

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
FACULTAD DE CIENCIAS



Universidad
Zaragoza

**Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular y Celular**

Trabajo Fin de Máster:

ACTIVIDAD ANTITUMORAL DEL ALCALOIDE NATURAL BERBERINA EN CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS

Presentado por:

Miguel Ángel Martín Serrano

Directores:

Dr. Julián Pardo Jimeno

Dra. Eva M^a Gálvez Buerba

(2013)



D. JULIAN PARDO JIMENO, Doctor en Ciencias Químicas e Investigador Aragón I+D en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular y Profesor Asociado del Departamento de Microbiología, Salud Pública y Medicina Preventiva de la Universidad de Zaragoza y D^a. EVA GÁLVEZ BUERBA, Doctora en Ciencias y Científica Titular en el Instituto de Carboquímica (CSIC).

CERTIFICAN:

Que el Proyecto Máster “ACTIVIDAD ANTITUMORAL DEL ALCALOIDE NATURAL BERBERINA EN CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS”, ha sido realizado por el Licenciado en Bioquímica MIGUEL MARTINEZ en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza bajo su dirección y que reúne, a su juicio, las condiciones requeridas para optar al Título de Máster en Biología Molecular y Celular.

Zaragoza, Septiembre de 2013

Fdo.: D. Julián Pardo Jimeno

D^a. Eva M^a Galvez Buerba

ABREVIATURAS

7-AAD: 7-Amino-Actinomicina D.

Apaf-1: factor 1 de la activación por proteolización de la apoptosis.

ABB: buffer de unión de la anexina.

CARD: dominio de reclutamiento de caspasas

DD: dominio de muerte.

DED: dominio efector de muerte.

DISC: complejo de señalización inductor de muerte.

FITC: isotiocianato de fluoresceína.

IC50: concentración mínima inhibitoria.

IFN: interferon

IL: interleuquina.

LDL: lipoproteínas de baja densidad.

LDLR: receptor de lipoproteínas de baja densidad.

LLC-B: leucemia linfocítica crónica de tipo B.

MDR: complejo de resistencia a drogas.

PBS: suero fisiológico.

PE: ficoeritrina

ROS: especies reactivas de oxígeno.

SFB: suero fetal bobino.

SH: suero de caballo.

TMRE: tetrametilrodamina metil ester.

TNF: factor de necrosis tumoral.

TNFR: receptor del factor de necrosis tumoral.

Z-DEVD-FMK: benciloxycarbonil-Asp-Val-Asp-fluorometilcetona.

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	MUERTE CELULAR.....	1
1.1.1.	Apoptosis.....	1
1.1.2.	Muerte celular que cursa con autofagia.....	2
1.1.3.	Necrosis.....	2
1.2.	APOPTOSIS.....	3
1.2.1.	Ruta extrínseca o de receptores mortales.....	3
1.2.2.	Ruta intrínseca o mitocondrial.....	5
1.3.	CASPASAS	5
1.4.	PROTEÍNAS DE LA FAMILIA Bcl2.....	7
1.5.	LA BERBERINA.....	9
1.5.1.	Efecto antimicrobiano.....	10
1.5.2.	Efecto antiinflamatorio.....	10
1.5.3.	Efecto antidiabético.....	10
1.5.4.	Tratamiento de enfermedades cardíacas.....	10
1.5.5.	Hiperlipidemias.....	11
1.5.6.	Ensayos clínicos.....	11
1.5.7.	La berberina y el cáncer.....	13
2.	ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	13
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1.	CULTIVOS CELULARES.....	16
3.1.1.	Líneas celulares utilizadas.....	16
3.1.2.	Materiales y medios de cultivo.....	16
3.1.3.	Mantenimiento de cultivos celulares.....	17
3.1.4.	Inactivación del complemento en el suero bovino.....	17
3.1.5.	Congelación y descongelación de líneas celulares.....	17
3.1.6.	Detección de micoplasmas en cultivos celulares mediante PCR.....	18
3.1.7.	Separación de células en gradiente de densidad.....	19
3.1.8.	Obtención, purificación y cultivo de células mononucleares de sangre periférica humana.....	19
3.1.9.	Pacientes incluidos en el estudio.....	20
3.1.10.	Determinación del inmunofenotipo de pacientes con LLC-B.....	20

3.1.11. Obtención de macrófagos derivados de médula ósea de ratón.....	21
3.2. ESTUDIO DE PROLIFERACIÓN, CITOTOXICIDAD, APOPTOSIS Y NECROSIS CELULAR.	21
3.2.1. Materiales y reactivos para estudios de proliferación y citotoxicidad.	21
3.2.2. Contaje y determinación de la viabilidad celular.	22
3.2.3. Determinación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).	22
3.2.4. Determinación simultánea de la translocación de fosfatidilserina y la permeabilidad de la membrana plasmática.	23
3.3. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.	23
3.3.1. Extracción y fraccionamiento de lisados celulares con detergentes.....	24
3.3.2. Separación de proteínas celulares. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.	24
3.3.3. Transferencia de proteínas a membranas.	25
3.3.4. Análisis de proteínas por inmunoblot (Western blotting).	25
3.3.5. Anticuerpos.	26
3.4. RATONES.	26
3.4.1. Desarrollo tumoral en ratones.	26
3.5. ANÁLISIS INFORMÁTICO DE DATOS	27
3.5.1. Estadística.	27
4. RESULTADOS.....	28
4.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (IC ₅₀) DE LA BERBERINA SOBRE DISTINTOS TIPOS CELULARES.	28
4.1.1. Determinación de la IC ₅₀ en el mieloma múltiple MM1S.	28
4.1.2. Determinación de la IC ₅₀ en el mieloma múltiple RPMI 8226.	29
4.1.3. Determinación de la IC ₅₀ en el linfoma histiocítico U937.....	30
4.1.4. Determinación de la IC ₅₀ en la leucemia T Jurkat.	31
4.2. ANÁLISIS DEL MECANISMO DE MUERTE CELULAR ACTIVADO POR LA BERBERINA UTILIZANDO MUTANTES DE LAS LINEAS TUMORALES.	32
4.2.1. Determinación de la exposición de la fosfatidilserina y la permeabilidad de la membrana celular en la línea celular Jurkat y sus líneas mutantes.	32
4.2.2. Determinación de la exposición de la fosfatidil serina y la permeabilidad en la membrana celular en la línea celular U937 y sus líneas mutantes.	33
4.2.3. Determinación de la caída de potencial mitocondrial en la línea celular Jurkat y sus líneas mutantes.	35
4.2.4. Determinación de la caída de potencial mitocondrial en la línea U937 y sus líneas mutantes.	36

4.2.5.	Niveles de expresión de las proteínas de la familia Bcl2 en la apoptosis inducida por berberina en la línea MM1S.	37
4.2.6.	Niveles de expresión de las proteínas de la familia Bcl2 en la apoptosis inducida por berberina en la línea RPMI.	38
4.2.7.	Niveles de expresión de las proteínas de la familia Bcl2 en la apoptosis inducida por berberina en la línea U937.	39
4.3.	ACTIVIDAD DE LA BERBERINA FRENTE A MUESTRAS DE PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA DE TIPO B (LLC-B).	40
4.3.1.	Ensayo sobre el paciente 01/2012.	41
4.3.2.	Ensayo sobre el paciente 04/2011.	42
4.3.3.	Ensayo sobre el paciente 08/2011.	43
4.4.	TOXICIDAD DE LA BERBERINA EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBLs).	44
4.4.1.	Ensayo sobre PBLs de pacientes poliglobúlicos.	44
4.4.2.	Ensayo sobre macrófagos extraídos de ratón.	45
4.5.	ACCIÓN PREVENTIVA DE LA BERBERINA FRENTE AL DESARROLLO TUMORAL DE LEUCEMIA “ <i>IN VIVO</i> ”.	46
5.	CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN.	52
6.	REFERENCIAS.	55

1. INTRODUCCIÓN

1.1. MUERTE CELULAR.

La muerte celular es un proceso que está estrechamente relacionado con el desarrollo fisiológico normal de los tejidos y con varios mecanismos de defensa de varios tipos de enfermedad humana. Según la definición del NCCD (*Nomenclature Committee on Cell Death*) [1] una célula se considera muerta cuando se cumple uno o más de los siguientes criterios establecidos: la célula ha perdido la integridad de la membrana plasmática, la célula, incluyendo al núcleo, ha sufrido fragmentación completa, mostrando los llamados cuerpos apoptóticos, o los fragmentos de las células han sido fagocitados por células adyacentes.

Aunque durante muchos años la clasificación de muerte celular ha estado dominada por criterios morfológicos, actualmente se pretende una mejor clasificación de la muerte celular en función de criterios enzimáticos, aspectos funcionales o de acuerdo a características inmunogénicas. Por ello el NCCD propuso una clasificación y definición actualizada de las diferentes modalidades de muerte.

1.1.1. Apoptosis.

Apoptosis fue un término introducido por Kerr y colaboradores en 1972 [2]. Es un tipo de muerte celular programada con características morfológicas como son: reducción del volumen celular (pyknosis), fragmentación nuclear (karyorrhexis), división de la membrana plasmática en vesículas, aunque sin pérdida de la integridad física (blebbing) y la fagocitosis de la célula “*in vivo*”.

Algunos de los elementos bioquímicos involucrados en la apoptosis son la activación de caspasas, la pérdida de potencial de la membrana mitocondrial, fragmentación del DNA y la exposición de la fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática. Este último representa una señal para las células fagocíticas para eliminar estas células y los cuerpos apoptóticos resultantes de este proceso, contribuyendo, a evitar que se liberen componentes extracelulares al medio que desencadenen procesos inflamatorios [3].

Existen otros tipos de muerte celular programada que no tienen las características morfológicas de la apoptosis. Aunque para la adquisición de dichas características sea necesario la activación de caspasas, ésta no es suficiente para definir un proceso como apoptosis, ya que la activación de estas puede estar asociada a procesos biológicos no letales. La muerte celular independiente de caspasas puede ocurrir a pesar de ella y exhibir signos morfológicos de la apoptosis, autofagia o necrosis.

1.1.2. Muerte celular que cursa con autofagia.

Se define morfológicamente como un tipo de muerte celular que ocurre en ausencia de condensación de la cromatina, pero acompañada por una masiva vacuolización autofágica. En la mayoría de casos este proceso es una respuesta de supervivencia que se activa en situaciones de estrés como privación de nutrientes, calor o estrés oxidativo [4]. Los autofagosomas, por definición, tienen doble membrana y contienen orgánulos citoplásmicos degenerados o citosol, que pueden distinguirse tales como lisosomas, endosomas o cuerpos apoptóticos mediante microscopía electrónica de transmisión. La fusión de los autofagosomas con los lisosomas da lugar a los autolisosomas, donde se llevan a cabo los procesos catabólicos característicos de la autofagia.

Al contrario que las células apoptóticas, las células que mueren con morfología autofágica no tienen asociación o muy poca con los fagocitos. Actualmente no debe asumirse que la autofagia es la ejecutora de esta muerte, ya que en un principio, la autofagia es un mecanismo de supervivencia celular, como lo indica el hecho de que la inhibición de la autofagia acelera el proceso de muerte celular. Algunos informes indican que las células que presentan características de la muerte celular por autofagia todavía pueden recuperarse tras la retirada de los estímulos que inducen la muerte, a pesar de que no está claramente definido el punto de no retorno.

1.1.3. Necrosis.

Es un tipo de muerte celular caracterizada por un aumento de volumen de los orgánulos y del citoplasma celular, moderada condensación de la cromatina y rotura de la membrana plasmática con la consecuente pérdida del contenido intracelular.

Durante mucho tiempo se consideró la necrosis como un tipo de muerte celular accidental, pero se están recogiendo evidencias de que es un proceso finalmente regulado por una vía de transducción de señal y mecanismos catabólicos [5]. Así receptores de muerte (TNF-R1, Fas, TRAIL-R) y receptores Toll-like, son capaces de inducir necrosis en presencia de inhibidores de caspasas. Esta muerte celular inducida puede ser inhibido por necrostatina [6], por tanto se ha propuesto el término de necroptosis [7] para distinguir este tipo de necrosis de la que no esta regulada.

Muchos orgánulos y procesos celulares se han descrito como mediadores de la muerte celular necrótica, pero aún no está muy claro cuál es la relación existente entre unos y otros. Estos fenómenos incluyen alteraciones mitocondriales (producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), permeabilización de la membrana mitocondrial), cambios lisosomales (producción de ROS por reacciones de Fenton, permeabilización de la membrana lisosomal), cambios nucleares (hiperactivación de PARP-1) o incremento en la concentración citosólica de calcio.

En ausencia de denominador bioquímico común, la muerte celular por necrosis está aún en gran parte identificada en términos negativos por la ausencia de apoptosis o marcadores autofágicos, en particular cuando las células se someten a la permeabilización temprana de la membrana plasmática.

1.2. APOPTOSIS.

La apoptosis es un mecanismo de defensa del organismo frente a células infectadas o transformadas, controla el desarrollo de los organismos y la homeostasis de poblaciones celulares. Los posibles fallos que puedan darse en la maquinaria apoptótica desencadenan muchos tipos de enfermedades, ya sea por la acumulación de células (enfermedades de tipo autoinmune o el cáncer) o por la pérdida de células (enfermedades degenerativas).

1.2.1. Ruta extrínseca o de receptores mortales.

Se caracteriza por la unión de ligandos a sus receptores específicos desencadenando una cascada de señalización a través de moléculas y caspasas [8].

Dentro de los ligandos de esta vía destacan el TNF- α , FasL y Apo2L/TRAIL, todos ellos miembros de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF). La mayoría de los miembros de esta familia se encuentran implicados en la activación de respuestas proinflamatorias, aunque también juegan un papel activo en la apoptosis. La unión de estas proteínas a los receptores TNFR, Fas y DR4/DR5, de forma respectiva, provoca el cambio conformacional de éstos en la cara interna de la membrana plasmática, de forma que oligomerizan y reclutan a la proteína FADD a través de sus dominios de muerte (DD) [9]. A su vez FADD es capaz de reclutar a la procaspasa-8 mediante sus dominios DED (Death Effector Domain) formando el complejo denominado DISC (Death Inducing signalling Complex), donde se procesa y se activa la caspasa-8. Posteriormente es liberada al citosol donde llevará a cabo la activación de las caspasas efectoras [10].

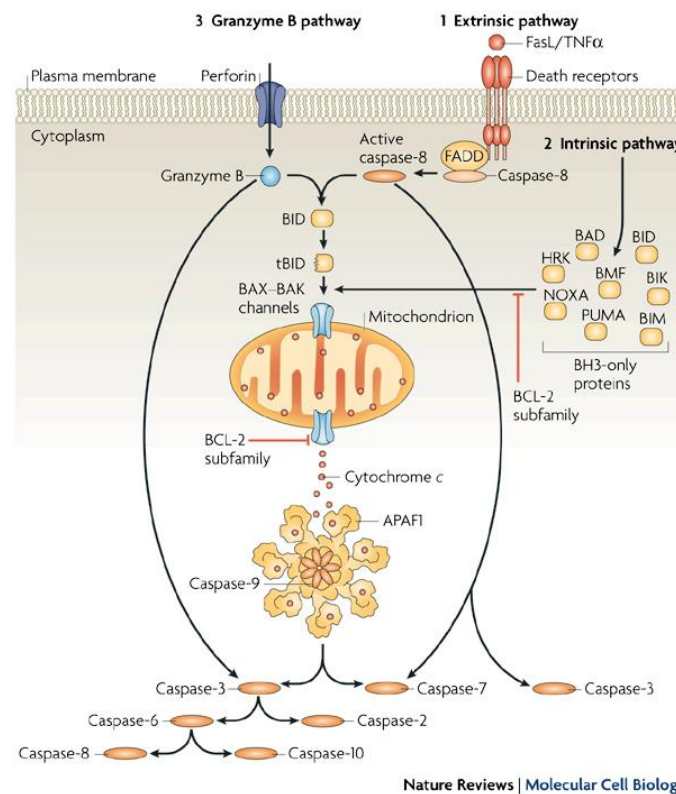


Figura 1: Vía extrínseca de la apoptosis y conexión con la vía intrínseca.

En función de la dependencia de DISC para activar las caspasas efectoras las células se pueden clasificar en dos subgrupos. Las células de tipo I se caracterizan por tener altos niveles de formación de DISC y por tanto de caspasa-8, que llevara a cabo la activación de las caspasas-3 y 7. Las células de tipo II presentan baja formación de DISC y necesitan la interrelación con la vía intrínseca para amplificar la señal de

activación de la caspasa-3. En estas células, Bid, perteneciente a la familia Bcl2, es proteolizada por la caspasa-8 generando t-Bid, capaz de conectar con la vía mitocondrial [11] (figura 1).

1.2.2. Ruta intrínseca o mitocondrial.

La vía intrínseca de la apoptosis se activa por señales de estrés intracelular como daño en el DNA, producción de ROS, infecciones virales, falta de factores de crecimiento o acumulación en el retículo endoplásmico de proteínas mal plegadas [12]. Esta ruta está controlada principalmente por las proteínas de la familia Bcl2 que se describe más adelante. Estos estímulos inducen o activan a las proteínas proapoptóticas de la familia Bcl2 que controlan, mediante sus interacciones, la activación de las proteínas Bak y Bax. Estas desencadenan la permeabilización de las membranas mitocondriales (figura 1), con la consiguiente liberación de diversos factores apoptogénicos, como el citocromo C, al citosol. La salida del citocromo C, su unión a la proteína Apaf-1 (Apoptosis protease activating factor 1) y el reclutamiento de la procaspasa-9 da lugar a la formación del apoptosoma. Finalmente la caspasa-9, procesada por el complejo anteriormente citado, llevará a cabo la activación de las caspasas-3 y -7 iniciando la cascada de muerte celular.

También hay que destacar el papel de t-Bid conectando a la vía intrínseca las señales proapoptóticas activadas por la granzima B [13] y por los receptores mortales en las células tipo II [11] (figura 1).

1.3. CASPASAS

Las caspasas son una familia de cisteín proteasas con especificidad de corte tras un residuo de aspártico [14] muy conservadas en la evolución, y componentes centrales de la respuesta apoptótica. En mamíferos se han descrito 14 caspasas de las cuales 12 están presentes en humanos, y que se clasifican, según su función, como caspasas inflamatorias y caspasas apoptóticas. Las caspasas inflamatorias participan en la maduración de citoquinas y en la respuesta inflamatoria. Las caspasas apoptóticas desencadenan la muerte celular tras ser activadas por estímulos proapoptóticos.

Las caspasas apoptóticas pueden dividirse a su vez en caspasas iniciadoras y en caspasas ejecutoras. Las caspasas iniciadoras (caspasas -2, -8, -9 y -10) son las primeras

en activarse tras el estímulo apoptótico, y tienen como misión procesar las procaspasas ejecutoras. Las caspasas ejecutoras (caspasas -3, -6 y -7) son las efectoras de la muerte celular [15].

Cada caspasa se sintetiza en la célula como un polipéptido inactivo (zimógeno). Esta conformación no activa se denomina procaspasa. Las caspasas se sintetizan como una cadena polipeptídica con dos dominios en común, un dominio central que contiene el sitio activo, y un dominio C-terminal o subunidad catalítica. El dominio N-terminal varía de longitud según la familia. El de las caspasas iniciadoras y las inflamatorias es más largo y presenta un motivo reclutador de caspasas (CARD, Caspase Recruitment Domain) y/o un motivo efector de muerte (DED) mientras que el extremo N-terminal de las caspasas ejecutoras es más corto [16] (figura 2).

