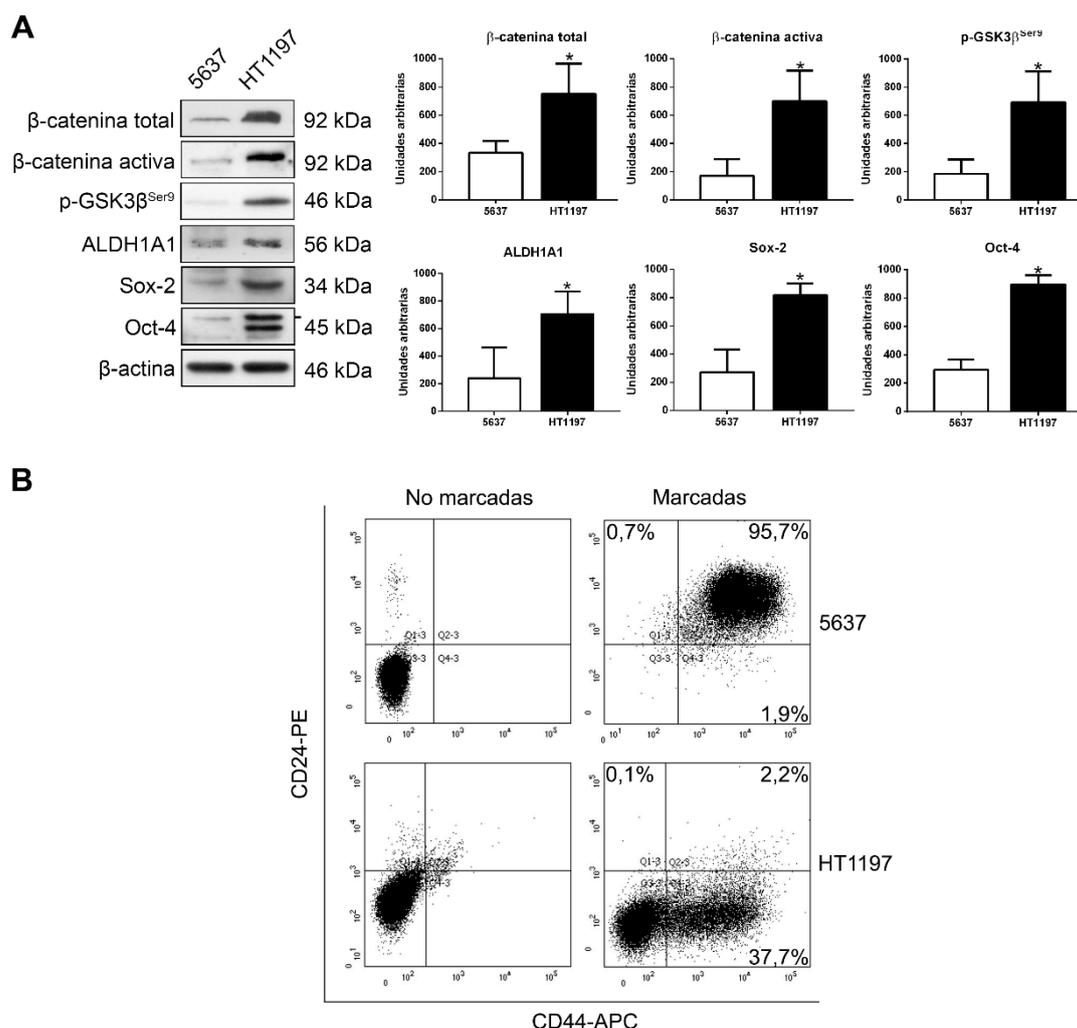


Figura 20. La línea celular HT1197 presenta un enriquecimiento de la vía Wnt/ β -catenina y del fenotipo de célula madre. A. Análisis mediante *western blot* de los niveles de β -catenina total, β -catenina activa, p-GSK3 β ^{Ser9}, ALDH1A1, Sox-2 y Oct-4 en las líneas celulares 5637 y HT1197, usando β -actina como control de carga. Los histogramas muestran el análisis densitométrico de las proteínas indicadas. Los datos se presentan como la media \pm SD. *P-valor < 0,05 obtenido del t-test de Student ($n \geq 3$). **B.** Medición por citometría de flujo (FACS) del porcentaje de células CD44⁺/CD24⁻ en las líneas 5637 y HT1197.

2.1.2. β -catenina juega un papel clave en la respuesta al paclitaxel

En el bloque de resultados anterior hemos demostrado que estas líneas celulares tienen diferente sensibilidad al paclitaxel. Para conocer si la vía de señalización Wnt/ β -catenina juega un papel clave en la respuesta al tratamiento, las células fueron tratadas con paclitaxel 0,1 μ M durante 48 horas (**Figura 21**). El análisis de expresión de proteínas mediante *western blot* mostró de nuevo la inducción de apoptosis en las células de la línea 5637, mientras que las células de la línea HT1197 fueron menos sensibles al tratamiento como se demuestra con la escisión de PARP y la activación de caspasa 3. Además, los marcadores de UCSCs y las proteínas relacionadas con la vía Wnt/ β -catenina eran también mayores en la línea celular HT1197 y no mostraron cambios significativos tras el tratamiento, por lo que concluimos que el mantenimiento de esta vía podría estar implicado en la resistencia a paclitaxel.

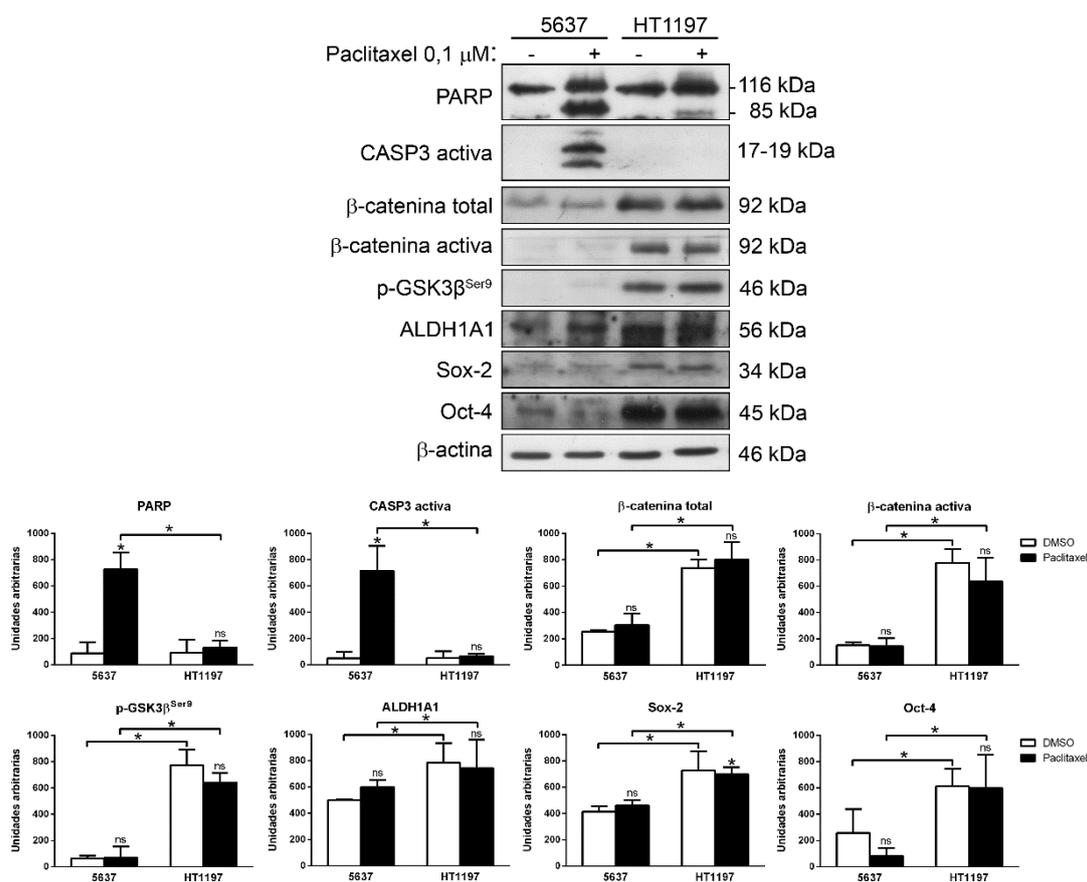


Figura 21. La activación de la vía Wnt/β-catenina y el fenotipo de célula madre podría controlar la respuesta a paclitaxel. Las líneas celulares 5637 y HT1197 se trataron con paclitaxel 0,1 uM durante 48 horas, utilizando DMSO como control. Los niveles de PARP, caspasa 3 activa, β-catenina total, β-catenina activa, p-GSK3β^{Ser9}, ALDH1A1, Sox-2 y Oct-4 se analizaron por *western blot*, usando β-actina como control de carga. Los histogramas muestran el análisis densitométrico de las proteínas indicadas. Los datos se presentan como la media ± SD, y cada tratamiento fue comparado con el DMSO como control o entre diferentes tratamientos cuando se indica. *P-valor < 0,05 y ns (no significativo) obtenidos del t-test de Student (n ≥ 3).

Nuestro grupo ha observado previamente que β-catenina puede mediar en la resistencia a paclitaxel en células de cáncer de próstata⁹¹. Además, como hemos visto que en líneas celulares de cáncer de vejiga su expresión se correlaciona con la resistencia al tratamiento, decidimos sobreexpresar esta proteína en la línea celular 5637 para demostrar su implicación en la respuesta al tratamiento con paclitaxel. Realizamos una transfección transitoria con los plásmidos pCMV6-XL5-CTNNB1 y pCMV6-XL5 como vector vacío (EV), y tras ello las células se trataron con paclitaxel 0,1 μM durante 48 horas (**Figura 22A**). Como pudimos comprobar mediante *western blot*, la sobreexpresión provocaba el aumento de la proteína tanto en su forma total como en su forma activa. A continuación, analizamos la muerte celular apoptótica tras el tratamiento y observamos que la rotura de PARP y la activación de caspasa 3 ocurría de manera mucho más discreta tras la sobreexpresión génica de β-catenina, indicando que las células se volvían resistentes a paclitaxel.

Por otro lado, para confirmar nuestra hipótesis las células de la línea HT1197 se silenciaron también de manera transitoria mediante siARN de β -catenina y se trataron con paclitaxel 0,1 μ M durante 48 horas (**Figura 22B**). En este caso, tras comprobar que el silenciamiento ocurría eficientemente como vemos por la disminución de los niveles de β -catenina total y activa en *western blot*, observamos que la apoptosis inducida por paclitaxel en las células silenciadas era mayor que tras el silenciamiento con el siARN control, restaurándose así la sensibilidad a paclitaxel.

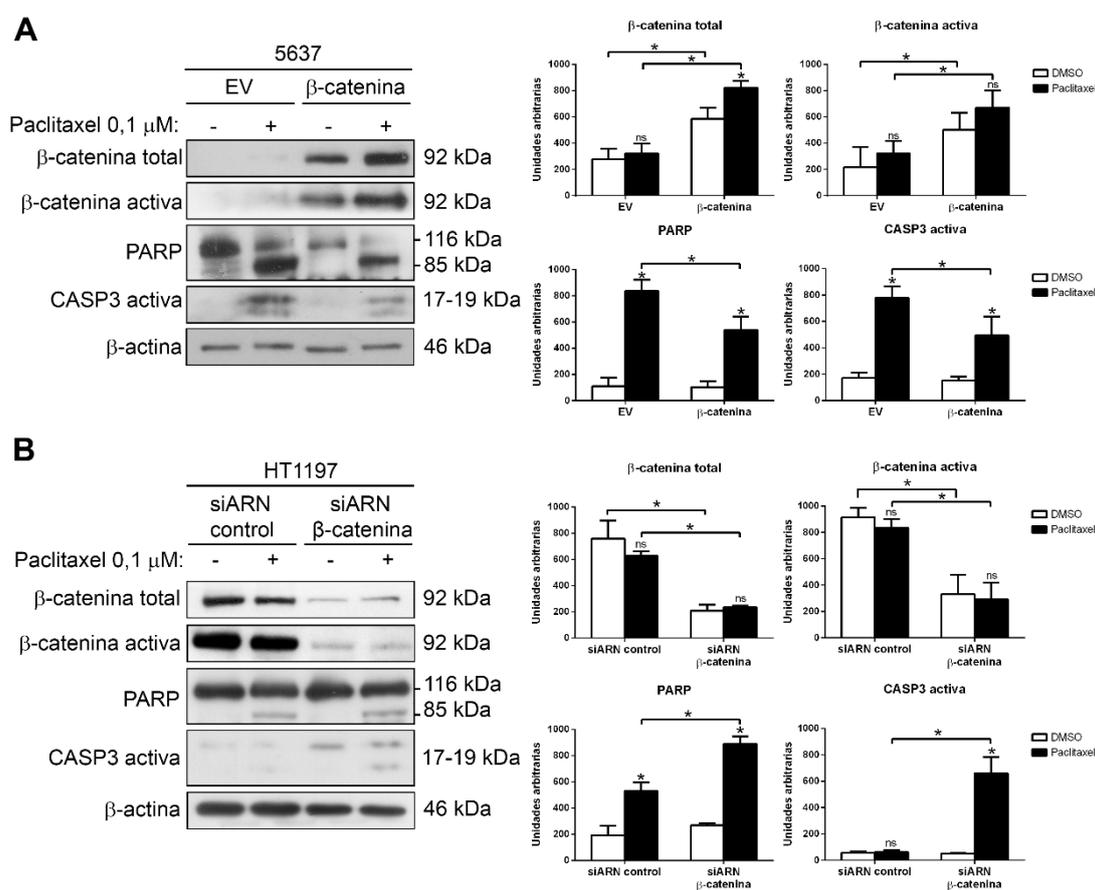


Figura 22. β -catenina regula la resistencia a paclitaxel. A. Las células de la línea 5637 se transfectaron de manera transitoria con los plásmidos pCMV6-XL5-CTNNB1 o pCMV6-XL5 como vector vacío (EV). **B.** Las células de la línea HT1197 se silenciaron de manera transitoria con un siARN β -catenina o siARN control. En ambos casos, tras la transfección las células fueron tratadas con DMSO como control o paclitaxel 0,1 μ M durante 48 horas. Los niveles de PARP, caspasa 3 activa, β -catenina total y β -catenina activa se analizaron por *western blot*, usando β -actina como control de carga. Los histogramas muestran el análisis densitométrico de las proteínas indicadas. Los datos se presentan como la media \pm SD, y cada tratamiento fue comparado con el DMSO como control o entre diferentes tratamientos cuando se indica. *P-valor < 0,05 y ns (no significativo) obtenidos del t-test de Student ($n \geq 3$).

2.2. El inhibidor farmacológico de la vía Wnt/ β -catenina XAV939 sensibiliza a la apoptosis inducida por paclitaxel en la línea celular HT1197

El XAV939 es un inhibidor específico de las tanquirasas 1 y 2. En condiciones normales, estas enzimas desestabilizan los niveles de Axina, uno de los componentes principales del complejo de degradación de la β -catenina, evitando la degradación de esta última y provocando una hiperactivación de la vía de señalización. La inhibición de las tanquirasas por parte del XAV939 provoca la estabilización de la Axina y, como consecuencia, se reducen los niveles de β -catenina y el estado de activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina¹⁷³.

Por ello, en segundo lugar, estudiamos si la combinación de este inhibidor con paclitaxel era capaz de sensibilizar a las células de la línea HT1197. Con este fin, las células de la línea HT1197 se trataron con 10 μ M del inhibidor farmacológico XAV939 solo o en combinación con 0,1 μ M de paclitaxel durante 48 horas (**Figura 23**). Es importante destacar que el inhibidor por sí solo no inducía apoptosis, pero la combinación de ambos tratamientos provocaba una muerte celular mayor que el tratamiento con paclitaxel, como se muestra por el aumento significativo de la rotura de PARP y de la activación de la caspasa 3. El tratamiento con XAV939 no tuvo ningún efecto sobre los niveles totales de β -catenina, pero los niveles de expresión de la forma activa de la proteína sí se vieron reducidos de manera estadísticamente significativa, al igual que ocurría tras el tratamiento combinado. Además, esto correlacionaba con la disminución de p-GSK3 β ^{Ser9} que se observó tras el tratamiento con XAV939 o con la combinación de éste junto a paclitaxel.

Por otro lado, los niveles de Oct-4 disminuyeron tras el tratamiento, sobre todo en el caso del tratamiento combinado. En cuanto a los niveles de ALDH1A1 y Sox-2, no se observaron diferencias significativas tras los tratamientos simples o combinados, posiblemente debido a la variabilidad entre los distintos experimentos.

En resumen, este resultado indicaba que, aunque el tratamiento con XAV939 en monoterapia no inducía muerte celular en la línea celular HT1197, era suficiente para inhibir la vía Wnt/ β -catenina, y esto podría ser lo que permitía que se desencadenase una mayor respuesta apoptótica en dichas células cuando el XAV939 se administraba en combinación con el paclitaxel.

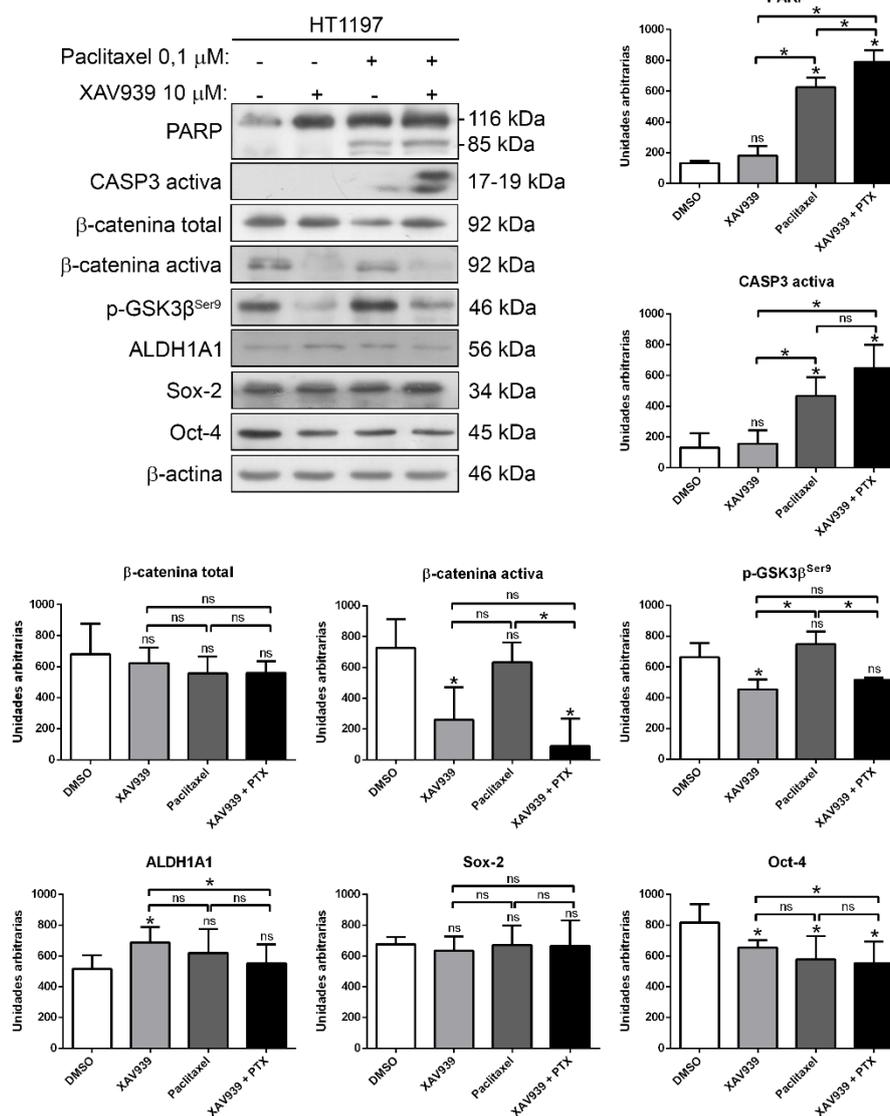


Figura 23. El inhibidor farmacológico XAV939 sensibiliza a la línea celular HT1197 a la apoptosis inducida por paclitaxel a través de la inhibición de la vía de señalización Wnt/ β -catenina. Las células de la línea HT1197 fueron tratadas con DMSO, 0,1 μ M de paclitaxel, 10 μ M de XAV939 o la combinación de ambos fármacos durante 48 horas. Los niveles de PARP, caspasa 3 activa, β -catenina total, β -catenina activa, p-GSK3 β ^{Ser9}, ALDH1A1, Sox-2 y Oct-4 se analizaron por *western blot*, usando β -actina como control de carga. Los histogramas muestran el análisis densitométrico de las proteínas indicadas. Los datos se presentan como la media \pm SD, y cada tratamiento fue comparado con el DMSO como control o entre diferentes tratamientos cuando se indica. *P-valor < 0,05 y ns (no significativo) obtenidos del t-test de Student ($n \geq 3$). PTX: paclitaxel.

2.3. Las tumoresferas derivadas de la línea celular 5637 muestran mayores niveles de β -catenina y resistencia a paclitaxel

Las células del cáncer de vejiga cambian sus fenotipos moleculares y su patrón de crecimiento cuando se cultivan en suspensión como tumoresferas¹⁴⁹. Además, también se ha demostrado que β -catenina actúa como una proteína esencial para el mantenimiento y la regulación de las CSCs, que a su vez están implicadas en la quimiorresistencia^{111,174}. Debido a ello, planteamos la hipótesis de que las células 5637 pudieran cambiar su fenotipo funcional al crecer en suspensión como tumoresferas, y así poder estudiar el papel de β -catenina y comprobar el efecto del paclitaxel en sus patrones de crecimiento.

En primer lugar, generamos una línea celular resistente a paclitaxel derivada de la línea 5637 a la que denominamos 5637R, ya que la línea HT1197 resistente a paclitaxel de manera intrínseca formaba tantas tumoresferas al crecer en suspensión que dificultaba la realización de los ensayos. Para generar esta línea, mantuvimos las células de la línea 5637 en cultivo con una concentración muy baja de paclitaxel (4 nM) durante dos meses, y a continuación seleccionamos los clones que se mantuvieron viables para exponerlos de nuevo a paclitaxel 2 nM. Posteriormente, se volvieron a seleccionar los clones viables y se mantuvieron en cultivo un mes más con paclitaxel 1 nM. Finalmente, las células se cultivaron en ausencia de paclitaxel y comprobamos que las células 5637R eran más resistentes a paclitaxel en comparación con la línea parental 5637, como indicaron los niveles de rotura de PARP y de activación de caspasa 3 en la **Figura 24**.

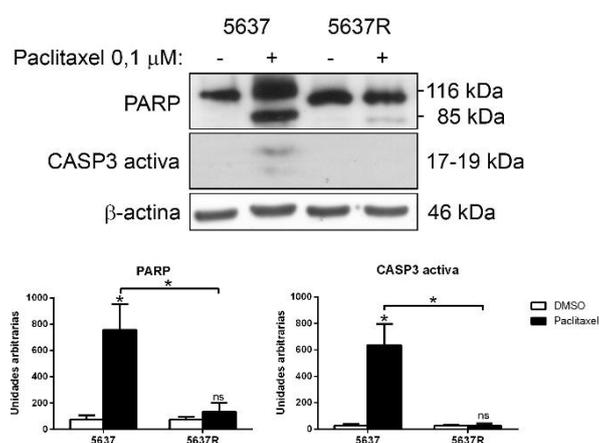


Figura 24. Generación de la línea celular 5637R resistente a paclitaxel. Las células de la línea generada 5637R y de la línea parental 5637 se trataron con DMSO y paclitaxel 0,1 μ M durante 48 horas. Los niveles de PARP y caspasa 3 activa se analizaron mediante *western blot*, usando β -actina como control de carga. Los histogramas muestran el análisis densitométrico de las proteínas indicadas. Los datos se presentan como la media \pm SD, y cada tratamiento fue comparado con el DMSO como control o entre diferentes tratamientos cuando se indica. *P-valor < 0,05 y ns (no significativo) obtenidos del t-test de Student ($n \geq 3$).

A continuación, con el objetivo de estudiar si la resistencia a paclitaxel estaba implicada en la generación de tumoresferas, realizamos un ensayo de formación de tumoresferas cultivando ambas líneas celulares en placas no adherentes con medio RPMI 1640 (su medio de cultivo rutinario) o con medio MammoCult (medio que favorece la formación de tumoresferas en suspensión). Se sembraron 6×10^3 células de cada línea celular y se cultivaron durante 5 días para posteriormente contar el número de tumoresferas formadas (**Figura 25A**). Ambas líneas celulares formaron tumoresferas cuando utilizamos el medio MammoCult, pero el número de ellas era significativamente mayor en el caso de la línea celular 5637R. Además, esta línea celular era capaz de formar tumoresferas incluso en el medio RPMI 1640 cuando se cultivaban en suspensión, por lo que pudimos concluir que la resistencia al paclitaxel promovía la proliferación de tumoresferas en líneas celulares de cáncer de vejiga.

En paralelo, quisimos estudiar las diferencias entre la línea celular 5637 cultivada en condiciones de adherencia o en suspensión para analizar a su vez el efecto que podía tener la formación de tumoresferas en la resistencia a paclitaxel. Curiosamente, la apoptosis inducida por paclitaxel era más eficaz en las células 5637 cultivadas en RPMI 1640 y en condiciones de adherencia que en las tumoresferas derivadas de las células 5637 cultivadas en MammoCult y en condiciones de no adherencia (**Figura 25B**).

Del mismo modo, estas últimas presentaban un incremento en los niveles de β -catenina activa y en los de los marcadores de fenotipo de célula madre ALDH1A1, Sox-2 y Oct-4 (**Figura 25C**). En conjunto, todos estos resultados demostraban que el fenotipo de UCSCs estaba implicado en la resistencia al paclitaxel, y que β -catenina podría jugar un papel clave en el mantenimiento y regulación de dicho fenotipo.

