



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Programa de Doctorado de BIOMEDICINA, INVESTIGACIÓN
TRASLACIONAL Y NUEVAS TECNOLOGÍAS EN SALUD

Facultad de Medicina
Universidad de Málaga

TESIS DOCTORAL

**Identificación de nuevas proteínas relacionadas con la resistencia
a radiación ionizante y el envejecimiento celular en *S. cerevisiae***

Autor

Juan Carlos Alamilla Presuel
Enero, 2023

Directores

Miguel José Ruiz Gómez
Antonio Manuel Burgos Molina

Tutor


Miguel José Ruiz Gómez





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Juan Carlos Alamilla Presuel

 <https://orcid.org/0000-0002-7893-7026>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



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

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

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

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

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



ÍNDICE

RESUMEN	25
SUMMARY	27
1. INTRODUCCIÓN	29
1.1 Efectos moleculares de radiación en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
1.2 Tratamiento con radioterapia	32
1.3 Tratamiento con radioterapia de algunas locaciones de tumores	33
1.3.1 <i>Cáncer de mama</i>	33
1.3.2 <i>Cáncer de pulmón</i>	34
1.3.3 <i>Cáncer de hígado y vías biliares</i>	35
1.3.4 <i>Cáncer ginecológico</i>	36
1.3.5 <i>Neoplasias de células plasmáticas</i>	36
1.3.6 <i>Cáncer de células renales</i>	36
1.3.7 <i>Cáncer de cabeza y cuello</i>	37
1.3.8 <i>Metástasis óseas</i>	37
1.4 Resistencia del cáncer al tratamiento con radioterapia	38
1.5 Mecanismos de radiorresistencia en diferentes tumores	38
1.5.1 <i>Cáncer de mama</i>	39
1.5.2 <i>Cáncer de pulmón</i>	40
1.5.3 <i>Cáncer de colon</i>	43
1.5.4 <i>Cáncer rectal</i>	45
1.5.5 <i>Cáncer de próstata</i>	46
1.5.6 <i>Cáncer gástrico</i>	48
1.5.7 <i>Cáncer hepatocelular</i>	49
1.5.8 <i>Cáncer cervical y uterino</i>	49
1.5.9 <i>Cáncer esofágico</i>	50
1.5.10 <i>Cáncer de tiroides</i>	51
1.5.11 <i>Cáncer de vejiga</i>	52
1.5.12 <i>Cáncer pancreático</i>	52
1.5.13 <i>Cáncer renal</i>	53
1.5.14 <i>Cáncer de cabeza y cuello</i>	54
1.5.15 <i>Cáncer oral</i>	56
1.5.16 <i>Cáncer nasofaríngeo</i>	56
1.5.17 <i>Cáncer cerebral y del sistema nervioso central</i>	58

1.5.18	<i>Cáncer óseo</i>	60
1.5.19	<i>Sarcoma</i>	60
1.5.20	<i>Cáncer de piel</i>	61
1.6	Limitaciones y perspectivas	64
1.7	Relación entre radiación y envejecimiento celular	65
1.7.1	<i>Generalidades sobre senescencia celular</i>	65
1.7.2	<i>Senescencia y cáncer</i>	66
1.7.3	<i>El gen p53 y su importancia en radioterapia</i>	67
1.7.4	<i>Interacciones moleculares de p53</i>	68
1.7.5	<i>Medicamentos sensibilizadores</i>	72
1.7.6	<i>Modulación de efectos adversos</i>	74
1.7.7	<i>Marcadores moleculares predictores de respuesta</i>	74
2.	PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS	77
2.1	Planteamiento del problema y justificación	77
2.1.1	<i>Justificación del uso de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo biológico</i>	77
2.2	Objetivos	78
2.2.1	<i>Objetivo general</i>	78
2.2.2	<i>Objetivos específicos</i>	78
3.	MATERIAL Y MÉTODO	79
3.1	Laboratorio	79
3.2	Equipamiento y material fungible	81
3.3	Cepa de levadura	82
3.4	Medios de cultivo	82
3.5	Drop test	82
3.6	Cuantificación de la densidad celular	83
3.7	Selección de resistencia a rayos X, nivel de resistencia y ajuste de modelos radiobiológicos	83
3.8	Irradiación	84
3.9	Ciclo celular	84
3.10	Tamaño de colonias, tamaño celular y contenido en proteínas	84
3.11	Envejecimiento cronológico	85
3.12	Envejecimiento replicativo	85
3.13	Estudio proteómico	86
3.13.1	<i>Preparación de las muestras</i>	86
3.13.2	<i>Digestión triptica en solución y marcaje mediante tandem mass tag (TMT)</i>	86
3.13.3	<i>Cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masas</i>	86
3.13.4	<i>Análisis de los datos</i>	87