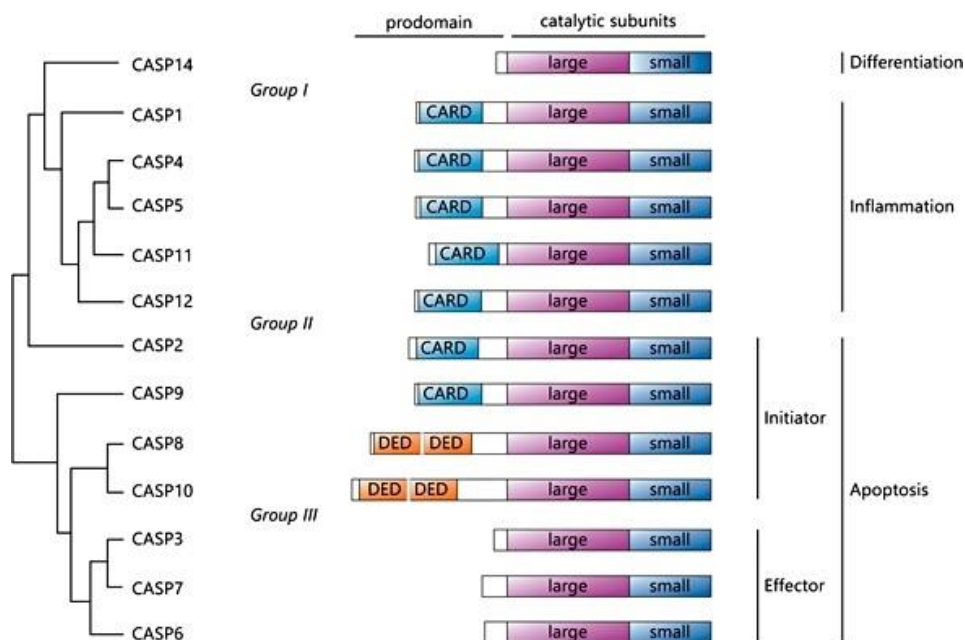


Figura 2: Caspasas. DED: dominio efector de muerte, CARD: dominio de reclutamiento de caspasas

El mecanismo de activación de las caspasas es distinto según el tipo de caspasa y la señal que lo induzca. Las caspasas iniciadoras, exceptuando a la caspasa-9, son reclutadas a través de su dominio DED por la proteína FADD a través de su propio dominio DED, que a su vez se encuentra unida al complejo formado por la oligomerización de los receptores por medio de dominios DD. Este reclutamiento permite que se autoprocenen debido a que aún en el estado de procaspasa presentan cierta actividad catalítica. En el de la caspasa-9 son reclutadas varias moléculas por el dominio CARD al complejo formado por Apaf-1 y el citocromo C, y finalmente se

activa por un cambio alostérico y posterior dimerización [17]. Por su parte, las caspasas ejecutoras son activadas por un corte proteolítico mediado normalmente por las caspasas iniciadoras [18].

Una vez activadas, las caspasas actúan como tetrámeros compuestos por dos homodímeros idénticos, cada uno con un sitio activo (figura 3). Las caspasas tienen multitud de proteínas como sustrato, dando lugar a su activación o inhibición tras la proteólisis [19]. Las caspasas pueden causar la muerte celular de forma rápida, por eso son necesarios precisos mecanismos de control que regulen la activación y la inhibición [18]. Además de los inhibidores naturales como FLIP (FLICE like inhibitor protein) y los IAP's (Inhibitor of apoptosis proteins), las utilizadas por patógenos como CrmA (cytokine response modifier A), se han desarrollado péptidos sintéticos que imitan la secuencia de los sustratos específicos de las caspasas como DEVD, IETD o Z-VAD.

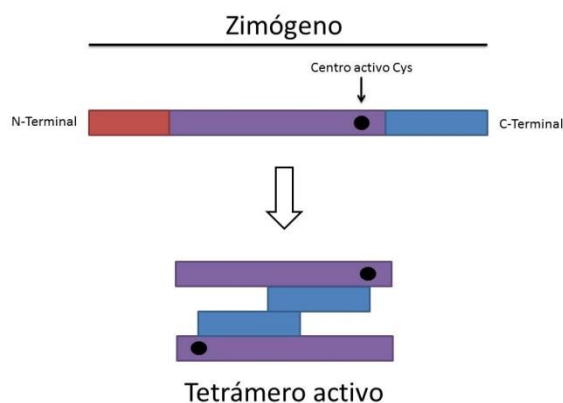


Figura 3: Procesamiento y activación de las caspasas.

1.4. PROTEÍNAS DE LA FAMILIA Bcl2.

Las proteínas de la familia Bcl2 se encargan de regular la fase de inducción de la apoptosis por la vía intrínseca, controlando la permeabilización de la membrana mitocondrial externa. Estas proteínas se caracterizan por compartir en su estructura uno o varios grupos de homología a Bcl2 (BH). Según la presencia de uno u otro se clasifican en tres grandes grupos: proteínas antiapoptóticas, proteínas proapoptóticas multidominio y proteínas proapoptóticas solo-BH3.

Las proteínas antiapoptóticas se componen de las proteínas Bcl2, Bcl_X_L, y Mcl1 entre otras. Estas poseen cuatro dominios de homología a Bcl2 (BH1-BH4) y son encargadas de favorecer la supervivencia inhibiendo la muerte celular [20].

Al grupo de las proteínas proapoptóticas multidominio pertenecen Bax, Bak y Bok, las cuales poseen dominios BH1, BH2 y BH3. Bak y Bax son responsables de la permeabilización de la membrana externa mitocondrial mediante su oligomerización, permitiendo la salida de los factores apoptogénicos al citosol [20].

Las proteínas proapoptóticas solo-BH3 son un grupo numeroso que únicamente poseen el dominio de homología BH3 y actúan como efectoras de estímulos proapoptóticos. A este grupo pertenecen Bim, Bid, Bad, Puma y Noxa [21].

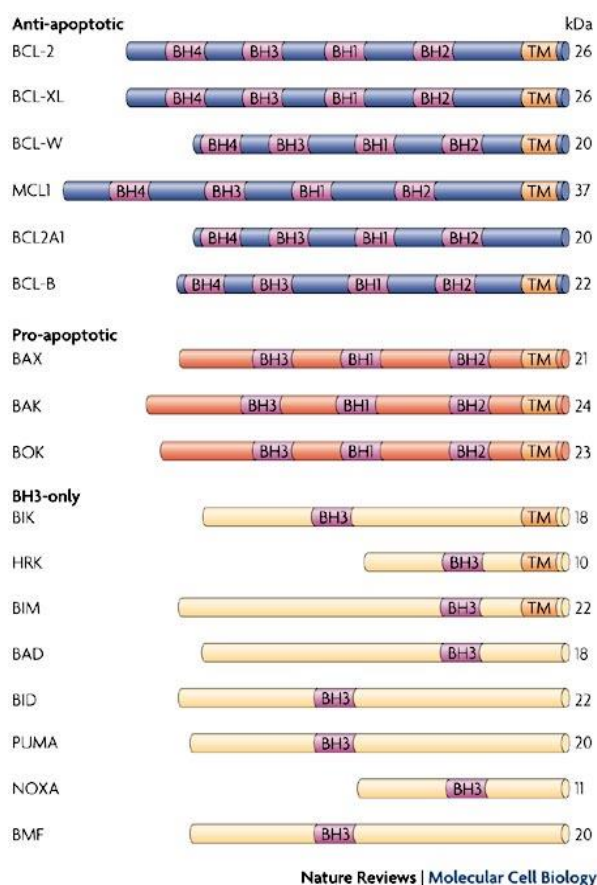


Figura 3: Esquema de la estructura de las proteínas de la familia Bcl2.

Que la célula sobreviva o muera ante estímulos de estrés o apoptóticos dependerá de la activación e interacción de las proteínas de esta familia [21]. Para explicar la forma en que se relacionan han sido propuestos diversos modelos [22]: El modelo directo, el modelo indirecto y el modelo mixto.

En el modelo directo se propone que las proteínas solo-BH3 pueden agruparse en activadoras y sensibilizadoras. Estas proteínas se encargan de activar a las proteínas Bak y Bax mientras que la familia proteínas antiapoptóticas actúan secuestrando a las proteínas activadoras solo-BH3, inhibiendo la activación de Bak y Bax. El papel de las proteínas solo-BH3 sensibilizadoras es el de unirse a las proteínas proapoptóticas bajo estímulos apoptóticos, permitiendo la activación de Bak y Bax [23].

Según el modelo indirecto las proteínas antiapoptóticas se unen directamente a Bak y Bax inhibiendo su actividad. El papel de las proteínas solo-BH3 es inhibir los efectos de las proapoptóticas liberando a Bak y Bax, pero sin interaccionar con ellas [24].

El tercer modelo y alternativo denominado modelo mixto intenta unificar los dos modelos descritos con anterioridad. En este modelo las proteínas antiapoptóticas interaccionan tanto con las solo-BH3 como con Bak y Bax. En este caso las proteínas solo-BH3 sensibilizadoras actúan liberando a las proteínas solo-BH3 activadoras y a Bak y Bax [25].

1.5. LA BERBERINA.

Alrededor del 80% de la población en los países en vías de desarrollo de África y Asia usan la medicina tradicional para el diagnóstico, tratamiento, prevención de enfermedades o mantenimiento de una buena salud [26]. Muchos compuestos naturales de la medicina tradicional pueden ser importantes bases para el diseño de nuevos fármacos ya que se ha demostrado su efectividad como antiinflamatorios, analgésicos, antimicrobianos, antiespasmódicos, antidiabéticos, antivirales y anticancerígenos [27].

La berberina es un alcaloide vegetal de color amarillo brillante que bajo luz ultravioleta emite una fuerte fluorescencia amarilla. Se puede encontrar en las raíces, flores, brotes y en la corteza de muchas plantas tales como *Hidrastis canadensis*, *Berberis aristata*, *Coptis chinensis*, *Coptis rhizome*, *Coptis japónica*, *Phellodendron amurense*, *Phellodendron chinense schneid*. Durante mucho tiempo se ha estado usando en la medicina tradicional y se ha demostrado su efectividad en el tratamiento de un gran número de enfermedades. La berberina tiene una amplia gama de efectos farmacológicos ante la gastroenteritis, dolores abdominales y diarrea, propiedades antimicrobianas, antidiabéticas, antiinflamatorias, o en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares o lipídicas [28, 29].

1.5.1. Efecto antimicrobiano.

La berberina ejerce su efecto antimicrobiano mediante la unión a la cadena de DNA, lo que lleva a la muerte de la bacteria debido al daño en su material genético [30]. Pocos estudios han analizado la relevancia “*in vivo*” de estos hallazgos. La mayoría de los datos sugieren que la berberina tiene un bajo poder antimicrobiano por sí sola, pero muy alto cuando actúa en sinergia con otras drogas. Esta baja actividad antimicrobiana se debe a la presencia de bombas MDR (Multi Drug Resistance) en la membrana de esos microorganismos, por lo que en combinación con inhibidores de MDR se mejora la actividad de la berberina.

1.5.2. Efecto antiinflamatorio.

La actividad antiinflamatoria de la berberina se da mediante la inhibición de la síntesis de las citoquinas TNF α (Tumor Necrosis Factor α) e Il-6 (interleuquina-6), y de MCP-1 (monocyte chemo-attractant protein 1). También afecta a la producción de la prostaglandina E2 (PGE2) y disminuye la expresión de COX-2, y de las metaloproteinasas de matriz -2 (MMP-2) y -9 (MMP-9) a través de las vías de señalización de MAPK y de NF- κ B [31].

1.5.3. Efecto antidiabético.

Existen informes sobre los beneficios del tratamiento de la diabetes de tipo II. Como ampliamente se describe en ratas diabéticas inducidas experimentalmente, este efecto parece ser mediado por la mejora de la homeostasis de la glucosa, aumento de la expresión de insulina y la regeneración de las células β del páncreas [32, 33]. También se han obtenido resultados prometedores en la administración de berberina a pacientes afectados por el síndrome metabólico, en el que la sensibilidad a la insulina se ve mejorada con el consecuente beneficio en la enfermedad [34, 35].

1.5.4. Tratamiento de enfermedades cardíacas.

La berberina posee propiedades inotrópicas positivas (mejora de la contracción cardíaca), cronotrópicas negativas (deceleración de la frecuencia cardíaca), antiarrítmicas, vasodilatadoras y antiateroescleróticas. Se conoce su papel como vaso

relajante en animales [36,37] y se ha usado con éxito en personas [38], lo que sugiere su potencial en el tratamiento de arritmias.

El mecanismo por el cual se da este efecto antiarrítmico no está claro todavía, pero el modelo de conejo parece indicar que puede estar relacionado con la supresión del retraso de despolarización en el músculo ventricular [39]. Otro trabajo en ratas sugiere que la berberina tiene un efecto vasodilatador atribuible a su potenciación de la acetilcolina [40].

1.5.5. Hiperlipidemias.

Se ha encontrado que reduce el colesterol en el suero de personas voluntarias mediante un mecanismo independiente de las estatinas [41]. En un modelo de rata se observó como la berberina era capaz de aumentar la expresión de LDLR en el hígado [41]. Este aumento de LDLR suponía la reducción del colesterol asociado a LDL en sangre.

Unos pocos estudios demuestran el aumento de formación y secreción de la bilis, y que la berberina es capaz de interactuar con las micelas [42, 43]. Se cree que de esta manera disminuye la capacidad de las micelas para solubilizar el colesterol disminuyendo por tanto la absorción de colesterol, aunque esto último no haya sido estudiado de forma directa.

1.5.6. Ensayos clínicos.

Se han realizado ensayo clínicos con este compuesto que sugieren que es beneficioso para el tratamiento de tracomas (una inflamación conjuntiva causada por microorganismos), diarrea causada por un agente infeccioso y leishmaniosis. Además de estos existen más ensayos clínicos en los que se está examinando el valor de la berberina, los cuales quedan recogidos en la siguiente tabla (tabla 1) [28].

Study	Status	Condition	Interventions
Polycystic Ovary Syndrome (POCS): Effect Of Letrozole and Berberine	Recruiting	Polycystic ovary syndrome	Drug: letrozole-berberine Drug: letrozole Drug: berberina

Role of Pioglitazone and Berberine in Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease	Completed	Nonalcoholic fatty liver disease	Lifestyle intervention Drug: pioglitazone Drug: berberina
Effect of Berberine on Hormonal and Metabolic Features in Obese Women With Polycystic Ovary Syndrom (POCS)	Active, not recruiting	Polycystic ovary syndrome Obesity	Drug: berberina Drug: placebo
Efficacy and Safety of Berberine in the Treatment of Diabetes With Dyslipidemia	Completed	Diabetes mellitus, type 2 Metabolic syndrome	Drug: berberina
Therapeutic Effects of Berberine in Patients With Type 2 Diabetes	Completed	Type 2 diabetes	Drug: berberina Drug: metformin
Armolidip Plus and Metabolic Syndrome	Completed	Metabolic syndrome	Dietary supplement: Armolidip Plus
The Role of a Combination of Nutraceuticals in the Control of Cardiovascular Risk	Active, not recruiting	Metabolic syndrome	Drug: Armolidip Plus
Combined Effects of Bioactive Compound in Lipid Profile	Recruiting	Hyperlipidemia low-density-lipoprotein-type elevated triglycerides	Dietary supplement: Armolidip Plus Dietary supplement: placebo
Effects of Armolidip Plus on Cholesterol Levels and Endothelial Function	Completed	Hyperlipidemia endothelial dysfunction	Dietary supplement: mixture of berberina, policosanol, red yeast, placebo
Ezetimibe Versus Nutraceuticals in Statin-intolerant Patients	Not yet recruiting	Coronary artery disease	Drug: ezetimibe Drug: nutraceuticals

Tabla 1: Clinical trial.

Se ha demostrado que la berberina es segura en la mayoría de los ensayos clínicos y que tiene una baja toxicidad secundaria frente a tejidos sanos. Se ha documentado que tanto las células T activadas o como las células T naïve son resistentes a la berberina [44] y que esta es capaz de proteger a los timocitos de la muerte inducida por dexametasona, etoposido o camptotecina [45]. También existen informes de que los macrófagos no solo son resistentes a la muerte celular inducida por berberina sino que además es capaz de estimular la producción de citoquinas como IFN γ e IL12 “*in vitro*” e “*in vivo*” potenciando su efecto antimicrobiano.

1.5.7. La berberina y el cáncer.

Aunque no se ha usado todavía en ensayos clínicos la berberina posee actividad antitumoral frente muchos tipos de tumores. De hecho, un estudio en el cual se usaron 60 líneas tumorales mostró que el valor de la IC50 para la berberina era similar al de otros alcaloides usados en quimioterapia como paclitaxel o vinblastina [46]. La mayoría de los datos se basan en la evidencia “*in vitro*” de su capacidad de afectar a varios pasos de desarrollo del tumor incluyendo la proliferación, la invasividad y la muerte celular [47, 48].

La berberina también se ha usado en combinación con radiación y otras drogas, siendo aparentemente más efectivo que las terapias individuales.

En cuanto al mecanismo a través del cual la berberina elimina células tumorales parece ser mayoritariamente la inducción de apoptosis a través de la ruta mitocondrial, si bien algún trabajo indica que también es capaz de inducir autofagia. [28].

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.

La berberina se ha probado “*in vitro*” en diversos tipos de carcinomas sólidos tales como carcinoma de lengua, hepático, pulmonar, de tiroides, de próstata, de pecho, cerebral, de piel, de esófago y de colon [28]. Lo más interesante es que parece prevenir el desarrollo de carcinomas sólidos “*in vivo*” en modelos de xenotrasplante, autotrasplante, o tumores inducidos por carcinógenos. En ratones inmunocomprometidos a los que se les ha xenotrasplantado un tumor, se ha visto que inhibe el crecimiento de células cancerosas humanas que provienen de pulmón o de próstata [49, 50]. Finalmente, la administración de berberina inhibe el crecimiento del cáncer de lengua SCC-4 sugiriendo un efecto beneficioso en las plantas que contienen este alcaloide para la prevención de esta neoplasia. Asimismo es capaz de retardar la aparición de fibrosarcomas inducidos con agentes químicos [28].

Sorprendentemente, aunque la berberina inhibe el crecimiento de algunas líneas tumorales en ratones desnudos [51], no parece afectar al crecimiento del carcinoma pulmonar de Lewis de ratón después de la implantación ortotópica en la parénquima pulmonar [52]. Estos resultados contradictorios podrían ser debido al uso de diferentes líneas celulares de pulmón, el sitio de la implantación, o el uso modelos de trasplante xenogénicos frente asingénicos (autotrasplante). Por lo tanto, la interpretación de los

resultados procedentes de xenotrasplante de tumores humanos en ratones debe hacerse con cautela.