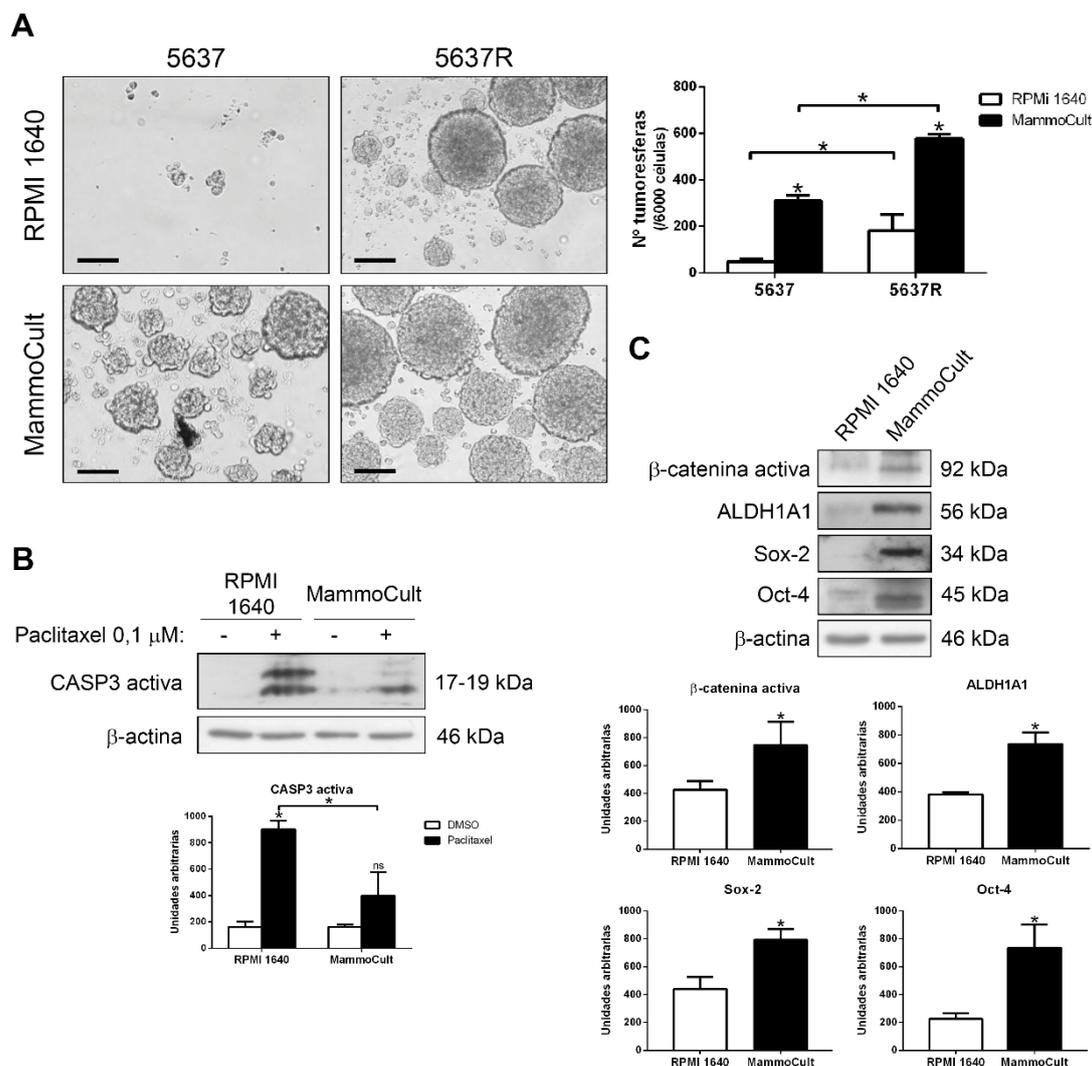


Figura 25. β-catenina promueve la resistencia a paclitaxel y la proliferación de tumoresferas en el cáncer de vejiga. **A.** Ensayo de formación de tumoresferas en las líneas 5637 y 5637R cultivadas en suspensión con RPMi 1640 o MammoCult durante 5 días. Se muestran imágenes representativas. Las barras representan 100 µm. Los histogramas muestran el número de tumoresferas contadas al microscopio. Los datos se presentan como la media ± SD comparando el crecimiento en RPMi 1640 y en MammoCult para cada línea y entre ellas. **B.** Línea celular 5637 cultivada en adherencia y RPMi 1640 o en suspensión y MammoCult, y tratada con DMSO o paclitaxel 0,1 µM durante 48 horas. Los niveles de caspasa 3 activa se analizaron mediante *western blot* usando β-actina como control de carga. **C.** Línea celular 5637 cultivada en adherencia y RPMi 1640 o en suspensión y MammoCult. Los niveles de β-catenina activa, ALDH1A1, Sox-2 y Oct-4 se analizaron mediante *western blot*, usando β-actina como control de carga. Los histogramas muestran el análisis densitométrico de las proteínas indicadas como la media ± SD, comparando cada tratamiento con el DMSO como control o entre ellos cuando se indica. *P-valor < 0,05 y ns (no significativo) obtenidos del t-test de Student (n ≥ 3).

2.4. Análisis de expresión inmunohistoquímica de β -catenina, ALDH1A1 y Sox-2 en tejidos de pacientes con CVMI

Por último, para estudiar la relevancia clínica de los resultados descritos anteriormente, analizamos la expresión de las proteínas β -catenina, ALDH1A1 y Sox-2 mediante un estudio por IHQ en 2 TMA's con biopsias de 140 pacientes con CVMI.

Como podemos observar en la **Figura 26**, los tumores mostraron dos patrones diferentes de inmunotinción para la proteína β -catenina. En la mayoría de ellos (80,5%), β -catenina tenía un patrón de expresión intensa en membrana (Caso 1), lo cual indicaba que la proteína estaba inactiva y unida al complejo de degradación. En cambio, en el 19,5% de los CVMI encontramos un patrón de expresión aberrante donde pudimos observar pérdida en membrana o expresión nuclear. En ambos casos, esto quiere decir que la proteína está activa, ya que se encuentra libre en el citoplasma y puede pasar al núcleo para ejercer su función transactivadora (Caso 2). Este hecho nos indicaba que, aunque en la mayoría de ellos la vía Wnt/ β -catenina se encontraba inactiva, había un pequeño pero importante grupo en los que esta vía de señalización se encontraba activa.

Además, cuando analizamos la inmunotinción de los marcadores ALDH1A1 y Sox-2 en estos mismos pacientes, observamos que el patrón de expresión aberrante de β -catenina coincidía con la expresión de estos marcadores. En el Caso 1 donde β -catenina se localizaba en membrana e inactiva, la expresión de ALDH1A1 y Sox-2 era negativa. Sin embargo, cuando la vía de señalización estaba activa y la expresión de β -catenina era citosólica o nuclear (Caso 2), la expresión de estos marcadores era positiva. Aunque sólo cuantificamos el marcador ALDH1A1 por ser el más consistente técnicamente, un 23,3% de los pacientes con CVMI expresaba ALDH1A de manera positiva.

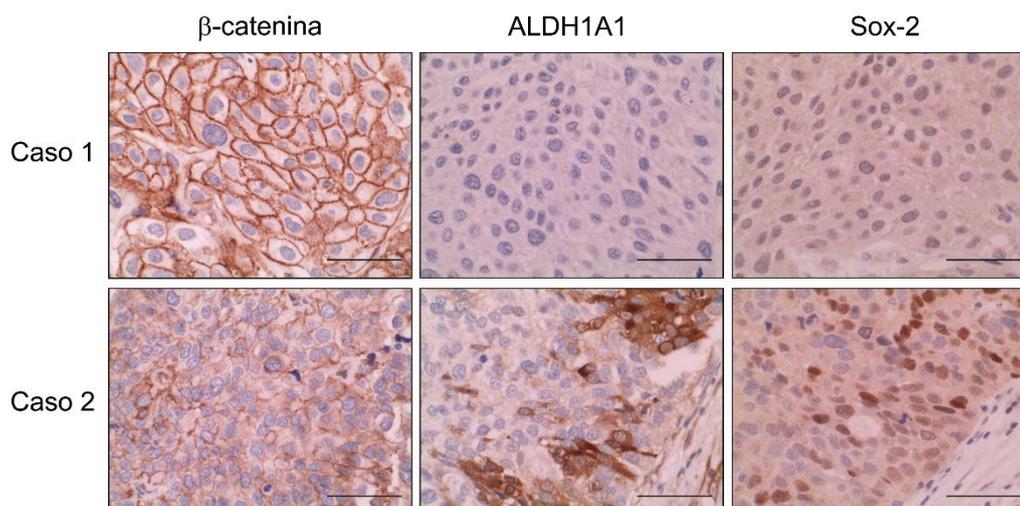


Figura 26. Expresión inmunohistoquímica de β -catenina, ALDH1A1 y Sox-2 en pacientes con CVMI. Se muestran fotografías representativas de los distintos patrones de tinción inmunohistoquímica de β -catenina junto con la expresión de los marcadores ALDH1A1 y Sox-2 en dos casos de pacientes con CVMI. Las barras representan 50 μ m.

En la **Tabla 5** se muestra la correlación entre el número de pacientes con expresión aberrante o no aberrante de β -catenina, y positiva o negativa de ALDH1A1. Aunque es una aproximación, la relación entre ambas es estadísticamente significativa (P-valor < 0,05). Por todo ello, pudimos comprobar que la activación de β -catenina se relaciona con un aumento de los marcadores de CSCs Sox-2 y sobre todo ALDH1A1 en los pacientes con CVMI, de manera que estos marcadores podrían predecir aquellos pacientes que más probablemente van a progresar o responder peor al tratamiento con paclitaxel.

Tabla 5. Correlación entre la expresión de β -catenina y ALDH1A1. La tabla muestra el número de pacientes con CVMI con expresión no aberrante (en membrana) o aberrante (pérdida en membrana o nuclear) de β -catenina y con expresión inmunohistoquímica negativa o positiva de ALDH1A1. P-valor = 0,0328 obtenido del test exacto de Fisher.

		Expresión de β -catenina	
		No aberrante (inactiva)	Aberrante (activa)
Expresión de ALDH	Negativa	88	16
	Positiva	19	10

3. SCF ^{β -TrCP} y las proteínas de reparación BRCA1 y CtIP pueden estar relacionadas en la respuesta a cisplatino

En esta tercera parte del trabajo quisimos estudiar los mecanismos de resistencia al tratamiento con cisplatino en líneas celulares de cáncer de vejiga, así como en otros modelos tumorales como mama y ovario, haciendo especial hincapié en el papel de los mecanismos de reparación del ADN y del sistema de degradación de proteínas mediado por β -TrCP.

3.1. La sobreexpresión de proteínas que participan en las vías de recombinación homóloga (HR) está implicada en la adquisición de resistencia a cisplatino

En primer lugar, estudiamos los niveles basales de algunas de las proteínas implicadas en las vías de reparación del ADN mediante HR en distintos modelos celulares de cáncer de vejiga, mama y ovario que, de acuerdo con la literatura y resultados previos de nuestro laboratorio, mostraban diferentes respuestas al tratamiento con cisplatino. Las líneas celulares de cáncer de vejiga utilizadas fueron la 5637, HT1197 y HT1376, todas ellas músculo-invasivas. En cuanto a los modelos de cáncer de mama se utilizaron tanto líneas tumorales hormono-dependientes (T47D) como líneas tumorales hormono-independientes (MDA-MB-468 y MDA-MB-231). Por último, como modelo de cáncer de ovario se utilizó la línea celular SKOV3. Como hemos mencionado, con el fin de comparar la capacidad intrínseca de reparación de estas líneas tumorales, se analizaron mediante *western blot* los niveles de expresión endógena de BRCA1, CtIP y RAD51.

Los resultados de la **Figura 27** mostraron que los niveles de expresión endógenos de las proteínas BRCA1 y CtIP eran más elevados en la línea celular HT1197 de cáncer de vejiga que en el resto de líneas celulares, seguidos por las células de la línea HT1376. De manera curiosa, el anticuerpo para la proteína CtIP utilizado marcaba dos bandas de 120 y 90 kDa que aparecían bien a una, a otra, o a ambas alturas dependiendo de la línea celular. Estos pesos moleculares estaban lo bastante separados en los geles de electroforesis como para descartar la posibilidad de que se tratase de una fosforilación; por lo que, según nuestra experiencia y los datos de la ficha técnica del anticuerpo, el doble bandeo podría ser debido a que la proteína presenta dos isoformas diferentes que están presentes en distinta proporción en cada una de las líneas celulares. Así, dependiendo de lo predominante que sea una u otra isoforma podíamos observar la banda de 90 kDa, la de 120 kDa, o ambas. Por ejemplo, en las líneas celulares MDA-MB-468, MDA-MB-231 y SKOV3 la isoforma predominante era la de 120 kDa. Por el contrario, en la línea celular HT1197 predominaba la isoforma de 90 kDa, mientras que en el resto de líneas celulares (T47D, 5637 y HT1376) ambas isoformas parecían estar presentes.

En cuanto a los niveles de RAD51, éstos eran más altos en las líneas celulares MDA-MB-231 de cáncer de mama y en la HT1376 de cáncer de vejiga, seguidos por las células de la línea

T47D. En el caso de la línea celular HT1197, RAD51 se expresaba en menor proporción; sin embargo, en los ensayos de *western blot* aparecía una doble banda por encima del peso molecular indicado cuyos niveles eran mucho más altos que los de la proteína basal. La posible fosforilación de esta proteína está siendo objeto de estudio en otra tesis doctoral de nuestro laboratorio. Por último, las células de las líneas MDA-MB-468 y SKOV3 expresaban muy pocos niveles de las tres proteínas implicadas en reparación por HR. Por ello, en conjunto decidimos elegir una línea celular de cada modelo tumoral con niveles intermedios de estas proteínas para posteriormente poder modularlas y estudiar así la respuesta a cisplatino. Concretamente, elegimos la línea celular T47D como modelo de cáncer de mama, la línea celular HT1376 de cáncer de vejiga y la línea celular SKOV3 de cáncer de ovario.

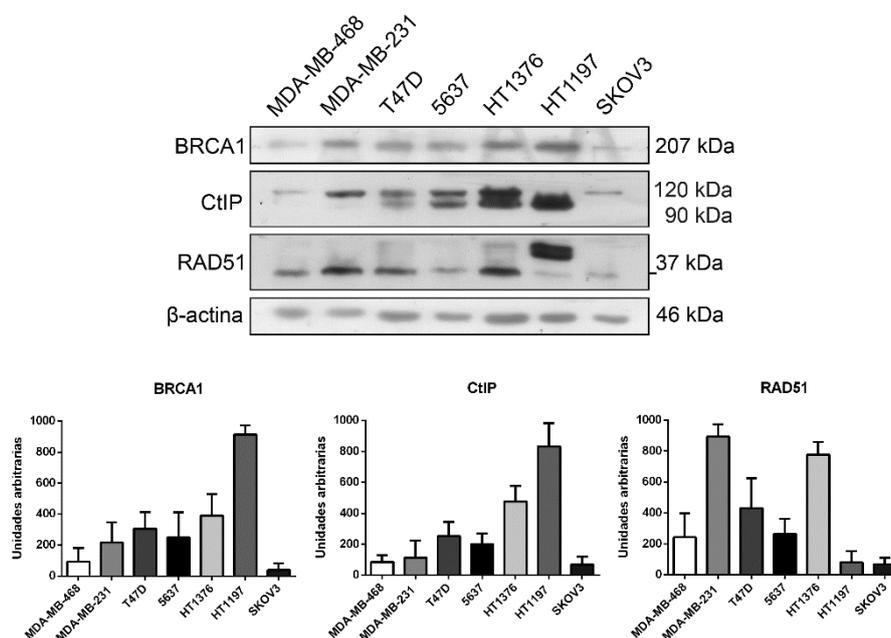


Figura 27. Expresión endógena de proteínas implicadas en HR en líneas celulares de cáncer de mama, vejiga y ovario. Análisis mediante *western blot* de los niveles de BRCA1, CtIP y RAD51 en las líneas celulares MDA-MB-468, MDA-MB-231, T47D, 5637, HT1376, HT1197 y SKOV3, utilizando β -actina como control de carga. Los histogramas muestran el análisis densitométrico de las proteínas indicadas. Los datos se presentan como la media \pm SD ($n \geq 3$).

A continuación, para caracterizar la respuesta al cisplatino y analizar la participación de las vías de HR en la adquisición de resistencia al mismo, se trataron las líneas celulares HT1376, T47D y SKOV3 con cisplatino 5 μ M durante 48 horas, utilizando DMSO como control. La concentración de cisplatino elegida se obtuvo de un análisis previo mediante IC50 de estas líneas celulares en nuestro laboratorio (datos no mostrados) (**Figura 28**). Los niveles del fragmento de 85 kDa de PARP y la activación de caspasa 3 obtenidos mediante *western blot* nos permitieron comprobar que la línea celular HT1376 era sensible al tratamiento con cisplatino, mientras que la línea celular T47D era resistente al mismo. Por su parte, en el modelo de cáncer de ovario SKOV3 la muerte celular apoptótica inducida por cisplatino era intermedia entre las otras dos líneas celulares.

Está descrito que el tratamiento con cisplatino induce la parada celular en fase S al inhibir la replicación y activarse el punto de control de daño al ADN, por lo que para comprobar el efecto del tratamiento en estas líneas analizamos también los niveles de Ciclina E, marcador de parada en fase G1/S. Como podemos observar, en las tres líneas celulares estudiadas los niveles de esta proteína aumentaban tras el tratamiento, indicando que el fármaco estaba actuando eficazmente independientemente de la inducción de apoptosis.

Además, aunque no ocurría así en la línea celular SKOV3, donde los niveles de todas las proteínas implicadas en HR eran de nuevo muy bajos, en las líneas celulares HT1376 y T47D la muerte celular parecía correlacionarse de manera inversa con los niveles de CtIP y especialmente de BRCA1, ya que en la línea celular T47D resistente los niveles de ambas proteínas estaban incrementados y se mantenían elevados tras el tratamiento en comparación con la línea celular HT1376 sensible a cisplatino. Por otro lado, la fosforilación de la Histona H2AX en la serina 139 (γ H2AX^{Ser139}) es un marcador de daño al ADN bastante consolidado cuya función es unirse a las DSBs para señalarlas y atraer al resto de la maquinaria de reparación, como RAD51 entre otros. En nuestro caso, observamos que el tratamiento con cisplatino provocaba un aumento en los niveles de γ H2AX^{Ser139} y RAD51 en aquellas líneas donde había muerte celular, corroborando que el fármaco estaba induciendo daño al ADN de manera eficiente y, con ello, desencadenando la apoptosis. En contraposición, ambas proteínas no se veían alteradas tras la adición del fármaco en la línea celular T47D.

En general, pudimos comprobar que las distintas líneas celulares estudiadas respondían de manera diferente al tratamiento con cisplatino, y que además esta sensibilidad o resistencia parecía depender de los niveles de expresión de las proteínas implicadas en los mecanismos de reparación del ADN por HR como CtIP y, especialmente, BRCA1.

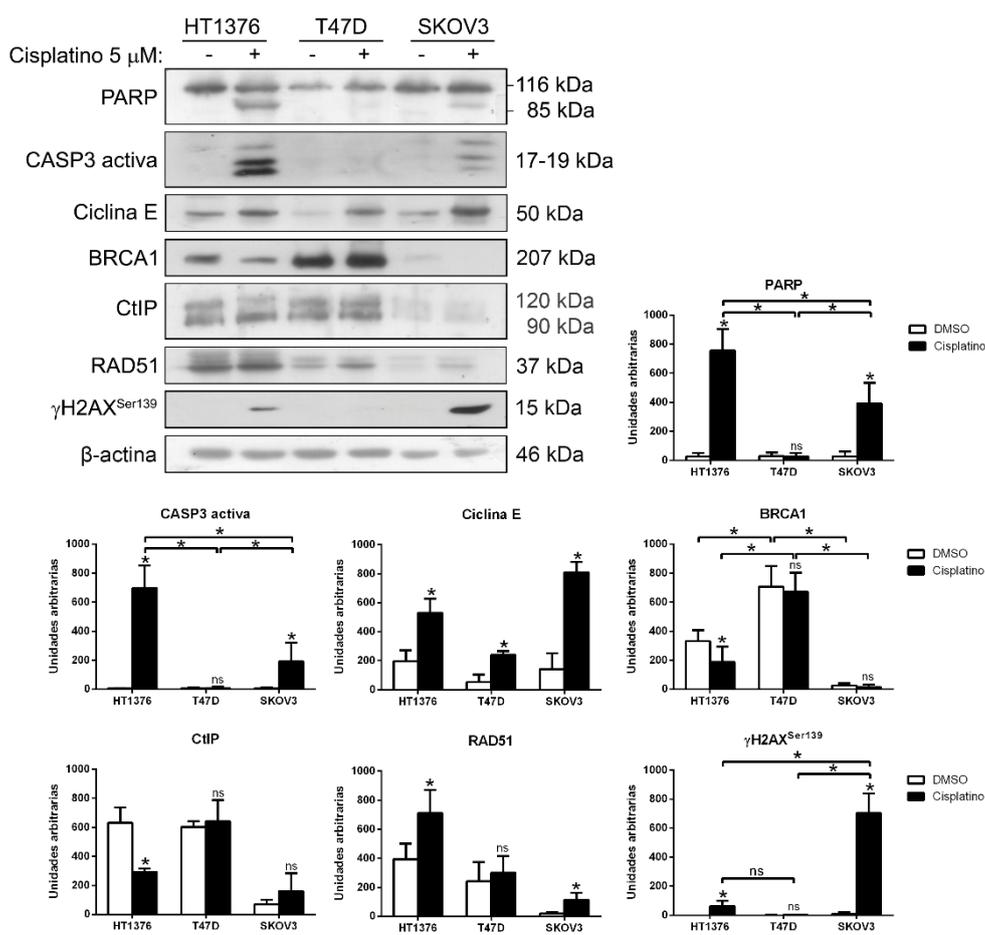


Figura 28. Caracterización de la respuesta a cisplatino en líneas celulares de cáncer de vejiga, mama y ovario. Las líneas celulares HT1376, T47D y SKOV3 se trataron con cisplatino 5 μ M durante 48 horas, utilizando DMSO como control. Los niveles de PARP, caspasa 3 activa, Ciclina E, BRCA1, CtIP, RAD51 y γ H2AX^{Ser139} se analizaron por *western blot*, usando β -actina como control de carga. Los histogramas muestran el análisis densitométrico de las proteínas indicadas. Los datos se presentan como la media \pm SD, y cada tratamiento fue comparado con el DMSO como control o entre diferentes tratamientos cuando se indica. *P-valor < 0,05 y ns (no significativo) obtenidos del t-test de Student (n \geq 3).

El siguiente paso en nuestra investigación fue demostrar que efectivamente BRCA1 tiene un papel crucial en la respuesta a cisplatino. Para ello, silenciamos la expresión de esta proteína mediante siARN transitorio en las líneas celulares HT1376 y T47D, considerándolas las más apropiadas por expresar niveles más altos de BRCA1 que la línea celular SKOV3. Mediante *western blot* confirmamos que los niveles de expresión de BRCA1 disminuían en ambas líneas celulares tras el silenciamiento génico (**Figura 29**). Sin embargo, tras el tratamiento con cisplatino obtuvimos respuestas diferentes dependiendo de la línea celular. En efecto, en la línea celular HT1376 el silenciamiento de BRCA1 aumentaba la inducción de apoptosis tras la adición de cisplatino, como podemos observar por el incremento en la rotura de PARP y en los niveles de caspasa 3 activa (**Figura 29A**), demostrando que esta proteína estaba implicada en la respuesta al tratamiento. En cambio, en la línea celular T47D la disminución de los niveles de BRCA1 no se acompañaba de la inducción de apoptosis, sugiriendo que en esta línea celular la resistencia a cisplatino podría estar mediada por otras proteínas y/o mecanismos (**Figura 29B**).

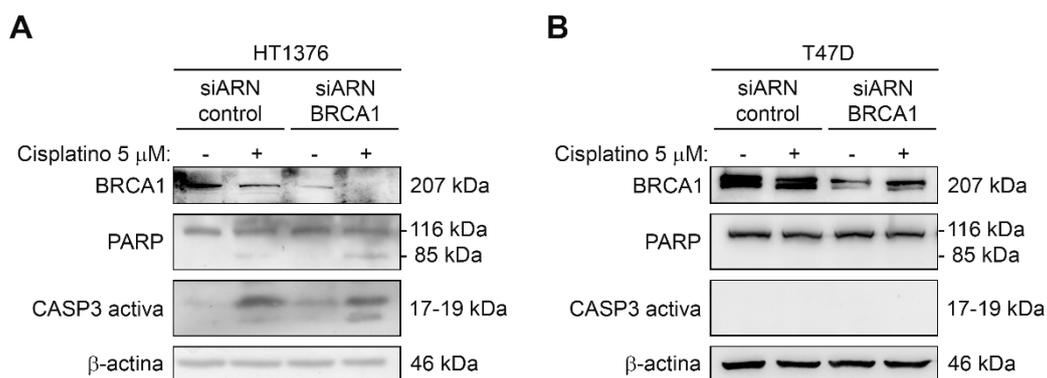


Figura 29. BRCA1 regula la respuesta a cisplatino en la línea celular HT1376. Las células de las líneas **(A)** HT1376 y **(B)** T47D fueron silenciadas de manera transitoria con siARN control o siARN BRCA1, y tratadas con DMSO como control o cisplatino 5 μM durante 48 horas. Los niveles de BRCA1, PARP y caspasa 3 activa se analizaron por *western blot*, usando β-actina como control de carga. Los experimentos fueron realizados al menos por triplicado.

3.2. El sistema de degradación de proteínas SCF^{β-TrCP} está implicado en la respuesta a cisplatino

Por otro lado, se sabe que el sistema UPS controla una gran variedad de procesos celulares entre los que se encuentra la reparación del ADN, y que su vez las proteínas implicadas en la reparación de DSBs están reguladas por ubiquitilación a múltiples niveles²⁹. Por este motivo, decidimos analizar también la posible implicación de β-TrCP en la regulación de la expresión de estas proteínas, así como su papel directo en la respuesta a cisplatino. Para ello, intentamos analizar sus niveles de expresión endógenos mediante *western blot* en todas las líneas celulares, pero tras probar varios anticuerpos de distintas casas comerciales que no parecían muy específicos, observamos que la detección de la proteína era muy dependiente de los niveles de expresión, por lo que decidimos analizar los niveles de ARNm mediante RT-qPCR.

Como observamos en la **Figura 30**, los niveles de β-TrCP eran más altos en la línea celular MDA-MB-468 que en la MDA-MB-231, comportándose de manera inversa con respecto a los niveles de BRCA1, CtIP y RAD51 en estas dos líneas celulares. En contraposición, en las líneas celulares de cáncer de vejiga los niveles de expresión de β-TrCP parecían correlacionarse positivamente con los de las proteínas implicadas en HR, expresándose de menor a mayor cantidad en la línea 5637, HT1376 y HT1197 respectivamente. Por otro lado, la línea celular T47D era la que expresaba mayores niveles de β-TrCP, mientras que de nuevo la línea celular de cáncer de ovario SKOV3 apenas expresaba esta proteína.

Debido a que en la línea celular T47D la resistencia a cisplatino no parecía estar mediada por BRCA1, y que la línea celular MDA-MB-468 tampoco expresaba niveles muy elevados de las proteínas implicadas en HR, decidimos elegir las líneas celulares de cáncer de vejiga HT1376 y HT1197 para continuar con el estudio de β-TrCP, ya que además en la línea celular HT1376 las proteínas BRCA1 y CtIP parecían tener un papel importante en la adquisición de resistencia al tratamiento. Sin embargo, cuando intentamos silenciar o sobreexpresar β-TrCP de manera

transitoria en la línea celular HT1197 encontramos diversas dificultades, por lo que finalmente seleccionamos como modelo la línea celular HT1376.

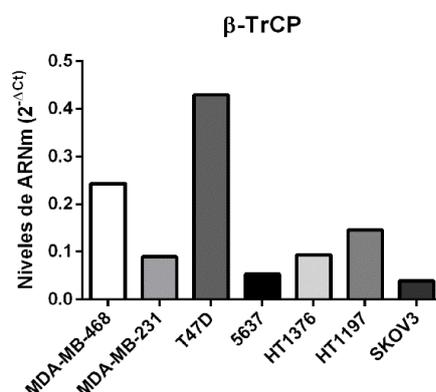


Figura 30. Niveles de expresión del gen β-TrCP en líneas celulares de cáncer de mama y ovario. Cuantificación de los niveles de ARNm por RT-qPCR en las líneas celulares MDA-MB-468, MDA-MB-231, T47D, 5637, HT1376, HT1197 y SKOV3, utilizando como control endógeno el gen HPRT1.

Se sabe que β-TrCP se expresa a niveles bajos de manera endógena¹⁶², y además los anticuerpos comerciales que existen en la actualidad muestran dificultades para detectar estos niveles. Por ello, a partir de la línea celular HT1376, recurrimos a la generación de dos líneas celulares transfectadas de manera estable mediante lentivirus con los plásmidos pCS2-HA-β-TrCP y pCS2-HA-β-TrCP ΔF cedidos por el Dr. F. Romero (Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla). Estos plásmidos contenían la proteína silvestre y un mutante dominante negativo de β-TrCP respectivamente, ambos etiquetados con HA. La generación de las líneas celulares se describe en el apartado de materiales y métodos, y a las líneas celulares generadas se les denominó HT1376 HA-β-TrCP y HT1376 HA-β-TrCP ΔF respectivamente.

Lo primero que hicimos fue comprobar la sobreexpresión de β-TrCP, así como la bajada de expresión de algunos de sus sustratos conocidos en las líneas celulares generadas. En la **Figura 31A** observamos que en la línea celular HT1376 HA-β-TrCP transfectada con la proteína silvestre, los niveles de β-TrCP se detectaban con facilidad mediante *western blot*. Además, en esta línea celular, la expresión de sus sustratos β-catenina, CDK1 y Mcl-1 disminuía significativamente. Como era de esperar, en el caso de la sobreexpresión de la proteína β-TrCP mutada en la línea HT1376 HA-β-TrCP ΔF, los niveles de estos sustratos se recuperaban. La mutación ΔF consistía en una deleción que afectaba al dominio F-box encargado de asociarse al resto del complejo SCF, por lo que, aunque β-TrCP era capaz de interactuar con sus sustratos, éstos no eran correctamente degradados. Esto explicaría por qué los niveles de β-catenina, CDK1 y Mcl-1 eran incluso mayores que en la línea parental HT1376 WT, debido a la competencia entre la proteína endógena y la proteína mutada. Curiosamente, cabe destacar que la deleción afectaba también a la zona de reconocimiento del anticuerpo, por lo que en el caso de la línea HT1376 HA-β-TrCP ΔF no se observaba banda de β-TrCP en el *western blot*. En

cambio, ambas proteínas eran correctamente detectadas mediante el anticuerpo contra HA, así como en el análisis de ARNm por RT-qPCR (**Figura 31B**).

