



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Mecanismos de muerte celular inducida por
fármacos antimitóticos y miméticos BH3

Mechanisms of cell death induced by antimitotic and
BH3-mimetic drugs

Autora

Andrea Benedí Visiedo

Directores

Isabel Marzo Rubio

Oscar Gonzalo Martínez

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Facultad de Ciencias

2016

Agradecimientos

En estas líneas, me gustaría dar las gracias a todas las personas que han hecho posible este trabajo.

En primer lugar, quisiera agradecer a Isabel Marzo la oportunidad de realizar este trabajo dentro de la línea de investigación de la que forma parte, Muerte Celular y Cáncer, en el grupo Apoptosis, Inmunidad y Cáncer.

A ella y a Oscar Gonzalo, los directores de este proyecto, así como a Alfonso Serrano y María Royo, por la ayuda prestada, los conocimientos aportados y el tiempo que han invertido para sacar este trabajo adelante. Igualmente, quisiera dar las gracias a todos los miembros del laboratorio por contribuir a que el ambiente de trabajo haya sido inmejorable.

Por último, quiero agradecer a mi familia, especialmente a mis padres y a mi hermana, la paciencia que han tenido y todo el cariño y el apoyo que me brindan en todo momento.

Índice

Resumen/Abstract	1
1 Introducción	1
1.1 Muerte celular	1
1.2 Fármacos antimitóticos.....	2
1.3 Proteínas de la familia Bcl-2 y miméticos BH3	3
2 Antecedentes y objetivos.....	5
3 Materiales y métodos.....	5
3.1 Líneas celulares.....	5
3.1.1 Células A549	5
3.1.2 Células 293T.....	6
3.1.3 Mantenimiento de las líneas celulares.....	6
3.1.4 Contaje de las células con una cámara de Neubauer	6
3.1.5 Test de micoplasmas por PCR	7
3.1.6 Criopreservación de las líneas celulares	7
3.2 Análisis del ciclo celular por citometría de flujo.....	7
3.3 Detección de senescencia celular mediante la actividad β -galactosidasa	8
3.4 Obtención de la línea celular A549 H2B-GFP	9
3.4.1 Transfección de las células 293T y obtención de retrovirus	9
3.4.2 Infección, expansión y selección de las células A549 H2B-GFP	9
3.5 Microscopía “time-lapse”	10
3.6 Análisis de proteínas por Western Blot.....	10
3.6.1 Extracción y fraccionamiento de extractos celulares.....	10
3.6.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS	11
3.6.3 Transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa.....	11
3.6.4 Análisis de proteínas por Western Blot.....	12
4 Resultados y discusión.....	12
4.1 Análisis del ciclo celular y del contenido de DNA de las células A549 tratadas con barasertib. 12	
4.2 Detección de la senescencia celular inducida por barasertib en células A549 mediante la medición de la actividad β -galactosidasa	14
4.3 Células A549 H2B-GFP	15
4.4 Estudio de la muerte celular inducida por diferentes fármacos antimitóticos en células A549 H2B-GFP mediante microscopía “time-lapse”	16
4.5 Determinación del mecanismo inicial de muerte celular en células A549 H2B-GFP tratadas con barasertib y ABT-737	20
4.6 Análisis de la expresión de Bcl-2 y Bcl-X _L fosforiladas mediante Western Blot	21
5 Conclusiones/Conclusions	23
6 Bibliografía	24
Anexos	26

Resumen

Los fármacos antimitóticos actúan a nivel de la mitosis para evitar la proliferación masiva de las células tumorales. Dos de estos fármacos son vincristina y docetaxel, un alcaloide de la vinca y un taxano, respectivamente, que tienen afinidad por la β -tubulina, un componente de los microtúbulos. Más recientemente se ha desarrollado un inhibidor específico de Aurora quinasa B, el cual ha entrado en ensayos clínicos. Nuestros resultados demuestran que barasertib induce la parada del ciclo celular en la fase G2/M y, dependiendo del tiempo de actuación, puede llevar a las células a la endoreduplicación, la entrada en senescencia o la muerte celular, que según los resultados de este estudio, tendría lugar principalmente durante la interfase. Por otra parte, mientras que barasertib induce la modificación de los núcleos celulares, dando lugar a morfologías aberrantes, el mimético BH3 ABT-737 induce la apoptosis celular al unirse e inactivar a sus dianas, las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-X_L y Bcl-w; sin embargo, al combinar ambos compuestos, parece que el efecto predominante es el provocado por barasertib.

Abstract

Antimitotic drugs act at the level of mitosis to avoid massive proliferation of tumor cells. Two of these drugs are vincristine and docetaxel, a vinca alkaloid and a taxane, respectively, which have affinity for β -tubulin, a component of microtubules. More recently, a specific inhibitor of Aurora B kinase has been developed and it has entered clinical trials. Our results demonstrate that barasertib induces cell cycle arrest in the G2/M phase and, depending on the exposure time, it can lead cells to endoreduplication, entry into senescence or cell death that according to the results of this study, it would take place mainly during interphase. On the other hand, while barasertib induces cell nuclei changes resulting in aberrant morphologies, the BH3-mimetic ABT-737 induces apoptosis by binding and inactivating their targets, the anti-apoptotic proteins Bcl-2, Bcl-X_L and Bcl-w; however, by combining both compounds, it appears that the predominant effect is caused by barasertib.

1 Introducción

1.1 Muerte celular

Las células pueden interrumpir sus funciones biológicas en algún momento de su vida por diversos motivos, causando su muerte^[1]. La muerte celular puede ser de tipo “accidental” cuando tiene su origen en estímulos físicos, químicos o mecánicos, mientras que se considera “regulada” cuando está implicada una maquinaria molecular codificada genéticamente^[2]. En cualquier caso, se considera que una célula está muerta cuando se cumple alguno de estos tres criterios: la pérdida de la integridad de su membrana plasmática; la fragmentación completa de la célula (incluido el núcleo) en cuerpos apoptóticos; o la fagocitosis de la célula muerta o sus fragmentos por una célula viva adyacente^[3].