Al igual que en carcinomas sólidos, la berberina presenta actividad antitumoral frente a diversos tipos de tumores hematológicos “*in vitro*” como leucemias mieloides agudas, leucemias linfocíticas agudas y algunos tipos de linfomas non-Hodgkin. Existen muy pocos estudios sobre la eficacia y el mecanismo de acción de la berberina contra estos tipos de neoplasias hematológicas, comparado con los estudios en cánceres sólidos. Además solo un estudio ha analizado el papel de la berberina en pacientes con leucemia mieloide aguda [53], y los resultados indican que es capaz de inhibir la migración de las células tumorales, si bien no resulta muy citotóxica.

Se ha demostrado que la berberina tiene potencial antitumoral “*in vivo*” frente a las leucemias linfocíticas agudas P388 [54] y la leucemia mieloide aguda WEHI-3 [55] en ratón. Además es capaz de inhibir la progresión de la eritroleucemia inducida por retrovirus en ratones inmunocompetentes [56].

En cuanto al mecanismo de acción de la berberina, los datos obtenidos en su mayoría en tumores sólidos indican que podría ser capaz de activar la ruta mitocondrial tras la inducción de daño en el DNA a través de la parada de ciclo inducida por la ruta TM/p53 y ATM/Chk1 [28]. Sin embargo los datos sobre el papel de la familia Bcl2 en la apoptosis inducida por la berberina son escasos y todos ellos indirecto. Únicamente se ha correlacionado la variación en los niveles de estas proteínas con el progreso de la apoptosis inducida por berberina, sin conocer de modo más directo cual es el efecto del aumento o inhibición de la expresión de estas proteínas sobre la apoptosis inducida por este alcaloide.

En este trabajo fin de master se propuso arrojar más luz a las capacidades antitumorales que ha demostrado la berberina en tumores hematológicos así como el papel de la familia Bcl2 en la muerte celular ejecutada. También, ante la falta de estudios realizados en pacientes acusados de estas patologías, se quiso realizar más ensayos sobre las capacidades de este alcaloide sobre pacientes con neoplasias hematológicas y corroborar la baja toxicidad secundaria que se le atribuye. Por último se quiso obtener más resultados sobre el papel antileucémico “*in vivo*” de la berberina en un modelo de autotrasplante de ratón. Para ello se plantearon los siguientes objetivos:

1. Calcular la dosis inhibitoria mínima en diversas líneas tumorales hematológicas.
 - Leucemia aguda de tipo T.

- Mieloma Múltiple.
 - Leucemia promonocítica.
2. Analizar el papel de la familia Bcl2 en el mecanismo de muerte celular activado en las líneas tumorales hematológicas analizadas en el objetivo anterior.
 - Analizar el efecto de la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas.
 - Analizar la inhibición de la expresión de proteínas proapoptóticas.
 - Evaluar la variación de la expresión de proteínas de la familia Bcl2.
 3. Estudiar el papel antitumoral de la berberina en pacientes de leucemia linfocítica crónica de tipo B “*in vitro*”.
 4. Comprobar la baja toxicidad secundaria de la berberina en células mononucleares de sangre periférica.
 5. Analizar el papel preventivo de la berberina frente al desarrollo tumoral de un linfoma T “*in vivo*”.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CULTIVOS CELULARES

3.1.1. Líneas celulares utilizadas.

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo han sido las líneas establecidas de mieloma múltiple humano MM1S y RPMI 8226, las líneas de leucemia linfoblástica aguda humana Jurkat, las sublíneas derivadas Jurkat CrmA, Jurkat BclX_L, la línea establecida de linfoma histiocítico difuso U937, y las sublíneas derivadas U937 Bcl2 y U937 Mcl1, todas obtenidas en nuestro laboratorio previamente mediante transfección estable de los cDNA correspondientes. Todas estas líneas crecieron en suspensión.

Además se empleó la línea El4 de linfoma tímico de ratón de origen C57BL6 (H-2^b).

3.1.2. Materiales y medios de cultivo.

En este proyecto se han utilizado los siguientes medios de cultivo: medio RPMI 1640 y medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), todos suministrados por PAN Biotech GMBH.

Los siguientes productos utilizados en el cultivo celular se obtuvieron de PAN Biotech: tripsina /EDTA, penicilina, estreptomicina. El piruvato sódico, la uridina, la mitomicina C, el β -mercaptoetanol suero de caballo (SH) y suero fetal bovino (SFB) fueron suministrados por Sigma (España), y la glucosa por Panreac. La glutamina fue de Invitrogen.

Los frascos de cultivo utilizados para cultivos celulares se obtuvieron de TPP (Suiza), al igual que el resto de material de plástico estéril (placas Petri, placas de 6, 12, 24 y 96 pocillos, tubos para centrifugación, pipetas, etc.). Las placas de 24 pocillos anti-adherentes fueron suministradas por Starstedt. Los filtros de 0,22 μ m de tamaño de poro utilizados para la esterilización de soluciones fueron de Pall Corporation. Los tubos criogénicos utilizados para la congelación de células fueron suministrados por Nunc (Dinamarca), y los viales de 1,5ml fueron de Axigen Quality.

3.1.3. Mantenimiento de cultivos celulares.

Todas las líneas celulares se cultivaron rutinariamente en frascos de cultivo de 25 cm² (volumen máximo de células en suspensión, 20 ml) o 75 cm² (volumen máximo de células en suspensión, 40 ml).

Todas las células se sembraron a una densidad mínima de $3 \cdot 10^5$ cel/ml. Todas las líneas, a excepción de la línea MM1S, se cultivaron en medio RPMI 1640 completo con 5% SFB. La línea MM1S se cultivó con medio RPMI 1640 completo con 10% SFB.

Las células se cultivaron en un incubador termostatzado, a 37°C, en aire saturado de humedad y con un 5% CO₂. A los 3 o 4 días de cultivo, alcanzada una densidad menor de $1 \cdot 10^6$ cel/ml, se realizó el pase de los cultivos. Todas las manipulaciones con células se realizaron en campanas de flujo laminar vertical en condiciones estériles. El material de vidrio usado en la manipulación de las células se esterilizó previamente en un autoclave durante 20-30 min a 1,2 atm de presión y las disoluciones añadidas a los cultivos se esterilizaron usando filtros de 0.22 µm.

3.1.4. Inactivación del complemento en el suero bovino.

En los experimentos realizados con células EL4 de ratón, el suero utilizado se decomplementó para evitar la lisis de las células por el sistema del complemento. Para ello, el suero se trató durante 30 min a 56°C y trascurrido este tiempo se centrifugó 15 min a 2095 g. El sobrenadante se recogió en un tubo de fondo cónico y se congeló hasta su uso.

3.1.5. Congelación y descongelación de líneas celulares.

Aproximadamente $6 \cdot 10^6$ células se centrifugaron a 335 g durante 5 min, se eliminó el sobrenadante, se resuspendieron en 500 µl de medio completo conteniendo un 7,5% de DMSO y se trasvasó el contenido a un criotubo de congelación estéril. Los viales fueron introducidos rápidamente en un congelador a -80°C. Pasadas al menos 24 horas, los viales se almacenaron en un contenedor de nitrógeno líquido (-196°C) hasta su utilización.

Para descongelar las células, se añadió lentamente a los criotubos un pequeño volumen de medio completo, hasta la descongelación de las células. En este momento, la

suspensión se añadió a aproximadamente 10 ml de medio completo, y rápidamente se centrifugó a 335 g durante 5 min. Tras la centrifugación y la eliminación del sobrenadante, se resuspendió el pellet de las células en 5-10 ml de medio completo, según la cantidad de células congeladas. Una vez las células se recuperaron de la descongelación, se sembraron a la densidad normal.

3.1.6. Detección de micoplasmas en cultivos celulares mediante PCR.

La detección de micoplasmas mediante PCR se realizó de modo rutinario en todas las células en cultivo. Para una detección óptima, las células deben haber permanecido al menos 48 horas en cultivo antes de realizar el análisis. Como muestra se tomó una pequeña cantidad de medio de cultivo de cada línea celular, se centrifugó y se recogió el sobrenadante. Si la detección no se realizó de inmediato, estos sobrenadantes se conservaron a -20°C hasta su análisis. Las secuencias de los oligonucleótidos usados como cebadores de la reacción fueron:

Mico A: 5'-GGC GAA TGG GTG AGT AAC ACG-3'

Mico B: 5'-CGG ATA ACG CTT GCG ACC TAT G-3'

La amplificación se llevó a cabo en una mezcla de reacción que contenía por cada muestra:

- 5 µl de tampón de reacción (MgCl₂ 15 mM, KCl 500 mM, 1 % Tritónx100, Tris -HCl 100 mM pH 8.8)
- 2,5 µl de cebador Mico A 10 µM
- 0.25 µl de cebador Mico B 100 µM
- 5 µl dNTPs 2 mM
- 2 µl de sobrenadante
- 0,5 µl de Taq polimerasa 2 U/µl
- 36,5 µl de agua Milli-Q estéril

Como control negativo de la amplificación se preparó la misma mezcla anterior sustituyendo el sobrenadante celular por H₂O libre de DNAsas y como control positivo se utilizó el sobrenadante de un cultivo celular contaminado, testado con anterioridad.

La amplificación se realizó con el siguiente programa de PCR:

- Calentamiento inicial: 94°C / 3 min
- Desnaturalización: 94°C / 30 seg.
- Hibridación: 60°C / 30 seg.
- Extensión: 72°C / 30 seg.
- Extensión: 72°C / 5 min
 - 30 ciclos: pasos 2-4.

Los productos de amplificación obtenidos se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa (Sigma) al 1% en TBE (0,045 M Tris-borato, 1mM EDTA) que contenía SYBR® Safe DNA gel stain 1x (Invitrogen). Como marcadores de peso molecular se utilizó el 100bp DNA ladder de Promega. La visualización se llevó cabo en el transiluminador Gel Doc 2000 de BioRad Laboratories (Hércules, CA) y se analizó mediante el programa Bio-Rad Muti-Analyst (PC versión 1.1). En caso de resultado positivo apareció una banda de aproximadamente 500 bp.

3.1.7. Separación de células en gradiente de densidad.

La separación de células en gradiente de densidad se llevó a cabo con el fin de eliminar las células muertas en los cultivos. Un volumen determinado de células se añadió despacio, con cuidado de no mezclar las fases, a un volumen equivalente de la solución de extracción Ficoll (Ficoll-Paque, obtenido de HE Healthcare). Se centrifugó a 524 g durante 20 min sin freno y posteriormente se recuperó con mucho cuidado el anillo que se encuentra en la interfase, correspondiente a las células vivas.

3.1.8. Obtención, purificación y cultivo de células mononucleares de sangre periférica humana.

Para la obtención de las células mononucleares con las que se va a realizar los posteriores experimentos se utiliza sangre total con EDTA como anticoagulante procedente de los pacientes afectados de Leucemia linfocítica crónica de tipo B (LLC-B) así como de voluntarios sanos.

Tras diluir la sangre a la mitad con PBS estéril (Na_2HPO_4 8mM, KH_2PO_4 2 mM, NaCl 15 mM pH 7.4) las células mononucleares se separaron del resto de las células

sanguíneas mediante centrifugación sobre un gradiente de Ficoll a 524 g durante 20 min, a temperatura ambiente y sin freno. Una vez recolectadas se realizaron tres lavados con PBS estéril a 524 g durante 5 min por cada lavado, tras los cuales las células están listas para ser utilizadas posteriormente. Antes de realizar el último lavado se toma una alícuota de la suspensión celular y se realiza un conteo de las células en cámara de Neubauer mediante exclusión con azul de tripán.

Una vez obtenidas las células mononucleares de sangre periférica, se resuspenden a la concentración deseada. En el caso de las células donante sano, se resuspenden en medio RPMI 1640 completo con 10% de SFB. En el caso de las células de paciente de LLC-B, se resuspenden en medio 1640 completo con 15% de SFB e interleuquina-4 20ng/ml.

3.1.9. Pacientes incluidos en el estudio.

En el estudio se incluyen 3 pacientes diagnosticados de LLC-B. La muestra del paciente número 1 proviene de sangre periférica extraída el 14 de marzo de 2012 y se le asignó el código de registro 01/20012. La muestra del paciente número 2 proviene de sangre periférica extraída el 3 de marzo de 2011 y se le asignó el código de registro 04/2011. La muestra de paciente del número 3 proviene de sangre periférica extraída el 28 de marzo de 2011 y se le asignó el código de registro 08/2011.

Las células mononucleadas se aislaron tal y como se describe en el apartado anterior.

3.1.10. Determinación del inmunofenotipo de pacientes con LLC-B.

Una característica importante de estas células es su heterogeneidad, sobre todo en cuanto a marcadores de membrana. Estos marcadores son muy útiles para distinguirlas de células plasmáticas normales y de linfocitos sanos.

Para realizar el inmunofenotipado, se tomaron $2 \cdot 10^5$ células, se centrifugaron y se lavaron con PBS. Se resuspendieron en 100 μ L de ABB (annexin binding buffer) con 5% SFB, 2 μ L del anticuerpo frente a CD5 marcado con FITC y 2 μ L del anticuerpo frente a CD19 marcado en PE (ambos fueron de BD Pharmingen). Se incubaron 15 min a temperatura ambiente y se analizaron por citometría de flujo empleando un citómetro FACSscan (Becton & Dickinson) y el análisis de los resultados se realizó mediante el software Weasel v2.6.1

3.1.11. Obtención de macrófagos derivados de médula ósea de ratón.

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Las tibias y los fémures fueron aislados de la masa y lavados con abundante etanol al 70%. Se eliminó la mayor parte de tejido muscular y se eluyeron las células inyectando, en condiciones estériles, 2 ml de medio RPMI a través de la cavidad de la médula ósea. Se resuspendieron hasta obtener una suspensión homogénea y se filtraron con un filtro de nylon de 100µM (BD Falcon). Las células se centrifugaron a 524 g durante 5 min y se resuspendieron en medio DMEM completo con 10% SFB y, 5% SH. Posteriormente se ajustaron a una concentración de $1 \cdot 10^6$ cel/ml y se sembraron en placas de Petri.

Al tercer o cuarto día se les cambió el medio, y a los 6 días se tripsinizaron las células, se recogieron con ayuda de una rasqueta y se trasvasaron a un falcon donde se inactivo la tripsina con 5 ml de medio. Se centrifugaron a 524 g durante 5 minutos y se resuspendieron en medio DMEM completo con 10% SFB. Se ajustó a una concentración de $4 \cdot 10^5$ c/ml y se sembraron en placas de 24 pocillos de baja adherencia a razón de 1ml por pocillo y se dejaron incubar durante 24 horas a 37°C y 5% CO₂. Al día siguiente ya estaban listas para realizar el experimento.

3.2. ESTUDIO DE PROLIFERACIÓN, CITOTOXICIDAD, APOPTOSIS Y NECROSIS CELULAR.

3.2.1. Materiales y reactivos para estudios de proliferación y citotoxicidad.

El azul Trypan procedió de Sigma. El péptido inhibidor de proteasas benciloxycarbonil-Asp-Val-Asp-fluorometilcetona (Z-DEVD-FMK) procedió de BD Biosciences, Madrid.

La Anexina V marcada con DY634 (AnnV dy634) y la 7-Amino-Actinomicina D (7-AAD) fueron de BD Biosciences, Madrid. La tetrametilrodamina metil ester (TMRE) procedió de Molecular Probes/Invitrogen.

El compuesto de berberina con el que se trabajó era cloruro de berberina y procedió de Sigma.

3.2.2. Contaje y determinación de la viabilidad celular.

La determinación de la viabilidad celular se realizó de forma rutinaria por contaje con azul Trypan, un colorante capaz de penetrar en las células muertas por tener la membrana plasmática desestructurada, tiñendo de esta forma las células de color azul. Las células vivas y las apoptóticas (que no sufren rotura de la membrana plasmática) no se tiñen. Para el contaje se mezclaron 50 µl de la suspensión celular y 50 µl de la solución de azul Trypan (azul Trypan al 0.4% en NaCl 0.15 M), se depositó la mezcla en una cámara Neubauer y se realizó el contaje en un microscopio óptico.

Cálculos para determinar la densidad celular:

$$\text{Densidad celular} = \frac{(\text{N}^{\circ} \text{ células viables} \times \text{factor de dilución} \times 10^4)}{\text{N}^{\circ} \text{ de cuadrantes contados}}$$

Siendo 10^4 el factor de corrección por el volumen de la cámara.

Determinación de la viabilidad celular:

$$\% \text{ de células viables} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ células viables}}{\text{N}^{\circ} \text{ células totales}} \times 100$$

Siendo las células totales las células vivas + células apoptóticas + células muertas.

Todos los experimentos con las células se realizaron partiendo de una viabilidad celular de al menos un 90%.

3.2.3. Determinación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).

El potencial de membrana mitocondrial que poseen las células se debe a la cadena de transporte de electrones y a la ATPasa que generan un gradiente de protones entre la matriz mitocondrial (cargada negativamente) y el espacio intermembrana (cargado positivamente). Este potencial, alto y constante en condiciones normales, disminuye en las primeras etapas de la apoptosis [57].

Para medir esta variación de potencial, utilizamos la sonda catiónica fluorescente TMRE con una máximo de emisión de fluorescencia en la zona naranja del espectro. Esta sonda se acumula en la matriz de las células viables y cuando descende el valor del potencial, a causa de la apoptosis, descende la cantidad de sonda retenida en la matriz, por lo que disminuye la intensidad de fluorescencia.

Se recogen las células después de ser tratadas y se resuspenden en TMRE (25nM) diluido en 100 µl de RPMI. Dichas células se incuban 15 min a 37°C y se analizan por

citometría de flujo empleando un citómetro FACScan (Becton & Dickinson) y el análisis de los resultados se realizó mediante el software Weasel v2.6.1.

3.2.4. Determinación simultanea de la translocación de fosfatidilserina y la permeabilidad de la membrana plasmática.

La fosfatidilserina es un fosfolípido que se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática. En etapas tempranas de la apoptosis se produce su translocación a la cara externa [3] de forma que queda accesible a proteínas que se unen específicamente a ella, como es la Anexina V. Esta unión es dependiente de la presencia de calcio.

La determinación de la permeabilidad de la membrana celular se realiza a través del marcaje con 7-AAD. Se trata de una molécula con un máximo de emisión de fluorescencia en la zona naranja del espectro que se une al DNA intercalándose en la doble cadena. En etapas tardías de apoptosis la membrana plasmática esta permeabilizada de forma que el DNA de células apoptóticas se encuentra accesible al 7-AAD. Habrá que tener en cuenta que este 7-AAD también se unirá al DNA de células necróticas, no solo apoptóticas, ya que la membrana también está permeabilizada en dicha situación.

Para medir estos eventos indicadores de apoptosis se utilizó junto con el 7-AAD, Anexina V conjugada a la sonda fluorescente dy634 con un máximo de emisión de fluorescencia en la zona roja. Para realizar el marcaje se centrifugaron las células 5 min a 524 g, se eliminó el sobrenadante y se añadió 100µL de tampón ABB, 1.5 µL de AnnV dy634 y 1.5 µL de 7-AAD. Las células se incubaron 15 min a temperatura ambiente y se analizaron por citometría de flujo empleando un citómetro FACScan (Becton & Dickinson) y el análisis de los resultados se realizó mediante el software Weasel v2.6.1.

3.3. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.