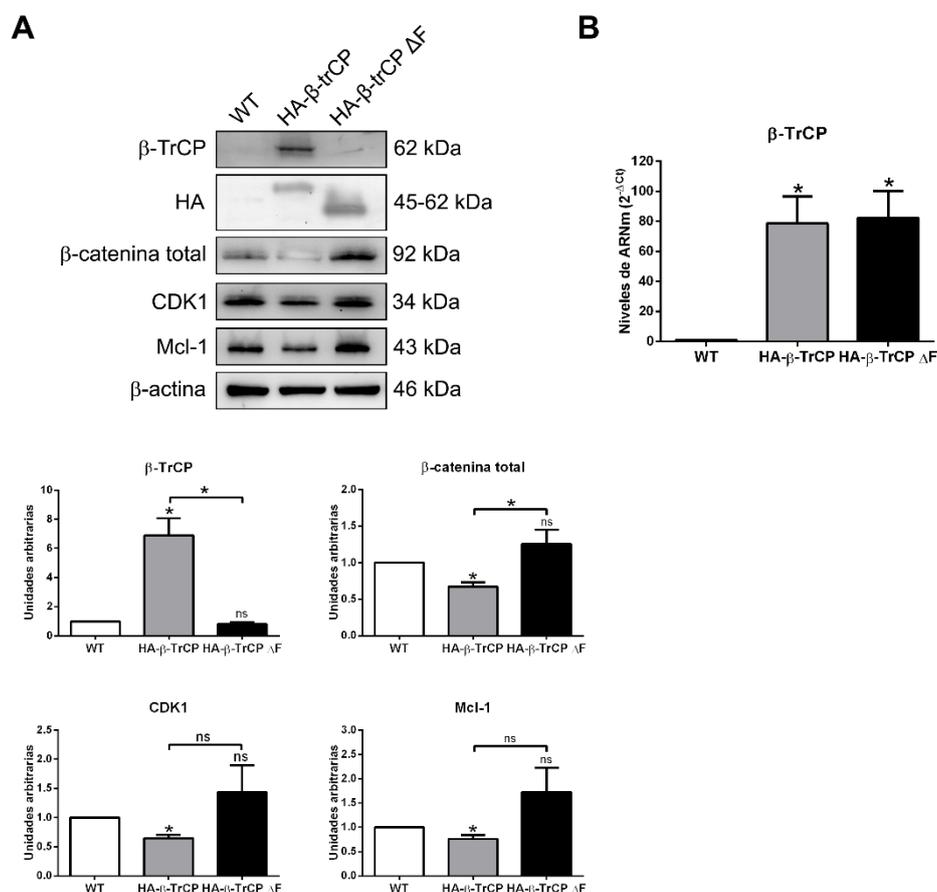


Figura 31. Generación de las líneas celulares HT1376 HA-β-TrCP y HT1376 HA-β-TrCP ΔF. **A.** Los niveles de β-TrCP, HA, β-catenina total, CDK1 y Mcl-1 se analizaron por *western blot*, usando β-actina como control de carga. Los histogramas muestran el análisis densitométrico de las proteínas indicadas. **B.** Niveles de expresión del gen β-TrCP en las mismas líneas celulares. Cuantificación de los niveles de ARNm por RT-qPCR, utilizando como control endógeno el gen HPR1. Los datos se presentan como la media ± SD, y cada línea celular fue comparada con la línea parental HT1376 WT o entre ellas cuando se indica. *P-valor < 0,05 y ns (no significativo) obtenidos del t-test de Student (n ≥ 3).

Una vez generadas las líneas celulares y comprobada la correcta función de β-TrCP en ellas, quisimos estudiar su papel en la regulación de la respuesta a cisplatino. Para ello, tratamos las células de las líneas HT1376 WT, HT1376 HA-β-TrCP y HT1376 HA-β-TrCP ΔF con cisplatino 5 μM durante 48 horas, utilizando DMSO como control, y analizamos los marcadores de apoptosis y daño al ADN mediante *western blot*. Nuestros resultados mostraron que la muerte celular inducida por cisplatino era mayor en la línea HT1376 HA-β-TrCP que en la línea parental HT1376 WT, como indicaron los niveles de rotura de PARP y de caspasa 3 activa. Además, esta inducción de apoptosis se acompañaba de un aumento del daño al ADN indicado por el incremento en los niveles de la proteína γH2AX^{Ser139}. En cambio, cuando se sobreexpresaba la proteína β-TrCP mutada, se revertía el efecto tanto en muerte como en daño al ADN causado por la adición del fármaco, ya que en la línea celular HT1376 HA-β-TrCP ΔF los niveles de todos estos marcadores volvían a disminuir (**Figura 32A**). Es decir, la sobreexpresión de β-TrCP

mejoraba la respuesta apoptótica tras el tratamiento con cisplatino debido a un aumento del daño al ADN.

Para confirmar nuestra hipótesis de que β -TrCP estaba implicada en la adquisición de resistencia al tratamiento, se silenció de manera transitoria mediante siARN la expresión de β -TrCP en la línea celular parental HT1376. En primer lugar, debido a que el anticuerpo anti- β -TrCP no reconocía bien la proteína a niveles bajos, comprobamos la eficacia del silenciamiento mediante el análisis de ARNm por RT-qPCR (**Figura 32B**).

A continuación, las células se trataron con cisplatino 5 μ M durante 48 horas utilizando DMSO como control, y se analizaron los niveles de proteínas sustrato de β -TrCP, así como la muerte celular apoptótica mediante *western blot*. Como podemos observar en la **Figura 32C**, el aumento de expresión de β -catenina y CDK1 tras el silenciamiento confirmaba de nuevo la correcta disminución de β -TrCP mediante el siARN. Curiosamente, ambas proteínas aumentaban tras el tratamiento con cisplatino. Por otra parte, en las células silenciadas para β -TrCP los niveles del fragmento de 85 kDa de PARP y de caspasa 3 activa inducidos tras la adición del tratamiento eran significativamente menores que tras el silenciamiento control, indicando que la disminución de β -TrCP confería resistencia al cisplatino. Además, nuestra teoría se reforzó cuando obtuvimos los mismos resultados tras el silenciamiento de β -TrCP en la línea HT1376 HA- β -TrCP (**Figura 32D**), donde la sobreexpresión de la proteína nos permitía comprobar los efectos del silenciamiento más fácilmente.

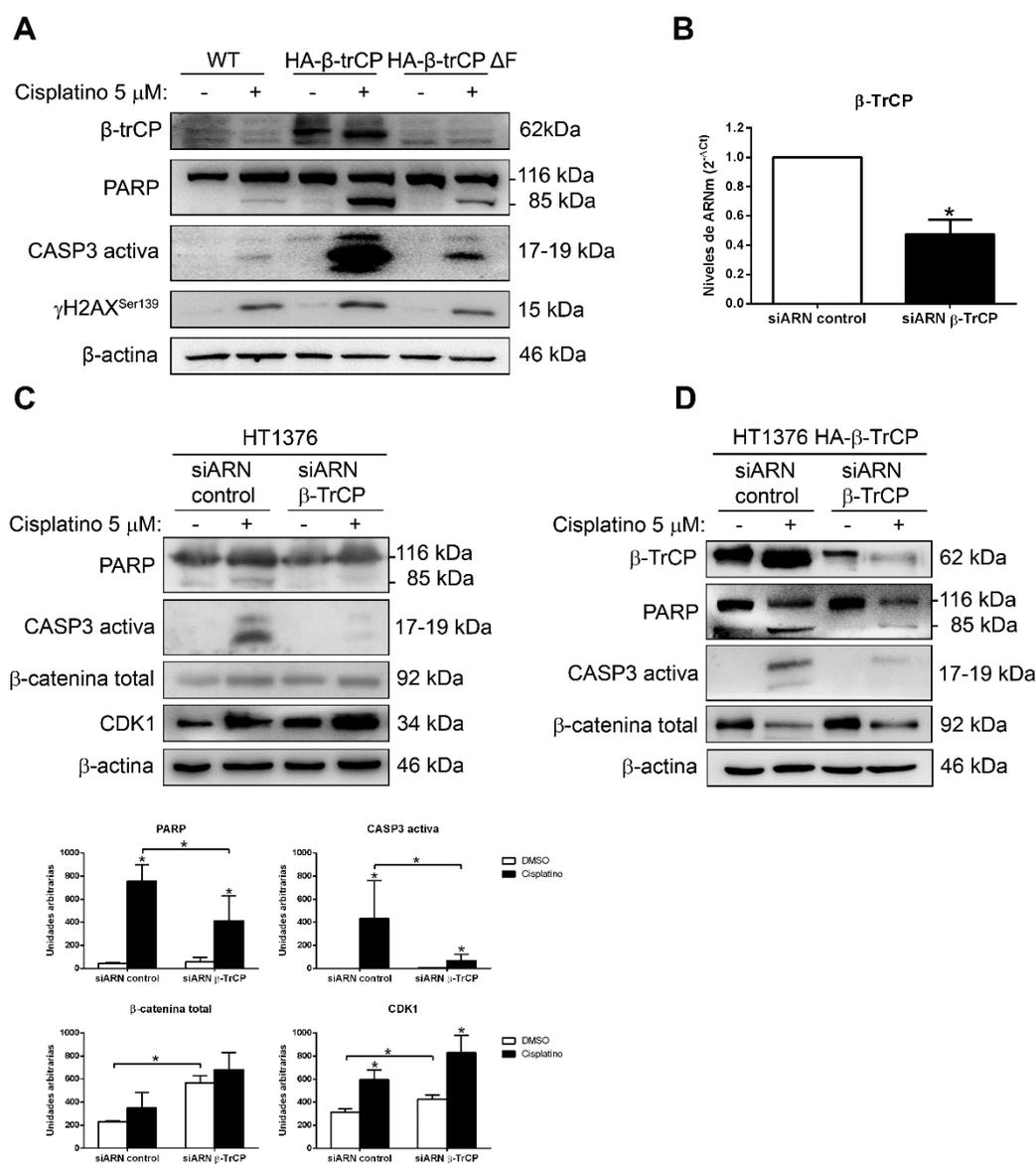


Figura 32. β -TrCP regula la respuesta a cisplatino en líneas celulares de cáncer de vejiga. **A.** Las líneas celulares HT1376 WT, HT1376 HA- β -TrCP y HT1376 HA- β -TrCP Δ F se trataron con DMSO o cisplatino 5 μ M durante 48 horas. Los niveles de β -TrCP, PARP, caspasa 3 activa y γ H2AX^{Ser139} se analizaron por *western blot*, usando β -actina como control de carga. **B.** Cuantificación de los niveles de ARNm del gen β -TrCP por RT-qPCR en la línea celular HT1376 tras el silenciamiento mediante siARN β -TrCP o siARN control, utilizando como control endógeno el gen HPRT1. **C y D.** Las líneas **(C)** HT1376 y **(D)** HT1376 HA- β -TrCP fueron silenciadas con siARN control o siARN β -TrCP, y tratadas con DMSO o cisplatino 5 μ M durante 48 horas. Los niveles de β -TrCP, PARP, caspasa 3 activa, β -catenina total y CDK1 se analizaron por *western blot*, usando β -actina como control de carga. Los histogramas muestran el análisis densitométrico de las proteínas indicadas. Los datos se presentan como la media \pm SD, y cada tratamiento fue comparado con el DMSO como control o entre diferentes tratamientos cuando se indica. *P-valor < 0,05 y ns (no significativo) obtenidos del t-test de Student ($n \geq 3$).

En paralelo, para comprender mejor la relación de β -TrCP con la adquisición de resistencia al tratamiento con cisplatino, quisimos estudiar su posible implicación en la reparación del daño al ADN, ya que anteriormente hemos descrito que la resistencia a cisplatino parece estar mediada por un aumento en la expresión de las proteínas de las vías de reparación por HR y que además, la sobreexpresión de β -TrCP parecía favorecer la apoptosis debido a un aumento del

daño al ADN, bien por un incremento en la generación del daño o bien por una disminución de su reparación.

Con el fin de investigar esta posibilidad, tratamos las líneas celulares HT1376 WT, HT1376 HA- β -TrCP y HT1376 HA- β -TrCP Δ F con cisplatino 5 μ M durante 1 hora y examinamos la cinética de reparación del ADN monitorizando la señal de γ H2AX^{Ser139} y RAD51 mediante *western blot* (**Figura 33**), así como la señal de γ H2AX^{Ser139} mediante inmunofluorescencia (**Figura 34**). Además, para evitar que el aumento de γ H2AX^{Ser139} pudiese confundirse con el marcaje de daño apoptótico, las líneas celulares fueron tratadas previamente con el inhibidor de pan caspasas Z-VAD-fmk 20 μ M durante 1 hora, ya que se ha descrito que la γ H2AX^{Ser139} no sólo marca las DSBs generadas por agentes genotóxicos, sino también las inducidas por algunas condiciones en las que se produce daño al ADN como por ejemplo ocurre cuando se desencadena la cascada apoptótica¹⁷⁵.

Como podemos observar en la **Figura 33A**, tras la exposición a cisplatino la fosforilación de la H2AX se induce gradualmente en la línea celular HT1376 WT, alcanzando el máximo a las 12-24 horas tras la retirada del tratamiento, seguida de una desaparición progresiva en el tiempo, lo que indica una reparación eficiente del ADN. Además, el aumento del daño marcado con γ H2AX^{Ser139} se correlaciona con el incremento en los niveles de RAD51, corroborando nuestros resultados. Sorprendentemente, aunque en la línea celular HT1376 HA- β -TrCP el tratamiento con cisplatino inducía un daño similar, la reparación del mismo se afectó en gran medida, ya que se produjo un retraso en la eliminación de γ H2AX^{Ser139} y en la disminución de los niveles de RAD51, manteniéndose elevados más tiempo (**Figura 33B**). Curiosamente, en la línea celular HT1376 HA- β -TrCP Δ F el cisplatino no parecía inducir daño al ADN, como se demostró por la ausencia de estas proteínas (**Figura 33C**). Las **Figuras 33D y 33E** muestran la comparación de los niveles relativos de γ H2AX^{Ser139} y RAD51 en las tres líneas celulares, respectivamente.

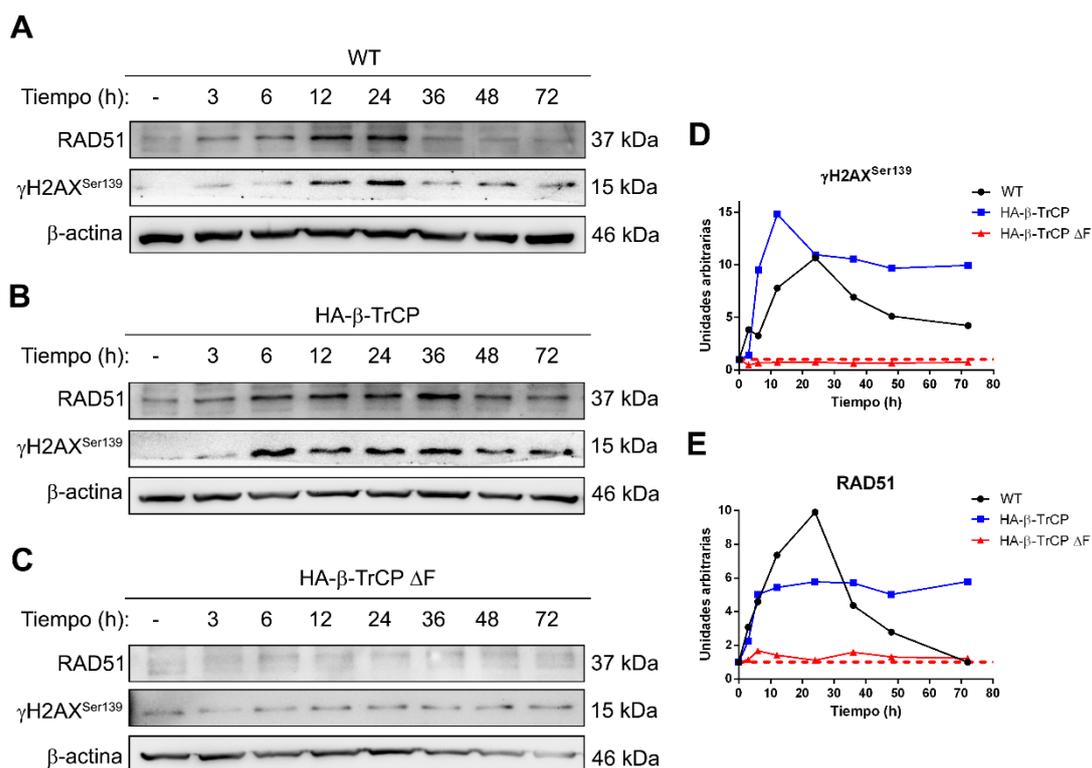


Figura 33. β -TrCP provoca un retraso en la reparación del daño al ADN tras el tratamiento con cisplatino. Las líneas celulares **(A)** HT1376 WT, **(B)** HT1376 HA- β -TrCP y **(C)** HT1376 HA- β -TrCP Δ F se trataron con cisplatino 5 μ M durante 1 hora tras el pre-tratamiento con Z-VAD-fmk 20 μ M durante otra hora, utilizando DMSO como control. Los niveles de RAD51 y γ H2AX^{Ser139} se analizaron por *western blot* a los tiempos indicados tras la retirada del tratamiento, usando β -actina como control de carga. **D** y **E**. Cuantificación de los niveles relativos de γ H2AX^{Ser139} y RAD51 respectivamente, normalizados con respecto al tiempo 0 o ausencia de daño. Los experimentos fueron realizados al menos por triplicado.

En consonancia con estos cambios en la expresión global de la proteína, el análisis por inmunofluorescencia nos permitió comprobar que los focos de γ H2AX^{Ser139} se acumularon rápidamente en las células de la línea HT1376 WT entre 3 y 12 horas después de la exposición a cisplatino, y se resolvieron a las 36 horas (**Figuras 34A y 34B**). Por el contrario, las células que sobreexpresaban β -TrCP silvestre mostraron focos de γ H2AX^{Ser139} persistentes, con un porcentaje significativo de células que no lograban eliminarlos después de 36 horas. Además, en afinidad con lo descrito previamente, la sobreexpresión del mutante negativo de β -TrCP disminuía la aparición de focos de γ H2AX^{Ser139}. Por tanto, englobando todos estos resultados pudimos confirmar que β -TrCP está implicada en la reparación eficiente del daño en el ADN tras el tratamiento con cisplatino en líneas celulares de cáncer de vejiga músculo-invasivo.

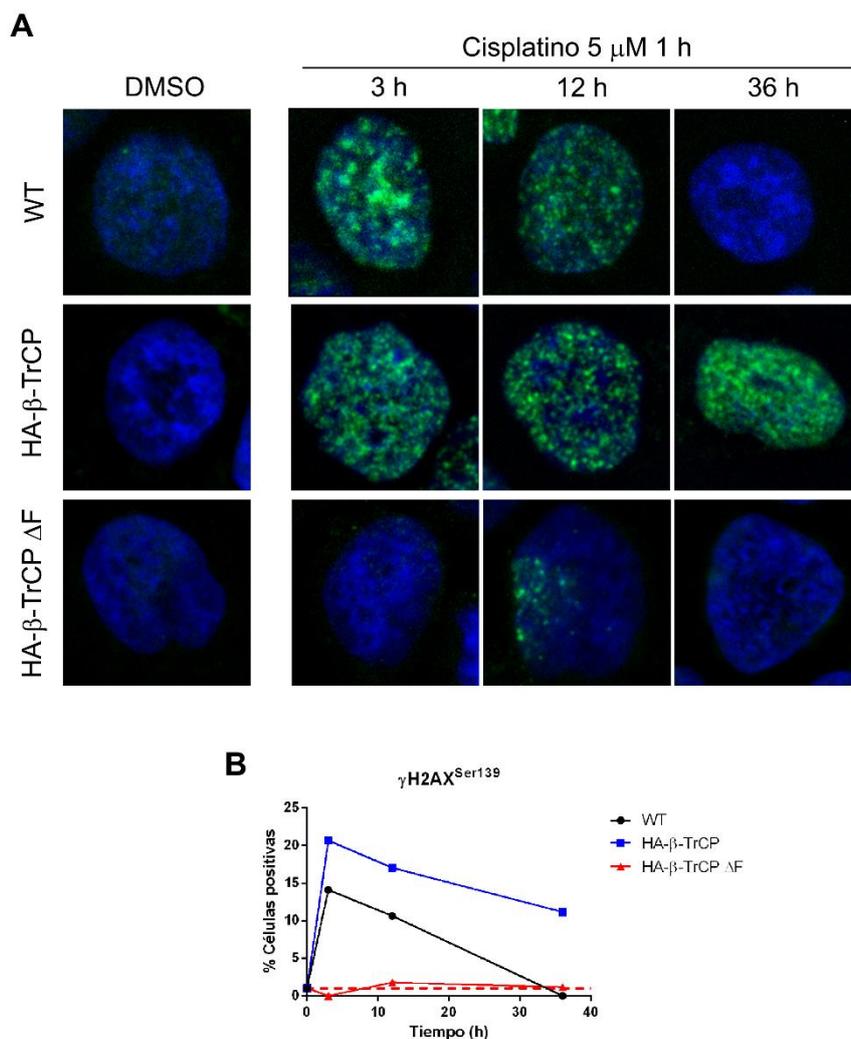


Figura 34. β -TrCP provoca un retraso en la eliminación de los focos de γ H2AX^{Ser139} tras el tratamiento con cisplatino. A. Inmunofluorescencia de γ H2AX^{Ser139} en las líneas celulares HT1376 WT, HT1376 HA- β -TrCP y HT1376 HA- β -TrCP Δ F tras el tratamiento con cisplatino 5 μ M durante 1 hora y el pre-tratamiento con Z-VAD-fmk 20 μ M durante otra hora, utilizando DMSO como control. Se muestran imágenes representativas a los tiempos indicados. **B.** Cuantificación del porcentaje de células positivas para γ H2AX^{Ser139}. Una célula se consideró positiva cuando su núcleo presentaba al menos 7 focos.

3.3. β -TrCP podría regular la degradación de BRCA1 y CtIP

Por último, para intentar ligar la implicación de los mecanismos de reparación del ADN mediante HR con la función de β -TrCP en la respuesta a cisplatino, hipotetizamos que el sistema de degradación mediado por SCF ^{β -TrCP} podría estar regulando la expresión de algunas de las proteínas que participan en este proceso como CtIP o BRCA1. En un estudio previo realizado por el grupo del Dr. F. Romero (Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla), se identificaron mediante la inmunoprecipitación anti-HA de extractos de células Cos-7 transfectadas con HA- β -TrCP, seguido de espectrometría de masas en tándem (MS/MS), una serie de péptidos correspondientes a BRCA1¹⁷⁶. Además, BRCA1 interacciona con CtIP¹⁷⁷, y según nuestros resultados previos éste también podría mediar la respuesta al cisplatino, por lo que, a partir de estos datos, decidimos inmunoprecipitar a β -TrCP en las líneas celulares HT1376

(Figura 35A) y HT1197 (Figura 35B) para comprobar si esta interacción era real. Elegimos ambas líneas ya que eran las que tenían mayores niveles tanto de β -TrCP como de BRCA1 de entre todas las líneas de cáncer de vejiga. Nuestros resultados demostraron que BRCA1 co-inmunoprecipitaba eficientemente con β -TrCP tanto en la línea celular HT1376 como en la línea celular HT1197. Cabe destacar que en los extractos totales la cantidad de β -TrCP endógena no era detectada por el anticuerpo, aunque éste sí era capaz de inmunoprecipitar a la proteína de manera eficaz. Además, CtIP también parecía co-inmunoprecipitar con β -TrCP, al menos en la línea celular HT1376. Curiosamente, parece que, aunque ambas bandas de CtIP están presentes en la línea celular HT1376, sólo la de 90 kDa es la que interacciona con β -TrCP, avalando nuestra teoría sobre las dos isoformas de la proteína. Sin embargo, aunque habíamos verificado la asociación *in vitro* de β -TrCP con BRCA1 y CtIP, esto no significaba necesariamente que estas proteínas fueran sustratos de la ligasa SCF $^{\beta$ -TrCP, ya que podrían formar parte del complejo para modular su actividad y no para ser ubiquitiladas. Por tanto, para demostrar si alguna de estas proteínas era sustrato de β -TrCP, decidimos estudiar los niveles de expresión de BRCA1 y CtIP en las líneas que expresaban la forma silvestre y la forma mutada de β -TrCP. Como podemos observar en la Figura 35C, los niveles de ambas proteínas disminuían significativamente en el caso de la línea celular HT1376 HA- β -TrCP y se recuperaban en el caso de la línea celular HT1376 HA- β -TrCP Δ F, comportándose de la misma manera que los sustratos de β -TrCP ya conocidos. Esto mismo se confirmó mediante la interferencia de β -TrCP con siARN en la línea celular HT1376 (Figura 35D), demostrando en conjunto que, CtIP y especialmente BRCA1, podrían ser nuevos sustratos de β -TrCP, y que la regulación de esta degradación sería la responsable de la respuesta al tratamiento con cisplatino en líneas celulares de cáncer de vejiga.

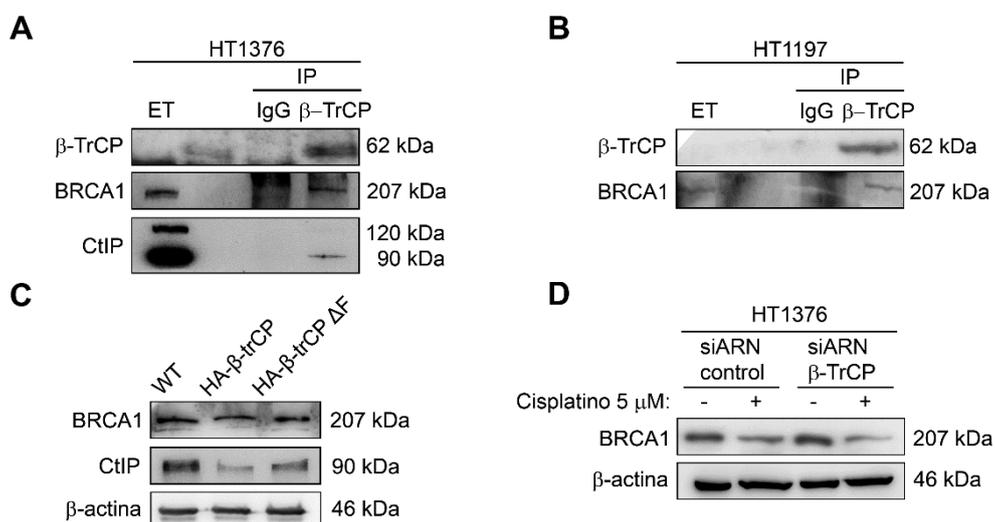


Figura 35. BRCA1 y CtIP podrían ser nuevos sustratos de β -TrCP. A. y B. Ensayos de co-inmunoprecipitación de β -TrCP en las líneas HT1376 y HT1197 respectivamente, usando como control suero total de ratón (IgG). Los niveles de BRCA1 y CtIP se analizaron por *western blot*. ET: extracto total. C. Los niveles de BRCA1 y CtIP se analizaron por *western blot*, utilizando β -actina como control de carga, en las líneas celulares HT1376 WT, HT1376 HA- β -TrCP y HT1376 HA- β -TrCP Δ F. D. Las células de la línea HT1376 fueron silenciadas de manera transitoria con siARN control o siARN β -TrCP, y tratadas con DMSO como control o cisplatino 5 μ M durante 48 horas. Los niveles de BRCA1 se analizaron por *western blot*, usando β -actina como control de carga. Los experimentos fueron realizados al menos por triplicado.