3.13.5	<i>Instrumentación usada en la realización del ensayo</i>	87
3.13.6	<i>Análisis de interacciones, función proteica/génica y genes homólogos en humanos</i>	88
3.14	Análisis estadístico	88
4	RESULTADOS	89
4.1	Selección de resistencia a rayos X	89
4.1.1	<i>Ciclo 1: Exposición a 1 kGy</i>	89
4.1.2	<i>Ciclo 2: Exposición a 1,5 kGy</i>	92
4.1.3	<i>Ciclo 3: Exposición a 1,5 kGy</i>	94
4.1.4	<i>Ciclo 4: Exposición a 3 kGy</i>	96
4.1.5	<i>Ciclo 5: Exposición a 3 kGy</i>	99
4.1.6	<i>Ciclo 6: Exposición a 3 kGy</i>	101
4.1.7	<i>Ciclo 7. Exposición a 3 kGy</i>	103
4.2	Tasa de crecimiento y tiempo en alcanzar la fase plateau durante la selección de resistencia	106
4.3	Nivel de resistencia adquirida de la cepa seleccionada con rayos X	107
4.4	Tamaño de colonias	113
4.5	Crecimiento en medio líquido	115
4.6	Ciclo celular	115
4.7	Tamaño celular y contenido en proteínas	117
4.8	Envejecimiento cronológico	118
4.9	Envejecimiento replicativo	120
4.10	Análisis proteómico	121
4.10.1	<i>Proteínas hiperexpresadas (up-regulated)</i>	124
4.10.2	<i>Proteínas hipoexpresadas (down-regulated)</i>	126
4.10.3	<i>Funciones moleculares</i>	127
4.10.4	<i>Procesos biológicos</i>	128
4.10.5	<i>Interacciones funcionales entre proteínas sobreexpresadas (up-regulated)</i>	128
4.10.6	<i>Interacciones funcionales entre proteínas hipoexpresadas (down-regulated)</i>	129
4.10.7	<i>Interacción entre los genes de las proteínas sobreexpresadas</i>	130
4.10.8	<i>Interacción entre los genes de las proteínas hipoexpresadas</i>	140
4.10.9	<i>Interacciones y funciones de los genes/proteínas</i>	149
4.10.10	<i>Genes homólogos humanos</i>	154
5	DISCUSIÓN	157
6	CONCLUSIONES	167
7	REFERENCIAS	169
8	ANEXO 1	183

RESUMEN

Introducción: La aparición de resistencia a radiación en células tumorales expuestas constituye un problema en el abordaje terapéutico de algunos tumores. La radiorresistencia es una preocupación grave, pues provoca un fracaso en la radioterapia y una recaída posterior del tumor. A largo plazo, cualquier estrategia terapéutica en radioterapia deberá tenerse en cuenta las características biológicas que controlan el comportamiento de células madre cancerosas y los mecanismos de la vía de señalización para permitir la implementación de una terapia personalizada. Cada vez hay más evidencia de relación entre envejecimiento celular y radiorresistencia; implicando mecanismos moleculares conjuntos y por tanto posibles marcadores.

Objetivos: Seleccionar una cepa celular de *S. cerevisiae* resistente a rayos X como modelo de estudio de resistencia a radiación ionizante y de envejecimiento celular. Estudiar la relación entre el envejecimiento celular y la resistencia adquirida a rayos X. Realizar un estudio proteómico para buscar marcadores moleculares y evaluar mecanismos de acción implicados.

Material y Método: Se usó una cepa salvaje de *S. cerevisiae* como modelo experimental, la cual se sometió a dosis crecientes y secuenciales de rayos X hasta obtener una cepa derivada resistente. La evaluación de supervivencia se realizó mediante drop test y ensayos de crecimiento celular. El envejecimiento cronológico se evaluó mediante drop test. El estudio proteómico se realizó mediante espectrometría de masas en tándem. Finalmente, para la búsqueda de marcadores y evaluación de mecanismos de acción se realizó un estudio empleando el software ProteinScape 3 acoplado al motor de búsqueda Mascot y la base de datos de secuencias Swiss Prot. El análisis de interacciones y función proteica/génica se llevó a cabo mediante los softwares Genemania, Uniprot y la base de datos del NCBI.

Resultados:

CONFIDENCIAL POR PATENTE EN ESTUDIO

Conclusiones: La levadura *S. cerevisiae* es un buen modelo biológico para estudiar los fundamentos moleculares y celulares de resistencia a radiación ionizante y su relación con el envejecimiento celular. El protocolo de exposición a rayos X induce resistencia adquirida a radiación ionizante. La cepa seleccionada resistente a rayos X presenta un proceso de envejecimiento cronológico retardado, por lo que deben existir mecanismos celulares y moleculares comunes entre ambos fenómenos. Las proteínas hiperexpresadas podrían ser buenos candidatos a biomarcadores de resistencia a radiación ionizante. El fenómeno de resistencia adquirida a rayos X y su relación con el envejecimiento celular son procesos multifactoriales.

CONCLUSIONES

1. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un modelo biológico ideal para estudiar los fundamentos moleculares y celulares de resistencia a radiación ionizante y su relación con el envejecimiento celular, ya que su cultivo y manipulación son muy asequibles, se conoce todo su genoma y muchos procesos celulares están conservados con similitud en células humanas.
2. CONFIDENCIAL POR PATENTE EN ESTUDIO
3. CONFIDENCIAL POR PATENTE EN ESTUDIO
4. El estudio proteómico realizado mostró 24 proteínas hipereexpresadas y 29 hipoexpresadas en la cepa resistente a rayos X. Es especialmente importante destacar el mayor nivel de expresión de los genes TDH2, ENO1, RPL1B-1A, HIS6, PGI1, IPP1. Los altos niveles de expresión de estos genes sugieren su implicación en el proceso de resistencia, por lo que podrían ser buenos candidatos a biomarcadores de resistencia a radiación ionizante.
5. Las mayores alteraciones producidas en las funciones moleculares de la cepa resistente corresponden a alteraciones de proteínas de unión y actividad catalítica. En cuanto a los procesos biológicos, las mayores alteraciones se producen en procesos metabólicos.
6. El fenómeno de resistencia adquirida a rayos X y su relación con el envejecimiento celular son procesos multifactoriales donde intervienen múltiples mecanismos celulares y moleculares, tal y como se deduce de las múltiples proteínas desreguladas y las múltiples interacciones moleculares que se observan entre ellas y con otras proteínas no desreguladas.