La acrilamida y la N,N'-metilen-bisacrilamida fueron de Biorad (España). El persulfato sódico, la aprotinina, leupeptina, EDTA, Tritón X-100, ortovanadato sódico, fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF), pirofosfato sódico, Tween-20, azul de bromofenol, N,N,N',N'- Tetrametilendiamina (T.E.M.E.D.), bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP) y el nitroazul de tetrazolio (NBT) fueron productos de Sigma (España). De Merck se

obtuvo el dodecilsulfatosódico (SDS) y el glicerol de Scharlau. Las membranas de PVDF fueron de GE Healthcare.

Los patrones de pesos moleculares coloreados utilizados en las electroforesis de proteínas fueron de Thermo.

Las cubetas de electroforesis y los aparatos de transferencia fueron de Hoefer.

3.3.1. Extracción y fraccionamiento de lisados celulares con detergentes.

Las células se centrifugaron a 335 g durante 5 min en una microcentrífuga (Thermo), se eliminaron los sobrenadantes y se lavaron 1 vez con PBS. Seguidamente, se resuspendieron en tampón de lisis (Tritón X-100 al 1% (v/v), NaCl 150 mM, TrisHCl 50 mM pH 7,6, glicerol 10% (v/v), EDTA 1mM, ortovanadato sódico 1 mM, pirofosfato sódico 10 mM, leupeptina 10 µg/ml, NaF 10 mM y PMSF 1 mM) a una relación de 20µL/10⁶cel durante 30 min a 4°C. Los tubos se centrifugaron durante 15 min, 4°C, 10.000 rpm y los sobrenadantes se depositaron en tubos Eppendorf, constituyendo la fracción soluble en Tritón X-100.

A los sobrenadantes anteriores se les añadieron 50 µl de una disolución preparada en agua Milli Q que contenía TrisHCl 150 mM pH 7,4, SDS 3%, molibdato de sodio 0,3 mM, pirofosfato de sodio 30 mM, NaF 30 mM, glicerol 30% (v/v), mercaptoetanol 30% (v/v) y azul de bromofenol 0,06% (v/v). Posteriormente se hirvió durante 5 min en un termo-bloque y las proteínas celulares se separaron por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida, o se congelaron a -20°C hasta el momento de su utilización.

3.3.2. Separación de proteínas celulares. Electroforesis en geles de poliácridamida con SDS.

La separación de proteínas en función de su peso molecular se realizó mediante electroforesis en geles de poliácridamida que contenían un 0,1% de SDS. El porcentaje de poliácridamida fue del 12% y el número de peines de 10. Las muestras se calentaron a 100°C durante 5 min, se centrifugaron (30 seg., 10000 rpm) y se cargaron 20 µl por pocillo del gel. Las electroforesis se realizaron a un amperaje constante de 20 mA/gel y un voltaje de 180 V durante 60-90 min. La electroforesis se realizó en presencia del tampón de electroforesis con una composición Tris 25mM, glicina 192 mM y SDS 3,4 mM.

3.3.3. Transferencia de proteínas a membranas.

Finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (pre-incubadas 30 segundos con metanol) mediante un equipo de transferencia semiseca de BioRad. En la transferencia se utilizó un tampón de transferencia compuesto por TrisHCl 48 mM pH 8,3, glicina 39 mM, SDS 0,037% y metanol de calidad HPLC 20% (v/v). La transferencia se realizó a 20 V y 400 mA durante 55 min. Después de la electrotransferencia, la membrana se bloqueó con leche desnatada en polvo al 5% (p/v) disuelta en un tampón con NaCl 0,12 M, Tris/HCl 10 mM pH 8 y Tween-20 0,5% (p/v) en PBS pH 7,4 (tampón B), durante 30 min a temperatura ambiente y agitación suave.

3.3.4. Análisis de proteínas por inmunoblot (Western blotting).

Las proteínas celulares fijadas en las membranas de PVDF se analizaron con anticuerpos específicos. La membrana se incubó durante toda la noche, a 4°C y con agitación suave, con el anticuerpo específico para detectar la proteína deseada. El anticuerpo primario se utilizó a la concentración indicada en la tabla 1, y se diluyó en una solución en tampón B de leche en polvo al 2,5% (p/v) (tampón A). Finalizada la incubación, se tiró la solución con el anticuerpo y la membrana se lavó con tampón B, 4 veces durante 5 min, agitando moderadamente.

Seguidamente, las membranas se incubaron en tampón A con el anticuerpo secundario correspondiente, según la especie de origen del anticuerpo primario, conjugado con fosfatasa alcalina o peroxidasa, durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación suave. En todos los casos se ha utilizado una concentración de anticuerpo de 0,2 µg/ml, para la fosfatasa alcalina, y 0,05 µg/ml para la peroxidasa. La solución del anticuerpo se retiró y la membrana se lavó abundantemente, 3 veces durante 5 min, agitando moderadamente con la disolución de lavado B.

La detección de los inmunocomplejos se realizó mediante captación de la señal quimioluminiscente en films fotográficos. Los sustratos para la fosfatasa alcalina y para la peroxidasa fueron obtenidos de Novagen y Termo respectivamente. En ambos casos se añade el sustrato directamente sobre la membrana y se deja incubar 5 min en el primer caso y 1 o 2 min en el segundo, tiempo tras el cual se elimina el sustrato y se pone la membrana en el cassette de revelado. Los intervalos de tiempo de exposición del film a la membrana variaron en función del anticuerpo, y fueron desde unos

segundos hasta varios min, aunque no es conveniente utilizar un tiempo de revelado muy largo debido al aumento de coloración inespecífica. Los líquidos de revelado y fijado utilizados fueron de la marca Kodak, y la preparación de los mismos se realizó según las instrucciones del fabricante.

3.3.5. Anticuerpos.

Los anticuerpos utilizados en este trabajo para inmunoblot se resumen en la siguiente tabla (tabla 2).

Anticuerpo	Características	Concentración	Proveedor
Bax	mc, conejo	1/1000	BD Pharmigen
Bak	pc, conejo	1/1000	Millipore
BclX _L	pc, conejo	1/1000	Cell Signaling
Bim	pc, conejo	1/1000	Calbiochem
Bcl2	pc, conejo	1/1000	Santa Cruz
Mcl1	pc, conejo	1/1000	Santa Cruz

Tabla 2: Relación de anticuerpo. mc: monoclonal; pc: policlonal

3.4. RATONES.

Para los experimentos “*in vivo*” realizados en este trabajo se utilizaron ratones de la estirpe C57BL6 y C57BL10 deficiente para el receptor tipo toll-2 (TLR2^{-/-}). Todos estos ratones provienen del laboratorio de Markus Simon, del Max-Planck Institute of Immunobiology, Friburgo, Alemania.

Estos ratones se han mantenido y criado en condiciones libres de patógenos en el animalario del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA) del Gobierno de Aragón.

3.4.1. Desarrollo tumoral en ratones.

A ratones de 8-9 semanas de edad se les separo en una población tratada, a la que se le administro 10mg/Kg (200 µL a una concentración 0.9 mg/mL) cada 48 horas durante una semana, y una población control, a la que se le administro 200 µL de PBS cada 48

horas durante una semana. Posteriormente se inyectaron subcutáneamente $2 \cdot 10^5$ células EL4, recogidas en fase exponencial de crecimiento, en 100 μ l de RPMI 1640 Al 2% de SFB de complementado. Tras la inoculación, el tratamiento se administraba cada 24 horas y se analizó el desarrollo del tumor mediante la medición del tumor diaria con un calibre de precisión. Para calcular el volumen del tumor, se midió el ancho (A), largo (L) y alto (T) del tumor y se aplicó la siguiente fórmula:

$$V = A \times L \times T$$

Los ratones se sacrificaron a los 9-12 días de la inoculación. Los tumores se extirparon y se procedió a medir su volumen y peso final.

3.5. ANÁLISIS INFORMÁTICO DE DATOS

3.5.1. Estadística.

El análisis estadístico de la significancia fue realizado mediante un análisis del cálculo de la *t* Student de dos colas, desapareado y con un intervalo de confianza del 95% empleando el programa GraphPad Prisma 4.0. (GrandPath Software, Inc., San Diego, CA, USA).

Los análisis estadísticos que dieron como resultado no significativos no se reflejan en las figuras. Los datos reflejados con un asterisco (*) dieron como resultado una P menor de 0.05. Los datos reflejados con dos asteriscos (**) dieron como resultado una P menor de 0.01.

4. RESULTADOS.

4.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (IC50) DE LA BERBERINA SOBRE DISTINTOS TIPOS CELULARES.

Se llevó a cabo la determinación de la IC50 en distintas líneas celulares tumorales con el objetivo de analizar la distinta sensibilidad de estas células a la acción citotóxica de la berberina. Las distintas líneas celulares tumorales empleadas fueron: los mielomas múltiples humano MM1S y RPMI 8226, el linfoma histiocítico U937 y la leucemia T humana Jurkat.

4.1.1. Determinación de la IC50 en el mieloma múltiple MM1S.

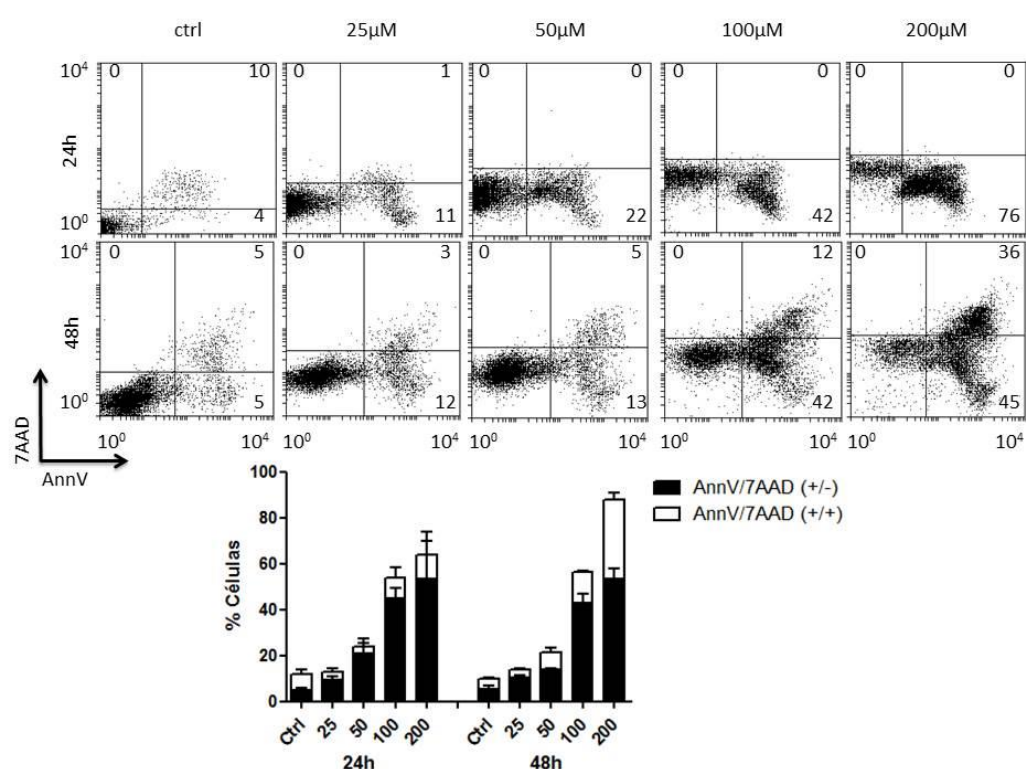


Figura 1: Análisis de la translocación de la fosfatidilserina y la permeabilidad de la membrana plasmática inducida por la berberina en las células MM1S. Se trataron las células MM1S con las distintas concentraciones de berberina durante 24 y 48 horas. Posteriormente se incubaron con Anexina V dy634 y 7-AAD tal y como se describe en los métodos y se analizó la fluorescencia por citometría de flujo. Las imágenes superiores muestran el análisis por citometría de flujo de un experimento representativo. Los

números indican el % de células en cada cuadrante. La gráfica representa la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. Se compararon estadísticamente los mismos rangos de concentración a distinto tiempo mediante el programa GraphPad Prisma.

Como se observa en la figura 1, La línea MM1S resulto sensible al efecto de la berberina, alcanzando la IC50 a una concentración cercana a 100 μ M tanto a 24 como a 48 horas. Se optó por usar esta concentración para realizar los experimentos posteriores.

4.1.2. Determinación de la IC50 en el mieloma múltiple RPMI 8226.

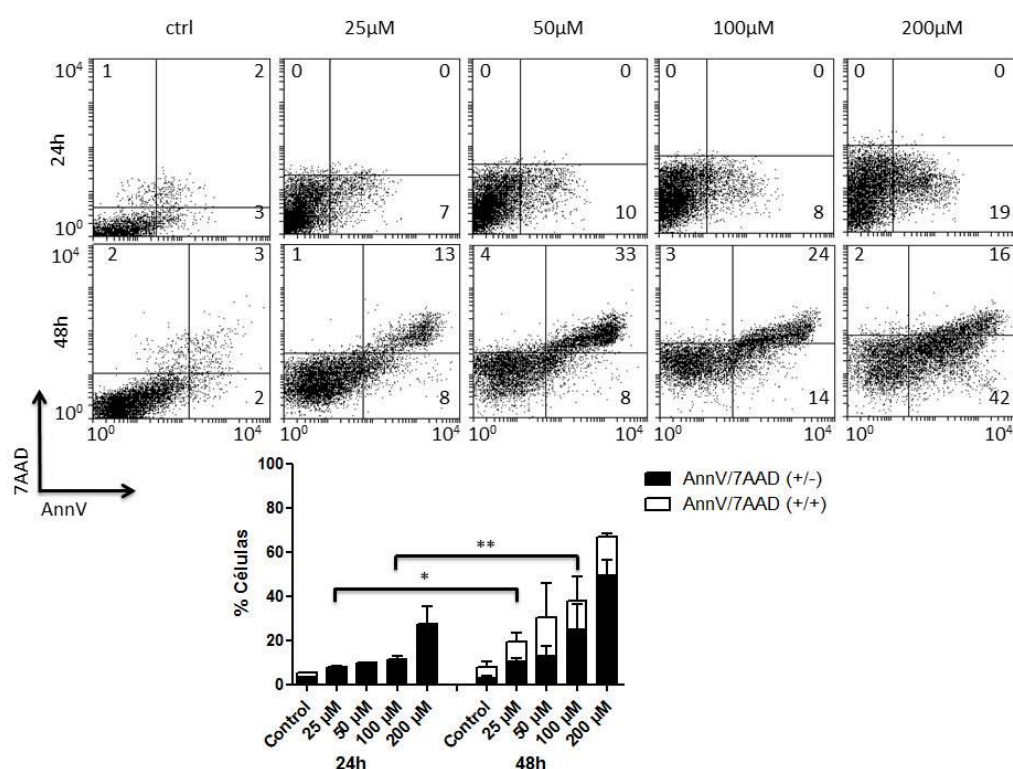


Figura 2: Análisis de la translocación de la fosfatidilserina y la permeabilidad de la membrana plasmática inducida por la berberina en las células RPMI 8226. Se trataron las células RPMI 8226 con las distintas concentraciones de berberina durante 24 y 48 horas. Posteriormente se incubaron con Anexina V dy634 y 7-AAD tal y como se describe en los métodos y se analizó la fluorescencia por citometría de flujo. Las imágenes superiores muestran el análisis por citometría de flujo de un experimento representativo. Los números indican el % de células en cada cuadrante. La gráfica representa la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. Se compararon estadísticamente los mismos rangos de concentración a distinto tiempo mediante el programa GraphPad Prisma.

A diferencia de la línea MM1S, la línea RPMI resulto ser más resistente a la berberina. De hecho, como puede observarse en la figura 2, a las 24 horas no se alcanzaba la IC50 en el rango de concentraciones utilizado. A pesar de que la desviación entre los datos

obtenidos de uno a otro ensayo es grande, de nuevo se optó por la concentración de 100 μM , en este caso a las 48 horas, por ser la más cercana a la IC50.

4.1.3. Determinación de la IC50 en el linfoma histiocítico U937.

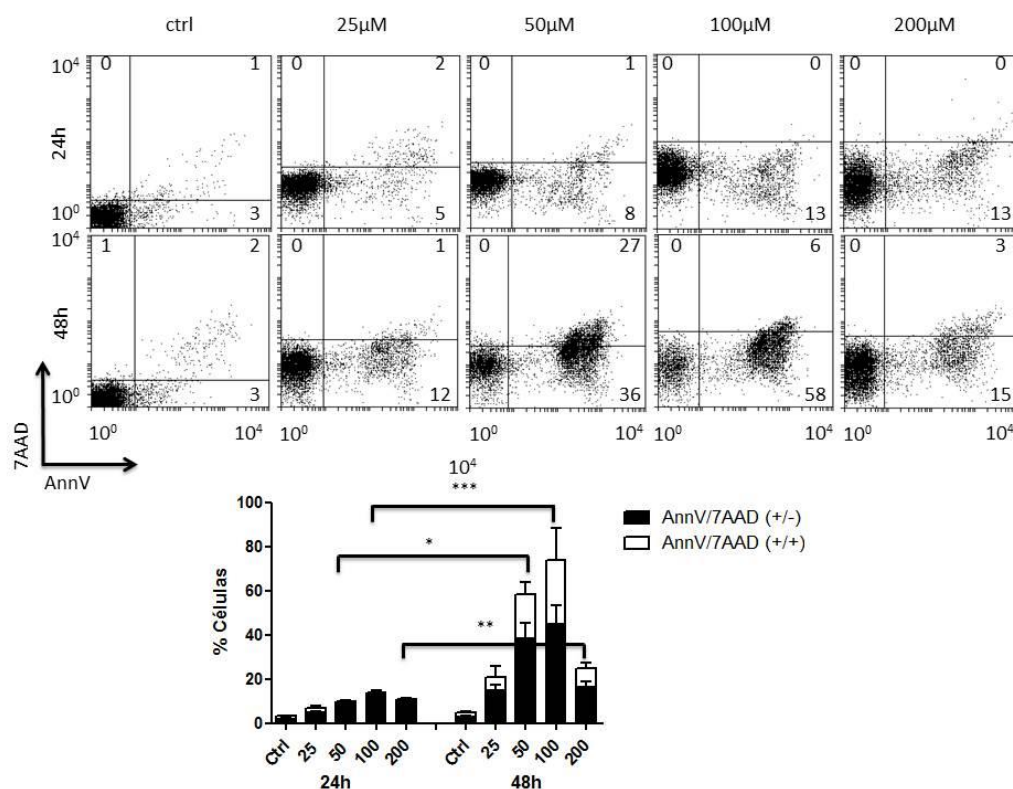


Figura 3: Análisis de la translocación de la fosfatidilserina y la permeabilidad de la membrana plasmática inducida por la berberina en las células U937. Se trataron las células U937 con las distintas concentraciones de berberina durante 24 y 48 horas. Posteriormente se incubaron con Anexina V dy634 y 7-AAD tal y como se describe en los métodos y se analizó la fluorescencia por citometría de flujo. Las imágenes superiores muestran el análisis por citometría de flujo de un experimento representativo. Los números indican el % de células en cada cuadrante. La gráfica representa la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. Se compararon estadísticamente los mismos rangos de concentración a distinto tiempo mediante el programa GraphPad Prisma.

En la figura 3 se observa que la línea U937 fué completamente resistente a la berberina a 24 horas en el rango de concentraciones utilizado, alcanzándose la IC50 a las 48 horas de a una concentración de berberina alrededor de 50 μM .