4. Identificación de genes diferencialmente expresados en el cáncer de vejiga músculo-invasivo

De manera paralela al resto de nuestra investigación, otra de las tareas que llevamos a cabo fue la de comprobar la relevancia de las vías de señalización que estábamos estudiando mediante un análisis de expresión diferencial entre muestras clínicas de pacientes con CVNMI y CVMI, con el objetivo también de identificar nuevos genes que pudieran estar involucrados en los mecanismos de adquisición de resistencia al tratamiento o en la progresión del cáncer de vejiga.

4.1. Análisis de expresión diferencial con *microarray* de *Affymetrix*

Para determinar la expresión diferencial de genes, realizamos un *microarray* mediante el chip *PrimeView™ Human Gene Expression Array* de *Affymetrix* en el que se comparaban muestras de 22 de los pacientes con CVNMI (también llamados superficiales o no infiltrantes) o CVMI (también llamados infiltrantes) incluidos en la **Tabla Suplementaria S2** (Anexo I).

En un primer análisis, las muestras se agruparon en 11 de alto grado vs 11 de bajo grado, donde se identificaron 602 genes con cambio de expresión significativos entre ambos grupos ($P < 0,05$ y $\log FC \geq 1$ o $\log FC \leq -1$). El gen FAM111B fue el más significativo estadísticamente en el estudio de expresión diferencial, con niveles de expresión más de tres veces superiores en los pacientes de alto grado comparados con los de bajo grado. Este gen codifica una proteína cuyas mutaciones se asocian a una forma autosómica dominante de poiquilodermia fibrosa hereditaria (HFP). El segundo gen fue CENPN, que forma parte del complejo asociado al nucleosoma y es importante para el ensamblaje de los cinetocoros durante la división celular, y el tercero fue el gen NASP, cuya función está relacionada con el transporte de las histonas al núcleo de las células en división. Asimismo, realizamos el estudio de sobrerepresentación de rutas biológicas conocidas, y observamos que una gran cantidad de ellos presentaban funciones relacionadas con la regulación del ciclo celular, la segregación de cromosomas, los componentes de los microtúbulos o la replicación del ADN (**Figura 36A**).

Por otro lado, realizamos un segundo análisis eliminando las 3 muestras de los pacientes con tumores de grado intermedio (G2), de manera que nos quedamos con dos grupos de 10 infiltrantes vs 9 no infiltrantes. En este caso, obtuvimos un total de 554 genes que se expresaban diferencialmente entre ambos grupos ($P < 0,05$ y $\log FC \geq 1$ o $\log FC \leq -1$), y de nuevo encontramos al gen FAM111B y al gen CENPN entre los sobreexpresados. En la **Figura 36B** se muestran las rutas y vías de señalización a las que pertenecían estos genes, donde una vez más pudimos observar que la mayoría presentaban funciones similares a las encontradas en el análisis previo.

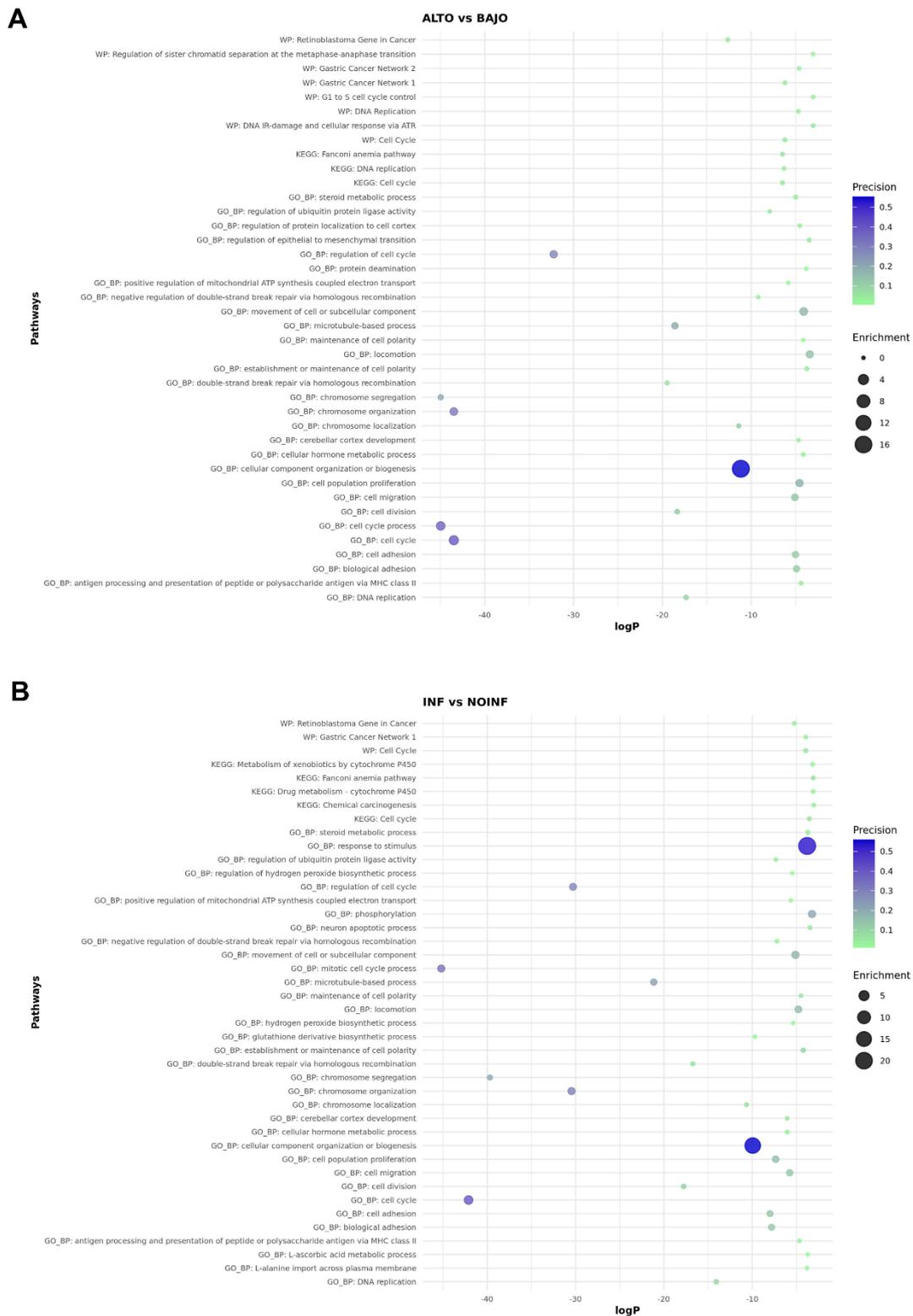


Figura 36. Análisis de las vías de señalización enriquecidas en los estudios de expresión diferencial. Funciones específicas y vías biológicas enriquecidas en la comparativa de **(A)** alto grado vs bajo grado y **(B)** infiltrante vs no infiltrante. Gráfico realizado con las herramientas gProfiler y REVIGO teniendo en cuenta los datos de las bases de datos GO, KEGG y Wiki pathways.

A continuación, se combinaron los resultados obtenidos de los dos análisis anteriores para determinar aquellos genes que mostraran cambios de expresión comunes en ambas comparaciones (**Figura 37A**). Así, se detectaron un total de 678 genes con diferencias de expresión entre los grupos, de los que 478 resultaron ser comunes en ambos análisis. Estos genes se muestran en la **Tabla Suplementaria S3** (Anexo I). En la **Figura 37B** se muestran algunos de los genes diferencialmente expresados que hemos considerado de mayor relevancia para nuestro estudio representados en un mapa de calor o *Heatmap* ($P < 0,001$ y $\log FC \geq 1,5$ o $\log FC \leq -1,5$ en alguna de las dos comparaciones).

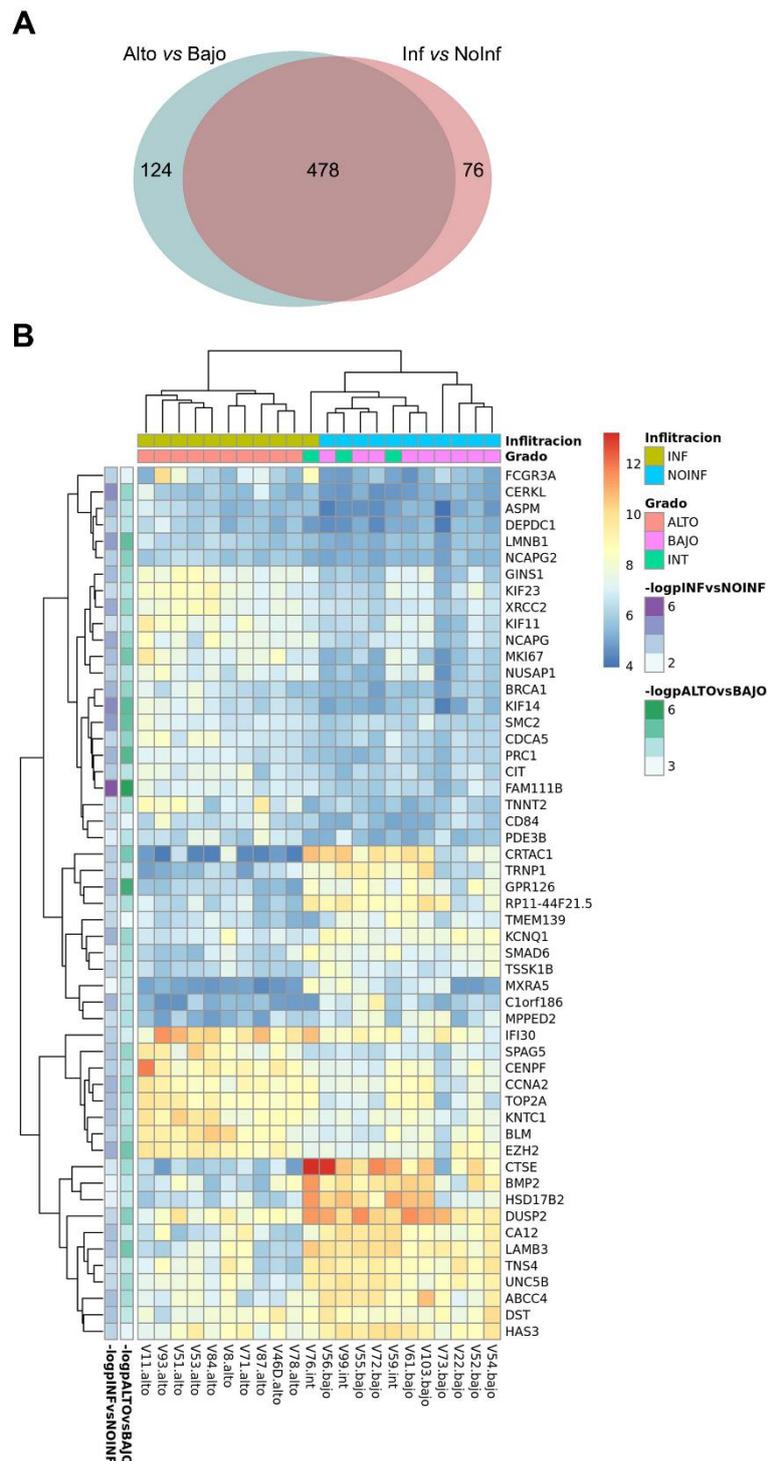


Figura 37. Genes comunes en las comparativas alto grado vs bajo grado e infiltrantes vs no infiltrantes. **A.** Diagrama de Venn que representa de manera gráfica el número de genes diferencialmente expresados en la comparativa alto grado vs bajo grado (círculo azul) y de la comparativa infiltrantes vs no infiltrantes (círculo rosa). El área común en ambos círculos representa el número de genes diferencialmente expresados en las dos comparativas. **B.** Representación de un mapa de calor (*Heatmap*) basado en la expresión de los genes más representativos comunes a ambas comparativas. El mapa de calor muestra los genes con P-valor < 0,001 y log FC $\geq 1,5$ o $\leq -1,5$ cuya expresión está inducida (naranja) o reprimida (azul) en los distintos pacientes. Datos obtenidos a partir de los resultados de *Affymetrix*.

4.2. Validación de los análisis de *microarrays* mediante RT-qPCR

Para confirmar la diferencia de expresión de algunos de los genes que se desprende de los resultados de los *microarrays*, comprobamos la expresión mediante RT-qPCR de 31 genes seleccionados del total de 478 genes comunes de los análisis anteriores, en estos y otros pacientes, ampliando el grupo con 29 pacientes más (**Tabla Suplementaria S2**, Anexo I). Estos 31 genes fueron seleccionados por ser genes interesantes de los que no había mucha información descrita en la literatura en relación al cáncer de vejiga, y por estar relacionados con las vías y rutas de señalización que estábamos estudiando en paralelo. En la **Tabla 6** se muestra la lista de genes seleccionados agrupados por función.

Tabla 6. Genes seleccionados para la validación del *microarray* por RT-qPCR. Se describe la función principal de cada uno de ellos.

Función	Genes
Adhesión/migración celular	ADGRG6, FN1, SDC2, VIM
Apoptosis	BIRC5
Ciclo celular	AURKA, BUB1, CCNE1, CDK4, CEP55, FAM111B, PLK4, PTTG1, SPAG5, TPX2
Complejo de los cinetocoros/centrosoma	CENPE, CENPF, CENPN, HJURP, NDC80
Factor de transcripción	GATA3
Metabolismo celular	GAPDH, TGM2
Metilación del ADN	TET2
Replicación del ADN	DBF4, GINS1, NASP
Respuesta al daño en el ADN	BRCA1, MCM8, XRCC2
Sistema de degradación de proteínas	FBXW7

La validación se llevó a cabo en el servicio de genómica y secuenciación y en el de apoyo a las investigaciones biomédicas del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), utilizando unas tarjetas TaqMan customizadas o *TaqMan Array Cards* (Thermo Fisher) y el equipo ViiA 7 Real-Time PCR System. Como control endógeno se utilizó el gen RPL13A.

La mayoría de los genes analizados participaban en las vías de reparación o replicación del ADN, así como en el proceso de formación de los centrómeros y el huso mitótico durante la mitosis. Como podemos observar en la **Figura 38**, se validaron 22 de estos 31 genes, de los cuales aparte del gen GAPDH que se encontraba regulado a la baja, casi todos ellos se encontraban sobreexpresados en las muestras tumorales infiltrantes frente a las no infiltrantes, corroborando los resultados obtenidos en el análisis transcriptómico de expresión diferencial a partir de *microarrays*.

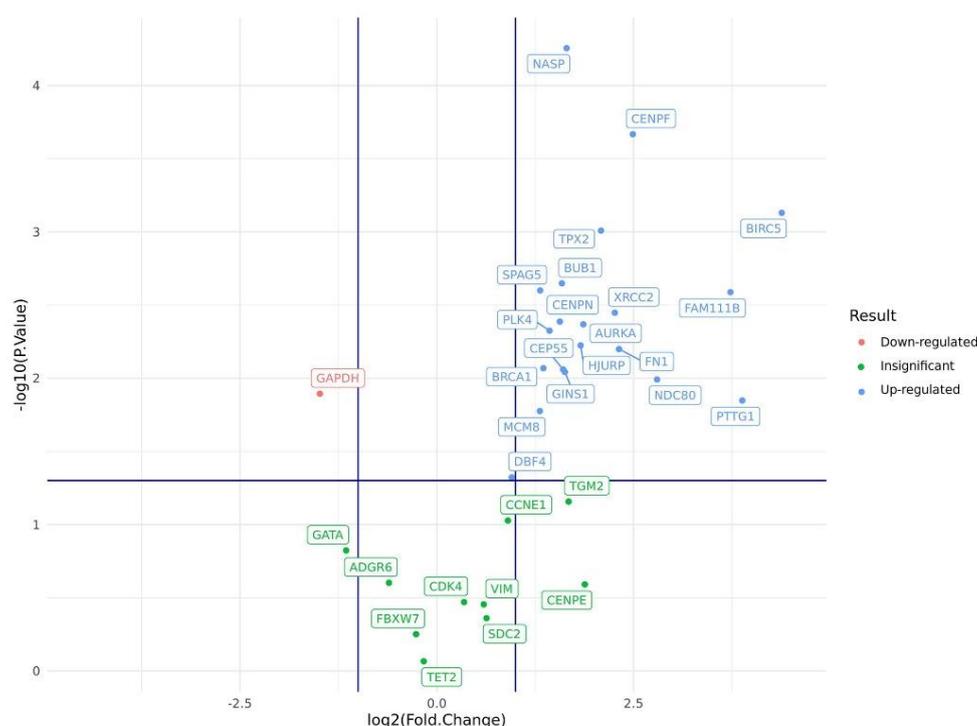


Figura 38. Gráfico Volcano de los 31 genes expresados diferencialmente en los tumores infiltrantes vs superficiales. En el eje X se representa la expresión diferencial (FC) y en el eje Y se indica el P-valor de cada gen, ambos en escala logarítmica. Las líneas azules indican los umbrales de log FC (>1 o <-1) y P-valor (<0,05) a partir de los cuales se obtiene significación. En azul se muestran los genes sobreexpresados, en rojo los reprimidos y en verde los no significativos.

Por último, analizamos estos 22 genes validados mediante la herramienta STRING, una herramienta específica para proteínas que permite generar una red de interacciones. Como vemos en la **Figura 39**, estas proteínas se incluyen en redes PPI conocidas e interaccionaban entre ellas, lo cual era lógico si pensamos que pertenecen a un grupo de genes con la misma función. Sin embargo, lo interesante de este resultado era que podíamos comprobar qué proteínas tenían un mayor número de interacciones y por ello podrían ser seleccionadas para futuros estudios, ya que serían mucho más eficientes como diana de un futuro nuevo fármaco.

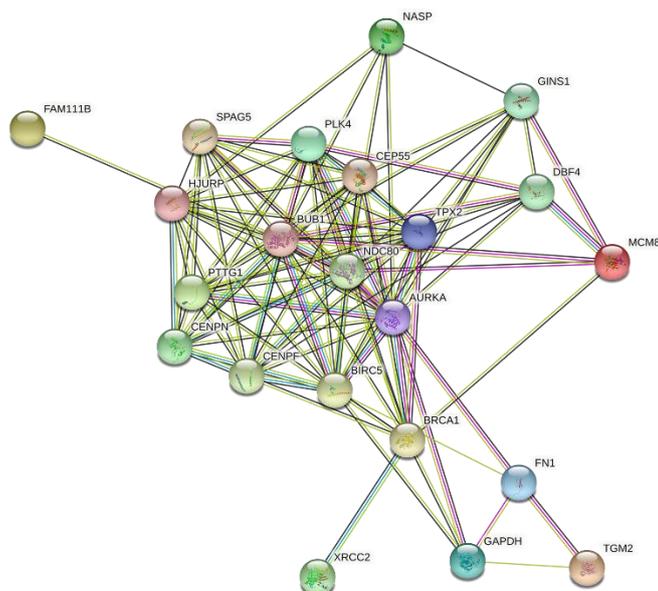


Figura 39. Red de interacciones proteína-proteína. Las esferas representan los genes/proteína y las líneas que los unen las evidencias de interacción reportadas (e.g. experimental, publicaciones, fusiones génicas, etc).

En conjunto, estos resultados refuerzan nuestra hipótesis inicial y otorgan relevancia clínica a las vías y rutas de señalización estudiadas, de manera que muchos de estos genes están siendo o serán analizados en profundidad en distintos proyectos de nuestro laboratorio para comprobar su posible papel como diana terapéutica y como marcadores de progresión y/o respuesta al tratamiento en el cáncer de vejiga músculo-invasivo.

DISCUSIÓN

El cáncer de vejiga es una de las causas de mayor morbilidad y mortalidad en todo el mundo. La mayoría de los pacientes son diagnosticados con CVNMI, cuya tasa de supervivencia global es bastante buena, pero aproximadamente el 30% de los pacientes se diagnostican con CVMI, y en torno a un 10-20% de los CVNMI progresan a CVMI, un tumor mucho más agresivo asociado a un peor pronóstico y con una tasa de supervivencia mucho más baja. En sus estadios avanzados, este tipo de tumor suele requerir el uso de quimioterapia con cisplatino en primera línea o con paclitaxel en segunda línea; pero con frecuencia los pacientes se vuelven resistentes al tratamiento y las expectativas de supervivencia decaen drásticamente. A pesar de que en las últimas décadas se han realizado numerosas investigaciones para el desarrollo de nuevas terapias alternativas, el manejo y la supervivencia a largo plazo de los pacientes con CVMI han permanecido relativamente estancados y con escasas mejoras en los resultados clínicos, debido en parte a la capacidad de las células tumorales de volverse resistentes al tratamiento una y otra vez generando recidivas y metástasis^{7,8,11,12}.

Por ello, nuestro interés durante esta tesis doctoral se ha centrado en esclarecer los mecanismos de resistencia que generan las células tumorales al cisplatino y paclitaxel, principales fármacos quimioterápicos utilizados en el tratamiento de este tipo de tumor, así como en la identificación de nuevos biomarcadores de respuesta al tratamiento. De esta manera, podríamos plantear combinaciones de fármacos convencionales con inhibidores específicos de estas nuevas dianas terapéuticas que permitan sensibilizar al tratamiento.

1. Mecanismos de resistencia al tratamiento con paclitaxel

En la actualidad los taxanos constituyen una terapia efectiva, y tanto paclitaxel como su análogo semisintético docetaxel se utilizan con éxito en el tratamiento de gran cantidad de tumores sólidos. Sin embargo, su toxicidad y resistencia limitan bastante sus beneficios clínicos, por lo que cada vez cobra mayor importancia la identificación de marcadores que puedan predecir qué pacientes con cáncer de vejiga avanzado se podrían beneficiar del tratamiento⁴⁹.

1.1. Mcl-1 como diana terapéutica

En esta primera parte del trabajo se estudiaron los mecanismos de apoptosis inducida por paclitaxel en dos líneas celulares de cáncer de vejiga músculo-invasivo, 5637 y HT1197. Como indicaron la rotura de PARP y la activación de caspasas 3 y 9, ambas presentaban diferente sensibilidad a este fármaco. Las células de la línea 5637 eran sensibles a la apoptosis vía intrínseca inducida por paclitaxel mientras que las células de la línea HT1197 eran resistentes al tratamiento.

Se sabe que el paclitaxel induce el bloqueo del ciclo celular en mitosis al impedir la dinámica de los microtúbulos y provocar una activación crónica del SAC, tras lo cual las células pueden morir o bien salir de la mitosis sin citocinesis mediante deslizamiento pasando a un estado G1 tetraploide y multinucleado; tras ello, las células pueden seguir ciclando, quedar bloqueadas en

esta fase del ciclo celular o morir^{56,178}. En nuestro caso, la diferente sensibilidad al fármaco no parecía estar asociada a grandes diferencias en los perfiles de ciclo celular, ya que ambas líneas mostraron un aparente acúmulo de células en G2/M. Curiosamente, a pesar del alto porcentaje de células en G2/M tanto a 24 como a 48 horas, los niveles de p-Histona H3^{Ser10} y Ciclina B1 disminuían considerablemente tras 48 horas de tratamiento, sugiriendo que este porcentaje no estaba reflejando la cantidad real de células mitóticas y que en realidad las células tratadas con paclitaxel estaban saliendo de la mitosis mediante deslizamiento. Esto se confirmó mediante el análisis de la ploidía por FISH, en el que se comprobó que ambas líneas presentaban una ploidía superior a la normal tras el tratamiento con paclitaxel y una morfología multinucleada típica de las células que han sufrido deslizamiento. Así, los resultados indicaban que las líneas celulares 5637 y HT1197 compartían mecanismos comunes para escapar de la parada mitótica inducida por paclitaxel, pero sólo las células de la línea 5637 sufrían apoptosis tras el deslizamiento mitótico.

El equilibrio entre las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas determina la susceptibilidad de las células a la apoptosis y puede contribuir a la progresión del cáncer o a la aparición de resistencia a quimioterápicos^{75,76}. Al analizar los niveles de expresión de las distintas proteínas de la familia Bcl-2 sí que encontramos diferencias entre las dos líneas celulares. En la línea celular 5637, cuando paclitaxel inducía apoptosis los niveles de Mcl-1 disminuían y Bcl-xL era fosforilado e inactivado, mientras que en la línea celular HT1197 estas proteínas no parecían alterarse tras el tratamiento. Anteriormente, nuestro grupo de investigación ha demostrado que Mcl-1 es determinante para que el paclitaxel induzca apoptosis tras la parada en mitosis⁹⁰, y que su regulación a la baja restaura la sensibilidad al tratamiento⁹². En este trabajo hemos observado que Mcl-1 disminuye enormemente tras la adición de paclitaxel en la línea celular sensible 5637, mientras que en la línea resistente HT1197 los niveles se mantienen elevados, por lo que esta proteína se presenta como potencial diana terapéutica que confiere resistencia al tratamiento. Además, hemos descrito la sobreexpresión de Mcl-1 en el 63,2% de las biopsias de CVMI, así como la baja expresión de la proteína en el 96,2% de las biopsias de CVNMI analizadas, y en el análisis de Kaplan-Meier observamos que sus niveles se relacionaban con una menor supervivencia libre de enfermedad y un mayor riesgo de recurrencia en los pacientes. La relevancia de Mcl-1 como biomarcador de agresividad se ha descrito bastante bien en varios tumores malignos como los carcinomas de próstata⁹¹, por lo que considerando nuestros resultados, también podría ser un buen marcador pronóstico de la agresividad del tumor en el entorno clínico del carcinoma de vejiga avanzado.

Llegados a este punto, obatoclax aparece como un buen complemento a los tratamientos antimitóticos. Este fármaco pertenece al grupo de moléculas BH3 miméticas que permiten la inhibición de proteínas como Mcl-1, dando lugar a la activación de las proteínas proapoptóticas que provocan la entrada de la célula en apoptosis⁹³. En la actualidad existen varios ensayos clínicos en fase I/II con obatoclax tanto en monoterapia como en combinación con otros fármacos en tumores sólidos y hematológicos^{71,179}, aunque el conocimiento sobre su papel sensibilizador

a los taxanos es aún muy limitado. Ante esta idea, nos planteamos si la combinación de ambos fármacos podría favorecer que el paclitaxel provoque el estímulo proapoptótico que conduzca a la muerte celular en las líneas celulares resistentes. En la línea celular 5637, obatoclax en monoterapia también inducía apoptosis junto con la disminución de los niveles de Mcl-1, mientras que en la línea celular HT1197 los niveles de esta proteína se mantenían sobreexpresados para mediar la resistencia al tratamiento, al igual que ocurría con el paclitaxel. Sin embargo, las tres posibles combinaciones de obatoclax y paclitaxel analizadas fueron capaces de inducir una fuerte disminución de Mcl-1 que se acompañaba de apoptosis tanto en las células sensibles 5637 como en las resistentes HT1197, así como en otro modelo de resistencia a paclitaxel, la línea celular HT1376. De esta forma, podemos concluir que el tratamiento combinado de obatoclax y paclitaxel sensibiliza a las células resistentes de cáncer de vejiga avanzado¹⁸⁰. Estos resultados han servido de precedente para otros estudios en los que se ha visto que obatoclax también es capaz de mejorar la apoptosis inducida por cisplatino en este mismo tipo tumoral¹⁸¹. Además, otros autores han estudiado el papel de obatoclax en la sensibilización de varias líneas celulares al tratamiento con distintos fármacos. En células de cáncer de ovario, la combinación de obatoclax con paclitaxel parece tener efectos antagónicos, mientras que la combinación con carboplatino consigue efectos aditivos¹⁸². Por el contrario, en líneas celulares de hepatoblastoma la combinación de obatoclax y paclitaxel sí que tiene efectos aditivos y provoca una pérdida de la viabilidad celular¹⁸³.

A día de hoy son varios los mecanismos implicados en la inducción de muerte celular por obatoclax -apoptosis, autofagia o necrosis-, pero aún no se conoce en profundidad cómo se produce cada uno de ellos en respuesta al tratamiento¹⁸⁴⁻¹⁸⁷. Aunque en principio debería inducir apoptosis debido a la disrupción de la interacción entre las proteínas de la familia Bcl-2^{93,98}, algunas investigaciones sugieren que, además o en lugar de ésta, la autofagia también podría estar implicada en la citotoxicidad mediada por obatoclax^{185,188,189}. La función principal de la autofagia es mantener la supervivencia celular en estados de privación de nutrientes o factores de crecimiento; sin embargo, cada vez son más las evidencias que demuestran que ésta puede tener un papel dual, actuando de manera citoprotectora o citotóxica dependiendo del contexto. En este sentido, en células de rhabdomyosarcoma se ha observado que obatoclax induce autofagia citotóxica, provocando necroptosis al promover el ensamblaje del necrosoma en las membranas de los autofagosomas. Además, el bloqueo genético de esta autofagia revierte el efecto en muerte del fármaco¹⁰¹. En cambio, en células de carcinoma adenoide quístico¹⁰² o esofágico¹⁹⁰ se ha visto que obatoclax induce autofagia citoprotectora, ya que es el bloqueo farmacológico de ésta lo que desemboca en apoptosis.