Existe una gran variedad de tipos de muerte celular, aunque los principales son la **necrosis**, la **muerte con autofagia** y la **apoptosis**. La necrosis accidental es inducida por agentes externos, como pueden ser el daño mecánico, infecciones o toxinas, y termina provocando la digestión no controlada de componentes celulares^[3, 4]. En los últimos años se ha descrito una vía de necrosis regulada que se activa en respuesta a determinados receptores y que se denomina **necroptosis**^[5]. La autofagia es un proceso catabólico donde se degradan orgánulos y proteínas en el lisosoma y que normalmente tiene una función de supervivencia^[4, 5]. Sin embargo, en determinadas situaciones un exceso de autofagia puede conducir a la muerte celular^[3]. Por otra parte, la apoptosis, descrita por primera vez en 1972 por Kerr et al., es un mecanismo de muerte celular que se complementa con la proliferación celular en los tejidos, y junto con la autofagia, favorece el mantenimiento de la homeostasis celular, tisular y del organismo^[4, 6]. Las células apoptóticas sufren cambios morfológicos importantes, entre los que se

incluyen la condensación de la cromatina y la fragmentación del núcleo, la reducción del volumen celular, el mantenimiento de la integridad de los orgánulos intracelulares y la formación de evaginaciones de la membrana plasmática, dando lugar a cuerpos apoptóticos que son engullidos por fagocitos próximos cuando este proceso ocurre *in vivo*. Por otra parte, desde el punto de vista bioquímico, se observan varios eventos relevantes: la rotura del DNA oligonucleosomal, la activación de las caspasas y proteínas pro-apoptóticas pertenecientes a la familia Bcl-2, la traslocación de la fosfatidilserina desde la semicapa interna a la externa de la membrana plasmática y la permeabilización de la membrana mitocondrial, así como la disipación del potencial transmembrana de las mitocondrias^[3].

Por otra parte, la apoptosis, la necrosis o la senescencia son el punto final de un mecanismo oncosupresor, denominado **catástrofe mitótica**, cuyo objetivo es evitar la inestabilidad genómica ante una mitosis aberrante^[5]. Algunos fármacos que inhiben la mitosis, como vincristina o paclitaxel, pueden desencadenar la catástrofe mitótica ya que producen alteraciones en el huso mitótico^[7, 8] (ver más adelante). La catástrofe mitótica se caracteriza habitualmente por varias modificaciones nucleares importantes, como son la multinucleación (presencia de dos o más núcleos de tamaño similar o heterogéneo), y la micronucleación (presencia de cromosomas o fragmentos de ellos fuera de los núcleos de las células hijas), que se han utilizado como marcadores morfológicos para su detección^[5, 9].

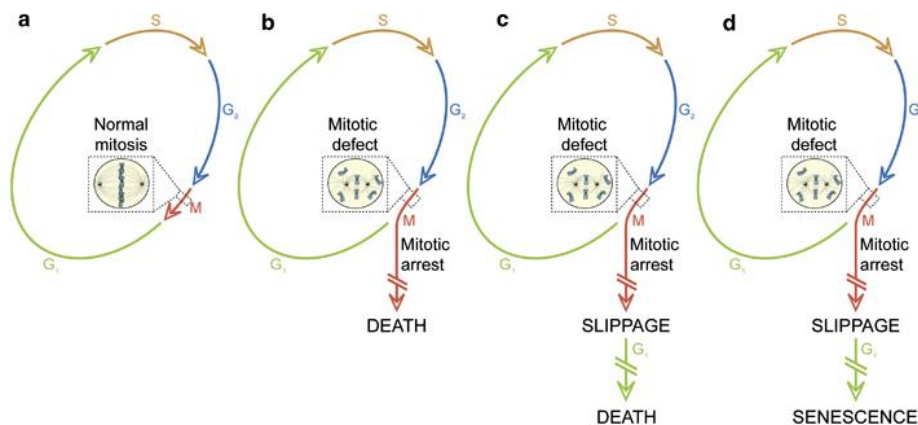


Figura 1. Ciclo celular en una célula sana (a) y posibles destinos de las células que sufren catástrofe mitótica (b-d). Galluzzi L., Vitale I., Abrams J. M., Alnemri E. S., Baehrecke E. H., Blagosklonny M. V., (...) & Kroemer G., (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation*, 19 (1), 107-120.

1.2 Fármacos antimitóticos

Las células tumorales suelen presentar una tasa de proliferación superior a la de las células normales. Por ello, alguno de los tratamientos habituales se basan en el uso de fármacos antimitóticos^[7].

La reorganización de los microtúbulos es un evento crítico durante la mitosis, ya que interviene en la relocalización de los centrosomas y en la adecuada segregación de las crómatidas hermanas en las células hijas^[7] (Fig. 2). Existen diversas familias de compuestos que inhiben la dinámica de polimerización de los microtúbulos, provocando la activación del punto de control de la mitosis (SAC, "Spindle Assembly Checkpoint"), lo que conduce a las células a un estado de detención prolongado denominado "arresto mitótico", que puede ir seguido de la inducción de la apoptosis, o la salida a un estado G₁ y senescencia^[10]. Dos de estas familias de fármacos, los taxanos y los alcaloides de la vinca, son agentes anti-microtúbulos (MTA) clásicos. Aunque ambos tipos de compuestos interactúan con la β -tubulina, tienen efectos diferentes: los taxanos, entre los que se incluye docetaxel (ver estructura en Anexo 1), estabilizan los microtúbulos preexistentes impidiendo la formación del huso mitótico;

mientras que los alcaloides de la vinca, donde se incluye vincristina (ver estructura en Anexo 1), impiden la polimerización de los microtúbulos^[7]. Pese a que ambas clases de fármacos son utilizadas actualmente para el tratamiento de diversos tumores, entre ellos el cáncer de mama, de pulmón y la leucemia aguda, estos causan importantes efectos secundarios, como neutropenia y neurotoxicidad, y además, su eficacia es limitada cuando actúan como agentes únicos. Por lo tanto, con el fin de mejorar la eficacia y reducir los efectos secundarios, se han desarrollado en los últimos años varios inhibidores de quinasas específicas de la mitosis y proteínas motoras de los microtúbulos, que actuarían como posibles dianas^[7] (Fig. 2).