4.1.4. Determinación de la IC50 en la leucemia T Jurkat.

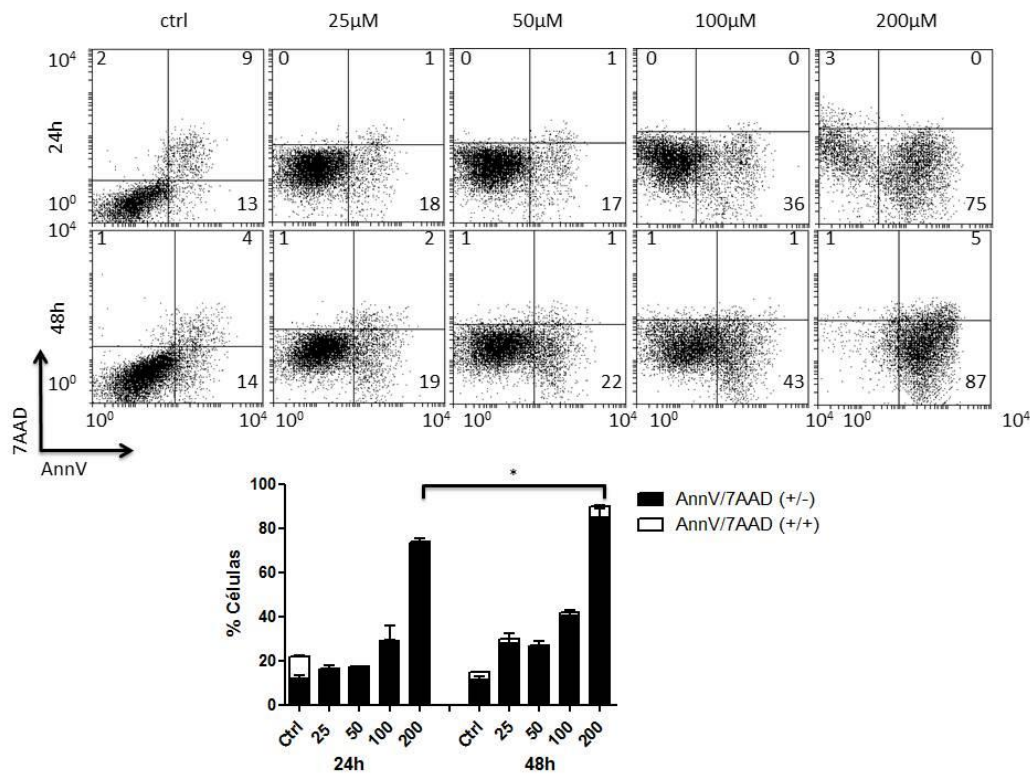


Figura 4: Análisis de la translocación de la fosfatidilserina y la permeabilidad de la membrana plasmática inducida por la berberina en las células Jurkat. Se trataron las células Jurkat con las distintas concentraciones de berberina durante 24 y 48 horas. Posteriormente se incubaron con Anexina V dy634 y 7-AAD tal y como se describe en los métodos y se analizó la fluorescencia por citometría de flujo. Las imágenes superiores muestran el análisis por citometría de flujo de un experimento representativo. Los números indican el % de células en cada cuadrante. La gráfica representa la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. Se compararon estadísticamente los mismos rangos de concentración a distinto tiempo mediante el programa GraphPad Prisma.

La línea Jurkat presenta una sensibilidad intermedia a la berberina, dando como resultado para la mayor concentración analizada (200 μ M) un índice de toxicidad muy alto tanto a 24 como a 48 horas (figura 4). Al igual que para la línea U937, la concentración de la IC50 se situaba alrededor de 50 μ M, si bien en este caso esta concentración era más evidente a las 48 horas.

4.2. ANÁLISIS DEL MECANISMO DE MUERTE CELULAR ACTIVADO POR LA BERBERINA UTILIZANDO MUTANTES DE LAS LINEAS TUMORALES.

Uno de los objetivos planteados era intentar determinar cuál de los mecanismos de muerte celular programada, la vía apoptótica extrínseca o la vía apoptótica intrínseca, cobraba más importancia en el mecanismo desencadenado por la acción de la berberina. Para ello se analizó la exposición de la fosfatidilserina, la permeabilidad de la membrana celular y la caída del potencial mitocondrial utilizando mutantes donde se habían sobrexpresado diferentes proteínas que protegen de estas dos vías de apoptosis.

Se utilizaron las líneas celulares Jurkat y U937, que servirían como control, y las líneas mutantes: Jurkat CrmA, Jurkat BclX_L, U937 Bcl2 y U937 Mcl1.

4.2.1. Determinación de la exposición de la fosfatidilserina y la permeabilidad de la membrana celular en la línea celular Jurkat y sus líneas mutantes.

Se realizaron ensayos a 24 y 48 horas sobre las líneas celulares: Jurkat, Jurkat CrmA y Jurkat BclX_L a una concentración de berberina de 100 μ M, la cual habíamos determinado como la más cercana a la IC₅₀ en la línea Jurkat.

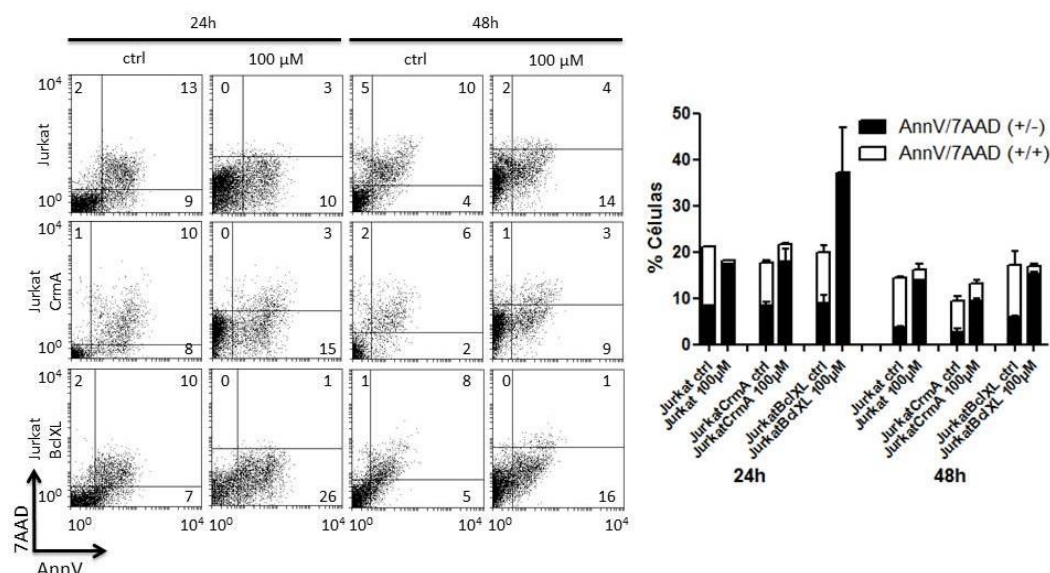


Figura 5: Análisis de la translocación de la fosfatidilserina y la permeabilidad de la membrana plasmática inducida por la berberina en las células Jurkat, Jurkat CrmA y Jurkat BclX_L. Se trataron las células Jurkat, Jurkat CrmA y Jurkat BclX_L con berberina 100 μ M durante 24 y 48 horas.

Posteriormente se incubaron con Anexina V dy634 y 7-AAD tal y como se describe en los métodos y se analizó la fluorescencia por citometría de flujo. Las imágenes superiores muestran el análisis por citometría de flujo de un experimento representativo. Los números indican el % de células en cada cuadrante. La gráfica representa la media \pm SEM de 2 experimentos independientes. Se compararon estadísticamente cada control con las células tratadas, además de las diferencias entre las líneas tratadas y los controles entre sí a mismo tiempo mediante el programa GraphPad Prisma.

A pesar de haber determinado la concentración de berberina 100 μ M como la más cercana a la IC₅₀, en estos experimentos la mortalidad de la línea celular Jurkat tratada con berberina no supero el 20% a ninguno de los dos tiempos (figura 5).

Los resultados obtenidos para la línea celular Jurkat CrmA determinan que la mortalidad a las 24 horas se encuentra en torno al 20% mientras que a las 48 horas se encuentra en torno al 10%, teniendo en cuenta que no existe diferencia entre el control y las células tratadas.

En el caso de la línea celular Jurkat BclX_L a las 24 horas existe una diferencia cercana al 20% de mortalidad de las células tratadas respecto del control. Sin embargo a las 48 horas no existe ninguna diferencia aparente entre ambas.

4.2.2. Determinación de la exposición de la fosfatidilserina y la permeabilidad en la membrana celular en la línea celular U937 y sus líneas mutantes.

Se realizaron ensayos a 24 y 48 horas sobre las líneas: U937, U937 Bcl2 y U937 Mcl1 a una concentración de berberina de 50 μ M, la cual se había determinado que era la más cercana a la IC₅₀ en la línea U937.

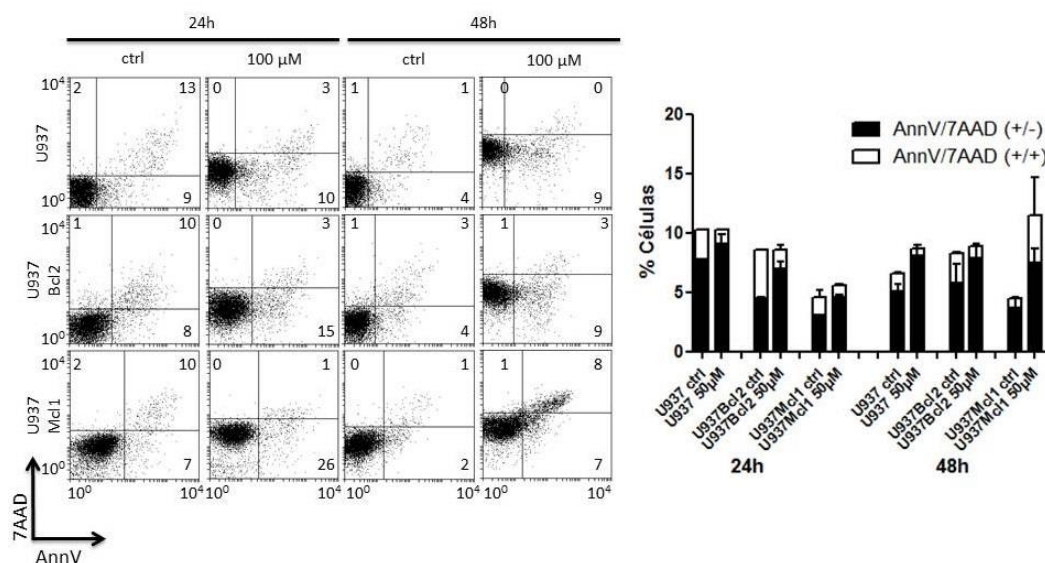


Figura 6: Análisis de la translocación de la fosfatidilserina y la permeabilidad de la membrana plasmática inducida por la berberina en las células U937, U937 Bcl2 y U937 Mcl1. Se trataron las células U937, U937 Bcl2 y U937 Mcl1 con berberina 50 μM durante 24 y 48 horas. Posteriormente se incubaron con Anexina V dy634 y 7-AAD tal y como se describe en los métodos y se analizó la fluorescencia por citometría de flujo. Las imágenes superiores muestran el análisis por citometría de flujo de un experimento representativo. Los números indican el % de células en cada cuadrante. La gráfica representa la media+/-SEM de 2 experimentos independientes. Se compararon estadísticamente cada control con las células tratadas, además de las diferencias entre las líneas tratadas y los controles entre sí a mismo tiempo mediante el programa GraphPad Prisma.

Como se puede observar en la figura 6, de nuevo sucede que a la concentración determinada como más cercana a la IC50, la mortalidad de la línea U937 tratada no superó el 10% a ninguno de los dos tiempos en estos experimentos.

Los resultados obtenidos para la línea U937 Bcl2 y U937 Mcl1 tienen mucha similitud. Ambas presentan muy poca mortalidad y valores prácticamente idénticos para el caso de la línea tratada y la línea control. Solo en el caso de la línea U937 Mcl1 a las 48 horas se observa una mortalidad en la línea tratada del doble respecto al control, pero a pesar de ello ese dato no supera el 15% de mortalidad.

4.2.3. Determinación de la caída de potencial mitocondrial en la línea celular Jurkat y sus líneas mutantes.

Se realizaron ensayos a 24 y 48 horas sobre las líneas: Jurkat, Jurkat CrmA y Jurkat BclX_L a una concentración de berberina de 100 μ M, la cual se había determinado que era la más cercana a la IC₅₀ en la línea Jurkat.

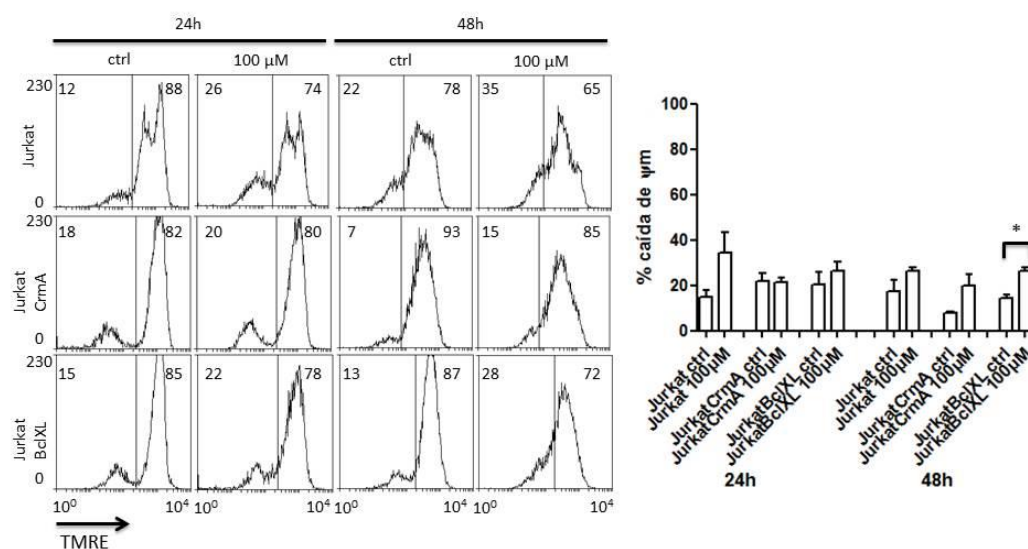


Figura 7: Análisis de la caída de potencial mitocondrial inducida por la berberina en las células Jurkat, Jurkat CrmA y Jurkat BclX_L. Se trataron las células Jurkat, Jurkat CrmA y Jurkat BclX_L con berberina 100 μ M durante 24 y 48 horas. Posteriormente se incubaron con TMRE tal y como se describe en los métodos y se analizó la fluorescencia por citometría de flujo. Las imágenes superiores muestran el análisis por citometría de flujo de un experimento representativo. Los números indican el % de células en cada cuadrante. La gráfica representa la media \pm SEM de 2 experimentos independientes. Se compararon estadísticamente cada control con las células tratadas, además de las diferencias entre las líneas tratadas y los controles entre sí a mismo tiempo mediante el programa GraphPad Prisma.

En la figura 7 no se observa una caída de potencial apreciable al comparar las células tratadas con el control a las 24 horas ni en la línea Jurkat CrmA, ni en la línea Jurkat BclX_L. Únicamente se observa una gran caída de potencial en el caso de la línea Jurkat, lo cual puede deberse a un efecto basal, puesto que las células tratadas presentan también un alto porcentaje de caída de potencial mitocondrial.

En los datos recogidos a las 48 horas no se observa que ninguna de las líneas, tanto las tratadas como los controles, superen una caída del potencial mitocondrial superior al 30%. A diferencia de la línea Jurkat, sí que se observan diferencias al comparar las

células tratadas con las controles en el caso de las líneas Jurkat CrmA y Jurkat BclX_L, llegando a ser significativa para la última de estas.

4.2.4. Determinación de la caída de potencial mitocondrial en la línea U937 y sus líneas mutantes.

Se realizaron ensayos a 24 y 48 horas sobre las líneas: U937, U937 Bcl2 y U937 Mcl1 a una concentración de berberina de 50 μ M, la cual se había determinado que era la más cercana a la IC₅₀ en la línea U937.

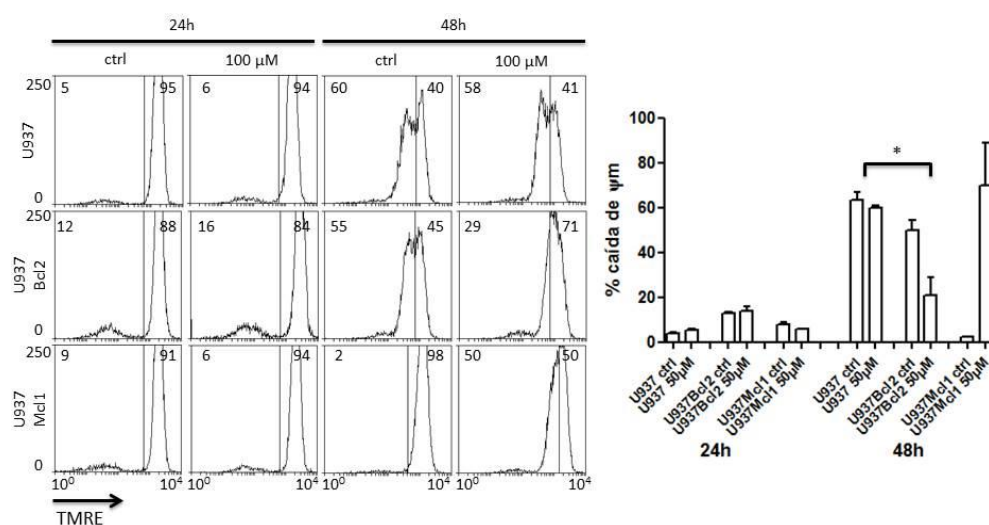


Figura 8: Análisis de la caída de potencial mitocondrial inducida por la berberina en las células U937, U937 Bcl2 y U937 Mcl1. Se trataron las U937, U937 Bcl2 y U937 Mcl1 con berberina 50 μ M durante 24 y 48 horas. Posteriormente se incubaron con TMRE tal y como se describe en los métodos y se analizó la fluorescencia por citometría de flujo. Las imágenes superiores muestran el análisis por citometría de flujo de un experimento representativo. Los números indican el % de células en cada cuadrante. La gráfica representa la media \pm SEM de 2 experimentos independientes. Se compararon estadísticamente cada control con las células tratadas, además de las diferencias entre las líneas tratadas y los controles entre sí a mismo tiempo mediante el programa GraphPad Prism.

En los ensayos para determinar la caída de potencial mitocondrial con la línea U937, U937 Bcl2 y U937 Mcl1 solo se observaron cambios apreciables a las 48 horas (figura 8). Cabe destacar que la caída es mucho mayor en las células control de la línea U937 Bcl2 que en sus células tratadas. En la línea U937 Mcl1 se puede observar una gran caída del potencial mitocondrial de las células tratadas respecto del control, sin embargo debido al error obtenido no se puede asegurar que dicha diferencia sea significativa.