Hasta hace poco, el método convencional para analizar la autofagia se basaba en medir el incremento en el número de autofagosomas mediante los niveles de LC3-II. No obstante, al ser un proceso dinámico, la acumulación de estas vesículas podría estar representando tanto un aumento en la generación como un bloqueo de su conversión en autolisosomas, por lo que la elevación en los niveles de LC3-II por sí sola no determina si la autofagia está siendo inducida o

inhibida. Por este motivo, cada vez más se recomienda monitorizar el flujo autofágico, para lo cual la proteína p62 (que a su vez se degrada por autofagia) junto con LC3-II han demostrado ser marcadores bastante consolidados^{152,169,170}. Gracias a ello, algunas investigaciones más recientes han señalado que obatoclax bloquea el flujo autofágico como mecanismo de toxicidad debido a la alteración de los lisosomas, independientemente del tipo de muerte celular que se induzca como respuesta^{103,182,186}. Consecuentemente, nos parecía necesario ahondar un poco más en el mecanismo molecular que media la actividad antitumoral de este compuesto, especialmente en líneas celulares de cáncer de vejiga.

Nuestros resultados apuntan a que obatoclax induce un bloqueo parcial del flujo autofágico en las células de cáncer de vejiga. Esto se puede deducir por el incremento de LC3-II/LC3-I y p62 que se produce tras el tratamiento en las líneas celulares estudiadas, señal de que los autofagosomas no se están fusionando con los lisosomas, LC3-II se acumula y p62 no se degrada. Sin embargo, el bloqueo inducido por obatoclax era menos eficiente en las células resistentes HT1197, donde la proporción LC3-II/LC3-I y los niveles de p62 aumentaban en presencia del inhibidor autofágico BafA1, que en las células sensibles 5637, donde estos niveles se mantenían elevados. Al analizar el bloqueo del flujo autofágico que inducían los distintos tratamientos, observamos que en las células sensibles 5637 el aumento de LC3-II/LC3-I y p62 ocurría tanto con obatoclax como con las tres combinaciones de obatoclax y paclitaxel. Por el contrario, en las células resistentes HT1197 estos niveles aumentaban de manera significativa únicamente tras los tratamientos combinados. Además, en ambas líneas celulares los casos en los que se incrementaban LC3-II/LC3-I y p62 coincidían con la rotura de PARP y la activación de caspasa 3, por lo que pudimos comprobar que la apoptosis inducida por obatoclax ocurría sólo cuando el bloqueo del flujo era eficiente. Asimismo, los resultados obtenidos en el modelo celular HT1376 refuerzan nuestra hipótesis, dado que de nuevo la muerte celular mediada por obatoclax se correlacionaba con el bloqueo eficiente del flujo autofágico. El estudio mediante citometría e inmunofluorescencia también apoyaba esta teoría, ya que en la línea celular 5637 se demostró que tanto el obatoclax solo como la mezcla con paclitaxel provocaban un efecto incluso mayor que el del inhibidor autofágico cloroquina; un aumento de autofagosomas debido al bloqueo del flujo que se acompañaba de núcleos celulares de apariencia apoptótica. En cambio, en la línea celular HT1197 el obatoclax en monoterapia mostraba un perfil mucho más similar al del inductor autofágico rapamicina; el bloqueo era menos eficaz y permitía la autofagia completa, por lo que las vesículas autofágicas no se acumulaban y los núcleos celulares estaban sanos. Era cuando se administraba la combinación de obatoclax y paclitaxel en estas células cuando se observaba la aparición de autofagosomas y cuerpos apoptóticos, indicando que se estaba produciendo un bloqueo eficiente del flujo autofágico que permitía la inducción de apoptosis para sensibilizar al tratamiento.

Para intentar dilucidar el mecanismo molecular que hace de nexo entre ambos procesos decidimos estudiar a la proteína Beclina-1. Esta proteína ejerce su papel en las fases iniciales de la autofagia, pero también posee un dominio BH3 que le permite interactuar con los

miembros de la familia Bcl-2 y es sustrato de las caspasas, conectando la autofagia con la apoptosis^{171,191-193}. De hecho, se ha descrito una nueva función proapoptótica de Beclina-1 al demostrar que su rotura mediada por caspasa 3 inhibe la autofagia y genera un fragmento N-terminal y un fragmento C-terminal que provoca la liberación del citocromo c y activa la apoptosis^{172,194}. Además, el bloqueo de esta fragmentación con inhibidores de caspasas induce autofagia, indicando que la rotura de Beclina-1 mediada por caspasas es suficiente para inhibir este proceso¹⁹⁵. Nosotros hemos observado que la apoptosis inducida por obatoclax en la línea celular 5637 coincide con la rotura de Beclina-1 y el bloqueo del flujo autofágico, y hemos demostrado que esta rotura era dependiente de caspasa 3 ya que no se producía en presencia del inhibidor de pan-caspasas Z-VAD-fmk. En el caso de la línea celular HT1197, el tratamiento con obatoclax no provocaba la aparición de ningún fragmento, respaldando la idea de que en estas condiciones el fármaco no bloqueaba el flujo y la autofagia que se inducía era completa, pero de nuevo la combinación de obatoclax y paclitaxel provocaba la rotura de Beclina-1, el bloqueo del flujo autofágico y la apoptosis. La interacción Mcl-1/Beclina-1 parece tener un papel importante para inducir autofagia y supervivencia celular en respuesta a obatoclax^{196,197}. De esta manera, si bien es cierto que nuestra investigación no profundizó en este aspecto, en el modelo que proponemos la interrupción de la interacción entre ambas proteínas podría ser la responsable de la apoptosis observada tras el tratamiento combinado al promover la degradación de Mcl-1 y la rotura de Beclina-1 mediada por caspasas.

Como hemos mencionado anteriormente, paclitaxel ejerce su efecto estabilizando a los microtúbulos y provocando una parada en G2/M. Las líneas celulares HT1197 y HT1376 logran salir de la mitosis mediante deslizamiento como mecanismo de resistencia; por el contrario, la línea celular 5637 muere por apoptosis tras el deslizamiento mitótico. Por su parte, el tratamiento con obatoclax no inducía apoptosis ni alteraba el ciclo celular de las células HT1197, mientras que en la línea celular 5637 producía una parada en fase S/G2 que se correlacionaba con la muerte celular apoptótica. Estos resultados se ven apoyados por estudios que señalan que obatoclax provoca un bloqueo celular en fase S/G2 en líneas celulares de leucemia mieloide aguda⁹³, aunque difieren de otros con células de cáncer colorrectal¹⁹⁸ y esofágico¹⁹⁹ en los que se sugiere que obatoclax detiene el ciclo celular en G1 sin inducción de apoptosis. En cuanto al tratamiento combinado en la línea celular 5637, se encontraron distintos efectos dependiendo de la secuencia de tratamiento: obatoclax seguido de paclitaxel tuvo un efecto similar al de obatoclax solo, mientras que la administración de paclitaxel seguido de obatoclax o ambos fármacos a la vez producía efectos más parecidos a los del paclitaxel. Esto significa que obatoclax por sí solo o cuando se añade en primer lugar es capaz de inducir muerte celular en la línea 5637 antes de llegar a mitosis; sin embargo, cuando paclitaxel se añade primero o cuando ambos fármacos se administran al mismo tiempo, las células mueren tras deslizamiento mitótico. En el caso de las células HT1197 y HT1376, las tres posibles combinaciones de obatoclax y paclitaxel consiguieron el mismo efecto, bloquear la salida de mitosis para evitar el deslizamiento, provocando una parada eficiente en G2/M. Ya se conoce que la dinámica de Mcl-1 influye en el deslizamiento mitótico y la muerte en mitosis²⁰⁰, así como la importancia de su ubiquitilación y

destrucción por el proteasoma para la inducción de apoptosis tras una parada prolongada en mitosis debida a fármacos antimitóticos^{92,201,202}. Por todo ello, nuestra hipótesis es que la inhibición del deslizamiento mitótico y el retraso en la progresión del ciclo celular observados tras el tratamiento combinado en las líneas celulares resistentes produce una parada eficiente en G2/M que facilita la degradación de Mcl-1 por parte de algunas ubiquitina ligasas.

La desregulación de la autofagia y la apoptosis es ampliamente conocida en muchas enfermedades, y aunque la relación entre ambos sigue siendo objeto de controversia, varios estudios indican que son mecanismos interconectados e importantes para la respuesta a la quimioterapia^{194,203,204}. En nuestro caso, cabe señalar que ambos procesos son opuestos y no coinciden, ya que sólo observamos apoptosis cuando se bloquea la autofagia de manera eficiente, mientras que cuando la autofagia es completa actúa como mecanismo de resistencia. Quizás, el papel dual de la autofagia en respuesta al tratamiento pueda deberse a la diferencia en el flujo autofágico, puesto que no sólo es importante si se induce la autofagia, sino también si se completa la autofagia inducida. Esta observación concuerda con varios artículos que han demostrado que la autofagia desempeña una función protectora para la supervivencia tumoral en respuesta a la quimioterapia y que su bloqueo aumenta la eficacia terapéutica en varias neoplasias^{153,205-208}. Más concretamente, en cáncer de vejiga varios estudios han revelado que la inhibición de la autofagia a través de distintos enfoques aumenta la sensibilidad a diferentes intervenciones terapéuticas²⁰⁹⁻²¹³, por lo que la modulación sobre la autofagia y la apoptosis ejercida por la combinación de obatoclax y paclitaxel abriría nuevas puertas para el desarrollo de nuevas opciones de tratamiento.

Como resumen de todos los mecanismos descritos anteriormente, proponemos que la combinación de obatoclax y paclitaxel permitiría, por un lado, la parada eficiente en mitosis y, por otro, la ruptura de la interacción entre Mcl-1 y Beclina-1, liberando ambas proteínas. Tras ello, Mcl-1 podría ser degradado por el proteasoma promoviendo la apoptosis, mientras que Beclina-1 libre podría estimular la autofagia. Sin embargo, la activación de las caspasas pronto provocaría la rotura de Beclina-1, generando un fragmento que bloquearía el flujo autofágico e incrementaría el estímulo apoptótico para garantizar la muerte celular.

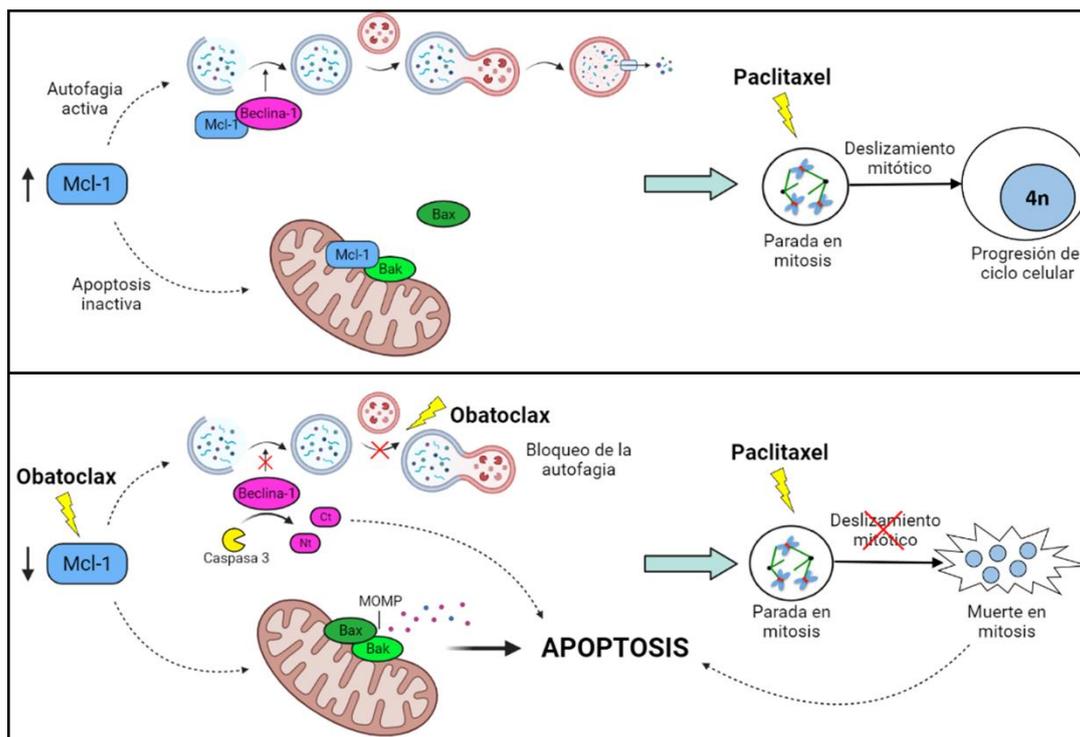


Figura 40. Modelo celular de los mecanismos de sensibilización al tratamiento combinado con obatoclox y paclitaxel. En el panel superior se muestran los mecanismos celulares que inducen resistencia al tratamiento con paclitaxel y en el panel inferior se muestran los efectos de la combinación de obatoclox y paclitaxel en estos mecanismos para finalmente inducir apoptosis.

1.2. Vía Wnt/ β -catenina como diana terapéutica

Cada vez está más aceptado que los tumores podrían estar sustentados por una pequeña subpoblación de células madre tumorales con capacidad de autorrenovarse y dar lugar a la tumorigénesis, la progresión tumoral, la migración y la metástasis^{104–106,108}. Además, debido a su naturaleza de célula madre son relativamente quiescentes, por lo que los tratamientos anticancerígenos convencionales de quimio y radioterapia dirigidos normalmente a células que se dividen más rápidamente no suelen tener mucho efecto en estas poblaciones. De hecho, terapias como las basadas en taxanos o platinos conducen a una reducción de la masa tumoral, pero a su vez provocan un aumento en la proporción de CSCs que genera recidivas y metástasis^{109–111}.

El papel de la vía Wnt/ β -catenina se ha descrito como esencial para el mantenimiento de las células madre tumorales en varios tipos de cáncer^{143–145,214,215}. En cáncer de mama, se ha visto que las CSCs presentan niveles más altos de señalización Wnt/ β -catenina que el resto del tumor, lo cual parece estar asociado a una mayor recurrencia y peor pronóstico^{144,145}. Por otro lado, en cáncer de próstata se ha observado que β -catenina promueve la autorrenovación de las CSCs¹⁴³. Además, se ha demostrado que el bloqueo esta vía de señalización evita la metástasis a través de la inhibición del fenotipo de célula madre¹⁴⁴. En nuestro caso, la caracterización de las dos líneas celulares de CVMI 5637 y HT1197 ha demostrado que el nivel de activación de la vía de

señalización Wnt/ β -catenina es muy diferente entre ambas, siendo significativamente mayor en las células HT1197. En esta línea celular, los altos niveles de β -catenina tanto en su forma total como en su forma activa se correspondían con un aumento de los niveles de p-GSK3 β ^{Ser9} (forma inactiva de la proteína), lo cual impediría la fosforilación y posterior degradación de β -catenina, que podría dirigirse al núcleo para ejercer su función transactivadora.

Además, la actividad de esta vía estaba estrechamente relacionada con el fenotipo de célula madre, ya que en comparación con la línea celular 5637, la línea celular HT1197 mostraba niveles mayores de expresión de proteínas como ALDH1A1, Oct-4 y Sox2, algunos de los marcadores de CSCs más consolidados^{128,216}. Otros estudios han descrito que β -catenina regula el fenotipo de CSC a través del control de algunas de sus dianas como ALDH1A1¹³⁶ u Oct-4²¹⁷, apoyando nuestra hipótesis de que la vía de señalización Wnt/ β -catenina podría estar implicada en el mantenimiento del fenotipo de célula madre tumoral en cáncer de vejiga. En cáncer de mama se ha propuesto la existencia de diferentes poblaciones celulares con propiedades de célula madre que expresan marcadores de superficie concretos, como las células CD44⁺/CD24⁻^{112,113}. Además, CD44 también parece ser un marcador de CSC en cáncer de vejiga¹¹⁴. Nuestros resultados mostraron un mayor porcentaje de células CD44⁺/CD24⁻ en la línea celular HT1197, lo que en conjunto parece indicar que estas células presentan un enriquecimiento claro en las propiedades tumorales y en el fenotipo de célula madre tumoral.

En el cáncer de vejiga, β -catenina se encuentra sobreexpresada en las muestras tumorales en comparación con el urotelio normal, y su señalización parece contribuir a la progresión tumoral^{122,146,147}. En cuanto a su relación con la resistencia a la quimioterapia, se ha documentado que la vía Wnt/ β -catenina podría estar implicada en la resistencia a cisplatino²¹⁸, doxorubicina^{219,220} e inmunoterapia²²¹ en el cáncer de vejiga. Sin embargo, su papel en la adquisición de resistencia a los taxanos todavía no está descrito. Anteriormente, nuestro grupo de investigación demostró que la vía Wnt/ β -catenina estaba implicada en la resistencia al paclitaxel en el cáncer de próstata⁹¹. En este trabajo, la activación de esta vía de señalización y el fenotipo de célula madre tumoral también se relaciona con la resistencia al paclitaxel en el cáncer de vejiga. Este hecho viene apoyado porque a diferencia de lo que ocurría en la línea celular 5637, las células HT1197 que presentaban un aumento en los marcadores ALDH1A1, Oct-4 y Sox-2, así como en proteínas relacionadas con la vía Wnt/ β -catenina, eran resistentes a la apoptosis inducida por paclitaxel, y además los niveles de estas proteínas no mostraron cambios significativos tras el tratamiento. Además, el silenciamiento génico de β -catenina en la línea celular HT1197 revertía la resistencia a paclitaxel, ya que la apoptosis tras el tratamiento fue significativamente mayor que tras el silenciamiento control. De igual modo, la sobreexpresión de β -catenina en la línea celular 5637 inducía resistencia al paclitaxel, provocando una disminución de la apoptosis en comparación con la transfección del plásmido vacío. De esta manera, pudimos confirmar que la vía Wnt/ β -catenina está implicada en la respuesta al tratamiento, mediando la adquisición de resistencia a paclitaxel en líneas celulares de cáncer de vejiga.

Una vez demostrado el efecto de la vía Wnt/ β -catenina sobre el fenotipo de célula madre y su relación con la resistencia a paclitaxel en la población total de células HT1197, nos propusimos confirmar estos resultados en una población enriquecida de UCSCs, ya que se conoce que los cultivos tridimensionales de esferoides son más similares al tumor sólido *in situ*. Yoshida et al. han sido los primeros en describir que la vía Wnt/ β -catenina es necesaria para la proliferación de las tumoresferas de la vejiga¹⁴⁹, pero en su trabajo no lo relacionan con la resistencia a la quimioterapia. Al igual que les ocurrió a ellos, una de las limitaciones que tuvimos en nuestro estudio fue la dificultad para generar tumoresferas a partir de células más invasivas como las de la línea celular HT1197, por lo que los ensayos se realizaron con la línea celular 5637. Para estudiar el efecto de las tumoresferas sobre la resistencia a paclitaxel y viceversa, generamos una línea celular resistente a partir de la línea celular 5637 a la que denominamos 5637R. Estas células resistentes a paclitaxel formaban un mayor número de tumoresferas y de mayor tamaño que la línea celular 5637 cuando se cultivaban en suspensión con un medio específico que fomentaba el crecimiento de esferoides. Curiosamente, a diferencia de las parentales, las células 5637R formaron tumoresferas incluso cuando se cultivaban sin este medio específico en cultivos no adherentes, demostrando que la resistencia a paclitaxel promueve la proliferación de las tumoresferas en cáncer de vejiga. Esta teoría podría explicar las recidivas y metástasis que se observan tras el tratamiento con quimioterapia y, de hecho, nuestros resultados coinciden con otros estudios donde se ha visto que paclitaxel induce muerte celular en células de cáncer de pulmón, pero a su vez selecciona y aumenta el número de CSCs ALDH⁺ que ayuda a promover la metástasis *in vivo*²²². De manera consistente con estos datos, la apoptosis inducida por paclitaxel en las tumoresferas derivadas de las células 5637 era menor que en las mismas células cultivadas en condiciones de adherencia, apoyando resultados en los que se ha descrito que las tumoresferas de cáncer de mama también son más resistentes al tratamiento con paclitaxel que los cultivos en monocapa²²³. Además, estas tumoresferas estaban enriquecidas en β -catenina activa y en los marcadores de CSCs ALDH1A1, Sox-2 y Oct-4, apuntando de nuevo a que la vía Wnt/ β -catenina juega un papel clave en la regulación de las UCSCs y en la adquisición de resistencia a la quimioterapia.

La expresión de β -catenina y algunos de los marcadores de CSC analizados en nuestro estudio como la ALDH1A1 o el Oct-4 se correlaciona con el grado tumoral, la probabilidad de recidivas, la metástasis o la peor supervivencia en pacientes con cáncer de vejiga^{128,147,224–227}. En los pacientes con CVMI analizados durante este trabajo, la expresión de β -catenina citosólica o nuclear (y, por tanto, activa) coincidía con la expresión positiva de los marcadores de CSCs ALDH1A1 y Sox-2, corroborando todos estos datos y recalcando la importancia de su uso como biomarcadores en la clínica.

En general, nuestros resultados nos sugieren que las UCSCs podrían ser sensibles a enfoques terapéuticos dirigidos a la vía Wnt/ β -catenina. Numerosos agentes que apuntan a los distintos componentes de la señalización mediada por Wnt/ β -catenina están siendo evaluados en el tratamiento del carcinoma urotelial de vejiga²²⁸. Por ejemplo, el compuesto silibinina es

capaz de inhibir las propiedades metastásicas de las UCSCs a través de la disminución e inactivación de β -catenina *in vitro* e *in vivo*²²⁹. Por otro lado, el tratamiento con curcumina revierte la activación de la vía Wnt/ β -catenina y las propiedades de UCSCs provocadas por la exposición crónica al humo del tabaco²³⁰. A pesar de ello, todavía son pocos los estudios *in vitro* que muestran la eficacia terapéutica de la inhibición de la vía en combinación con otros fármacos, y aunque en otros tipos de cáncer sí son más frecuentes, actualmente no hay ningún ensayo clínico en curso en cáncer de vejiga dirigido al bloqueo de la actividad de la vía Wnt/ β -catenina en esta subpoblación de CSCs^{231,232}. Por ello, en este trabajo nos planteamos el uso del inhibidor farmacológico XAV939 en combinación con paclitaxel para intentar sensibilizar a las líneas celulares de cáncer de vejiga resistentes. A este respecto, hemos observado que esta combinación de fármacos era capaz de disminuir los niveles de activación de la vía Wnt/ β -catenina permitiendo la inducción de apoptosis en las células HT1197 resistentes. Además, recientemente se ha demostrado que otras combinaciones de fármacos con taxanos, como la de salinomicina y docetaxel, son capaces de eliminar tanto las células cancerosas como las CSC en el cáncer gástrico²³³. Así, se refuerza la idea de combinar fármacos que, junto con la quimioterapia convencional, consigan actuar tanto sobre las células tumorales en general como sobre las CSCs en particular.

2. Mecanismos de resistencia al tratamiento con cisplatino

Los compuestos basados en platinos se utilizan en la actualidad para tratar aproximadamente a la mitad de los pacientes que reciben quimioterapia contra el cáncer. El mecanismo de acción del cisplatino se ha relacionado con la generación de roturas de doble cadena en el ADN (DSBs), provocando la inhibición de la replicación y de la transcripción, la parada del ciclo celular y la muerte celular por apoptosis en las células tumorales^{20,21}. Sin embargo, los pacientes que responden bien al inicio del tratamiento con cisplatino acaban volviéndose resistentes a la quimioterapia en poco tiempo. Esta resistencia aparece como resultado de mecanismos intrínsecos de las células tumorales que se ven potenciados tras el tratamiento y que conducen a la reducción de la acumulación intracelular del fármaco, al aumento del sistema de detoxificación, al aumento en la reparación del ADN, o a la disminución de la apoptosis y/o autofagia. Concretamente, la estimulación de los mecanismos de reparación del ADN –como la reparación por escisión de nucleótidos (NER) o por recombinación homóloga (HR) entre otros– se considera la característica más significativa en las células resistentes al cisplatino^{22,24,31}.

De hecho, se ha observado que los altos niveles de ARNm de ERCC1 (el cual participa en ambos procesos) correlacionan de manera inversa con la supervivencia en pacientes con cáncer de vejiga tratados con cisplatino²³⁴. Sin embargo, en las líneas celulares, los mecanismos implicados en la resistencia a cisplatino parecen ser mucho más variados, explicando la heterogeneidad de las respuestas de los pacientes a la quimioterapia²³. Por ello, nuestro objetivo en esta parte del trabajo se centró en analizar el papel de algunas proteínas de reparación por

HR en la adquisición de resistencia al tratamiento con cisplatino en líneas celulares de cáncer de vejiga músculo-invasivo.

En las líneas tumorales utilizadas en este estudio hemos observado que los niveles de algunas de las proteínas implicadas en el mecanismo de HR parecían correlacionarse con la respuesta al tratamiento con cisplatino. Concretamente, en las líneas celulares de cáncer de vejiga (HT1376) y ovario (SKOV3) donde el tratamiento con cisplatino inducía apoptosis, los niveles de BRCA1 y CtIP eran bajos o disminuían tras el tratamiento. Por el contrario, en la línea celular de cáncer de mama T47D resistente al cisplatino, los niveles endógenos de ambas proteínas eran más elevados y se mantenían sin cambios tras el tratamiento con el fármaco, indicando una posible hiperactivación de esta vía de reparación. Estos resultados cuadran con otros estudios en los que se ha demostrado que los tumores deficientes de BRCA1/2 tienen menor capacidad para reparar las DSBs mediante HR y, en consecuencia, responden mejor al tratamiento con cisplatino²³⁵, y que las mutaciones secundarias que restauran la función de BRCA1/2 favorecen la quimiorresistencia adquirida²³⁶. En cuanto a CtIP, no encontramos estudios que describan su relación con la resistencia al cisplatino, aunque al ser un factor clave que regula la elección de la vía de reparación de las DSBs mediante su interacción con BRCA1²³⁷, no sería extraño que también estuviese implicado en la respuesta al tratamiento. De igual modo, además de BRCA1 y CtIP, la deficiencia de otras proteínas de HR como XRCC2 también han demostrado estar relacionadas con la sensibilidad a la quimioterapia²³⁸.

Para corroborar nuestros resultados, silenciamos la expresión de BRCA1 en las líneas celulares HT1376 y T47D, pero en esta última el siARN BRCA1 no mejoraba la inducción de apoptosis tras cisplatino. Además, en esta línea celular el tratamiento con cisplatino no provocaba daño al ADN como se comprobó por la ausencia de γ H2AX^{Ser139} aunque sí inducía parada en fase G1/S como indicó el incremento en los niveles de Ciclina E, poniendo de manifiesto que en estas células la resistencia podría estar mediada por otras vías de reparación como la NHEJ²⁴. En cambio, el silenciamiento de BRCA1 en la línea celular HT1376 nos permitió comprobar que la apoptosis inducida por cisplatino tras el siARN BRCA1 era mayor que la inducida por el fármaco tras el siARN control, demostrando que al menos BRCA1 estaba implicado en la adquisición de resistencia al tratamiento con cisplatino en líneas celulares de cáncer de vejiga músculo-invasivo.

Todas estas observaciones sugieren que el estado de la HR, al menos en entornos clínicos específicos, tiene un importante valor pronóstico y predictivo. Por ello, aunque no hemos profundizado en este aspecto, nuestros resultados apuntan a que los pacientes con cáncer de vejiga que posean mutaciones supresoras de las proteínas de HR (fenotipo *BRCAness*) podrían beneficiarse de la quimioterapia basada en cisplatino, mientras que en pacientes donde BRCA1 se encuentre sobreexpresada, el uso de inhibidores de ésta podría ser una posible estrategia para revertir la resistencia al tratamiento. Sin embargo, con el tiempo las células tumorales adquieren la capacidad de reparar el daño generado mediante otras vías y consiguen volverse resistentes al tratamiento. En estos casos, una alternativa terapéutica se basa en el uso

inhibidores de PARP, ya que el bloqueo de esta vía secundaria de reparación provoca un efecto conocido como letalidad sintética que consigue sensibilizar al tratamiento con quimio o radioterapia^{239–242}.