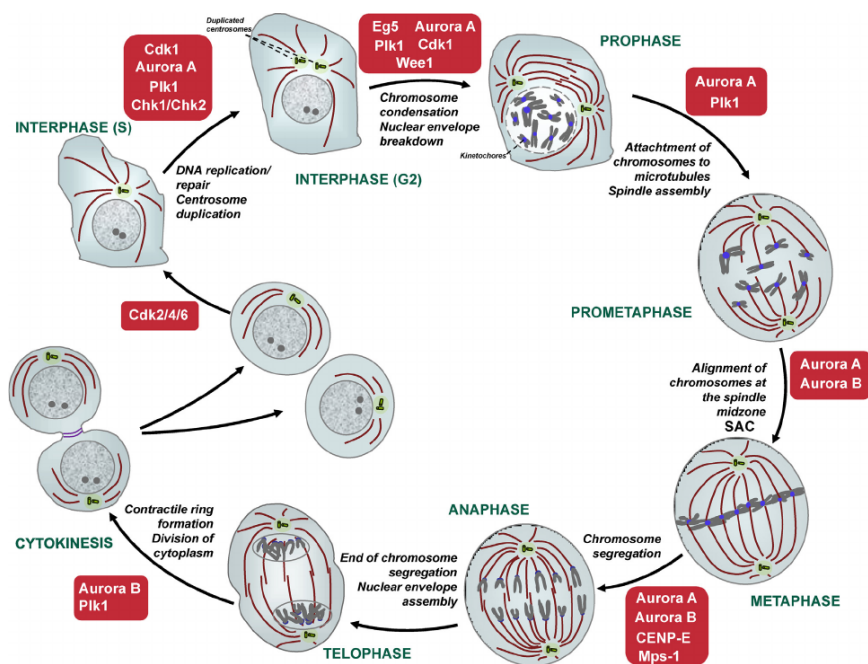


Figura 2. Fases y algunas proteínas reguladoras de la mitosis que pueden ser dianas de fármacos anti-mitóticos. Marzo I. & Naval J., (2013). Antimitotic drugs in cancer chemotherapy: Promises and pitfalls. *Biochemical Pharmacology*, 86 (6), 703-710.

Una familia de serín/treonín quinasas importante en el control de la división celular es la familia Aurora, compuesta de 3 isoformas en células de mamíferos: Aurora A, B y C, que poseen localizaciones subcelulares y funciones distintas^[11]. En concreto, Aurora quinasa B (Anexo 2) es el componente catalítico del CPC (“chromosomal passenger complex”), implicado en la fosforilación de la Histona H3, la segregación cromosómica y la citocinesis^[12] (Fig. 2). La desregulación de estas quinasas tiene importantes consecuencias intracelulares, lo que las convierte en posibles dianas de los fármacos antitumorales. Un ejemplo de ellos es barasertib (ver estructura en Anexo 1), un inhibidor muy potente y selectivo de Aurora B ($K_i = 1 \text{ nM}$) (Anexo 2) en comparación con Aurora A ($K_i = 1,4 \text{ mM}$), y que también muestra una especificidad elevada frente a otras 50 quinasas^[11]. *In vitro*, este fármaco induce la desalineación cromosómica e impide la división celular, lo que disminuye la viabilidad celular e induce la muerte celular por apoptosis. Por otra parte, en ensayos clínicos, se ha obtenido respuesta en el 19-25 % de pacientes con leucemia mieloide aguda cuando se utilizó barasertib como agente único; sin embargo, los tumores sólidos no parecen responder a este fármaco^[11].

1.3 Proteínas de la familia Bcl-2 y miméticos BH3

Un grupo importante de proteínas que intervienen en la vía intrínseca de la apoptosis es el conformado por las proteínas de la familia Bcl-2. Estas proteínas controlan la integridad mitocondrial evitando o induciendo la liberación de proteínas apoptogénicas como el citocromo c, Smac/DIABLO, AIF o EndoG, localizadas en el espacio intermembrana mitocondrial de las células sanas^[13]. Todos los miembros de la familia poseen como mínimo uno de los 4 dominios de homología Bcl-2 (BH) (BH1-BH4), y pueden clasificarse según su función en proteínas anti- y pro-apoptóticas, pudiendo

subdividirse a su vez este último grupo en pro-apoptóticas multidominio y en pro-apoptóticas “solo-BH3”^[14] (Fig. 3).

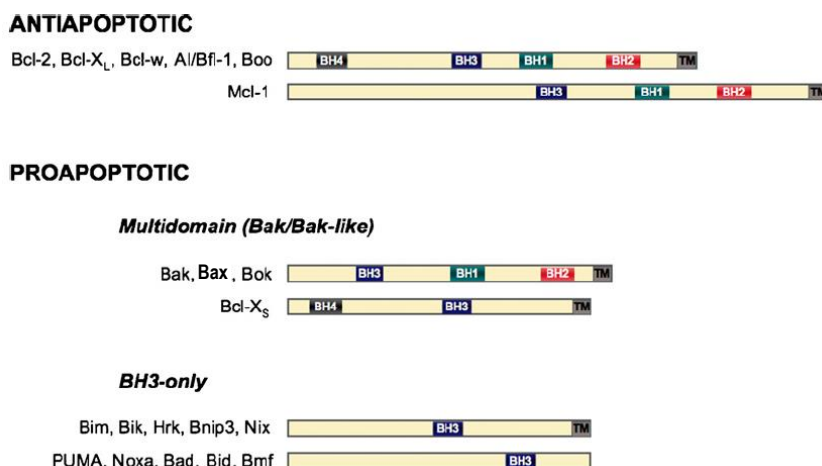


Figura 3. Proteínas de la familia Bcl-2. Marzo I. & Naval J., (2008). Bcl-2 family members as molecular targets in cancer therapy. *Biochemical Pharmacology*, 76 (8), 939-946.