4.2.5. Niveles de expresión de las proteínas de la familia Bcl2 en la apoptosis inducida por berberina en la línea MM1S.

El equilibrio entre las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas juega un papel importante en la homeostasis celular, por lo que para que se inicie la apoptosis por la vía intrínseca es necesario un desequilibrio entre estas proteínas a favor de las proteínas proapoptóticas. Por ello se analizó el efecto de la berberina a una concentración fija y diferentes intervalos de tiempo sobre los niveles de expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis mediante inmunoblots.

Se realizaron ensayos a 2, 12 y 24 horas sobre la línea MM1S a una concentración de berberina 100 μ M, la cual se había determinado que era la más cercana a la IC50. Se prepararon los lisados celulares y se analizaron por inmunoblot los niveles de expresión de las proteínas Mcl1, BclX_L, Bak y Bax.

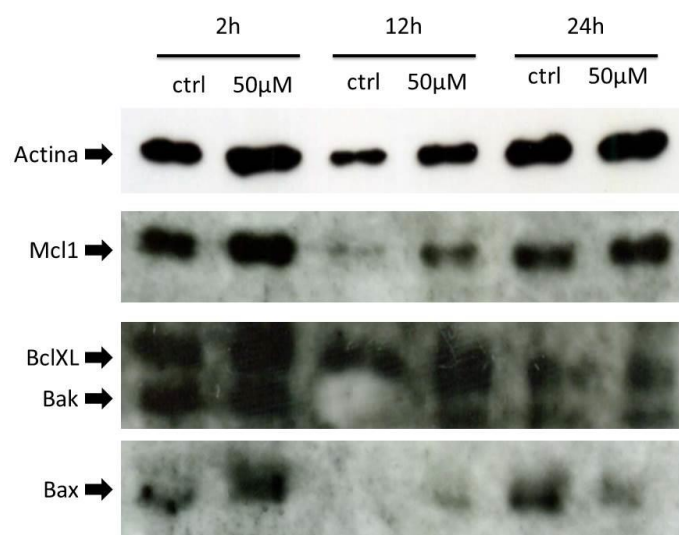


Figura 9: Niveles de expresión de las proteínas de la familia Bcl2 en la línea MM1S tratadas con berberina 100 μ M a diferentes tiempos. Se prepararon los lisados y se analizaron por inmunoblot los niveles de expresión de las proteínas que se indican en la figura, utilizándose la actina como control interno de carga.

Como puede verse en la figura 9, se observa una disminución de las proteínas antiapoptóticas Mcl1 y BclX_L a las 24 horas. Se puede observar también el descenso de Mcl1 a las 12 horas pero teniendo en cuenta el control de la actina, no podemos asegurar que se deba al efecto de la berberina o un problema de carga en el gel. De igual manera podría discutirse el efecto observado en BclX_L si lo comparamos con el control

al mismo tiempo. Por otro lado también parece observarse un descenso de las proteínas proapoptóticas Bak y Bax.

4.2.6. Niveles de expresión de las proteínas de la familia Bcl2 en la apoptosis inducida por berberina en la línea RPMI.

Se realizaron ensayos a 12, 24 y 48 horas sobre la línea RPMI a una concentración de berberina 100 μ M, la cual se había determinado que era la más cercana a la IC50. Se prepararon los lisados celulares y se analizaron por inmunoblot los niveles de expresión de las proteínas Mcl1, BclXL, Bak y Bax.

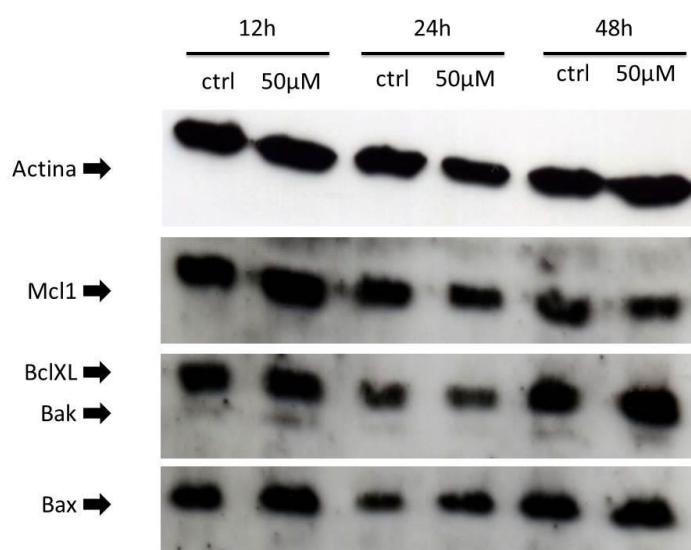


Figura 10: Niveles de expresión de las proteínas de la familia Bcl2 en la línea RPMI MM1S tratadas con berberina 100 μ M a diferentes tiempos. Se prepararon los lisados y se analizaron por inmunoblot los niveles de expresión de las proteínas que se indican en la figura, utilizándose la actina como control interno de carga.

Puede observarse el ligero descenso de la proteína antiapoptótica Mcl1 a las 24 y 48 horas de incubación con berberina (figura 10). Respecto a la proteína antiapoptótica BclXL y las proteínas proapoptóticas Bak y Bax choca el hecho de que se observa un descenso de las mismas a las 24 horas, pero de nuevo incrementa su expresión a las 48 horas. No obstante también se produce un descenso en los niveles de actina a las 24 horas, lo que puede significar que hay menos proteínas en general a ese tiempo.

4.2.7. Niveles de expresión de las proteínas de la familia Bcl2 en la apoptosis inducida por berberina en la línea U937.

Se realizaron ensayos a 12, 24 y 48 horas sobre la línea U937 a una concentración de berberina 50 μ M, la cual se había determinado que era la más cercana a la IC50. Se prepararon los lisados celulares y se analizaron por inmunoblot los niveles de expresión de las proteínas Mcl1, Bim y Bax.

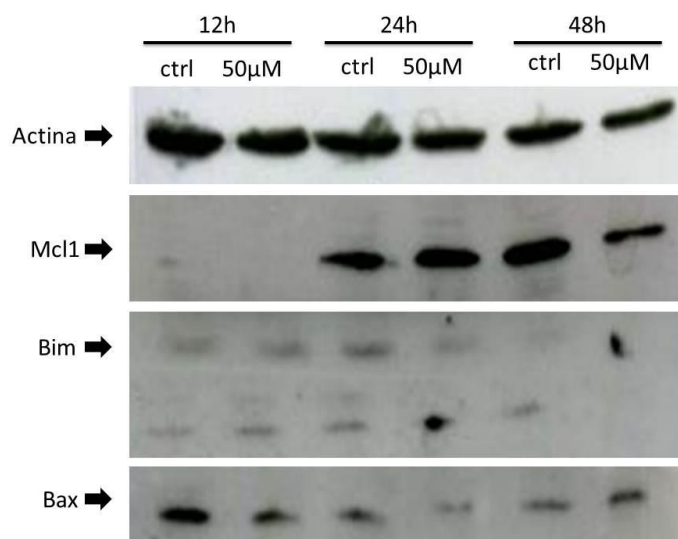


Figura 11: Niveles de expresión de las proteínas de la familia Bcl2 en la línea U937 tratadas con berberina 50 μ M a diferentes tiempos. Se prepararon los lisados y se analizaron por inmunoblot los niveles de expresión de las proteínas que se indican en la figura, utilizándose la actina como control interno de carga.

En la figura 11 sorprende el hecho de que no se observa la presencia de la proteína antiapoptótica Mcl1 en ninguno de los dos lisados recogidos a las 12 horas, más teniendo en cuenta que según el control de la actina, no ha habido ningún problema en la carga. Atendiendo a los resultados a los otros dos tiempos, podríamos decir que puede apreciarse un descenso de Mcl1 a las 48 horas. Con respecto a las proteínas proapoptóticas Bim y Bax, se observa una disminución de la señal tanto a las 24 como a las 48 horas.

4.3. ACTIVIDAD DE LA BERBERINA FRENTE A MUESTRAS DE PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA DE TIPO B (LLC-B).

Otro de los objetivos que se planteo fue observar el efecto antitumoral de la berberina en distintas muestras de pacientes con LLC-B y determinar si se pudiera tener en consideración para dicho tratamiento, por lo que se procedió a realizar experimentos “*ex vivo*”.

Las células plasmáticas se incubaron a las dosis de 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M y 200 μ M de berberina durante 24 horas tanto en presencia como en ausencia del inhibidor de la caspasa 3 Z-DEVD-FMK, lo que a su vez nos ayudaría a determinar si el mecanismo desencadenado por la berberina depende de la caspasa-3. Dado que las células de LLC son positivas para los marcadores de membrana CD5 y CD19 mientras que las células sanas sólo expresan uno de ellos, transcurrido este tiempo las células se marcaron con CD5, CD19, Anexina V Dy634 y 7-AAD.

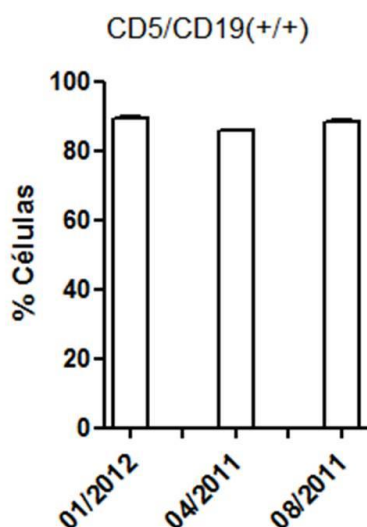


Figura 12: Determinación del inmunofenotipo de pacientes con LLC-B mediante citometría de flujo. Las distintas muestras fueron incubadas con anticuerpos frente a CD5 marcado con FITC y a CD19 marcado en PE.

Como se observa en la figura 12, en los 3 pacientes analizados se determinó que más de un 80% de la población celular era doble positiva para el marcaje con CD5 y CD19, el cual es un inmunofenotipo típico de la leucemia linfocítica crónica.

4.3.1. Ensayo sobre el paciente 01/2012.

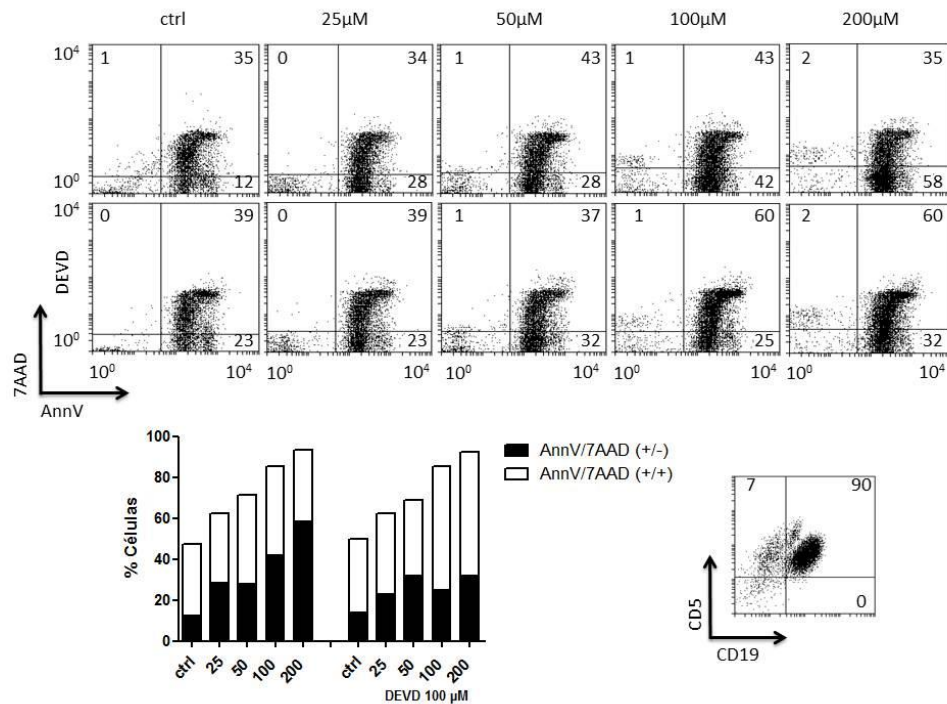


Figura 13: Ensayo de la citotoxicidad de la berberina frente a un paciente con LLC-B. Las células obtenidas del paciente de LLC-B 01/2012 se trataron a distintas concentraciones de berberina durante 24 horas, en presencia y ausencia de Z-DEVD-FMK. Posteriormente se incubaron con AnnV V Dy634 y 7-AAD tal y como se describe en los métodos y se analizó la fluorescencia por citometría de flujo. Las imágenes superiores muestran el análisis por citometría de flujo de un experimento representativo. Los números indican el % de células en cada cuadrante.

A pesar de que la muerte basal sobrepasa el 40% en el control, se observa claramente el aumento de la mortalidad a mayores concentraciones de berberina, llegando a alcanzar una mortalidad del 90% a la concentración más alta de berberina ensayada (figura 13). Los datos obtenidos en presencia del inhibidor Z-DEVD-FMK no muestran diferencias con los datos obtenidos en su ausencia, indicando que no ha habido ningún tipo de protección frente a la muerte.

4.3.2. Ensayo sobre el paciente 04/2011.

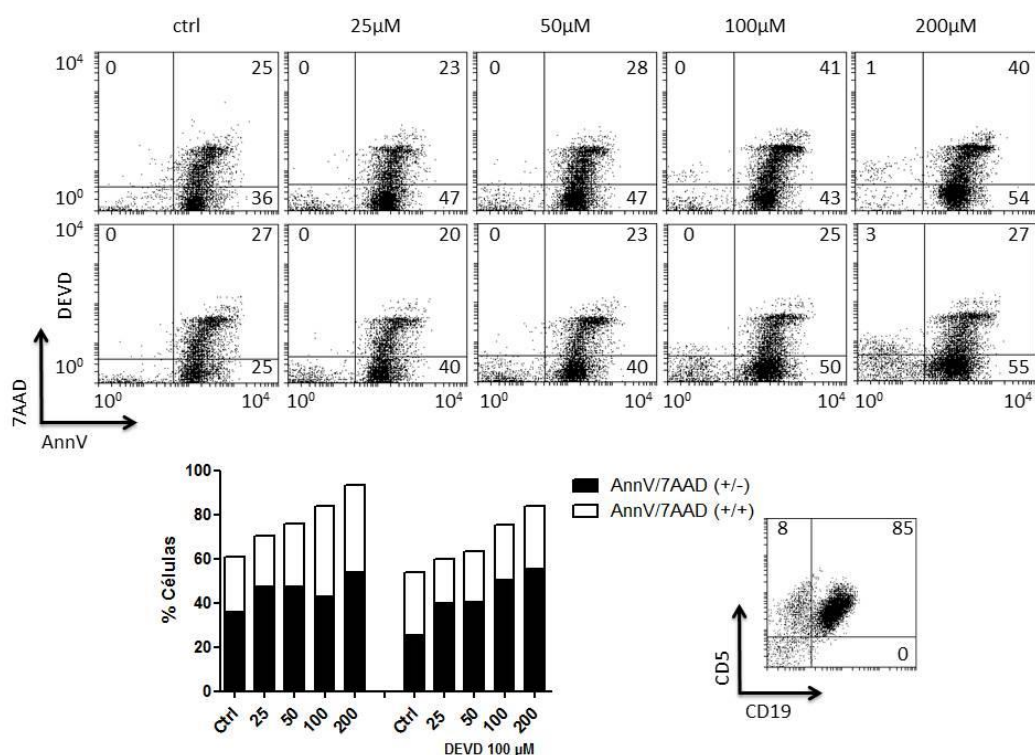


Figura 14: Ensayo de la citotoxicidad de la berberina frente a un paciente con LLC-B. Las células obtenidas del paciente de LLC-B 04/2011 se trataron a distintas concentraciones de berberina durante 24 horas, en presencia y ausencia de Z-DEVD-FMK. Posteriormente se incubaron con AnnV V Dy634 y 7-AAD tal y como se describe en los métodos y se analizó la fluorescencia por citometría de flujo. Las imágenes superiores muestran el análisis por citometría de flujo de un experimento representativo. Los números indican el % de células en cada cuadrante.

En el caso del paciente de LLC-B 04/2011, el control llega a alcanzar una muerte basal del 60%. A pesar de ello sigue observándose un incremento de la muerte en función de concentraciones más altas de berberina (figura 14). De nuevo los datos obtenidos en presencia del inhibidor Z-DEVD-FMK son muy similares a los datos obtenidos en su ausencia, sin embargo sí que puede apreciarse una ligera protección en este caso.

4.3.3. Ensayo sobre el paciente 08/2011.

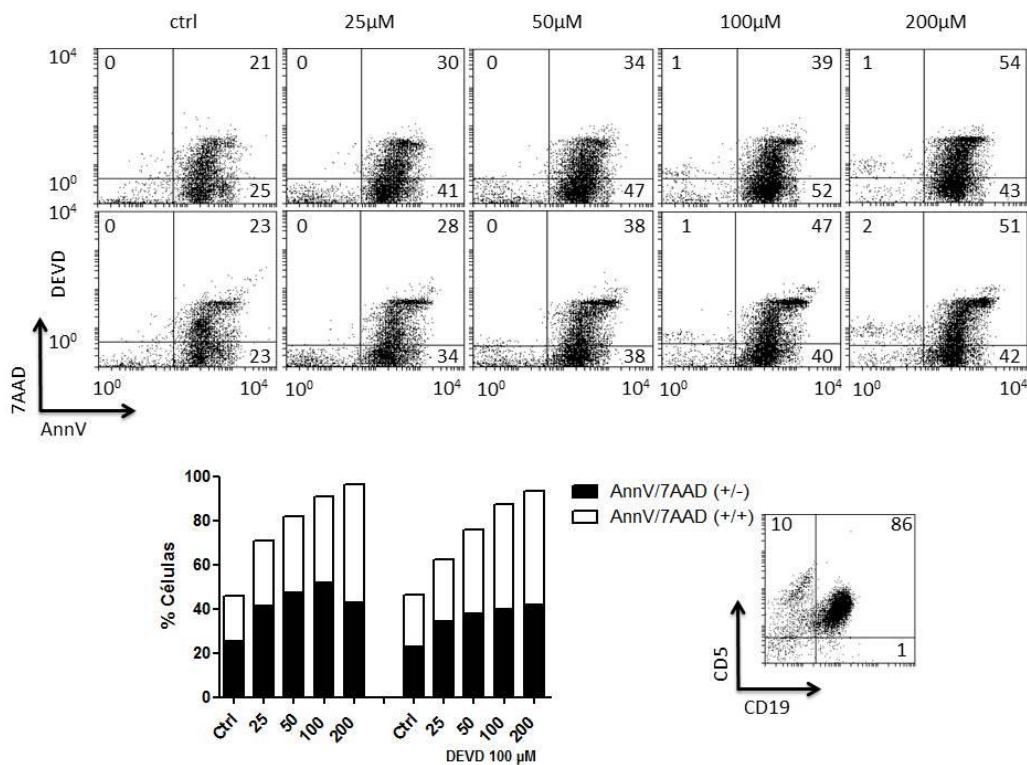


Figura 15: Ensayo de la citotoxicidad de la berberina frente a un paciente con LLC-B. Las células obtenidas del paciente de LLC-B 08/2011 se trataron a distintas concentraciones de berberina durante 24 horas, en presencia y ausencia de Z-DEVD-FMK. Posteriormente se incubaron con AnnV V Dy634 y 7-AAD tal y como se describe en los métodos y se analizó la fluorescencia por citometría de flujo. Las imágenes superiores muestran el análisis por citometría de flujo de un experimento representativo. Los números indican el % de células en cada cuadrante.