Además, no sólo son importantes las mutaciones sino también los niveles de expresión, ya que las células que no expresan BRCA1 por otros motivos como la metilación del promotor²⁴³, presentan un fenotipo similar. Por esta razón, la regulación de la estabilidad de BRCA1 ha sido abordada desde varios puntos de vista^{37,38}, aunque se conoce poco acerca de la regulación de su degradación y la implicación del sistema SCF^{β-TrCP} en la adquisición de resistencia al tratamiento con cisplatino. Por ello, y porque se conoce que otras proteínas implicadas en la reparación de DSBs también están reguladas por ubiquitilación a múltiples niveles²⁹, decidimos analizar la relación del sistema de degradación de proteínas mediado por SCF^{β-TrCP} con la respuesta a cisplatino.

La experiencia de nuestro grupo de investigación y colaboradores nos ha permitido describir cómo ésta y otras ubiquitina ligasas como FBXW7 modulan la respuesta al paclitaxel o al daño al ADN mediante la degradación de diversos sustratos^{92,244–246}. En este trabajo hemos observado que β-TrCP podría estar actuando como tumor supresor en el contexto de la respuesta al cisplatino, ya que su sobreexpresión en la línea celular HT1376 HA-β-TrCP mejoraba la respuesta apoptótica induciendo un aumento del daño al ADN, como se demostró por el aumento de la rotura de PARP, la activación de caspasa 3 y los niveles de γH2AX^{Ser139} que se producían tras el tratamiento con cisplatino en comparación con la línea celular parental. En cambio, cuando sobreexpresamos la proteína mutada HA-β-TrCP ΔF se revertía este efecto. Para reforzar nuestra teoría, comprobamos que tanto en la línea parental HT1376 como en la línea HT1376 HA-β-TrCP que sobreexpresa la proteína silvestre, la interferencia de β-TrCP mediante siARN disminuía la apoptosis inducida por cisplatino de manera significativa, indicando que la reducción de los niveles de β-TrCP confería resistencia al tratamiento.

Por otro lado, hemos descrito que la función de β-TrCP en la respuesta al cisplatino estaba relacionada con la reparación del daño al ADN. Esto se demuestra porque cuando monitorizamos la reparación del daño pudimos observar que, aunque el tratamiento con cisplatino inducía una señal de RAD51 y γH2AX^{Ser139} similar, la resolución de ésta era mucho más lenta en las células que sobreexpresaban β-TrCP que en las células parentales. De hecho, mediante el estudio de inmunofluorescencia comprobamos que los focos nucleares de γH2AX^{Ser139} en la línea celular HT1376 HA-β-TrCP persistían incluso 36 horas después de haber retirado el tratamiento, a diferencia de lo que ocurría en la línea celular HT1376. Por el contrario, en el caso de la línea celular HT1376 HA-β-TrCP ΔF tanto la señal de RAD51 y γH2AX^{Ser139} en el *western blot* como los focos de γH2AX^{Ser139} en inmunofluorescencia tras el tratamiento con cisplatino eran menores. Todo esto indica que la sobreexpresión de β-TrCP podría interferir con la reparación del daño al ADN inducido por cisplatino, mejorando así la respuesta al tratamiento.

Nuestros resultados se ven apoyados por estudios previos que han demostrado que β -TrCP puede actuar como tumor supresor^{247,248}, y que desempeña importantes funciones en la respuesta al daño al ADN^{249–251}. Un estudio reciente ha establecido que β -TrCP1 ayuda a mantener la estabilidad genómica mediante la activación del punto de control de ciclo celular y la reparación del daño en el ADN tras estrés genotóxico, actuando como tumor supresor²⁵². En esta misma línea, parece que la degradación del oncogén AEBP2 mediada por β -TrCP aumenta la apoptosis inducida por cisplatino en cáncer de ovario²⁵³. Por el contrario, también se ha visto que β -TrCP favorece la reparación de las DSBs y la supervivencia celular tras el tratamiento quimioterápico²⁵⁴, por lo que su función parece depender del contexto celular.

Por último, hemos relacionado el papel de SCF β -TrCP y el de las proteínas de HR en la respuesta a cisplatino mediante la hipótesis de que BRCA1 y CtIP puedan ser nuevos sustratos de esta ubiquitina ligasa, y que por tanto la sobreexpresión de β -TrCP y consiguiente degradación de BRCA1 y CtIP sería la responsable de la dificultad en la reparación y el aumento de la respuesta apoptótica al tratamiento con cisplatino. Está descrito que BRCA1 es sustrato de varias enzimas E3 ligasas que permiten su degradación vía proteasoma^{255–257}, por lo que β -TrCP también podría ser una de ellas. De hecho, en un estudio previo mediante inmunoprecipitación anti-HA y espectrometría de masas en tándem (MS/MS) en células Cos-7 transfectadas con HA- β -TrCP, se encontraron péptidos correspondientes a BRCA1¹⁷⁶. Sin embargo, otro estudio ha descrito que esta ubiquitina ligasa no está entre las que co-inmunoprecipitan con BRCA1 mediante *western blot*²⁵⁶. Por otro lado, la propia BRCA1 posee actividad E3 ligasa y ubiquitila a CtIP²⁵⁸ (aunque no para degradar), y dada la importancia de la interacción entre ambas^{177,237}, es lógico pensar que la expresión de CtIP también debe estar finamente regulada. En relación a esta idea, nuestros resultados han demostrado que β -TrCP interacciona con BRCA1 en al menos dos líneas celulares tumorales de cáncer de vejiga, y con CtIP en una de ellas. Además, esta interacción parecía mediar la degradación de BRCA1 y CtIP. Hemos comprobado que los niveles de ambas proteínas disminuían cuando se sobreexpresaba la β -TrCP silvestre y se recuperaron cuando sobreexpresamos la proteína mutada. Asimismo, el silenciamiento de β -TrCP en la línea celular HT1376 también consiguió incrementar los niveles de BRCA1, apoyando nuestros resultados.

En general, si bien es cierto que esta parte de nuestra investigación es aún preliminar y tiene algunas limitaciones, todos estos resultados nos hacen pensar en la importancia de la regulación de la degradación de las proteínas implicadas en HR. Actualmente, casi todos los ensayos clínicos dirigidos a las alteraciones moleculares en la reparación del ADN sólo tienen en cuenta el estado mutacional de la(s) proteína(s). Sin embargo, independientemente de éste, el aumento o la disminución de la expresión de estas proteínas debido a los diferentes niveles de β -TrCP u otras ubiquitina ligasas también puede tener efectos importantes en la respuesta al tratamiento. Por todo ello, una buena propuesta sería el diseño de pequeñas moléculas como los PROTACs^{259,260} (del inglés *Proteolysis targeting chimeric*) que faciliten la degradación de ciertas proteínas implicadas en la adquisición de resistencia, lo cual podría contribuir a mejorar los

efectos terapéuticos de la quimioterapia basada en cisplatino en el cáncer de vejiga músculo-invasivo.

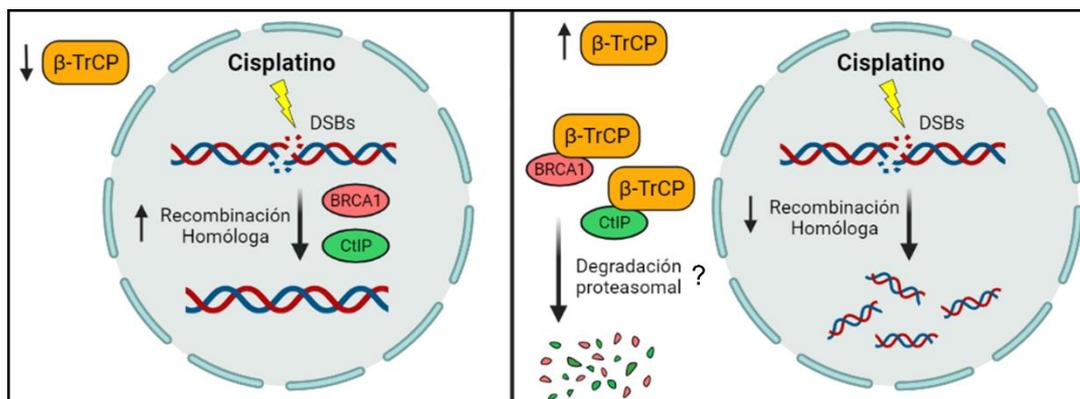


Figura 41. Modelo celular propuesto para la regulación de la degradación de BRCA1 y CtIP por β -TrCP en respuesta a cisplatino. En el panel de la izquierda se muestran las condiciones de resistencia a cisplatino, en las que las proteínas de reparación homóloga BRCA1 y CtIP se encuentran elevadas y β -TrCP baja. En el panel de la derecha se muestran las condiciones de sensibilidad a cisplatino, en las que los altos niveles de β -TrCP podrían contribuir a la degradación de BRCA1 y CtIP y con ello a la inducción de daño al ADN y apoptosis.

3. Identificación de biomarcadores de respuesta a la quimioterapia en el carcinoma de vejiga

Por último, hemos comprobado la relevancia de las proteínas y vías de señalización analizadas durante esta tesis mediante el estudio de expresión diferencial transcriptómico entre muestras de pacientes con CVMI y CVNMI. Actualmente, el estudio de la regulación de genes mediante -ómicas proporciona ingentes cantidades de datos de gran valor para identificar genes implicados en los procesos patológicos, además de permitir la identificación de posibles dianas terapéuticas en el proceso de desarrollo de nuevos fármacos. En nuestros resultados, la mayoría de los genes que se encontraban sobreexpresados en las muestras de CVMI estaban relacionados con las rutas de señalización que habíamos considerado objeto de estudio, entre ellos BRCA1. Además, al haber validado la sobreexpresión de algunos de estos genes mediante RT-qPCR en un grupo más amplio de pacientes, abrimos paso a nuevos estudios para confirmar su papel como posibles dianas terapéuticas y/o biomarcadores de pronóstico y respuesta al tratamiento con cisplatino y paclitaxel en el cáncer urotelial músculo-invasivo.

Aunque *a priori* los distintos mecanismos de resistencia a la quimioterapia convencional como los taxanos o los platinos puedan parecer independientes entre sí, cada vez son más los estudios que avalan que todos ellos están relacionados y forman parte del cómputo global de adaptaciones que sufren las células tumorales durante el proceso tumorigénico. Durante toda esta tesis se han descrito diferentes mecanismos de resistencia a paclitaxel o a cisplatino basándonos en las características de distintas líneas celulares; sin embargo, la mayoría de estos mecanismos ocurren de manera simultánea en una misma línea celular ante un estímulo u otro.

Por ejemplo, la resistencia a paclitaxel que poseen las células de la línea HT1197 puede explicarse a través de los siguientes eventos: el aumento en los niveles de Mcl-1, la activación aberrante de la vía Wnt/ β -catenina, el enriquecimiento en las propiedades de célula madre tumoral o la inducción de autofagia. El aumento en los niveles de Mcl-1 de esta línea celular también podría explicarse, al menos en parte, por la activación de la vía Wnt/ β -catenina y la consiguiente expresión de sus genes diana como la quinasa Akt, ya que ésta juega un papel clave en la inactivación de GSK3 β y, en consecuencia, en la estabilización de la propia β -catenina o de Mcl-1⁹¹. Por otro lado, es importante destacar que la autofagia es un proceso indispensable durante el origen y la propagación de las CSCs, y que a su vez está regulada por vías de señalización como la Wnt entre otras, por lo que las alteraciones en estas vías que se producen con frecuencia en las CSCs tendrían efectos directos sobre la autofagia¹¹⁰. Del mismo modo, algunos de estos mecanismos se comparten cuando hablamos de resistencia a cisplatino, ya que por ejemplo, además de la implicación de los mecanismos de reparación del ADN, se ha visto que las líneas celulares de cáncer de vejiga resistentes a cisplatino poseen una mayor población de células ALDH⁺ y características de CSCs^{261,262}, o niveles más altos de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2¹⁸¹. Por otro lado, la modulación de la vía Wnt/ β -catenina también altera la eficacia de la reparación del ADN en respuesta al tratamiento con cisplatino²⁶³. Además, Mcl-1, β -catenina y otras proteínas implicadas en la autofagia también son sustratos de β -TrCP²⁶⁴⁻²⁶⁶, ligando estos mecanismos de resistencia con el sistema de degradación de proteínas y respaldando la importancia de la regulación de la degradación de estas dianas terapéuticas para la respuesta al tratamiento.

En otro orden de ideas, los niveles de expresión diferenciada de BRCA1 muestran diferente quimiosensibilidad al tratamiento con taxanos y/o platinos³⁵. En relación a esto, otra de las investigaciones de nuestro laboratorio nos ha permitido observar que en las mismas líneas celulares de cáncer de vejiga utilizadas en esta tesis (5637, HT1376 y HT1197), los niveles de BRCA1 determinan la respuesta a cisplatino y paclitaxel (datos no publicados) del mismo modo que se ha descrito en pacientes con cáncer de ovario³⁶: la baja expresión de BRCA1 induce susceptibilidad al cisplatino y resistencia al paclitaxel; en cambio, su alta expresión se relaciona con la resistencia al cisplatino y sensibilidad al paclitaxel.

Por todo ello, utilizar un fármaco dirigido a cualquiera de estas vías puede ser beneficioso en combinación tanto con paclitaxel como con cisplatino. De hecho, se ha observado que obatoclax y XAV939 también son capaces de aumentar la apoptosis inducida por cisplatino en cáncer de vejiga y colon, respectivamente^{181,267}. En resumen, todos estos hallazgos tendrían importantes aplicaciones para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, ya que hemos comprobado que las adaptaciones que permiten a las células resistentes tolerar el tratamiento con paclitaxel o con cisplatino, son las que a su vez las hacen más vulnerables a la presencia de otros inhibidores. De esta forma, resulta evidente que la combinación de la quimioterapia convencional con estos nuevos fármacos podrían ser una buena opción para moderar la resistencia al tratamiento con taxanos o platinos en pacientes con cáncer urotelial músculo-invasivo.

CONCLUSIONES

1. La proteína antiapoptótica Mcl-1 destaca como biomarcador y diana terapéutica, su sobreexpresión confiere resistencia al tratamiento con paclitaxel en líneas celulares y puede tener valor pronóstico y predictivo en muestras clínicas de cáncer de vejiga.
2. El inhibidor farmacológico de Mcl-1 obatoclax en combinación con paclitaxel inhibe el deslizamiento mitótico, promueve la parada del ciclo celular en fase G2/M y sensibiliza a la apoptosis en las células resistentes.
3. La combinación de obatoclax y paclitaxel induce un bloqueo eficiente del flujo autofágico que favorece la apoptosis en las células resistentes a través de la disminución de los niveles de Mcl-1 y la rotura proteolítica caspasa-dependiente de Beclina-1.
4. Las células de cáncer de vejiga resistentes a paclitaxel poseen una mayor activación de la vía Wnt/ β -catenina, así como un aumento de las propiedades y el fenotipo de célula madre tumoral que podrían estar reguladas por esta vía de señalización.
5. El silenciamiento génico de β -catenina sensibiliza a las líneas celulares resistentes a la apoptosis inducida por paclitaxel, efecto que puede lograrse también con la combinación de paclitaxel e inhibidores farmacológicos de la vía Wnt/ β -catenina como XAV939.
6. La expresión de β -catenina en muestras clínicas de carcinoma de vejiga músculo-invasivo puede tener interés pronóstico, su expresión aberrante parece correlacionar con la expresión de los marcadores de célula madre tumoral ALDH1A1 y Sox-2.
7. La sobreexpresión de BRCA1 y de CtIP permite la reparación eficiente del daño al ADN y la adquisición de resistencia al tratamiento con cisplatino en líneas celulares de cáncer de vejiga músculo-invasivo.
8. β -TrCP actúa como tumor supresor en este contexto del cáncer de vejiga; su sobreexpresión aumenta el daño al ADN y la apoptosis inducida por cisplatino, mientras que su interferencia reduce el daño al ADN y confiere resistencia al tratamiento.
9. BRCA1 y CtIP interaccionan con β -TrCP y podrían ser nuevos sustratos de ésta. Defectos en la regulación de estas proteínas permitirían una reparación más eficiente del daño al ADN y la adquisición de resistencia a cisplatino en el cáncer de vejiga músculo-invasivo.
10. El análisis transcriptómico en muestras clínicas confirma la relevancia de estas vías celulares en el cáncer de vejiga músculo-invasivo y contribuye a la identificación de nuevos biomarcadores pronósticos y predictivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer Review Douglas. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
2. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
3. Antoni, S. *et al.* Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. *Eur. Urol.* **71**, 96–108 (2017).
4. Burger, M. *et al.* Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur. Urol.* **63**, 234–241 (2013).
5. International Agency for Research on Cancer. Global Cancer Observatory. <https://gco.iarc.fr/>. Acceso el 26 de octubre de 2020.
6. Alfred Witjes, J. *et al.* Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer. *Eur. Urol.* **71**, 462–475 (2017).
7. Degeorge, K. C., Holt, H. R. & Hodges, S. C. Bladder Cancer: Diagnosis and Treatment. *Am. Fam. Physician* **96**, 507–514 (2017).
8. Criscuolo, D. *et al.* New combinatorial strategies to improve the PARP inhibitors efficacy in the urothelial bladder Cancer treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **38**, 1–9 (2019).
9. Seiler, R. *et al.* An Oncofetal Glycosaminoglycan Modification Provides Therapeutic Access to Cisplatin-resistant Bladder Cancer. *Eur. Urol.* **72**, 142–150 (2017).
10. Sharma, S., Ksheersagar, P. & Sharma, P. Diagnosis and treatment of bladder cancer. *Am. Fam. Physician* **80**, 717–723 (2009).
11. For, H. *et al.* Salvage Systemic Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma: On the Cusp of a Sea Change? *Oncologist* **20**, 461–463 (2015).
12. Rosenberg, J. E. *et al.* Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: A single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet* **387**, 1909–1920 (2016).
13. Stewart, R. A., Piliie, P. G. & Yap, T. A. Development of PARP and immune-checkpoint inhibitor combinations. *Cancer Res.* **78**, 6717–6725 (2018).
14. Powles, T. *et al.* Atezolizumab versus chemotherapy in patients with platinum-treated locally advanced or metastatic urothelial carcinoma (IMvigor211): a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* **391**, 748–757 (2018).
15. Bellmunt, J. *et al.* Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **376**, 1015–1026 (2017).

16. Narayanan, S., Harshman, L. C. & Srinivas, S. Second-Line Therapies in Metastatic Urothelial Carcinoma. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **29**, 341–359 (2015).
17. Knowles, M. A. & Hurst, C. D. Molecular biology of bladder cancer: New insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 25–41 (2015).
18. Merrin, C. Treatment of advanced bladder cancer with cis-diamminedichloroplatinum (II NSC 119875): A pilot study. *J. Urol.* **119**, 493–495 (1978).
19. Prestayko, A. W., D'Aoust, J. C., Issell, B. F. & Crooke, S. T. Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II). *Cancer Treat. Rev.* **6**, 17–39 (1979).
20. Kelland, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 573–584 (2007).
21. Chválová, K. *et al.* Mechanism of the formation of DNA-protein cross-links by antitumor cisplatin. *Nucleic Acids Res.* **35**, 1812–1821 (2007).
22. Ghosh, S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorg. Chem.* **88**, 1–20 (2019).
23. Skowron, M. A. *et al.* Multifaceted mechanisms of cisplatin resistance in long-term treated urothelial carcinoma cell lines. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1–17 (2018).
24. Galluzzi, L. *et al.* Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* **31**, 1869–1883 (2012).
25. Long, X. *et al.* Cancer-associated fibroblasts promote cisplatin resistance in bladder cancer cells by increasing IGF-1/ER β /Bcl-2 signalling. *Cell Death Dis.* **10**, 1–16 (2019).
26. Xu, Q. *et al.* GMDTC Chelating Agent Attenuates Cisplatin-Induced Systemic Toxicity without Affecting Antitumor Efficacy. *Chem. Res. Toxicol.* **32**, 1572–1582 (2019).
27. Bartek, J., Lukas, J. & Bartkova, J. DNA damage response as an anti-cancer barrier: Damage threshold and the concept of 'conditional haploinsufficiency'. *Cell Cycle* **6**, 2344–2347 (2007).
28. Chernikova, S. B., Game, J. C. & Brown, J. M. Inhibiting homologous recombination for cancer therapy. *Cancer Biol. Ther.* **13**, 61–68 (2012).
29. Schwertman, P., Bekker-Jensen, S. & Mailand, N. Regulation of DNA double-strand break repair by ubiquitin and ubiquitin-like modifiers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 379–394 (2016).
30. Chang, H. H. Y., Pannunzio, N. R., Adachi, N. & Lieber, M. R. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 495–506 (2017).

31. Rocha, C. R. R., Silva, M. M., Quinet, A., Cabral-Neto, J. B. & Menck, C. F. M. DNA repair pathways and cisplatin resistance: An intimate relationship. *Clinics* **73**, 1–10 (2018).
32. Damia, G. & Broggini, M. Platinum resistance in ovarian cancer: Role of DNA repair. *Cancers (Basel)*. **11**, 1–15 (2019).
33. Chaudhuri, A. R. *et al.* Replication fork stability confers chemoresistance in BRCA-deficient cells. *Nature* **535**, 382–387 (2016).
34. Nicolas, E., Bertucci, F., Sabatier, R. & Gonçalves, A. Targeting BRCA deficiency in breast cancer: What are the clinical evidences and the next perspectives? *Cancers (Basel)*. **10**, 1–22 (2018).
35. Quinn, J. E. *et al.* BRCA1 functions as a differential modulator of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* **63**, 6221–6228 (2003).
36. Quinn, J. E. *et al.* BRCA1 mRNA expression levels predict for overall survival in ovarian cancer after chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **13**, 7413–7420 (2007).
37. Blagosklonny, M. V. *et al.* Regulation of BRCA1 by protein degradation. *Oncogene* **18**, 6460–6468 (1999).
38. Choudhury, A. D., Xu, H. & Baer, R. Ubiquitination and proteasomal degradation of the BRCA1 tumor suppressor is regulated during cell cycle progression. *J. Biol. Chem.* **279**, 33909–33918 (2004).
39. Wang, X. *et al.* WP1130 attenuates cisplatin resistance by decreasing P53 expression in non-small cell lung carcinomas. *Oncotarget* **8**, 49033–49043 (2017).
40. Zhou, J. & Giannakakou, P. Targeting microtubules for cancer chemotherapy. *Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents* **5**, 65–71 (2005).
41. Orr, G. A., Verdier-Pinard, P., Mcdaid, H. & Horwitz, S. B. Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene* **22**, 7280–7295 (2003).
42. Steinmetz, M. O. & Prota, A. E. Microtubule-Targeting Agents : Strategies To Hijack the Cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* **28**, 1–17 (2018).
43. Jordan, M. A. & Wilson, L. Microtubules As a Target for Anticancer Drugs. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 253–265 (2004).
44. Dumontet, C. & Jordan, M. A. Microtubule-binding agents: A dynamic field of cancer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 790–803 (2010).
45. Naaz, F., Haider, M. R., Shafi, S. & Yar, M. S. Anti-tubulin agents of natural origin: Targeting taxol, vinca, and colchicine binding domains. *Eur. J. Med. Chem.* **171**, 310–331

- (2019).
46. Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P. & Mcphail, A. T. Plant Antitumor Agents. VI. The Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 2325–2327 (1971).
 47. Schiff, P. B., Fant, J. & Horwitz, S. B. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* **277**, 665–667 (1979).
 48. Montero, A., Fossella, F., Hortobagyi, G. & Valero, V. Docetaxel for treatment of solid tumours: A systematic review of clinical data. *Lancet Oncol.* **6**, 229–239 (2005).
 49. Rodrigues-ferreira, S., Moindjie, H., Haykal, M. M. & Nahmias, C. Predicting and Overcoming Taxane Chemoresistance. *Trends Mol. Med.* **27**, 138–151 (2021).
 50. Pérez De Castro, I., De Cárcer, G. & Malumbres, M. A census of mitotic cancer genes: new insights into tumor cell biology and cancer therapy. *Carcinogenesis* **28**, 899–912 (2007).
 51. Malumbres, M. & Barbacid, M. Cell cycle kinases in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **17**, 60–65 (2007).
 52. Musacchio, A. & Salmon, E. D. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 379–393 (2007).
 53. Ruan, W., Lim, H. H. & Surana, U. Mapping Mitotic Death: Functional Integration of Mitochondria, Spindle Assembly Checkpoint and Apoptosis. *Front. Cell Dev. Biol.* **6**, 1–9 (2019).
 54. Gascoigne, K. E. & Taylor, S. S. Cancer Cells Display Profound Intra- and Interline Variation following Prolonged Exposure to Antimitotic Drugs. *Cancer Cell* **14**, 111–122 (2008).
 55. Brito, D. A. & Rieder, C. L. Mitotic Checkpoint Slippage in Humans Occurs via Cyclin B Destruction in the Presence of an Active Checkpoint. *Curr. Biol.* **16**, 1194–1200 (2006).
 56. Gascoigne, K. E. & Taylor, S. S. How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? *J. Cell Sci.* **122**, 2579–2585 (2009).
 57. Galán-Malo, P. *et al.* Cell fate after mitotic arrest in different tumor cells is determined by the balance between slippage and apoptotic threshold. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **258**, 384–393 (2012).
 58. Raff, M. Cell suicide for beginners. *Nature* **396**, 119–122 (1998).
 59. Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with

- wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239–257 (1972).
60. Adams, J. M. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *GENES Dev.* **17**, 2481–2495 (2003).
 61. Kerr, J. F. R. R., Winterford, C. M. & Harmon, B. V. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer Therapy. *Cancer* **73**, 2013–2026 (1994).
 62. Hengartner, M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770–776 (2000).
 63. Pop, C. & Salvesen, G. S. Human caspases: Activation, specificity, and regulation. *J. Biol. Chem.* **284**, 21777–21781 (2009).
 64. Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S. & Kumar, S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ.* **22**, 526–539 (2015).
 65. Locksley, R. M., Killeen, N. & Lenardo, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell* **104**, 487–501 (2001).
 66. Ashkenazi, A. & Dixit, V. M. Death receptors: Signaling and modulation. *Science* **281**, 1305–1308 (1998).
 67. Mahmood, Z. & Shukla, Y. Death receptors: Targets for cancer therapy. *Exp. Cell Res.* **316**, 887–899 (2009).
 68. Galluzzi, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **25**, 486–541 (2018).
 69. Adams, J. M. & Cory, S. The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science* **281**, 1322–1326 (1998).
 70. Chipuk, J. E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M. J. & Green, D. R. The BCL-2 Family Reunion. *Mol. Cell* **37**, 299–310 (2010).
 71. Suvarna, V., Singh, V. & Murahari, M. Current overview on the clinical update of Bcl-2 anti-apoptotic inhibitors for cancer therapy. *Eur. J. Pharmacol.* **862**, 1–20 (2019).
 72. Tait, S. W. G. & Green, D. R. Mitochondria and cell death: Outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 621–632 (2010).
 73. Li, P. *et al.* Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479–489 (1997).
 74. Oliver, F. J. *et al.* Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis: Lesson from an uncleavable mutant. *J. Biol. Chem.* **273**, 33533–33539 (1998).
 75. Adams, J. M. & Cory, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy.