Las proteínas anti-apoptóticas de esta familia (Fig. 3) poseen los 4 dominios BH, excepto Mcl-1^[13]. La mayoría de las proteínas de este grupo contienen un segmento C-terminal hidrofóbico que permite su interacción con la membrana nuclear, el retículo endoplásmico y la membrana mitocondrial externa, siendo esta última su localización habitual^[15]. Sus dominios BH1, BH2 y BH3 plegados revisten un bolsillo hidrofóbico que puede unirse a péptidos “solo-BH3”^[16]. Estas proteínas inhiben la apoptosis uniéndose de forma directa a los miembros pro-apoptóticos multidominio y “solo-BH3”^[17].

Las proteínas pro-apoptóticas multidominio, donde se incluyen Bax y Bak, poseen 3 de los dominios BH, mientras que las proteínas pro-apoptóticas “solo-BH3” poseen únicamente el dominio BH3 e incluyen Bim, Bik, Bad, PUMA, Noxa y Bid entre otros^[13]. Además, las proteínas “solo-BH3” actúan como “sensores” del daño celular y desencadenan la activación de Bax y Bak^[13].

En los últimos años ha surgido una estrategia interesante para desarrollar nuevas terapias contra el cáncer basada en reproducir la actividad pro-apoptótica de las proteínas “solo-BH3”, que parecen ser un factor clave en la vía intrínseca de la apoptosis^[10]. Para ello, se han desarrollado pequeñas moléculas orgánicas que tratan de imitar los dominios BH3 de estas proteínas, denominadas **miméticos BH3**. Estos compuestos se unen de forma directa al bolsillo hidrofóbico de las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2, consiguiendo activar así la apoptosis en las células tumorales^[12, 17].

Uno de estos nuevos compuestos es ABT-737 (ver estructura en Anexo 1), desarrollado por la farmacéutica estadounidense Abbot Laboratories. Esta molécula se une fuertemente a Bcl-2, Bcl-X_L y Bcl-w ($K_i < 1$ nM) (Anexo 3) pero tiene poca afinidad por Mcl-1 y A1/Bfl-1, y actúa como mimético funcional del dominio BH3 de la proteína pro-apoptótica Bad^[13]. Cuando ABT-737 se une a sus dianas, desplaza las proteínas “solo BH3” propias de la célula, de manera que estas pueden unirse a Mcl-1, A1 y algunas también a Bax o Bak, lo que desencadena la muerte de las células tumorales a través de un mecanismo dependiente de la vía de Bax/Bak. ABT-737 es tóxico para varias líneas celulares aunque no es un buen inductor de la apoptosis cuando actúa solo, pero si se utiliza en combinación con otros compuestos quimioterápicos, se observa un efecto sinérgico. Por otra parte, también se ha visto que es capaz de inducir la apoptosis en células de mieloma múltiple sin afectar a las células normales y que es activo como agente único en xenoinjertos de leucemia linfoblástica aguda *in vivo*^[13, 17].

Además de ABT-737 se han desarrollado otros miméticos BH3. Algunos de ellos son ABT-263 (o navitoclax), cuyas dianas son las mismas que las de ABT-737, pero presenta la ventaja de poder administrarse por vía oral, y en 2015 se encontraba en fase II de ensayos clínicos; WEHI-539 es muy selectivo para Bcl-X_L; y ABT-199 actúa de forma selectiva frente a Bcl-2 y, según los resultados obtenidos en ensayos preclínicos y en algunos pacientes con leucemia linfocítica crónica, es igual de potente que ABT-263 y mantiene los niveles de plaquetas^[17, 18].

Sin embargo, estos compuestos también afectan a las células normales, causando trombocitopenia si se utilizan ABT-263 y ABT-737, ya que la supervivencia de las plaquetas depende Bcl-X_L^[17]. Este efecto secundario puede evitarse si se utiliza ABT-199, puesto que esta proteína no está incluida entre sus dianas^[10]. Por lo tanto, para evitar la afección de las células normales, puede ser mejor utilizar los miméticos BH3 combinados con fármacos que afecten únicamente a células tumorales, por ejemplo, inhibidores de quinasas oncogénicas^[17].

2 Antecedentes y objetivos

Los compuestos antimitóticos tienen una eficacia limitada al actuar como agentes únicos, por lo que se están evaluando combinaciones con compuestos que actúan sobre otras vías de señalización. Una de las estrategias más recientes utiliza los miméticos BH3, unos compuestos que presentan afinidad por el bolsillo hidrofóbico de proteínas anti-apoptóticas de la familia de Bcl-2, desencadenando la muerte por apoptosis en las células cancerosas.

Partiendo de esta base, se pretende hacer un estudio sobre el efecto y las modificaciones ocasionados por los fármacos antimitóticos barasertib, vincristina (alcaloide de la vinca) y docetaxel (taxano), así como el mimético BH3 ABT-737. En concreto, los objetivos propuestos son los siguientes:

1. Estudiar el efecto producido por barasertib en el ciclo celular de las células A549 y verificar la reversibilidad y desaparición de las modificaciones inducidas por el fármaco al retirarse este del medio.
2. Generar la línea celular A549 H2B-GFP para seguir la evolución de los núcleos celulares cuando las células son tratadas con barasertib, ABT-737, vincristina y docetaxel, gracias a la fluorescencia aportada por la proteína GFP.
3. Estudiar la muerte celular inducida en las células A549 H2B-GFP tras el tratamiento con barasertib, vincristina y docetaxel.
4. Estudiar los cambios en la morfología nuclear de las células A549 H2B-GFP al tratarlas con barasertib y ABT-737, y determinar el mecanismo inicial de muerte celular que se desencadena al exponerlas a una combinación de ambos fármacos.
5. Analizar la fosforilación de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-X_L en la línea celular A549 tras su exposición a barasertib.

3 Materiales y métodos

3.1 Líneas celulares

3.1.1 Células A549

Se trata de una línea celular procedente de un adenocarcinoma de pulmón humano que fue establecida en 1972 por D. J. Giard y otros a partir de explantes de tejido carcinomatoso pulmonar de un paciente^[19]. Se trata de células adherentes que crecen en monocapa, por lo que su cultivo se realiza en medio DMEM completo (en inglés, Dulbecco's Modified Eagle's Medium), que consiste en medio DMEM comercial suplementado con suero fetal bovino (*Sigma-Aldrich*) al 5% (v/v), GlutaMAXTM

(contiene 2 mM del dipéptido de L-alanil-L-glutamina en 0,85 % de NaCl; *Thermo Scientific*) y antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml)).