Al igual que se ha ido observando con los otros pacientes de LLC-B, se repite un incremento de la mortalidad a concentraciones mayores de berberina, siendo para este caso mayor el salto dado entre el control y la primera concentración que los saltos sucesivos (figura 15). La presencia del inhibidor Z-DEVD-FMK sigue suponiendo una muy ligera protección, de modo que no podemos aventurar que dichas diferencias puedan deberse a él o a simples errores experimentales.

4.4. TOXICIDAD DE LA BERBERINA EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBLs).

Para determinar la posible aplicación de la berberina en tratamientos era necesario llevar a cabo ensayos sobre la toxicidad de la misma en PBLs sanos, de modo que su actividad citotóxica se desempeñe únicamente en las células objetivo del tratamiento. Con este objetivo se realizaron ensayos “*ex vivo*” con poblaciones de PBLs sanos extraídos de muestras de pacientes poliglobúlicos, donadas por el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza.

Los PBLs se incubaron a las dosis de 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M y 200 μ M de berberina durante 24 y 48 horas. Transcurrido este tiempo las células se marcaron con Annexina V Dy634.

De la misma manera se llevaron a cabo ensayos “*ex vivo*” con poblaciones de macrófagos obtenidos de la médula ósea de ratones C57BL6.

4.4.1. Ensayo sobre PBLs de pacientes poliglobúlicos.

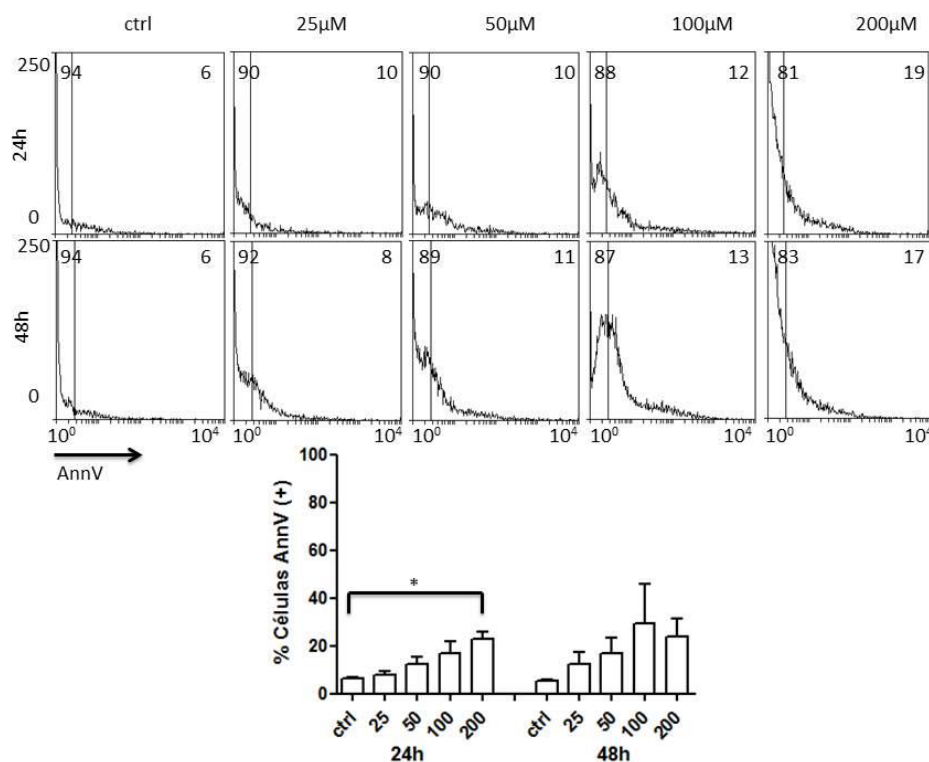


Figura 16: Análisis de la citotoxicidad de la berberina sobre PBLs sanos. Se trataron los PBLs con las distintas concentraciones de berberina durante 24 y 48 horas. Posteriormente se incubaron con Annexin V

dy634 tal y como se describe en los métodos y se analizó la fluorescencia por citometría de flujo. Las imágenes superiores muestran el análisis por citometría de flujo de un experimento representativo. Los números indican el % de células en cada cuadrante. La gráfica representa la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. Se compararon estadísticamente los mismos rangos de concentración a distinto tiempo y cada concentración con el control a cada tiempo mediante el programa GraphPad Prisma.

En la figura 16 observamos como el porcentaje de células positivas al marcaje con Anexina V incrementa a concentraciones mayores de berberina, al igual que ha ido repitiéndose con los ensayos similares que se han presentado anteriormente. Aunque la diferencia es significativa al comparar el control con 200 μ M de berberina, ninguno de los datos sobrepasa el 20% de la población. Solo el dato representado a las 48 horas y a una concentración de 100 μ M sobresale entre los demás, pero no puede considerarse fiable dado el error experimental.

4.4.2. Ensayo sobre macrófagos extraídos de ratón.

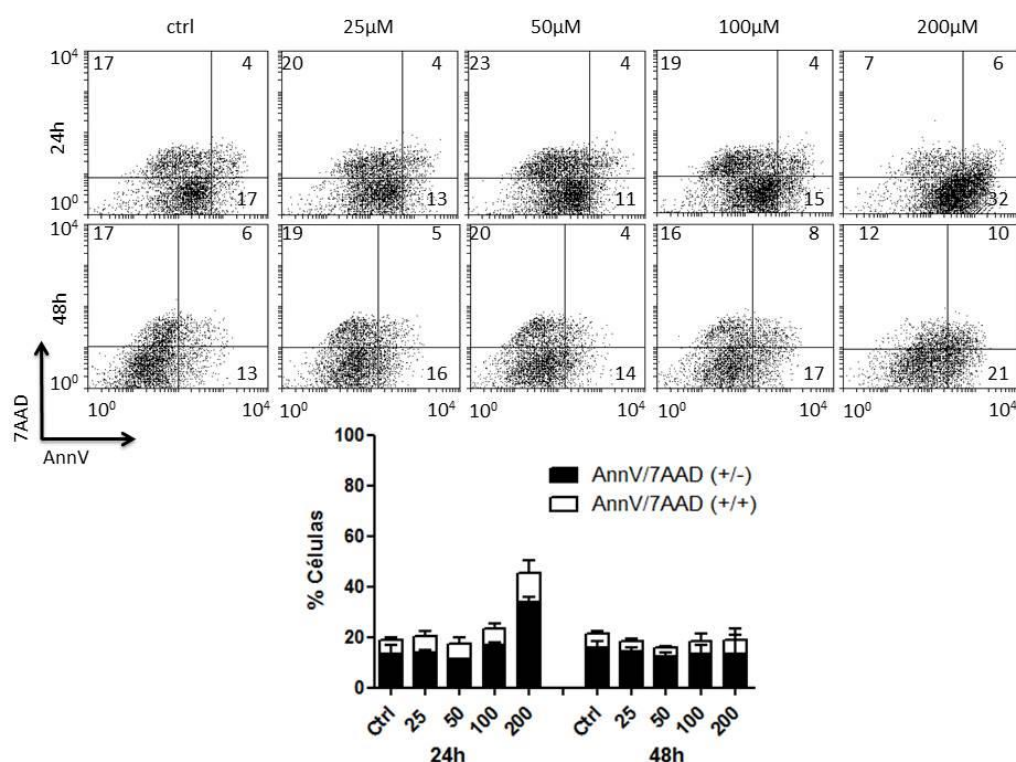


Figura 17: Análisis de la citotoxicidad de la berberina sobre macrófagos de ratón. Se trataron los PBLs con las distintas concentraciones de berberina durante 24 y 48 horas. Posteriormente se incubaron con Anexina V dy634 y 7-AAD tal y como se describe en los métodos y se analizó la fluorescencia por citometría de flujo. Las imágenes superiores muestran el análisis por citometría de flujo de un

experimento representativo. Los números indican el % de células en cada cuadrante. La gráfica representa la media+/-SEM de 3 experimentos independientes. Se compararon estadísticamente los mismos rangos de concentración a distinto tiempo y cada concentración con el control a cada tiempo mediante el programa GraphPad Prisma.

Aunque según los dot plots representativos se podría decir que en todos ellos se observan grandes porcentajes de poblaciones positivas únicamente para 7-AAD (figura 17), estos datos fueron discriminados debido a un problema en la realización de los settings en los que no se tuvo en cuenta la propia autofluorescencia de los macrófagos y la fluorescencia intrínseca de la berberina. Descartados estos datos, ninguna de las poblaciones a las distintas concentraciones de berberina, tanto a las 24 como a las 48 horas, sobrepasa el 30% de mortalidad, salvo la población a berberina 200 μ M a las 24 horas.

4.5. ACCIÓN PREVENTIVA DE LA BERBERINA FRENTE AL DESARROLLO TUMORAL DE LEUCEMIA “*IN VIVO*”.

En el laboratorio ya se habían llevado a cabo ensayos en los cuales se había tratado con berberina a una población de ratones a los que previamente se les habían inoculado células de leucemia de ratón EL4. Se había visto que la berberina retrasaba el crecimiento tumoral aunque no eliminaba los tumores. Al ser un componente natural de las plantas utilizadas en medicina tradicional se pensó en el beneficio que puede desempeñar su toma habitual por lo que se diseñó un nuevo ensayo en el que se empezara a tratar con berberina a la población en estudio una semana previa a la inoculación de las células tumorales.

Los 16 ratones C57BL6 de los que se disponían se dividieron en dos poblaciones, una a la que se trataría con 10mg/Kg de berberina cada 48 horas y otra población control en la que se sustituyó la berberina por PBS. Los ratones tratados fueron numerados del 1 al 8 mientras que a los ratones control se les asignó números del 9 al 16. Después de una semana de tratamiento, se inocularon $2 \cdot 10^5$ células EL4 a cada ratón de forma subcutánea en uno de los costados, considerándose este como el día 0. El crecimiento de los tumores se controló cada día hasta el día 12, en el cual los ratones fueron sacrificados, se les extirparon los tumores y se procedió a medir su volumen real y su peso.

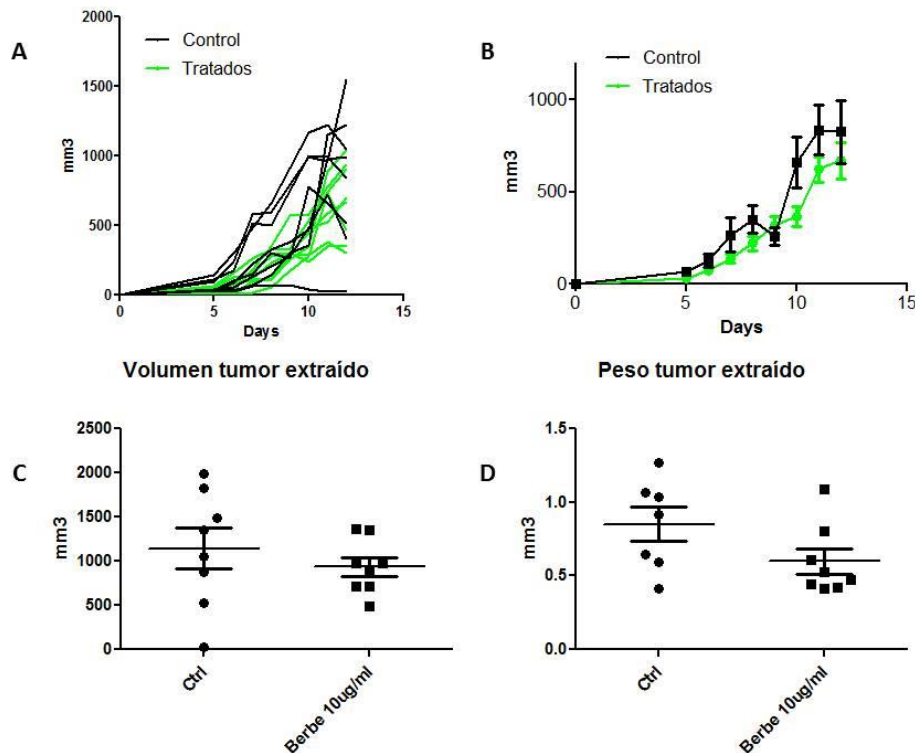


Figura 18: Análisis “*in vivo*” de la acción de la berberina frente a EL4 en ratones C57BL6. En la gráfica **A** se representa el volumen medido del tumor de cada ratón (en negro los ratones control y en verde los ratones tratados) frente a los días. En la gráfica **B** se representa el volumen medio de los tumores de los ratones tratados (en verde) y de los ratones control (en negro) frente a los días. En la gráfica **C** se representa el volumen final de los tumores después de sacrificar a los ratones. En la gráfica **D** se representa el peso de los tumores extraídos después de sacrificar a los ratones. Los datos representados en las gráficas **C** y **D** se compararon estadísticamente de forma respectiva mediante el programa GraphPad Prisma.

Durante la disección de los ratones para extirparles el tumor, se tomaron notas sobre la apariencia que mostraba el interior de cada ratón, las cualidades de cada tumor, si se observaba infiltración, si había afectado a otros órganos o si se observaba necrosis:

- EL ratón 1 presentaba un tumor muy consistente y delimitado, el cual además no presentaba rasgos de necrosis.
- El ratón 2 presentaba una ligera infiltración que llegaba hasta los riñones. El tumor no mostraba rasgos de necrosis pero si de disgregabilidad.
- El ratón 3 presentaba un tumor compacto, delimitado, sin rasgos de necrosis ni de infiltración.
- El ratón 4 presentaba un tumor muy necrotizado por la cara externa, pero delimitado, compacto y subcutáneo. Adherido al tumor se observó una

irrigación a simple vista similar a la grasa, la cual se hipotetizo que fueran ganglios o células E14.

- El ratón 5 se halló muerto el día del sacrificio. A pesar de presentar un tumor pequeño en tamaño, este era deleznable y con un alto grado de infiltración a uno de los riñones.
- El ratón 6 presentaba un tumor con dos zonas diferenciables, una sólida y otra endeble. Se encontraba ligeramente infiltrado y no mostraba rasgos de necrosis.
- El ratón 7 presentaba un tumor pequeño, subcutáneo, firme y bien delimitado.
- El ratón 8 presentaba un tumor por debajo de la hipodermis que había invadido uno de los riñones, además de tener un aspecto inconsistente.
- El ratón 9 presentaba un tumor con dos secciones, una pequeña y con cierto grado de necrosis que se mantenía en la capa subcutánea, y otra mayor la cual se había infiltrado hasta el hueso.
- El ratón 10 presentaba dos tumores, uno de ellos más compacto y subcutáneo, y otro más endeble e interno sin llegar a sobrepasar la hipodermis. Ambos tumores se mantenían unidos por un tejido blanquecino similar al observado en el ratón 4.
- El ratón 11 presento dos tumores de apariencia similar a los vistos en el ratón 10. El mayor de los tumores presentaba tropismo hacia la columna pero no llegaba a presentar infiltración.
- El ratón 12 presentaba un tumor diminuto con adherencias del tejido blanquecino comentado anteriormente.
- El ratón 13 presentaba un tumor deleznable. Unido a él se observaban ganglios y tejido blanquecino.
- El ratón 14 presentaba una pequeña zona necrotizada en la parte exterior. En el interior mostro ser compacto, subcutáneo y sin infiltraciones.
- El ratón 15 presentaba dos tumores, uno de ellos considerablemente mayor que el otro, con tropismo hacia la columna. Aunque no firme, no era tan frágil como el que presentaba el ratón 13.
- El ratón 16 presento un tumor pequeño, necrótico en la cara expuesta pero completamente superficial.

Los resultados obtenidos, sin tener en cuenta aquellos casos que se salen de la tendencia, parecen mostrar que los ratones tratados frente a los ratones control presentan

tumores de menor tamaño y pesos (figura 18). Además estos presentan un aspecto menos invasivo y más encapsulado, lo que podría considerarse más benigno. Esta prueba realizada se repitió pasado un tiempo con la diferencia de que se consideró como día 0 el día en que los tumores alcanzaron un volumen de 30-50 mm³, retrasando o adelantando el periodo en unos u otros ratones según el crecimiento para ajustar al máximo las desviaciones.

En este caso los ratones usados fueron 17 ratones de la estirpe TLR2-/- C57BL10, al ser aquellos de los que se disponía y juzgar que no afectaría al desarrollo del ensayo. Los ratones se dividieron en una población de 8 y 9 ratones de las cuales la primera se consideró como la población de ratones a tratar y la segunda como la población control. La población tratada se numeró del 1 al 8 y la población control del 9 al 17. Tras la inoculación de las células EL4 de forma similar a la anterior, el crecimiento de cada tumor fue controlado hasta el día 9 en que los ratones fueron sacrificados.

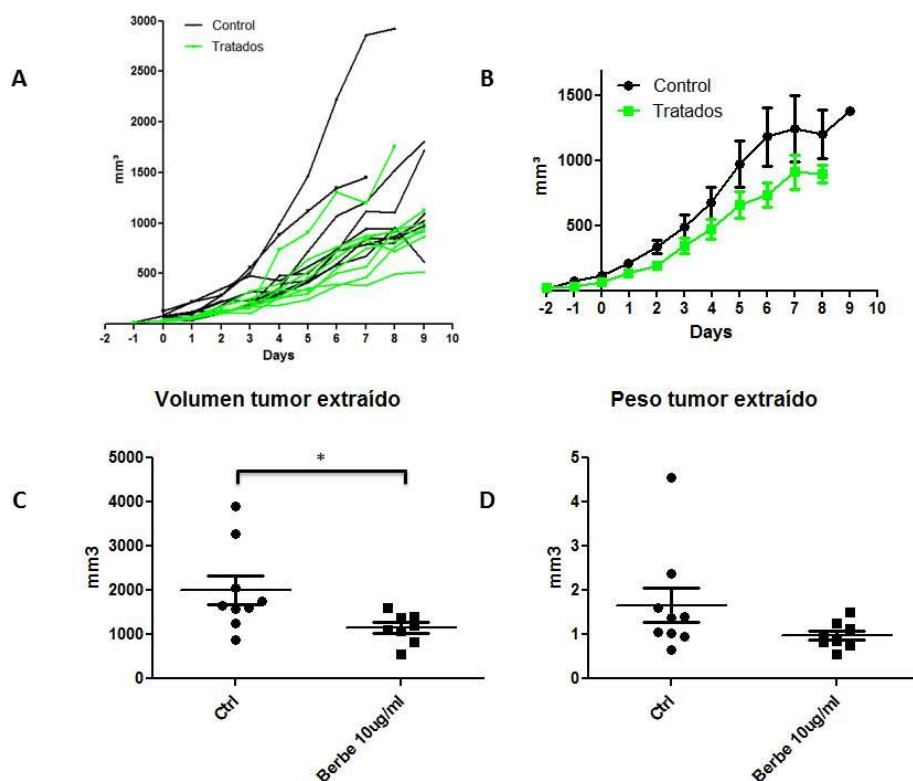


Figura 19: Análisis “*in vivo*” de la acción de la berberina frente a EL4 en ratones TLR2-/- C57BL10. En la gráfica **A** se representa el volumen medido del tumor de cada ratón (en negro los ratones control y en verde los ratones tratados) frente a los días. En la gráfica **B** se representa el volumen medio de los tumores de los ratones tratados (en verde) y de los ratones control (en negro) frente a los días. En la gráfica **C** se representa el volumen final de los tumores después de sacrificar a los ratones. En la gráfica **D** se representa el peso de los tumores extraídos después de sacrificar a los ratones. Los datos

representados en las gráficas **C** y **D** se compararon estadísticamente de forma respectiva mediante el programa GraphPad Prisma.