- Oncogene* **26**, 1324–1337 (2007).
76. Yip, K. W. & Reed, J. C. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* **27**, 6398–6406 (2008).
 77. Kitada, S., Pedersen, I. M., Schimmer, A. D. & Reed, J. C. Dysregulation of apoptosis genes in hematopoietic malignancies. *Oncogene* **21**, 3459–3474 (2002).
 78. Flores, M. L. *et al.* Paclitaxel sensitivity of breast cancer cells requires efficient mitotic arrest and disruption of Bcl-xL/Bak interaction. *Breast Cancer Res. Treat.* **133**, 917–928 (2012).
 79. Zhou, M. *et al.* MicroRNA-125b confers the resistance of breast cancer cells to paclitaxel through suppression of pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer 1 (Bak1) expression. *J. Biol. Chem.* **285**, 21496–21507 (2010).
 80. Gandhi, L. *et al.* Phase I study of navitoclax (ABT-263), a novel bcl-2 family inhibitor, in patients with small-cell lung cancer and other solid tumors. *J. Clin. Oncol.* **29**, 909–916 (2011).
 81. Bedikian, A. Y. *et al.* Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: The oblimersen melanoma study group. *J. Clin. Oncol.* **24**, 4738–4745 (2006).
 82. Castilla, C. *et al.* Bcl-xL is overexpressed in hormone-resistant prostate cancer and promotes survival of LNCaP cells via interaction with proapoptotic Bak. *Endocrinology* **147**, 4960–4967 (2006).
 83. Li, X. Y. *et al.* Overexpression of BCL-XL underlies the molecular basis for resistance to staurosporine-induced apoptosis in PC-3 cells. *Cancer Res.* **61**, 1699–1706 (2001).
 84. Liu, Q. Y. & Stein, C. A. Taxol and estramustine-induced modulation of human prostate cancer cell apoptosis via alteration in bcl-x(L) and bak expression. *Clin. Cancer Res.* **3**, 2039–2046 (1997).
 85. Ashkenazi, A., Fairbrother, W. J., Levenson, J. D. & Souers, A. J. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 273–284 (2017).
 86. Perciavalle, R. M. & Opferman, J. T. Delving deeper: MCL-1's contributions to normal and cancer biology. *Trends Cell Biol.* **23**, 22–29 (2013).
 87. Wuillème-Toumi, S. *et al.* Mcl-1 is overexpressed in multiple myeloma and associated with relapse and shorter survival. *Leukemia* **19**, 1248–1252 (2005).
 88. Glaser, S. P. *et al.* Anti-apoptotic mcl-1 is essential for the development and sustained

- growth of acute myeloid leukemia. *Genes Dev.* **26**, 120–125 (2012).
89. Song, L., Coppola, D., Livingston, S., Cress, D. & Haura, E. B. Mcl-1 regulates survival and sensitivity to diverse apoptotic stimuli in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Biol. Ther.* **4**, 267–276 (2005).
 90. Castilla, C. *et al.* Prostate cancer cell response to paclitaxel is affected by abnormally expressed securin PTTG1. *Mol. Cancer Ther.* **13**, 2372–2383 (2014).
 91. Flores, M. L. *et al.* Loss of PKC δ induces prostate cancer resistance to paclitaxel through activation of wnt/ β -catenin pathway and Mcl-1 accumulation. *Mol. Cancer Ther.* **15**, 1713–1725 (2016).
 92. Gasca, J. *et al.* Loss of FBXW7 and accumulation of MCL1 and PLK1 promote paclitaxel resistance in breast cancer. *Oncotarget* **7**, 52751–52765 (2016).
 93. Konopleva, M. *et al.* Mechanisms of antileukemic activity of the novel Bcl-2 homology domain-3 mimetic GX15-070 (Obatoclax). *Cancer Res.* **68**, 3413–3420 (2008).
 94. Schimmer, A. D. *et al.* A phase I study of the pan bcl-2 Family Inhibitor obatoclax mesylate in patients with advanced hematologic malignancies. *Clin. Cancer Res.* **14**, 8295–8301 (2008).
 95. Hwang, J. J. *et al.* Phase I dose finding studies of obatoclax (GX15-070), a small molecule Pan-BCL-2 family antagonist, in patients with advanced solid tumors or lymphoma. *Clin. Cancer Res.* **16**, 4038–4045 (2010).
 96. Li, J., Viallet, J. & Haura, E. B. A small molecule pan-Bcl-2 family inhibitor, GX15-070, induces apoptosis and enhances cisplatin-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **61**, 525–534 (2008).
 97. Rahmani, M. *et al.* Inhibition of Bcl-2 antiapoptotic members by obatoclax potently enhances sorafenib-induced apoptosis in human myeloid leukemia cells through a Bim-dependent process. *Blood* **119**, 6089–6098 (2012).
 98. Nguyen, M. *et al.* Small molecule obatoclax (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis. *PNAS* **104**, 19512–19517 (2007).
 99. Mitchell, C. *et al.* Inhibition of MCL-1 in breast cancer cells promotes cell death in vitro and in vivo. *Cancer Biol. Ther.* **10**, 903–917 (2010).
 100. Yu, L. & Liu, S. Autophagy contributes to modulating the cytotoxicities of Bcl-2 homology domain-3 mimetics. *Semin. Cancer Biol.* **23**, 553–560 (2013).
 101. Basit, F., Cristofanon, S. & Fulda, S. Obatoclax (GX15-070) triggers necroptosis by promoting the assembly of the necrosome on autophagosomal membranes. *Cell Death*

- Differ.* **20**, 1161–1173 (2013).
102. Liang, L.-Z. *et al.* Obatoclox induces Beclin 1- and ATG5-dependent apoptosis and autophagy in adenoid cystic carcinoma cells. *Oral Dis.* **21**, 470–477 (2015).
 103. Yu, L. *et al.* Obatoclox impairs lysosomal function to block autophagy in cisplatin-sensitive and -resistant esophageal cancer cells. *Oncotarget* **7**, 14693–14707 (2016).
 104. Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. & Weissman, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105–111 (2001).
 105. Lobo, N. A., Shiono, Y., Qian, D. & Clarke, M. F. The biology of cancer stem cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**, 675–699 (2007).
 106. Dalerba, P., Cho, R. W. & Clarke, M. F. Cancer stem cells: Models and concepts. *Annu. Rev. Med.* **58**, 267–284 (2007).
 107. Visvader, J. E. & Lindeman, G. J. Cancer stem cells in solid tumours: Accumulating evidence and unresolved questions. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 755–768 (2008).
 108. Ailles, L. E. & Weissman, I. L. Cancer stem cells in solid tumors. *Curr. Opin. Biotechnol.* **18**, 460–466 (2007).
 109. Han, L., Shi, S., Gong, T., Zhang, Z. & Sun, X. Cancer stem cells: therapeutic implications and perspectives in cancer therapy. *Acta Pharm. Sin. B* **3**, 65–75 (2013).
 110. Carnero, A. *et al.* The cancer stem-cell signaling network and resistance to therapy. *Cancer Treat. Rev.* **49**, 25–36 (2016).
 111. Soltanian, S. & Matin, M. M. Cancer stem cells and cancer therapy. *Tumor Biol.* **32**, 425–440 (2011).
 112. Al-hajj, M., Wicha, M. S., Benito-hernandez, A., Morrison, S. J. & Clarke, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 3983–3988 (2003).
 113. Ponti, D. *et al.* Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res.* **65**, 5506–5511 (2005).
 114. Chan, K. S. *et al.* Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 14016–14021 (2009).
 115. Van Der Horst, G. *et al.* Epithelial plasticity, cancer stem cells, and the tumor-supportive stroma in bladder carcinoma. *Mol. Cancer Res.* **10**, 995–1009 (2012).
 116. Ho, P. L., Kurtova, A. & Chan, K. S. Normal and neoplastic urothelial stem cells: Getting

- to the root of the problem. *Nat. Rev. Urol.* **9**, 583–594 (2012).
117. Garg, M. Urothelial cancer stem cells and epithelial plasticity current concepts and therapeutic implications in bladder cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **34**, 691–701 (2015).
 118. Ohishi, T., Koga, F. & Migita, T. Bladder Cancer Stem-Like Cells : Their Origin and Therapeutic Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1–20 (2015).
 119. Fang, D. & Kitamura, H. Cancer stem cells and epithelial–mesenchymal transition in urothelial carcinoma: Possible pathways and potential therapeutic approaches. *Int. J. Urol.* **25**, 7–17 (2018).
 120. Yang, Y. M. & Chang, J. W. Bladder cancer initiating cells (BCICs) are among EMA-CD44v6+ subset: Novel methods for isolating undetermined cancer stem (initiating) cells. *Cancer Invest.* **26**, 725–733 (2008).
 121. Kuncová, J., Kostrouch, Z., Viale, M., Revoltella, R. & Mandys, V. Expression of CD44v6 correlates with cell proliferation and cellular atypia in urothelial carcinoma cell lines 5637 and HT1197. *Folia Biol. (Praha).* **51**, 3–11 (2005).
 122. He, X. *et al.* Differentiation of a highly tumorigenic basal cell compartment in urothelial carcinoma. *Stem Cells* **27**, 1487–1495 (2009).
 123. HUANG, P. *et al.* Cancer stem cell-like characteristics of a CD133+ subpopulation in the J82 human bladder cancer cell line. *Mol. Clin. Oncol.* **1**, 180–184 (2013).
 124. Atlasi, Y., Mowla, S. J., Ziaee, S. A. M. & Bahrami, A. R. OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer. *Int. J. Cancer* **120**, 1598–1602 (2007).
 125. Chang, C. C. *et al.* Oct-3/4 expression reflects tumor progression and regulates motility of bladder cancer cells. *Cancer Res.* **68**, 6281–6291 (2008).
 126. Ginestier, C. *et al.* ALDH1 Is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome. *Cell Stem Cell* **1**, 555–567 (2007).
 127. Van Den Hoogen, C. *et al.* High aldehyde dehydrogenase activity identifies tumor-initiating and metastasis-initiating cells in human prostate cancer. *Cancer Res.* **70**, 5163–5173 (2010).
 128. Su, Y. *et al.* Aldehyde dehydrogenase 1 A1-positive cell population is enriched in tumor-initiating cells and associated with progression of bladder cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **19**, 327–337 (2010).
 129. Kitamura, H. *et al.* Prognostic impact of the expression of ALDH1 and SOX2 in urothelial cancer of the upper urinary tract. *Mod. Pathol.* **26**, 117–124 (2013).

130. Shen, H. *et al.* Sox4 expression confers bladder cancer stem cell properties and predicts for poor patient outcome. *Int. J. Biol. Sci.* **11**, 1363–1375 (2015).
131. Jun, J. S., Peng, G. Z., Zi, M. W., Wei, M. G. & Xiang, M. C. Identification of side population cells from bladder cancer cells by dyecycle violet staining. *Cancer Biol. Ther.* **7**, 1663–1668 (2008).
132. Ning, Z. F. *et al.* Subpopulations of stem-like cells in side population cells from the human bladder transitional cell cancer cell line T24. *J. Int. Med. Res.* **37**, 621–630 (2009).
133. Holland, J. D., Klaus, A., Garratt, A. N. & Birchmeier, W. Wnt signaling in stem and cancer stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **25**, 254–264 (2013).
134. de Sousa e Melo, F. & Vermeulen, L. Wnt signaling in cancer stem cell biology. *Cancers (Basel)*. **8**, 1–18 (2016).
135. Cojoc, M. *et al.* Aldehyde dehydrogenase is regulated by β -Catenin/TCF and promotes radioresistance in prostate cancer progenitor cells. *Cancer Res.* **75**, 1482–1494 (2015).
136. Condello, S. *et al.* β -Catenin-regulated ALDH1A1 is a target in ovarian cancer spheroids. *Oncogene* **34**, 2297–2308 (2015).
137. Reya, T. & Clevers, H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* **434**, 843–850 (2005).
138. Clevers, H. & Nusse, R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell* **149**, 1192–1205 (2012).
139. Mohammed, M. K. *et al.* Wnt/ β -catenin signaling plays an ever-expanding role in stem cell self-renewal, tumorigenesis and cancer chemoresistance. *Genes Dis.* **3**, 11–40 (2016).
140. Li, V. S. W. *et al.* Wnt Signaling through Inhibition of β -Catenin Degradation in an Intact Axin1 Complex. *Cell* **149**, 1245–1256 (2012).
141. Yang, L. *et al.* Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. *Signal Transduct. Target. Ther.* **5**, 1–35 (2020).
142. Yeung, J. *et al.* β -Catenin Mediates the Establishment and Drug Resistance of MLL Leukemic Stem Cells. *Cancer Cell* **18**, 606–618 (2010).
143. Bisson, I. & Prowse, D. M. WNT signaling regulates self-renewal and differentiation of prostate cancer cells with stem cell characteristics. *Cell Res.* **19**, 683–697 (2009).
144. Jang, G. B. *et al.* Blockade of Wnt/ β -catenin signaling suppresses breast cancer metastasis by inhibiting CSC-like phenotype. *Sci. Rep.* **5**, 1–15 (2015).
145. Yang, L. *et al.* LGR5 promotes breast cancer progression and maintains stem-like cells through activation of wnt/ β -catenin signaling. *Stem Cells* **33**, 2913–2924 (2015).

146. Urakami, S. *et al.* Epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 plays an important role in bladder cancer through aberrant canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Clin. Cancer Res.* **12**, 383–391 (2006).
147. Kastritis, E. *et al.* Somatic mutations of adenomatous polyposis coli gene and nuclear β -catenin accumulation have prognostic significance in invasive urothelial carcinomas: Evidence for Wnt pathway implication. *Int. J. Cancer* **124**, 103–108 (2009).
148. Pierzynski, J. A. *et al.* Genetic variants in the Wnt/ β -Catenin signaling pathway as indicators of bladder cancer risk. *J. Urol.* **194**, 1771–1776 (2015).
149. Yoshida, T. *et al.* Three-dimensional organoid culture reveals involvement of Wnt/ β -catenin pathway in proliferation of bladder cancer cells. *Oncotarget* **9**, 11060–11070 (2018).
150. Mizushima, N. & Komatsu, M. Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell* **147**, 728–741 (2011).
151. Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y. & Ohsumi, Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: Lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 458–467 (2009).
152. Galluzzi, L. *et al.* Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J.* **36**, 1811–1836 (2017).
153. Wirawan, E., Berghe, T. Vanden, Lippens, S., Agostinis, P. & Vandenabeele, P. Autophagy: For better or for worse. *Cell Res.* **22**, 43–61 (2012).
154. Silva, V. R., Neves, S. P., Santos, L. de S., Dias, R. B. & Bezerra, D. P. Challenges and therapeutic opportunities of autophagy in cancer therapy. *Cancers (Basel)*. **12**, 1–36 (2020).
155. Konac, E., Kurman, Y. & Baltaci, S. Contrast effects of autophagy in the treatment of bladder cancer. *Exp. Biol. Med.* **246**, 354–367 (2021).
156. Hershko, A. & Ciechanover, A. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425–479 (1998).
157. Ciechanover, A. & Iwai, K. The ubiquitin system: From basic mechanisms to the patient bed. *IUBMB Life* **56**, 193–201 (2004).
158. Teixeira, L. K. & Reed, S. I. Ubiquitin ligases and cell cycle control. *Annu. Rev. Biochem.* **82**, 387–414 (2013).
159. Weissman, A. M. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 169–178 (2001).

160. Pickart, C. M. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 503–533 (2001).
161. Nakayama, K. I. K. & Nakayama, K. I. K. Ubiquitin ligases: Cell-cycle control and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 369–381 (2006).
162. Bi, Y., Cui, D., Xiong, X. & Zhao, Y. The characteristics and roles of β -TrCP1/2 in carcinogenesis. *FEBS J.* **288**, 3351–3374 (2021).
163. Fuchs, S. Y., Spiegelman, V. S. & Suresh Kumar, K. G. The many faces of b-TrCP E3 ubiquitin ligases: reflections in the magic mirror of cancer. *Oncogene* **23**, 2028–2036 (2004).
164. Frescas, D. & Pagano, M. Deregulated proteolysis by the F-box proteins SKP2 and β -TrCP: Tipping the scales of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 438–449 (2008).
165. Yan, L. *et al.* Emerging roles of F-box proteins in cancer drug resistance. *Drug Resist. Updat.* **49**, 1–14 (2020).
166. Wang, T. H., Wang, H. S. & Soong, Y. K. Paclitaxel-induced cell death: Where the cell cycle and apoptosis come together. *Cancer* **88**, 2619–2628 (2000).
167. Pan, Z. & Gollahon, L. Taxol directly induces endoplasmic reticulum-associated calcium changes that promote apoptosis in breast cancer cells. *Breast J.* **17**, 56–70 (2011).
168. Oki, Y. *et al.* Experience with obatoclax mesylate (GX15-070), a small molecule pan-Bcl-2 family antagonist in patients with relapsed or refractory classical Hodgkin lymphoma. *Blood* **119**, 2171–2172 (2012).
169. Tanida, I., Ueno, T. & Kominami, E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 2503–2518 (2004).
170. Klionsky, D. J. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition). *Autophagy* 1–382 (2021).
171. Pattingre, S. *et al.* Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* **122**, 927–939 (2005).
172. Wirawan, E. *et al.* Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell Death Dis.* **1**, 1–10 (2010).
173. Huang, S. M. A. *et al.* Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature* **461**, 614–620 (2009).
174. Zhang, L. *et al.* Tumorspheres derived from prostate cancer cells possess chemoresistant

- and cancer stem cell properties. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **138**, 675–686 (2012).
175. Luczak, M. W. & Zhitkovich, A. Monoubiquitinated γ -H2AX: Abundant product and specific biomarker for non-apoptotic DNA double-strand breaks. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **355**, 238–246 (2018).
176. Herrero Ruíz, J. A. *BÚSQUEDA DE NUEVOS SUSTRATOS DE SCF-BTRCP IMPLICADOS EN TUMORIGÉNESIS (Tesis Doctoral)*. (Universidad de Sevilla, 2015).
177. Cruz-García, A., López-Saavedra, A. & Huertas, P. BRCA1 accelerates CtIP-mediated DNA-end resection. *Cell Rep.* **9**, 451–459 (2014).
178. Huang, H. C., Shi, J., Orth, J. D. & Mitchison, T. J. Evidence that Mitotic Exit Is a Better Cancer Therapeutic Target Than Spindle Assembly. *Cancer Cell* **16**, 347–358 (2009).
179. National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=cancer&term=obatoclox&cntry=&state=&city=&dist=>. Acceso el 19 de junio de 2021.
180. Jiménez-Guerrero, R. *et al.* Obatoclox and paclitaxel synergistically induce apoptosis and overcome paclitaxel resistance in urothelial cancer cells. *Cancers (Basel)*. **10**, 1–17 (2018).
181. Steele, T. M. *et al.* Obatoclox, a BH3 mimetic, enhances cisplatin-induced apoptosis and decreases the clonogenicity of muscle invasive bladder cancer cells via mechanisms that involve the inhibition of pro-survival molecules as well as cell cycle regulators. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1–15 (2019).
182. Stamelos, V. A. *et al.* The BH3 mimetic obatoclox accumulates in lysosomes and causes their alkalization. *PLoS One* **11**, 1–20 (2016).
183. Lieber, J. *et al.* Apoptosis sensitizers enhance cytotoxicity in hepatoblastoma cells. *Pediatr. Surg. Int.* **28**, 149–159 (2012).
184. Martin, A. P. *et al.* Inhibition of MCL-1 enhances lapatinib toxicity and overcomes lapatinib resistance via BAK-dependent autophagy. *Cancer Biol. Ther.* **8**, 2084–2096 (2009).
185. Wei, Y. *et al.* The combination of a histone deacetylase inhibitor with the Bcl-2 homology domain-3 mimetic GX15-070 has synergistic antileukemia activity by activating both apoptosis and autophagy. *Clin. Cancer Res.* **16**, 3923–3932 (2010).
186. Champa, D. *et al.* Obatoclox kills anaplastic thyroid cancer cells by inducing lysosome neutralization and necrosis. *Oncotarget* **7**, 34453–34471 (2016).
187. Or, C. H. R. *et al.* Obatoclox, a pan-BCL-2 inhibitor, downregulates survivin to induce apoptosis in human colorectal carcinoma cells via suppressing WNT/ β -catenin signaling.

- Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–16 (2020).
188. Heidari, N., Hicks, M. A. & Harada, H. GX15-070 (obatoclox) overcomes glucocorticoid resistance in acute lymphoblastic leukemia through induction of apoptosis and autophagy. *Cell Death Dis.* **1**, 1–10 (2010).
 189. Wei, W. J. *et al.* Obatoclox and LY3009120 efficiently overcome Vemurafenib resistance in Differentiated Thyroid Cancer. *Theranostics* **7**, 987–1001 (2017).
 190. Pan, J. *et al.* The BH3-mimetic GX15-070 induces autophagy, potentiates the cytotoxicity of carboplatin and 5-fluorouracil in esophageal carcinoma cells. *Cancer Lett.* **293**, 167–174 (2010).
 191. Oberstein, A., Jeffrey, P. D. & Shi, Y. Crystal structure of the Bcl-XL-beclin 1 peptide complex: Beclin 1 is a novel BH3-only protein. *J. Biol. Chem.* **282**, 13123–13132 (2007).
 192. Erlich, S. *et al.* Differential interactions between Beclin 1 and Bcl-2 family members. *Autophagy* **3**, 561–568 (2007).
 193. Cho, D. H. *et al.* Caspase-mediated cleavage of ATG6/Beclin-1 links apoptosis to autophagy in HeLa cells. *Cancer Lett.* **274**, 95–100 (2009).
 194. Luo, S. & Rubinsztein, D. C. Apoptosis blocks Beclin 1-dependent autophagosome synthesis: An effect rescued by Bcl-xL. *Cell Death Differ.* **17**, 268–277 (2010).
 195. Li, H., Wang, P., Yu, J. & Zhang, L. Cleaving Beclin 1 to suppress autophagy in chemotherapy-induced apoptosis. *Autophagy* **7**, 1239–1241 (2011).
 196. Tang, Y. *et al.* Obatoclox and lapatinib interact to induce toxic autophagy through NOXA. *Mol. Pharmacol.* **81**, 527–540 (2012).
 197. Sharma, A. *et al.* BECN1 and BIM interactions with MCL-1 determine fludarabine resistance in leukemic B cells. *Cell Death Dis.* **4**, 1–10 (2013).
 198. Koehler, B. C. *et al.* Pan-Bcl-2 inhibitor obatoclox delays cell cycle progression and blocks migration of colorectal cancer cells. *PLoS One* **9**, 1–11 (2014).
 199. Zhong, D. *et al.* Obatoclox induces G1/G0-phase arrest via p38/p21waf1/Cip1 signaling pathway in human esophageal cancer cells. *J. Cell. Biochem.* **115**, 1624–1635 (2014).
 200. Sloss, O., Topham, C., Diez, M. & Taylor, S. Mcl-1 dynamics influence mitotic slippage and death in mitosis. *Oncotarget* **7**, 5176–5192 (2016).
 201. Inuzuka, H. *et al.* SCFFBW7 regulates cellular apoptosis by targeting MCL1 for ubiquitylation and destruction. *Nature* **471**, 104–109 (2011).
 202. Wertz, I. E. *et al.* Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and

- FBW7. *Nature* **471**, 110–114 (2011).
203. Levine, B., Sinha, S. C. & Kroemer, G. Bcl-2 family members: Dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy* **4**, 600–606 (2008).
204. Tompkins, K. D. & Thorburn, A. Regulation of apoptosis by autophagy to enhance cancer therapy. *Yale J. Biol. Med.* **92**, 707–718 (2019).
205. De La Cruz-Morcillo, M. A. *et al.* P38MAPK is a major determinant of the balance between apoptosis and autophagy triggered by 5-fluorouracil: Implication in resistance. *Oncogene* **31**, 1073–1085 (2012).
206. O'Donovan, T. R., O'Sullivan, G. C. & McKenna, S. L. Induction of autophagy by drug-resistant esophageal cancer cells promotes their survival and recovery following treatment with chemotherapeutics. *Autophagy* **7**, 509–524 (2011).
207. Amaravadi, R. K. *et al.* Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a. *J. Clin. Invest.* **117**, 326–336 (2007).
208. Jung, H. J. *et al.* The anticancer effect of chaetocin is enhanced by inhibition of autophagy. *Cell Death Dis.* **7**, 1–8 (2016).
209. Wang, F. *et al.* Chloroquine Enhances the Radiosensitivity of Bladder Cancer Cells by Inhibiting Autophagy and Activating Apoptosis. *Cell. Physiol. Biochem.* **45**, 54–66 (2018).
210. Kang, M. *et al.* Concurrent autophagy inhibition overcomes the resistance of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in human bladder cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1–11 (2017).
211. Schlütermann, D. *et al.* Targeting urothelial carcinoma cells by combining cisplatin with a specific inhibitor of the autophagy-inducing class III PtdIns3K complex. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* **36**, 160.e1-160.e13 (2018).
212. Dyshlovoy, S. A. *et al.* The marine triterpene glycoside frondoside A induces p53-independent apoptosis and inhibits autophagy in urothelial carcinoma cells. *BMC Cancer* **17**, 1–10 (2017).
213. Lin, J. F. *et al.* Cisplatin induces protective autophagy through activation of BECN1 in human bladder cancer cells. *Drug Des. Devel. Ther.* **11**, 1517–1533 (2017).
214. Phiboonchaiyanan, P. P. & Chanvorachote, P. Suppression of a cancer stem-like phenotype mediated by alpha-lipoic acid in human lung cancer cells through down-regulation of β -catenin and Oct-4. *Cell. Oncol.* **40**, 497–510 (2017).
215. Jiang, R., Niu, X., Huang, Y. & Wang, X. β -Catenin is important for cancer stem cell generation and tumorigenic activity in nasopharyngeal carcinoma. *Acta Biochim. Biophys.*

- Sin. (Shanghai)*. **48**, 229–237 (2015).
216. Chen, Y. W. Y. C. *et al.* Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells. *PLoS One* **3**, 1–14 (2008).
217. Lee, S. H. *et al.* Wnt/ β -catenin signalling maintains self-renewal and tumourigenicity of head and neck squamous cell carcinoma stem-like cells by activating Oct4. *J. Pathol.* **234**, 99–107 (2014).
218. Goto, T. *et al.* Estrogen receptor- β signaling induces cisplatin resistance in bladder cancer. *Am. J. Cancer Res.* **10**, 2523–2534 (2020).
219. Guo, Y. *et al.* Non-coding RNA NEAT1/MIR-214-3P contribute to doxorubicin resistance of urothelial bladder cancer preliminary through the Wnt/ β -catenin pathway. *Cancer Manag. Res.* **10**, 4371–4380 (2018).
220. Xie, D., Zhang, H., Hu, X. & Shang, C. Knockdown of long non-coding RNA Taurine Up-Regulated 1 inhibited doxorubicin resistance of bladder urothelial carcinoma via Wnt/ β -catenin pathway. *Oncotarget* **8**, 88689–88696 (2017).
221. Chehrazi-Raffle, A., Dorff, T. B., Pal, S. K. & Lyou, Y. Wnt/ β -catenin signaling and immunotherapy resistance: Lessons for the treatment of urothelial carcinoma. *Cancers (Basel)*. **13**, 1–13 (2021).
222. Larzabal, L. *et al.* Differential effects of drugs targeting cancer stem cell (CSC) and non-CSC populations on lung primary tumors and metastasis. *PLoS One* **8**, 1–13 (2013).
223. Kim, S. & Alexander, C. M. Tumorsphere assay provides more accurate prediction of in vivo responses to chemotherapeutics. *Biotechnol. Lett.* **36**, 481–488 (2014).
224. Zhao, P. *et al.* Expression of OCT4 protein in bladder cancer and its clinicopathological implications. *J. South. Med. Univ.* **32**, 643–646 (2012).
225. Abdou, A. G., El-Wahed, M. M. A., Kandil, M. A. E., Samaka, R. M. & Elkady, N. Immunohistochemical analysis of the role and relationship between Notch-1 and Oct-4 expression in urinary bladder carcinoma. *Apmis* **121**, 982–996 (2013).
226. Huang, P. *et al.* Implications of transcriptional factor, OCT-4, in human bladder malignancy and tumor recurrence. *Med. Oncol.* **29**, 829–834 (2012).
227. N, X. *et al.* Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) expression is associated with a poor prognosis of bladder cancer. *Cancer Epidemiol.* **39**, 375–381 (2015).
228. Garg, M. & Maurya, N. WNT/ β -catenin signaling in urothelial carcinoma of bladder. *World J Nephrol* **8**, 83–94 (2019).