3.1.2 Células 293T

La línea HEK293 (abreviada como 293) deriva de células embrionarias de riñón humanas. Además de ser fácilmente transfectables por diversos métodos, contienen el antígeno T del poliomavirus SV40, por lo que son capaces de replicar vectores que contienen la región de replicación del SV40. Es una línea celular muy utilizada en la producción de retrovirus, así como en la producción de proteínas y en la expresión génica^[20]. Tienen una morfología celular de tipo epitelial y, al igual que las células A549, son células adherentes que crecen en monocapa, de manera que su cultivo se realiza en medio DMEM completo.

3.1.3 Mantenimiento de las líneas celulares

La manipulación de las líneas celulares se realizó en condiciones de esterilidad en campanas de flujo laminar vertical (*Telstar Bio-II-A/P*), y los cultivos se mantenían en un incubador termostatzado (Heraeus Heracell 150i, *Thermo*) a 37 °C, con un 5 % de CO₂ y aire saturado de humedad. Se realizaron subcultivos de forma periódica en frascos de cultivo de 25 cm² (volumen final de 5 ml) o de 75 cm² (volumen final de 20 ml). Al alcanzar la confluencia, el número de células totales era aproximadamente de 2,5·10⁶ células en los frascos de 25 cm² y de 8·10⁶ células en los de 75 cm². Además, ambas líneas celulares se observaban diariamente al microscopio invertido para controlar su morfología y crecimiento y para detectar posibles contaminaciones.

Para establecer subcultivos, las células se trataron con 1,5 ml (frasco de 25 cm²) o 2,5 ml (frasco de 75 cm²) de una preparación comercial de tripsina (tripsina 0,25 % (w/v), 1 mM EDTA-Na₄ en HBSS w/o Ca-Mg, con rojo fenol; *Gibco*) para cubrir la monocapa celular y se mantuvieron de 5 a 15 minutos en el incubador termostatzado. Pasado este tiempo, se observaron las células al microscopio invertido para comprobar que se habían despegado del fondo del frasco, y si era así, se añadía medio DMEM completo para neutralizar la acción de la tripsina (3,5 ml en el frasco pequeño y 7,5 ml en el frasco mediano). Finalmente, se determinó la cantidad de células totales en cada cultivo y su viabilidad (según se indica en el siguiente apartado), y se iniciaron nuevos subcultivos con 5·10⁴, 10⁵ o 2·10⁵ células totales en función del tamaño del frasco de cultivo y del tiempo previsto hasta el siguiente pase.

3.1.4 Contaje de las células con una cámara de Neubauer

La densidad (nº de células viables/ml) y/o la viabilidad de los cultivos (nº de células viables/nº de células totales) se determinó mediante el contaje con azul Trypan siempre que se realizaban subcultivos o se iniciaba cualquier experimento. Este colorante puede introducirse en aquellas células cuya membrana plasmática está dañada, de manera que estas se observan azules al microscopio óptico. De esta forma, solo las células muertas aparecen teñidas, mientras que las células viables y las apoptóticas no incorporan el colorante.

En cada contaje se mezclaron 50 µl de la suspensión celular cuya densidad y/o viabilidad se deseaba conocer con el mismo volumen de azul Trypan (al 0,4 % en NaCl 0,15 M), se dispuso parte del volumen final de la mezcla en una cámara de Neubauer (o hemocitómetro) y se llevó al microscopio óptico para realizar el contaje.

La densidad celular se calculó mediante la siguiente expresión:

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

Donde 10⁴ es el factor de corrección del volumen del hemocitómetro.

3.1.5 Test de micoplasmas por PCR

La posible contaminación por micoplasmas de las líneas celulares se analizó mediante el “Mycoplasma Gel Detection Kit” (Biotools), siguiendo las instrucciones del fabricante. En aquellos casos en los que se detectó contaminación por estos microorganismos y no se disponía de células criopreservadas para iniciar un nuevo cultivo, las células se trataron con el kit de descontaminación “BM-Cyclin” (Roche).

3.1.6 Criopreservación de las líneas celulares

Tras la tripsinización y la determinación de la densidad y viabilidad, las células (entre $2,5 \cdot 10^6$ y $4 \cdot 10^6$) se centrifugaron a 335xg durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 800 µl de medio DMEM completo con DMSO al 10 % (crioprotector cuyo objetivo es minimizar el daño celular durante la congelación). El volumen se trasvasó a un vial de congelación y se llevó rápidamente al congelador de -80 °C. Finalmente, pasadas 24 horas como mínimo, el vial se introdujo en un contenedor de nitrógeno líquido (-196 °C), donde permaneció hasta su utilización.

Para descongelar las células, el vial se introdujo en un baño de agua a 37 °C. Antes de que el contenido se descongelara completamente, se sacó el criotubo del baño y se trasvasó rápidamente a un tubo de fondo cónico que contenía 5 ml de medio DMEM completo para diluir el DMSO y reducir su toxicidad a esa temperatura. El contenido se mezcló suavemente por inversión del tubo, se centrifugó a 149xg durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 5-10 ml de medio completo. Finalmente, se determinó su densidad y viabilidad celular y se iniciaron nuevos cultivos con 10^5 células totales en frascos de cultivo de 25 cm².

3.2 Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

La distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular se analizó mediante marcaje con yoduro de propidio y análisis por citometría de flujo. El yoduro de propidio es un fluorocromo ($\lambda_{\text{ex}}=535$ nm, $\lambda_{\text{em}}=617$ nm) y un agente intercalante de DNA muy utilizado para identificar las células muertas en una población y para estudiar el ciclo celular. Esta molécula se intercala cada 4 o 5 bases del DNA mostrando poca o ninguna secuencia de preferencia, y puesto que se une a DNA y RNA, es necesario tratar con las nucleasas adecuadas para distinguir las tinciones de cada ácido nucleico^[21, 22]. El análisis por citometría de flujo del marcaje con yoduro de propidio informa sobre el contenido de DNA, ya que se puede distinguir y cuantificar la distribución relativa de las células en las distintas fases del ciclo celular (G0/G1, S, G2/M, células subdiploides y poliploides)^[23].