De nuevo se llevó a cabo un análisis cualitativo sobre la apariencia que mostraba el interior de cada ratón, las cualidades de cada tumor, si se observaba infiltración, si había afectado a otros órganos o si se observaba necrosis en el momento de la disección.

- El ratón 1 presentaba un tumor diferenciable en 3 partes de las cuales la más pequeña era ligeramente invasiva sin llegar a atravesar la hipodermis ni a afectar a los riñones.
- El ratón 2 presentaba un tumor diferenciable en 3 partes superficiales y sin infiltraciones. El tumor era fácilmente disgregable de la dermis y presentaba mucha irrigación sanguínea.
- Los ratones 3, 4 y 5 presentaban tumores prácticamente idénticos, superficiales, planos y completamente subcutáneos. Se podía observar cierto grado de necrotización en el centro de la cara expuesta del tumor.
- El ratón 6 presentaba un tumor de nuevo idéntico a los observados en los ratones 3, 4 y 5, con la única salvedad de que en este caso la cara externa estaba totalmente necrotizada.
- El ratón 7 presentaba un tumor superficial y necrótico en la superficie además de otro de menor tamaño que se infiltró por debajo de la hipodermis. Este segundo tumor se encontraba adherido al hueso y parecía haberse introducido en las costillas. A pesar de su invasión no había afectado a los riñones.
- El ratón 8 presentaba la misma morfología que se había observado en los ratones 3, 4 y 5.
- El ratón 9 presentaba dos tumores, uno superficial con gran presencia de tejido blanquecino y cierto grado de necrotización, y otro que había llegado a infiltrar hasta los intestinos. En un principio no se observaron afectados ni los riñones ni el hígado, pero el tumor se extendió hasta las costillas.
- El ratón 10 presentaba un tumor superficial necrotizado con gran presencia de tejido blanquecino.
- El ratón 11 presentaba un tumor superficial con ligeros signos de necrosis, y un segundo tumor de gran tamaño infiltrado por debajo de la hipodermis y muy irrigado. Este segundo tumor había llegado hasta las costillas. Aunque los

riñones e hígado no parecían estar afectados, este último presenta un color extraño.

- El ratón 12 presentaba un tumor superficial, completamente subcutáneo y ligeramente necrotizado.
- El ratón 13 presentaba un tumor localizado por debajo de la hipodermis que mostraba signos de irrigación.
- El ratón 14 presentaba un tumor subcutáneo con gran presencia de tejido blanquecino. En este caso dicho tejido presentaba una consistencia más espesa a la que se había observado anteriormente.
- El ratón 15 presentaba un tumor con la cara externa necrótica y un segundo tumor infiltrado. El tumor presentaba moderada irrigación.
- El ratón 16 presentaba un tumor superficial necrótico, muy extendido e irrigado. Se pudo observar también una protuberancia del tumor completamente infiltrada en las costillas.
- El ratón 17 presentaba un tumor con menor irrigación como la que se había visto en el resto de los ratones control. Como el resto de tumores, presentaba la cara externa necrótica. También se observó por la zona inguinal, un cuerpo con el aspecto pero demasiado grande para ser un ganglio, que se recogió para su posterior análisis.

Como se había observado en la prueba anterior con los ratones C57BL6, los datos aportados en este ensayo coincidían en que los ratones tratados frente a los ratones control presentan tumores de menor tamaño y peso (figura 19). Además estos presentan un aspecto menos invasivo y más encapsulado, lo que podría considerarse más benigno. Éste estudio es quizás más visible al haber intentado corregir la desviación y poder verse más claramente, exceptuando los casos que siempre se salen de la normal, los datos obtenidos de forma cuantitativa y cualitativa.

5. CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN.

Al igual que se había observado en los pocos estudios realizados hasta el momento, se ha corroborado el papel antitumoral de la berberina en tumores hematológicos “*in vitro*”. Esto dista lejos de asegurar su eficacia “*in vivo*” pero son los primeros pasos necesarios.

De las cuatro líneas celulares sobre las que se ha ensayado, la que presento mayor resistencia al tratamiento fue la línea celular RPMI 8226, además el error obtenido en el ensayo hace dudar de los resultados obtenidos a las 48 horas, a pesar de que al rango de 100 μM se obtenga una diferencia significativa de P menor de 0.01 entre las 24 y las 48 horas.

La línea celular MM1S resulto ser la más sensible al tratamiento alcanzando altos porcentajes de muerte a las 24 horas y que se mantuvieron a las 48 horas, no dando diferencias significativas al comparar los resultados obtenidos a uno y otro tiempo.

La línea celular Jurkat presento una sensibilidad similar a la que se observó en la línea celular RPMI 8226 excepto al rango de 200 μM , al que el porcentaje de muerte llegaba incluso a duplicar al porcentaje obtenido al rango inmediatamente anterior.

Los datos más sorprendentes que se obtuvieron en la realización de estos ensayos fueron los obtenidos para la línea celular U937 en referencia a los porcentajes obtenidos al rango de 200 μM respecto a los obtenidos a 100 μM . En principio se atribuyó a un error en la administración de la berberina o al analizar la muestra, pero tras varias repeticiones se descartó que este pudiese ser el problema. Se intentó buscar información en otros ensayos en que se hubiera usado la berberina sobre esta misma línea celular, pero aunque los rangos de concentración usados eran similares, no llegaban a analizar el efecto del tratamiento a las 48 horas [58]. Se hipotetizo que al ser una línea promonocítica, quizás dicha concentración indujese la diferenciación de las células, volviéndose más resistentes al tratamiento con el alcaloide, pero los ensayos planteados no aportaron ninguna información que dilucidara la razón de los resultados obtenidos.

Se había visto que la berberina elimina las células tumorales mayoritariamente mediante la inducción de la apoptosis a través de la ruta mitocondrial [28]. Aunque los ensayos

realizados con los mutantes no fueron del todo concluyentes, la falta de protección en la línea Jurkat CrmA podría descartar la implicación de la vía extrínseca en el mecanismo activado por la berberina, aunque este mecanismo había sido sugerido previamente [59].

Sorprende el hecho de que en la línea Jurkat BclX_L, se observe un alto porcentaje de muerte a las 24 horas, teniendo en cuenta que la sobreexpresión de esta proteína debería protegerlas de la muerte. Bien es cierto que los resultados decaen a las 48 horas. Quizás como se observa en el marcaje con la sonda TMRE, la caída, aunque ligera, del potencial mitocondrial que sufren tiene mayor peso de modo que la célula se desequilibra hacia las señales proapoptóticas recibidas.

También sorprende la total falta de protección que presenta la línea U937 Mcl1 puesto que la sobreexpresión de esta proteína antiapoptótica de la familia Bcl2 podría haber supuesto resistencia al tratamiento. De hecho en un trabajo previo se había sugerido la implicación de esta proteína en la apoptosis inducida por Berberina [60]. Sin embargo los datos de ese trabajo eran indirectos, ya que se basaban en una bajada de expresión de Mcl1 durante la incubación con la droga. Esto puede significar que, a pesar de ser una de las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl2 y de que se produzca un descenso en su expresión (dato confirmado en nuestro trabajo), no es una de las dianas en las que actúa la berberina. Sin embargo todo lo contrario se puede observar en la línea U937 Bcl2, en la cual puede verse en los resultados, sobre todo más claro en los obtenidos con la sonda TMRE, que la sobreexpresión de esta proteína protege de la caída de potencial mitocondrial y de la muerte celular.

Los datos obtenidos por inmunoblot son todavía menos aclaratorios. Si bien parece verse un descenso de las proteínas antiapoptóticas Mcl1 y BclX_L, este hecho es contradictorio con la también bajada de las proteínas proapoptóticas Bak y Bax.

Los datos obtenidos en el ensayo del tratamiento con berberina de las tres muestras de pacientes con LLC-B fueron satisfactorios. A pesar de que en las tres muestras se partió de niveles de muerte celular altos, se pudo observar el efecto citotóxico que desempeña la berberina en este tipo de cáncer hematológico. Además se ha corroborado la baja toxicidad secundaria que presenta en el resto de células mononucleadas de sangre periférica [44]. Finalmente, la falta de protección que se observa en presencia del inhibidor de caspasas Z-DEVD-FMK, parece de nuevo excluir a la vía extrínseca del mecanismo de muerte celular activado por la berberina.

Por último, en el análisis del papel preventivo de la berberina frente al desarrollo tumoral de un linfoma T “*in vivo*”, los resultados indican en ambos casos que la berberina ha retrasado el crecimiento de los tumores, que ha inhibido la invasividad y la angiogénesis en la mayoría de los casos, y que los tumores en los ratones tratados presentan un aspecto más encapsulado y benigno, datos similares a los que se habían tomado con anterioridad [54, 55, 56].

Las conclusiones pueden por tanto resumirse en:

- La berberina presenta actividad antitumoral “*in Vitro*” sobre diferentes tipos de líneas tumorales hematológicas.
- La berberina presenta potencial antitumoral “*in vivo*” en un modelo de autotrasplante frente al linfoma de células T EL4:
 - Retarda su crecimiento.
 - Inhibe su capacidad invasiva.
 - Interfiere con su vascularización.
- La berberina elimina células tumorales mayoritariamente mediante inducción de la apoptosis a través de la vía mitocondrial, habiéndose comprobado la participación de la proteína Bcl2 en este mecanismo.
- La proteína Mcl1 no está implicada en la apoptosis inducida por berberina en los tipos de tumores analizados.
- La berberina tiene potencial antitumoral “*in vitro*” sobre células tumorales de pacientes con LLC-B.
- La berberina presenta una baja toxicidad secundaria a las células mononucleares de la sangre periférica y en macrófagos diferenciados.

6. REFERENCIAS.

1. Kroemer, G., et al., *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death*. Cell Death Differ, 2009. 16: p. 3-11.
2. Kerr, J. F., et al., *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. 26: p. 239-257.
3. Fadok, V. A., et al. *The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes*. Cell Death Differ, 1998. 5: p. 551-562.
4. Mizushima, N. *Autophagy: process and function*. Genes Dev, 2007. 21: p. 2861-2873.
5. Golstein, P., and Kroemer, G., *Cell death by necrosis: towards a molecular definition*. Trends Biochem Sci, 2007. 32: p. 37-43.
6. Holler, N., et al. *Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule*. Nat Immunol, 2000. 1: p. 489-495.
7. Wu, W., et al., *Necroptosis: an emerging form of programmed cell death*. Crit Rev Oncol Hematol, 2012. 82: p. 249-258.
8. Nagata, S. *Apoptosis by death factor*. Cell, 1997. 88: p. 355-365.
9. Strasser, A., et al. *Apoptosis signaling*. Annu Rev Biochem, 2000. 69: p. 217-245.
10. Lavrik, I., et al. *The active caspase-8 heterotetramer is formed at the CD95 DISC*. Cell Death Differ, 2003. 10: p. 144-145.
11. Luo, X., et al. *Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors*. Cell, 1998. 94: p. 481-490.
12. Shibue, T., and Taniguchi, T. *BH3-only proteins: integrated control point of apoptosis*. Int J Cancer 2006.119: p. 2036-2043.
13. Barry, M., et al. *Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid*. Mol Cell Biol, 2000. 20: p. 3781-3794.
14. Alnemri, E.S., et al. *Human ICE/CED-3 protease nomenclature*. Cell, 1996. 87: p. 171.
15. Boatright, K.M., and G.S. Salvesen. *Mechanisms of caspase activation*. Curr Opin Cell Biol, 2003. 15: p. 725-731.
16. Nagata, S. *Apoptosis by death factor*. Cell, 1997 88: p. 355-365.

17. Boatright, K.M., et al. *A unified model for apical caspase activation*. Mol Cell, 2003. 11: p. 529-541.
18. Degterev, A., et al. *A decade of caspases*. Oncogene. 2003. 22: p. 8543-8567.
19. Salvesen, G.S., and Dixit, V.M. *Caspase activation: the induced-proximity model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96: p. 10964-10967.
20. Youle, R.J., and Strasser, A. *The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. 9: p. 47-59.
21. Shore, G.C., and Nguyen, M. *Bcl-2 proteins and apoptosis: choose your partner*. Cell, 2008 135:1004-1006.
22. Shamas-Din, A., et al. *BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis*. Biochim Biophys Acta, 2010. 1813: p. 508-520.
23. Kim, H., et al. *Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies*. Nat Cell Biol, 2006 8: p. 1348-1358.
24. Fletcher, J.I., and Huang, D.C. *Controlling the cell death mediators Bax and Bak: puzzles and conundrums*. Cell Cycle, 2008. 7: p. 39-44.
25. Shore, G.C., and Nguyen, M. *Bcl-2 proteins and apoptosis: choose your partner*. Cell, 2008. 135: p. 1004-1006.
26. Chung, V. C., et al. *Developing policy for integrating biomedicine and traditional Chinese medical practice using focus groups and the Delphi technique*. Evid Based Complement Alternat Med, 2012. 2012: 149512.
27. Beg, S., et al. *Systematic review of herbals as potential anti-inflammatory agents: recent advances, current clinical status and future perspectives*. Pharmacogn Rev, 2011. 5: p. 120–37.
28. E. M. Galvez, M. Perez, P. Domingo, D. Núñez, V. L. Cebolla, M. Matt, Auland J. Pardo. *Pharmacological/Biological effects of berberine*. Handbook of natural products – Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes, 2013. 41: p. 1303-1320.
29. M. P. Domingo, J. Pardo, V. Cebolla and Eva M^a Gálvez. *Berberine: A fluorescent Alkaloid with a Variety of Applications from Medicine to Chemistry*. Mini-Reviews in Organic Chemistry, 2010. 7: 335-340.
30. Boberek, J. M., et al. *Genetic evidence for inhibition of bacterial division protein FtsZ by berberine*. PLoS One, 2010. 5: e13745.

31. Remppis, A., et al. *Rhizoma coptidis inhibits LPS-induced MCP-1/CCL2 production in murine macrophages via an AP-1 and NFkappaB-dependent pathway*. Mediators Inflamm, 2010. 2010: 194896.
32. Yin, J. *Traditional chinese medicine in treatment of metabolic syndrome*. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2008. 8: p. 99–111.
33. Hui, H. *Hypoglycemic herbs and their action mechanisms*. Chin Med, 2009. 4: p. 11.
34. Yin, J., et al. *Efficacy of berberine in patients with type 2 diabetes mellitus*. Metabolism, 2008. 57: p. 712–7.
35. Yang, J., et al. *Berberine improves insulin sensitivity by inhibiting fat store and adjusting adipokines profile in human preadipocytes and metabolic syndrome patients*. Evid Based Complement Alternat Med, 2012. 363845.
36. Fatehi-Hassanabad, Z., et al. *The antihypertensive and vasodilator effects of aqueous extract from Berberis vulgaris fruit on hypertensive rats*. Phytother Res, 2005. 19: p. 222–225.
37. DerMaderosian, A. *The review of natural products*. St. Louis, Missouri, Facts and Comparisons, 2001.
38. Lau, C. W., et al. *Cardiovascular actions of berberine*. Cardiovasc Drug Rev, 2001. 19: p. 234–244.
39. Wang, Y. X., et al. *Effects of berberine on delayed afterdepolarizations in ventricular muscles in vitro and in vivo*. J Cardiovasc Pharmacol, 1994 23: p. 716–722.
40. Chun, Y. T., et al. *A biochemical study on the hypotensive effect of berberine in rats*. Gen Pharmacol, 1979 10: p. 177–182.
41. Kong, W., et al. *Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins*. Nat Med, 2004. 10(12): p. 1344–1351.
42. Chang, H. M., et al. *Pharmacology and applications of Chinese materia medica*. World Scientific, 2000, Singapore.
43. Oshiba, S., et al. *Effect of berberine on bile secretion*. Nihon Univ J Med, 1974. 16: p. 69–79.
44. Ckless, K., et al. *Inhibition of in-vitro lymphocyte transformation by the isoquinoline alkaloid berberine*. J Pharm Pharmacol, 1995. 47(12A): p. 1029–1031.
45. Miura, N., et al. *Inhibition of thymocyte apoptosis by berberine*. Biochem Pharmacol, 1997. 53(9): p. 1315–1322.

46. Efferth, T., et al. *Molecular determinants of response of tumor cells to berberine*. Cancer Genomics Proteomics, 2005. 2: p. 115–124.
47. Sun, Y., et al. *A systematic review of the anticancer properties of berberine, a natural product from Chinese herbs*. Anticancer Drugs, 2009. 20(9): p. 757–769.
48. Tang, J., et al. *Berberine and Coptidis rhizome as novel antineoplastic agents: a review of traditional use and biomedical investigations*. J Ethnopharmacol, 2009. 126(1): p. 5–17.
49. Katiyar, S. K., et al. *p53 Cooperates berberine-induced growth inhibition and apoptosis of non-small cell human lung cancer cells in vitro and tumor xenograft growth in vivo*. Mol Carcinog, 2009. 48: p. 24–37.
50. Choi, M. S., et al. *Berberine inhibits p53-dependent cell growth through induction of apoptosis of prostate cancer cells*. Int J Oncol, 2009. 34: p. 1221–1230.
51. Katiyar, S. K., et al. *p53 Cooperates berberine-induced growth inhibition and apoptosis of non-small cell human lung cancer cells in vitro and tumor xenograft growth in vivo*. Mol Carcinog, 2009. 48: p. 24–37.
52. Mitani, N., et al. *Inhibitory effect of berberine on the mediastinal lymph node metastasis produced by orthotopic implantation of Lewis lung carcinoma*. Cancer Lett, 2001. 165: p. 35–42.
53. Li, H., et al. *Berberine inhibits SDF-1-induced AML cells and leukemic stem cells migration via regulation of SDF-1 level in bone marrow stromal cells*. Biomed Pharmacother, 2008. 62: p. 573–578.
54. Kuo, C. L., et al. *Berberine complexes with DNA in the berberine-induced apoptosis in human leukemic HL-60 cells*. Cancer Lett, 1995. 93: p. 193–200.
55. Yu, F. S., et al. *Berberine inhibits WEHI-3 leukemia cells in vivo*. In Vivo, 2007 21: p. 407–412.
56. Harikumar, K. B., et al. *Inhibition of progression of erythroleukemia induced by Friend virus in BALB/c mice by natural products—berberine, curcumin and picroliv*. J Exp Ther Oncol, 2008. 7: p. 275–284.
57. Zamzami, N., et al. *Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death*. J Exp Med, 1995. 182: p. 367–377.
58. Jantova, S., et al. *Berberine induces apoptosis through a mitochondrial/caspase pathway in human promonocytic U937 cells*. Elsevier, 2007. 21: p. 25–31.

59. Hsu, W. H., et al. *Berberine induces apoptosis in SW620 human colonic carcinoma cells through generation of reactive oxygen species and activation of JNK/p38 MAPK and FasL*. ArchToxicol, 2007. 81(10): p. 719–728.
60. Kuo, C., et al. *Modulation of apoptosis by berberine through inhibition of cyclooxygenase-2 and Mcl-1 expression in oral cancer cells*. In Vivo, 2005 19: p. 247–252