229. Wu, K. *et al.* Silibinin inhibits β -catenin/ZEB1 signaling and suppresses bladder cancer metastasis via dual-blocking epithelial-mesenchymal transition and stemness. *Cell. Signal.* **25**, 2625–2633 (2013).
230. Liang, Z. *et al.* Curcumin reversed chronic tobacco smoke exposure induced urocytic emt and acquisition of cancer stem cells properties via wnt/ β -catenin. *Cell Death Dis.* **8**, 1–12 (2017).
231. Massari, F. *et al.* The route to personalized medicine in bladder cancer: where do we stand? *Target. Oncol.* **10**, 325–336 (2015).
232. Krishnamurthy, N. & Kurzrock, R. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors. *Cancer Treat. Rev.* **62**, 50–60 (2018).
233. Li, L. *et al.* Codelivery of salinomycin and docetaxel using poly(d, l-lactic-co-glycolic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles to target both gastric cancer cells and cancer stem cells. *Anticancer. Drugs* **28**, 989–1001 (2017).
234. Bellmunt, J. *et al.* Gene expression of ERCC1 as a novel prognostic marker in advanced bladder cancer patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *Ann. Oncol.* **18**, 522–528 (2007).
235. Narod, S. A. & Foulkes, W. D. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 665–676 (2004).
236. Sakai, W. *et al.* Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. *Nature* **451**, 1116–1120 (2008).
237. Yun, M. H. & Hiom, K. CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle. *Nature* **459**, 460–463 (2009).
238. Zhang, Y. Z. *et al.* XRCC2-Deficient Cells are Highly Sensitive to 5-Fluorouracil in Colorectal Cancer. *Cell. Physiol. Biochem.* **43**, 1207–1219 (2017).
239. Johnson, N. *et al.* Stabilization of mutant BRCA1 protein confers PARP inhibitor and platinum resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 17041–17046 (2013).
240. Jian, W. *et al.* Activity of CEP-9722, a poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor, in urothelial carcinoma correlates inversely with homologous recombination repair response to DNA damage. *Anticancer. Drugs* **25**, 878–886 (2014).
241. Rimar, K. J., Tran, P. T., Matulewicz, R. S., Hussain, M. & Meeks, J. J. The emerging role of homologous recombination repair and PARP inhibitors in genitourinary malignancies. *Cancer* **123**, 1912–1924 (2017).
242. Liu, Q. *et al.* PARP-1 inhibition with or without ionizing radiation confers reactive oxygen

- species-mediated cytotoxicity preferentially to cancer cells with mutant TP53. *Oncogene* **37**, 2793–2805 (2018).
243. Glodzik, D. *et al.* Comprehensive molecular comparison of BRCA1 hypermethylated and BRCA1 mutated triple negative breast cancers. *Nat. Commun.* **11**, 1–16 (2020).
244. Limón-Mortés, M. C. *et al.* UV-induced degradation of securin is mediated by SKP1-CUL1- β TrCP E3 ubiquitin ligase. *J. Cell Sci.* **121**, 1825–1831 (2008).
245. Giráldez, S. *et al.* SCFFBXW7 α modulates the intra-S-phase DNA-damage checkpoint by regulating Polo like kinase-1 stability. *Oncotarget* **5**, 4370–4383 (2014).
246. Galindo-Moreno, M. *et al.* SCF(FBXW7)-mediated degradation of p53 promotes cell recovery after UV-induced DNA damage. *FASEB J.* **33**, 11420–11430 (2019).
247. He, N. *et al.* Regulation of lung cancer cell growth and invasiveness by β -TRCP. *Mol. Carcinog.* **42**, 18–28 (2005).
248. Liang, J. *et al.* β -transducin repeat-containing E3 ubiquitin protein ligase inhibits migration, invasion and proliferation of glioma cells. *Oncol. Lett.* **14**, 3131–3135 (2017).
249. Busino, L. *et al.* Degradation of Cdc25A by β -TrCP during S phase and in response to DNA damage. *Nature* **426**, 87–91 (2003).
250. Inuzuka, H. *et al.* Phosphorylation by Casein Kinase I promotes the turnover of the Mdm2 oncoprotein via the SCF β -TRCP ubiquitin ligase. *Cancer Cell* **18**, 147–159 (2010).
251. Wang, Z. *et al.* DNA damage-induced activation of ATM promotes β -TRCP-mediated Mdm2 ubiquitination and destruction. *Oncotarget* **3**, 1026–1035 (2012).
252. Islam, S., Dutta, P., Sahay, O. & Santra, M. K. β -TrCP1 facilitates cell cycle checkpoint activation, DNA repair, and cell survival through ablation of β -TrCP2 in response to genotoxic stress. *J. Biol. Chem.* **296**, 1–39 (2021).
253. Qin zhang, Wei wang & Qun gao. β -TRCP-mediated AEBP2 ubiquitination and destruction controls cisplatin resistance in ovarian cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **523**, 274–279 (2020).
254. Shu, J. *et al.* SCF β -TrCP-mediated degradation of TOP2 β promotes cancer cell survival in response to chemotherapeutic drugs targeting topoisomerase II. *Oncogenesis* **9**, 1–14 (2020).
255. Wu, W. *et al.* HERC2 is an E3 ligase that targets BRCA1 for degradation. *Cancer Res.* **70**, 6384–6392 (2010).
256. Lu, Y. *et al.* The F-box Protein FBXO44 Mediates BRCA1 ubiquitination and degradation.

- J. Biol. Chem.* **287**, 41014–41022 (2012).
257. Wang, X. *et al.* HUWE1 interacts with BRCA1 and promotes its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **444**, 549–554 (2014).
258. Yu, X., Fu, S., Lai, M., Baer, R. & Chen, J. BRCA1 ubiquitinates its phosphorylation-dependent binding partner CtIP. *Genes Dev.* **20**, 1721–1726 (2006).
259. Sakamoto, K. M. *et al.* Protacs: Chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 8554–8559 (2001).
260. Khan, S. *et al.* PROteolysis TArgeting Chimeras (PROTACs) as emerging anticancer therapeutics. *Oncogene* **39**, 4909–4924 (2020).
261. Zhang, Y. *et al.* Cancer stem-like cells contribute to cisplatin resistance and progression in bladder cancer. *Cancer Lett.* **322**, 70–77 (2012).
262. Falso, M. J. S., Buchholz, B. A. & White, R. W. D. Stem-like Cells in Bladder Cancer Cell Lines with Differential Sensitivity to Cisplatin. *Anticancer Res.* **32**, 733–738 (2012).
263. Pasadi, S. & Muniyappa, K. Evidence for functional and regulatory cross-talk between Wnt/ β -catenin signalling and Mre11–Rad50–Nbs1 complex in the repair of cisplatin-induced DNA cross-links. *Oncotarget* **11**, 4028–4044 (2020).
264. Ding, Q. *et al.* Degradation of Mcl-1 by β -TrCP Mediates Glycogen Synthase Kinase 3-Induced Tumor Suppression and Chemosensitization. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 4006–4017 (2007).
265. Hart, M. *et al.* The F-box protein β -TrCP associates with phosphorylated β -catenin and regulates its activity in the cell. *Curr. Biol.* **9**, 207–211 (1999).
266. Zhiwei Wang *et al.* DEPTOR ubiquitination and destruction by SCF(β -TrCP). *Am J Physiol Endocrinol Metab* **303**, E163-9 (2012).
267. Wu, X., Luo, F., Li, J., Zhong, X. & Liu, K. Tankyrase 1 inhibitor XAV939 increases chemosensitivity in colon cancer cell lines via inhibition of the Wnt signaling pathway. *Int. J. Oncol.* **48**, 1333–1340 (2016).

ANEXOS

1. Datos suplementarios

Tabla S1. Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio de expresión de Mcl-1.
Mcl-1: Bajo=0, Alto=1; TNM: Estadaje clínico; Sup. Gl.: Supervivencia global; *: Exitus no relacionado con cáncer de vejiga (estos pacientes no fueron incluidos en el análisis de Kaplan-Meier).

Paciente	Grado tumoral	TNM	Género	Edad	Mcl-1	Sup. Gl. (meses)	Recaída (meses)
1	G2	TaN0M0	M	73	0	108	
2	G3	T1bN0Mx	M	73	0	24	24 exitus*
3	G1	TaN0M0	M	61	0	100	
4	G3	T1N0M0	M	73	0	120	
5	G1	TaN0M0	M	64	0	94	
6	G1	TaN0M0	F	53	0	96	
7	G2	T1N0M0	M	75	0	24	24 exitus
8	G1	TaN0M0	F	79	0	120	
9	G1	TaN0M0	M	77	0	120	
10	G1	TaN0M0	M	73	0	96	
11	G1	TaN0M0	M	58	0	75	75 exitus*
12	G2	T1N0M0	M	53	0	96	
13	G1	TaN0M0	M	75	0	108	
14	G2	T1N0M0	M	79	0	24	
15	G2	T1aN0M0	M	83	0	60	
16	G1	TaN0M0	M	71	0	96	
17	G1	TaN0M0	M	74	0	96	
18	G1	TaN0M0	M	82	0	85	
19	G1	TaN0M0	M	70	0	110	
20	G1	TaN0M0	M	72	0	100	
21	G1	T1aN0M0	M	71	0	75	75 exitus*
22	G2	TaN0M0	F	74	0	108	
23	G3	T1aN0M0	M	73	0	48	48 exitus
24	G2	TaN0M0	M	70	0	108	
25	G1	TaN0M0	M	43	0	108	96
26	G1	TaN0M0	M	51	0	104	
27	G2	T1aN0M0	M	88	0	24	
28	G1	TaN0M0	M	73	0	104	
29	G1	T1N0M0	M	61	0	106	
30	G3	T1aN0M0	M	69	0	104	
31	G1	TaN0M0	M	80	0	106	
32	G1	TaN0M0	M	50	0	108	
33	G1	TaN0M0	M	57	0	108	
34	G3	T1N0M0	M	55	1	96	
35	G1	TaN0M0	F	85	0	48	
36	G1	TaN0M0	M	57	0	108	
37	G1	TaN0M0	F	61	0	128	
38	G1	TaN0M0	M	69	0	156	
39	G2	TaN0M0	M	72	0	24	24 exitus*
40	G1	TaN0M0	M	66	0	108	
41	G2	TaN0M0	F	72	0	110	
42	G2	TaN0M0	M	72	0	106	94
43	G1	TaN0M0	F	49	0	108	100
44	G2	TaN0M0	M	81	0	48	
45	G2	TaN0M0	M	46	0	108	

46	G2	TaN0M0	F	77	0	96	
47	G2	T1aN0M0	M	75	0	48	48 exitus*
48	G3	T1N0M0	M	64	0	108	
49	G1	TaN0M0	M	65	0	108	
50	G1	TaN0M0	M	62	1	96	
51	G1	TaN0M0	M	74	0	52	52 exitus*
52	G2	T1N0M0	M	74	0	50	50 exitus*
53	G1	TaN0M0	M	51	0	108	
54	G3	T2N1M1	M	71	1	64	64 exitus
55	G3	T3N2M1	M	77	1	20	20 exitus
56	G3	T2N2M1	F	45	0	132	120
57	G3	T2N2M1	F	77	1	36	36 exitus
68	G2	T2NxMx	M	70	0	130	118
59	G3	T2N1M1	M	63	1	20	20 exitus
60	G3	T2N1M1	M	70	1	11	11 exitus
61	G3	T2N1M1	M	41	1	38	38 exitus
62	G3	T2NxM1	M	75	1	15	15 exitus
63	G3	T2N1M1	F	62	1	14	14 exitus
64	G3	T2N0M0	M	81	1	36	
65	G3	T2N0M0	M	46	0	108	
66	G3	T2NxMx	F	84	0	36	36 exitus
67	G3	T2N0Mx	M	69	1	96	
68	G3	T2N0M0	M	73	0	85	
69	G2	T2NxMx	M	71	0	12	12 exitus*
70	G3	T4N1M1	M	80	0	6	6 exitus
71	G3	T2N0M0	M	75	1	15	15 exitus
72	G3	T2N1M1	M	60	1	24	24 exitus

Tabla S2. Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio de expresión diferencial y posterior validación. En negrita se marcan los pacientes elegidos en primer lugar para el *microarray*.

Paciente	Grado Tumoral	Categoría pT	Infiltración
1	G2	pT2	SI
3	G4	pT3	SI
5	G2	pT2b	SI
7	G3	pT2	SI
8	Alto (G3)	pT2	SI
11	Alto (G4)	pT2	SI
13	G2	pT2	SI
15	G3	pT2	SI
22	Bajo (G1)	pT1	NO
25	G3	pT2	SI
26	G3	pT2	SI
32	G3	pT3b	SI

36	G1	pTa	NO
39	G3	pT4	SI
41	G1	pTa	NO
42	G1	pTa	NO
44	G1	pTa	NO
46	Alto (G3)	pT1a	SI
47	G1	pTa	NO
48	G1	pTa	NO
50	G1	pTa	NO
51	Alto (G3)	pTX	SI
52	Bajo (G1)	pTa	NO
53	Alto (G3)	pT2	SI
54	Bajo (G1)	pTa	NO
55	Bajo (G1)	pTa	NO
56	Bajo (G1)	pTa	NO
59	Bajo (G2)	pTa	NO
61	Bajo (G1)	pTa	NO
67	G3	pT2	SI
71	Alto (G3)	pT1	SI
72	Bajo (G1)	pTa	NO
73	Bajo (G1)	pTa	NO
75	G1	pTa	NO
76	Alto (G2)	pT1	SI
78	Alto (G3)	pT2	SI
79	G2	pTa	NO
83	G3	pT2	SI
84	Alto (G3)	pT2	SI
87	Alto (G3)	pT1	SI
90	G1	pTa	NO
92	G3	pT2	SI
93	Alto (G3)	pT2	SI
98	G1	pTa	NO
99	Bajo (G2)	pTa	NO
103	Bajo (G1)	pTa	NO
107	G3	pT2	SI
111	G1	pTa	NO
112	G1	pTa	NO
114	G1	pTa	NO
120	G3	pT2	SI

Tabla S3. Genes diferencialmente expresados comunes en las comparativas alto grado vs bajo grado e infiltrantes vs no infiltrantes.

Listado de genes comunes expresados diferencialmente en los dos análisis de microarrays
VDR ESPL1 CAPN8 XCL1 CCDC102B C1orf106 BTG2 GOLT1A SPINK1 IQGAP3 RTKN2 MST1R DHCR24 CNTN3 CACNA1D ADARB1 MCCC1 HSD17B2 ARHGAP11A MPPED2 TMEM139 IDO1 BTBD3 ALDH1L1 HAS3 PPP1R13L ZDHHC2 MBNL2 GJD3 TPX2 HMGCS2 FCGR2A ODF2 ID3 S100P D4S234E C15orf48 MLF1IP CCNB1 SMC2 SHCBP1 UPK1A FOXQ1 EFNA5 GDA XK CAPNS2 MMRN2 MET ASPM UNC5B FPR3 ATP2C2 LMNB1 KCTD15 HOXA1 PCDH1 SPAG5 GATA3 LSP1 UGT1A1 RORA CYP4X1 CD59 CALB1 SORL1 ALOX5 PLEK SLC44A3 ELOVL5 CYP4F22 RFC3 PLEK2 GPNMB PTPN22 ITGA3 BRCA1 GEN1 INPP4B TGM2 GHITM HNMT EFNB1 GINS1 DMKN ENTPD3 C5AR1 NASP S100A4 ANXA10 LGMN PIGZ RP11-44F21.5 HIST2H3A ABCG1 ATAD2 PDLIM1 UGT2B7 DNMT1 ID4 PCGF5 CTSL1 IL12RB2 SEL1L3 SMAD3 ADHFE1 SAMHD1 DSCC1 ANLN TACC3 UCHL1 DGKH IL9R SELL WHSC1 PLK1 TAP2 ITGB4 VWA5A UBE2C SERPINB9 KNTC1 RASGEF1B KCNAB2 ZNF321P MSMB SRPX2 EZH2 CTLA4 HECTD2 AQP3 POLE2 SGPL1 PRC1 SLC1A4 CASC5 LCOR CDK1 FOXC1 VWA8 CLEC7A PUS7 RNF152 MEIS2 KIF11 CEP55 ORAI3 AZGP1 HLA-DPB1 SDR42E1 TRIM29 ID1 GPR34 GKN1 FKBP1A-SDCBP2 CTSE TUSC3 DUSP2 IFI30 KIF18B BCAM ADAM19 CORO1A SP140 ANKRD36 CHST11 MGST2 KLF5 MYEF2 CTPS1 ASF1B RASSF2 TOP2A EHD3 PCP4L1 FYB CXCL9 ABAT RAI14 HOXB3 TNS4 IGSF11 TXNRD1 KRTAP5-9 ZNF367 CFH MAPK10 TBX3 HIST1H2BL NRP2 SLC9A1 CYBB FGFR3 BAGE HOXB6 BCAS1 CDC6 IGHG1 BAG1 CD53 JAG1 IRF6 CIITA TNFRSF10B FBP1 RAPGEFL1 PLA2G7 CST1 UCA1 KIAA0922 CCDC18 FAM72A LOC100509445 AKR1C2 KIF18A MCC PKIB GSTP1 TCF4 ID2 AGTPBP1 DBF4 AURKA RHOBTB2 LOC100996724 DST GPRC5C PDE10A HIST1H2BK KIF14 C10orf99 FLJ23867 CDH24 SMC6 FN1 ABCC4 MAPRE2 PHACTR1 OLFML2B KRT7 PCLO MUC15 HJURP MECOM RAD51AP1 FABP6 WDR67 COL17A1 FAM133A SYCP2 FSTL4 KIAA1524 C1orf112 DGKA OXCT1 CXCL10 CKS1B ZNF626 LAMB3 FLRT3 LCP2 RNASEH2A BTBD16 RASSF4 MKI67 GSTM2P1 PPFIBP2 HOXB5 C4orf19 CYP3A5 EDARADD CENPJ STARD3 HOXB8 GPR126 GSTO2 MYOF MIR205HG CDH23 FANCA ASAP1 NLRP1 TSSK1B C5 CDCA2 FRMD6 CIT FYN AKR1C1 FAM3B BLM SH3KBP1 FERMT1 MMD CERKL ITGB6 PLCD3 TCF7L2 NTF4 HIST1H3D ME3 VIM CD84 NCAPG2 APH1B ANXA8 CTNND1 LYZ HLA-DMB GSTO1 AK5 DUOXA1 NREP ZNF827 KRT8 CCDC150 GATA2 BAGE2 TMPRSS4 C12orf56 MCM6 TRAK1 AKAP2 SHROOM2 MPP1 RAB39A TNNT2 PARBP CRTAC1 HIST1H2BM KALRN SSH3 KIF20A NT5DC3 CYTH2 CPM VSIG2 CKAP5 LMCD1 CCSAP FGF12 IRF8 SGOL2 ANK3 FCGR3A PYHIN1 HIST1H2BD CCND1 ADH6 TPPP WIPF1 UST BMP2 NLGN4Y C5orf34 FKBP5 TRBC1 ST3GAL5 CSAG2 CTSH NDFIP2 TYMS CDCA7 ADAM22 ANKRD36BP2 MXRA5 DENND5B PLCD4 GPX2 CD9 C1orf186 IGFBP4 HIST2H2AB NBPFF14 CDC20 CENPN CEP128 FAM111B FCRLB KRTAP5-10 ZWINT APOL1 MTBP BCAT1 MFAP3L NDC80 SLC2A9 AIF1L LPAR1 ITGA2 KIAA0101 PSCA MACROD2 TESC C15orf54 MCTP2 EOGT LDOC1 PLK4 GGT6 RFC4 AUTS2 CCNA2 HIST1H2AG TTK TFF1 PPM1N GTSE1 SNX14 TRNP1 HOXB2 WNT7B MCM8 CDKN3 EPB41L5 FAM3D DHRS3 POLQ CYP2J2 NUF2 THEMIS2 MR1 NCAPG ZBTB46 SLITRK6 RASSF6 PTPN13 ORAOV1 DROSHA CHD1L POLA2 AADAT FXYD3 CYP24A1 PRR11 PASK SLC16A1 PCDHGB1 MOGAT2 CA12 MAD2L2 INSIG1 HLA-QA1 CBX2 PTTG1 APOC1 NEK2 HCAR1 GRAMD3 FANCB CDCA5 TP63 GINS2 STMN1 SMAD6 CENPF NUSAP1 KCNQ1 SMARCA1 TRIM6 CKS2 AGR2 FANCD2 EFS SPOCD1 PDE3B ZNF33B DEPDC1 KIF23 DHRS2 ASPN PTPRC SH2D4A CDC25A HIST1H2BF CDCA8 XRCC2 ITGA4

2. Recetas

Medios de cultivo utilizados:

Medio RPMI 1640 suplementado	Medio de congelación RPMI 1640	Medio MEM/EBSS suplementado	Medio de congelación MEM/EBSS
Medio RPMI 1640	Medio RPMI 1640	Medio MEM/EBSS	Medio MEM/EBSS
10% FBS (Sigma)	30% FBS (Sigma)	10% FBS (Biowest)	50% FBS (Biowest)
2 mM L-Glutamina	2 mM L-Glutamina		
10 mM Hepes	10 mM Hepes	1 mM aminoácidos no esenciales	1 mM aminoácidos no esenciales
1% mezcla de penicilina y estreptomicina			
	10% DMSO		7% DMSO

Medio McCoy's 5A suplementado	Medio de congelación McCoy's 5A	Medio MammoCult completo
Medio McCoy's 5A	Medio McCoy's 5A	Medio MammoCult
10% FBS (Sigma)	30% FBS (Sigma)	10% suplemento MammoCult
		4 µg/ml Heparina
1 mM aminoácidos no esenciales	1 mM aminoácidos no esenciales	0,48 µg/ml Hidrocortisona
1% mezcla de penicilina y estreptomicina	1% mezcla de penicilina y estreptomicina	1% mezcla de penicilina y estreptomicina
	10% DMSO	

Tampones usados para la técnica de FISH:

Solución SSC pH 7 20X	Solución SSC 2X/NP40 0.3%
3 M NaCl	300 mM NaCl
0,3 M citrato trisódico	30 mM citrato trisódico
ajustar pH a 7,0 con HCl	0,3% NP40
H ₂ O bidestilada	H ₂ O bidestilada

Tampones usados para la extracción y desnaturalización de proteínas:

Tampón NP40	Tampón RIPA 1X	Tampón Laemmli 5X
1% NP40	1% NP40	0,1% (p/v) azul de Bromofenol
10 mM Tris-HCl pH 7,5	50 mM Tris-HCl pH 7,5	60 mM Tris-HCl pH 6.8
150 mM NaCl	420 mM NaCl	14,4 mM β-mercaptoetanol
10% glicerol	10% glicerol	25% glicerol
	1% SDS	2% SDS
	0,5% DOC	
H ₂ O bidestilada	H ₂ O bidestilada	H ₂ O bidestilada

Tampones usados en electroforesis y *western-blot*.

Tampón Tris-HCl 1 M pH 6,8	Tampón Tris-HCl 1 M pH 7,6	Tampón Tris-HCl 1.5 M pH 8,8	Tampón Tris-HCl 2 M pH 7,5
121.14 g/l Trizma Base	121.14 g/l Trizma Base	181.71 g/l Trizma Base	242.28 g/l Trizma Base
ajustar pH a 6,8 con HCl	ajustar pH a 7,6 con HCl	ajustar pH a 8,8 con HCl	ajustar pH a 7,5 con HCl
H ₂ O bidestilada	H ₂ O bidestilada	H ₂ O bidestilada	H ₂ O bidestilada

SDS 10% pH 7,2	Tampón Tris-Glicina 5X	Tampón de transferencia	Solución rojo Ponceau S 1X
181.71 g/l SDS	125 nM Trizma Base	25 nM Trizma Base	0,2% Solución rojo Ponceau S 10X (Sigma)
ajustar pH a 7,2 con NaOH	1 M Glicina	192 nM Glicina	10% ácido acético
	0,5% SDS 10% pH 7,2	20% metanol	
H ₂ O bidestilada			

Tampón Maleico pH 7,5	Tampón de Bloqueo 10%	Tampón de bloqueo 1%	TBS-Tween 20 pH 7,5 10X	Tampón Tris 0,05 M
100 mM ácido maleico	10 g Blocking Reagent	1% Tampón bloqueo 10%	1,5 M NaCl	0,042 M Trizma clorhídrico
150 mM NaCl	100 mL maleico	0,05% solución Tween 20 10%	200 mM Tris-HCl 1M pH 7.6	0,008 M Trizma Base
Ajustar pH a 7,5 con NaOH		0,045 M Tampón Tris 0,05M	0,5% Tween 20	
H ₂ O bidestilada			H ₂ O bidestilada	H ₂ O bidestilada

Reactivos para los geles de acrilamida	Running 12%	Running 10%	Running 8%	Running 6%	Stacking 4%
H ₂ O bidestilada	1600 µl	1900 µl	2300 µl	2600 µl	3620 µl
Solución Acrilam.:Bisacrilam. 29:1	2000 µl	1700 µl	1300 µl	1000 µl	650 µl
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	1300 µl	1300 µl	1300 µl	1300 µl	-
Tris-HCl 1 M pH 6,8	-	-	-	-	50 µl
SDS 10% pH 7,2	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
APS 10%	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	2 µl	2 µl	3 µl	4 µl	5 µl

3. Contribuciones científicas

3.1. Publicaciones científicas

Jiménez-Guerrero R, Gasca J, Flores ML, Pérez-Valderrama B, Tejera-Parrado C, Medina R, Tortolero M, Romero F, Japón MA, Sáez C. *Obatoclax and Paclitaxel Synergistically Induce Apoptosis and Overcome Paclitaxel Resistance in Urothelial Cancer Cells*. *Cancers (Basel)*. 2018 Dec 5;10(12):490. doi: 10.3390/cancers10120490. PMID: 30563080; PMCID: PMC6316685.

Gasca J, Flores ML, **Jiménez-Guerrero R**, Sáez ME, Barragán I, Ruíz-Borrego M, Tortolero M, Romero F, Sáez C, Japón MA. *EDIL3 promotes epithelial-mesenchymal transition and paclitaxel resistance through its interaction with integrin $\alpha_v\beta_3$ in cancer cells*. *Cell Death Discov*. 2020 Sep 16;6:86. doi: 10.1038/s41420-020-00322-x. PMID: 33014430; PMCID: PMC7494865.

Jiménez-Guerrero R, Belmonte A, Flores ML, González M, Pérez-Valderrama B, Romero F, Japón MA, Sáez C. *Wnt/ β -catenin pathway induces bladder cancer resistance to paclitaxel through a CSC-like phenotype*. Manuscrito en preparación.

3.2. Contribuciones a congresos

Póster: M^a Luz Flores de Mera; Carolina Castilla; Jessica Gasca Bellido; **Rocío Jiménez Guerrero**; Francisco Romero Portillo; María Tortolero; Miguel Ángel Japón Rodríguez; Carmen Sáez Torres. *Papel de PKC delta en la apoptosis inducida por Paclitaxel en el cáncer de próstata*. XXXVIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM) 2015

Póster + Comunicación Oral: **Rocío Jiménez Guerrero**; Jessica Gasca Bellido; M^a Luz Flores de Mera; María Tortolero García; Francisco Romero Portillo; Miguel Ángel Japón Rodríguez; Carmen Sáez Torres. *El bloqueo farmacológico de Mcl-1 sensibiliza a las células de cáncer de vejiga al tratamiento con Paclitaxel*. XXXIX Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM) 2016

Póster: Jessica Gasca; **Rocío Jiménez-Guerrero**; M Luz Flores; Alejandro Belmonte; María Tortolero; Miguel A Japón; Carmen Sáez; Carmen Sáez. *Identification of EDIL3 as a novel regulator of EMT which contributes to paclitaxel resistance in breast cancer cells*. XL Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM) 2017

Póster: **Rocío Jiménez Guerrero**; Alejandro Belmonte Fernández; M luz Flores de Mera; María Galindo Moreno; María Tortolero; Francisco Romero; Miguel A Japón Rodríguez; Carmen Sáez Torres. *Implication of the Wnt/ β -catenin pathway in the maintenance of cancer stem cells (CSCs) and tumor progression in bladder cancer*. XLI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM) 2018

Póster: Mónica González-Moreno; **Rocío Jiménez-Guerrero**; M. Luz Flores; Begoña Pérez-Valderrama; Francisco Romero; Miguel A. Japón; Carmen Sáez. *BH3 mimetics sensitize bladder cancer cells to cisplatin treatment*. XLIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM) 2021.