Se recogieron las células sembradas en 6 pocillos de una placa de 12 pocillos en 6 tubos eppendorf, de los cuales, la mitad contenía células sin tratar, que se tomaron como control (10^4 células totales iniciales), y la otra mitad, células tratadas con barasertib a una concentración final de 5 µM (10^5 células totales iniciales). Se centrifugaron a 73xg durante 5 minutos, se retiraron los sobrenadantes y se fijaron las células añadiendo a cada tubo 800 µl de etanol al 70 % gota a gota en un vórtex para mezclar y resuspender las células, evitando la formación de agregados. Tras la fijación, los eppendorf se guardaron a -20 °C durante al menos 24 horas, momento en el que las células se lavaron con 300 µl de PBS y se centrifugaron a 461xg durante 10 minutos. Se eliminaron los sobrenadantes, los precipitados se resuspendieron en 200 µl de una solución que contenía yoduro de propidio y RNasa (en PBS y azida de sodio al 0,09 %, pH 7,2, *Immunostep*) y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos en oscuridad. Finalmente, las células se analizaron en el citómetro de flujo (BD FACSCaliburTM, *BD Biosciences*) y los datos se obtuvieron y procesaron con el programa informático CellQuest Pro.

3.3 Detección de senescencia celular mediante la actividad β -galactosidasa

La senescencia es un potente mecanismo supresor de tumores, ya que detiene la proliferación celular de forma irreversible, lo que conlleva una serie de cambios fenotípicos y alteraciones en el patrón de expresión génica de la célula, incluyendo la resistencia a la apoptosis y la sobreexpresión de la enzima lisosomal β -galactosidasa (Anexo 4), entre otras^[22, 24]. Este fenómeno se observó a mediados del siglo pasado en células somáticas humanas normales que habían realizado un determinado número de duplicaciones en cultivo. Sin embargo, este estado también puede inducirse cuando las células se exponen a diferentes tipos de estrés, como agentes oxidantes o que dañan el DNA, o la expresión de oncogenes activados^[24]. Uno de los cambios que se produce cuando las células entran en senescencia es la sobreexpresión de la hidrolasa β -galactosidasa lisosomal^[22]. Esta enzima está presente en todas las células normales y su mayor actividad enzimática se detecta a pH ácido, en concreto a pH 4. Sin embargo, en 1995 se demostró que las células senescentes poseen una actividad β -galactosidasa diferente a la de las células normales, conocida como “actividad β -galactosidasa asociada a senescencia”, cuyo pH óptimo asciende hasta 6. El origen de esta actividad en células senescentes es el aumento de la expresión de la enzima lisosomal, que puede estar relacionado con el aumento de la biogénesis lisosomal que tiene lugar en las células senescentes. También se ha encontrado actividad β -galactosidasa asociada a senescencia en biopsias de piel humana, por lo que este parámetro se ha convertido en un biomarcador ampliamente utilizado actualmente en estudios de senescencia celular en cultivo e *in vivo*. Sin embargo, esta actividad no se ha detectado en células inmortales, quiescentes ni en células diferenciadas terminalmente, aunque hay excepciones^[24].

Existen dos métodos muy utilizados para detectar la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia de forma sencilla: un método citoquímico y uno basado en fluorescencia. El ensayo citoquímico utiliza un sustrato cromogénico, denominado X-gal, que al ser hidrolizado por la β -galactosidasa origina un compuesto insoluble de color azul; además, este método permite la detección histoquímica en muestras de tejido. Por otra parte, el método basado en fluorescencia es más sensible y, si se utiliza citometría de flujo, se obtiene una medida cuantitativa de esta actividad para cada célula de una determinada población^[24].

En concreto, en esta ocasión se ha utilizado el método citoquímico, que es simple y muy rápido, ya que algunas células desarrollan el color azul a las 2 horas de la tinción, aunque la máxima coloración se detecta después de 12-16 horas. Además, se trata de una tinción bastante estable que puede detectarse durante varios meses si las muestras han sido fijadas, secadas y están protegidas de la luz. Es importante utilizar un tampón de ácido cítrico/fosfato sódico a pH 6 para distinguir la actividad de la β -galactosidasa asociada a senescencia de la actividad de la enzima a pH ácido^[24]. Por lo tanto, puesto que el pH tiene un papel vital en este ensayo, las células no deben mantenerse en un incubador de CO₂, ya que esto provocaría un descenso del pH del tampón, y por lo tanto, el rendimiento de este experimento también disminuiría.

Se sembraron células A549 en dos pocillos de una placa de 12 pocillos, uno con $3 \cdot 10^3$ y otro con $3 \cdot 10^4$ células totales en 1 ml de medio. Pasadas 24 horas, se añadió barasertib a una concentración final de 5 μ M al pocillo que contenía $3 \cdot 10^4$ células y se dejó actuar al fármaco durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo, se cambió el medio de ambos pocillos por 1 ml de medio fresco. Pasados 4 días, se retiró el medio de los pocillos, y se fijaron las células añadiendo a cada uno de ellos 2 ml de una mezcla de paraformaldehído (2 %) – glutaraldehído (0,2 %) e incubando la placa a 4 °C durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se eliminó la disolución fijadora, se lavó cada pocillo con 2 ml de PBS, se añadieron a cada pocillo 2 ml de la mezcla de tinción (ferricianuro potásico 5 mM, ferrocianuro potásico 5 mM, MgCl₂ 2 mM en PBS pH 6), y finalmente, se añadió el sustrato X-gal a una concentración final de 1 mg/ml. Se sellaron los bordes de la placa con parafilm para evitar el

intercambio de CO₂, puesto que esto provocaría un descenso del pH del tampón, y se incubó en la estufa a 37 °C durante varias horas. La placa se observó al microscopio invertido con los objetivos de 10, 20 y 40 aumentos y con contraste de fases Ph2 a las 6 y 24 horas de realizar la tinción para identificar células senescentes, que aparecían coloreadas de azul.

3.4 Obtención de la línea celular A549 H2B-GFP

Las células A549 H2B-GFP son células A549 que sobreexpresan la Histona H2B fusionada a la proteína fluorescente verde de *Aequorea victoria* (GFP, molécula cuyos picos máximos de excitación y de emisión de fluorescencia se encuentran dentro de la zona del espectro visible, en concreto a 395 y 509 nm, respectivamente)^[25]. Para conseguir esta línea celular se llevaron a cabo varios pasos que se describen a continuación.

3.4.1 Transfección de las células 293T y obtención de retrovirus

La técnica de transfección utilizada fue la basada en la utilización de fosfato de calcio. Se trata de un método ampliamente utilizado para introducir DNA en células eucariotas y conseguir transformantes en multitud de tipos celulares. La técnica se basa en mezclar lentamente 2 soluciones, una de las cuales contiene el DNA mezclado con CaCl₂, y la otra está formada por un tampón que contiene fosfato, dando lugar a la formación de un co-precipitado fosfato de calcio-DNA, que se adhiere a la superficie celular y se internaliza probablemente por endocitosis^[26, 27].

En primer lugar se sembraron 1,8·10⁶ células 293T (empaquetadoras) totales en un pocillo de una placa de 6 pocillos en 3 ml de medio DMEM completo. Pasadas 24 horas, se añadió cloroquina (inhibe la acción lisosomal de las células, y por tanto, evita la destrucción de los plásmidos introducidos) a una concentración final de 25 µM y se mantuvo en el incubador durante 5 minutos.

Por otra parte, se preparó la mezcla de transfección en un tubo de fondo cónico, que constaba de 61 µl de CaCl₂, 2,5, 5 y 3 µg de 3 vectores a transfectar y agua autoclavada hasta completar un volumen de 500 µl. Los vectores fueron, respectivamente: el plásmido pMDG-VSV (contiene las secuencias codificantes para las proteínas de la envuelta del virus), el plásmido pNVUL-MLV-gag-pol (contiene las secuencias que codifican para la transcriptasa reversa y la cápside del virus) y el plásmido pBABE-puro (es un vector retroviral que se inserta en el genoma de las células gracias a las secuencias LTR y contiene el cDNA de la Histona H2B fusionado con el gen de la GFP)^[28] (Mapa del vector en Anexo 5). A esta preparación se añadieron 500 µl de HBS 2x (HEPES Bufferd Saline), se mezcló por inversión y se burbujeó durante 20-30 segundos para conseguir un precipitado lo más fino posible, ya que el DNA aglomerado no se adhiere o introduce en las células de forma eficiente. Por último, la mezcla final se añadió gota a gota a la placa y se agitó suavemente en círculos antes de introducirla de nuevo en el incubador, donde se dejó 72 horas para que se produjeran las partículas retrovíricas. Tras este tiempo, se recogió el sobrenadante, se filtró en un tubo de fondo cónico utilizando un filtro estéril de 0,22 µm para eliminar posibles restos celulares y se guardó a -80 °C hasta su utilización.

3.4.2 Infección, expansión y selección de las células A549 H2B-GFP

Las células A549 a infectar se sembraron en una placa de 24 pocillos (2·10⁴ células/pocillo, 500 µl/pocillo). Tras 24 horas, se retiró el sobrenadante de uno de los pocillos y se añadió el sobrenadante con las partículas retrovirales recogido el día anterior. La placa se centrifugó a 1455xg durante 2 horas a 37 °C y después se sustituyó el sobrenadante de un pocillo cualquiera (control) y el de las células que se habían infectado por 1,5 ml de medio nuevo. Finalmente, todo el material que estuvo en contacto con los retrovirus generados se trató con lejía para eliminar los restos de virus y se esterilizó en la campana de flujo laminar, programándola en el modo “UV”.

A las 48 horas se inició la selección de las células que habían integrado el cDNA de la fusión H2B-GFP, añadiendo puromicina (antibiótico aminonucleósido que inhibe la síntesis proteica al actuar

como un análogo del extremo 3' terminal del aminoacil-tRNA, lo que conlleva la muerte celular)^[29, 30] a una concentración final de 2 µg/ml. Se agitó ligeramente la placa, se mantuvo durante 24 horas en el incubador y se cambió el medio de cultivo por medio nuevo. A las 72 horas se renovó el medio, se añadió la misma concentración de puomicina para continuar seleccionando, y a los 2 días se cambió el medio por medio fresco. Por otra parte, durante el proceso de selección de las células infectadas, se fue recogiendo medio de cultivo de las A549 de mantenimiento hasta conseguir 20 ml del mismo, ya que contiene factores producidos por las células que favorecen su crecimiento (medio condicionado) en las etapas posteriores. Para eliminar restos celulares del medio condicionado se utilizó el tipo de filtro descrito anteriormente.

Pasados 2 días, las células infectadas se tripsinizaron, se contaron ($2,7 \cdot 10^5$ células totales) y se realizó una dilución intermedia 1:100, de la que se tomó el volumen necesario para tener 150 células, que se resuspendieron en una mezcla del medio condicionado filtrado y 10 ml de medio normal. Se sembraron 100 µl de esta suspensión celular en 3 placas de 96 pocillos para que en cada pocillo hubiera una célula o ninguna. Se descartaron aquellos pocillos donde no cayó ninguna célula o había más de una, y del resto de pocillos se fueron controlando los clones que iban apareciendo durante los siguientes días mediante observación al microscopio invertido de fluorescencia. Finalmente, se seleccionaron y se expandieron los clones que presentaban una mayor fluorescencia, llegando a establecer un cultivo de mantenimiento con estas nuevas células, denominadas A549 H2B-GFP.

3.5 Microscopía “time-lapse”

Esta técnica permite llevar a cabo experimentos aplicados a células vivas en cultivo, manteniendo las condiciones ambientales (temperatura, presión de CO₂ y humedad) adecuadas para garantizar la supervivencia de las células. El proceso consiste en tomar imágenes de varios puntos fijos del cultivo celular a intervalos regulares durante un determinado tiempo. Estas imágenes, que pueden contener células fluorescentes o células observadas por contraste de fase, son procesadas por un programa informático adecuado, de manera que si se reproducen de forma secuencial todas las imágenes captadas de una misma posición, es posible observar la dinámica de las células en el campo observado. Además, se puede ajustar la velocidad de reproducción de la grabación para facilitar el análisis.

Se sembraron 10^4 células A549 H2B-GFP totales en 200 µl de medio DMEM completo en 4 pocillos de una microplaca de 8 pocillos con el fondo de cristal (*Ibidi*), especial para este microscopio. Tras 24 horas, se sustituyó el medio de los pocillos (DMEM completo) por 250 µl de medio DMEM sin rojo fenol para eliminar la fluorescencia de fondo, se añadieron los fármacos barasertib (5 µM), vincristina (1 µg/ml) y docetaxel (5 µM) a diferentes pocillos y se llevaron al Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA), donde disponen de un sistema de microscopía multidimensional Leica AF6000 LX con control en tiempo real. Este sistema se programó para que tomara imágenes fijas de 3 posiciones diferentes de cada pocillo cada 15 minutos durante 48 horas. Finalmente, las imágenes obtenidas se analizaron y procesaron con el programa informático LAS X Core Offline junto con la versión LAS AF Lite (*Leica Microsystems*) y el procesador de imagen Fiji.

3.6 Análisis de proteínas por Western Blot

3.6.1 Extracción y fraccionamiento de extractos celulares

La fosforilación de las proteínas Bcl-2 y Bcl-X_L en las células A549 tratadas con barasertib se evaluó mediante 2 ensayos de Western Blot en momentos diferentes.

Tras la tripsinización y el conteo de las células A549 dispuestas en un frasco de cultivo de 25 cm², se sembraron $5 \cdot 10^5$ y $9 \cdot 10^5$ células totales en 5 ml en 4 pocillos de 2 placas de 6 pocillos, respectivamente. Transcurridas 24 horas, se añadió barasertib a una concentración final de 5 µM a 2

de los pocillos de cada placa. Tras otras 24 horas, se tripsinizaron todas las células, se contaron y se centrifugaron a 524xg durante 5 minutos. Se desecharon los sobrenadantes, cada pellet se lavó con 1 ml de PBS y se pasó el contenido procedente de la primera y segunda placa a 4 y 2 tubos eppendorf, respectivamente (en la segunda placa, el contenido de los 2 pocillos control se recogió conjuntamente en un único tubo eppendorf, al igual que el contenido de los 2 pocillos tratados con barasertib). Los tubos eppendorf se centrifugaron a 461xg durante 5 minutos, se retiraron los sobrenadantes, los pellet se pusieron en hielo y se resuspendieron en 10 µl de tampón lisis para extraer proteínas citoplasmáticas. Este tampón contenía Tritón X-100 1% (v/v), glicerol 10 % (v/v), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, ortovanadato 1 mM, pirofosfato sódico 10 mM, leupeptina (10 µg/ml), fluoruro de sodio 10 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM y Tris-HCl 50 mM pH 7,6. Además, se suplementó con inhibidor de fosfatasas para que las proteínas fosforiladas no se defosforilaran ("Phosphatase inhibitor cocktail 2", *Sigma-Aldrich*). Esta preparación se dejó incubar entre 30 minutos y una hora en hielo y, a continuación, los eppendorf se centrifugaron a 20817xg durante 30 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes donde se encontraban las proteínas celulares se transfirieron a otros tubos eppendorf nuevos, que se guardaron a -20 °C hasta su utilización.

3.6.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS

Se determinó la cantidad de proteína total presente en cada extracto celular para cargar la misma cantidad de proteína en cada pocillo de 2 geles (75 µg) mediante el método del BCA (ácido bicinconínico; Micro BCATM Protein Assay Kit, *Thermo Scientific*), un método colorimétrico muy sensible que no interacciona con los detergentes iónicos y no iónicos.

Una vez conocido el volumen necesario de cada extracto para cargar los 75 µg en cada pocillo, se añadieron 5 µl de tampón de carga concentrado 3x (Tris-HCl 150 mM pH 7,4, SDS 3 % (p/v), molibdato de sodio di-anhidro 0,3 mM, pirofosfato de sodio 30 mM, fluoruro de sodio 30 mM, glicerol 30 % (v/v), β-mercaptoetanol 30 % (v/v) y azul de bromofenol 0,06 % (p/v)). A continuación, los extractos celulares se calentaron a 95 °C durante 5 minutos en un bloque térmico sin agitación (*Eppendorf*) y se les dio un pulso de centrifuga a 11529xg durante 30 segundos.

Por otra parte, se prepararon 2 geles de poliacrilamida al 12 % con SDS (dodecilsulfato sódico) en el que se separaron las proteínas celulares según su peso molecular. La composición química de los geles fue: acrilamida/bisacrilamida (30 %), 0,5 M Tris-Hcl pH 6,8 (solo gel concentrador), 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 (solo gel separador), agua destilada, 10 % SDS, 10 % APS (persulfato amónico) y TEMED (*Sigma-Aldrich*).

Se cargaron 15 µl de cada extracto celular por pocillo, 5 µl de marcador de peso molecular (SpectraTM Multicolor Broad Range Protein Ladder, *Thermo Scientific Fermentas Technology*) y 5 µl de tampón de carga concentrado 3x en los pocillos donde no se cargó muestra para controlar que el frente avanzaba recto. Las electroforesis se llevaron a cabo en cubetas de *Bio-Rad* a unas condiciones de 180 V y 20 mA con tampón de electroforesis (Tris (hidroximetil) aminometano 25 mM, glicina 192 mM y SDS 3,5 mM).

3.6.3 Transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa

Las proteínas separadas en los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa utilizando un tampón de transferencia (Tris (hidroximetil) aminometano 25 mM, glicina 192 mM, SDS 3,5mM y metanol 20 % (v/v), pH 8,3). Para cada transferencia, se dispusieron 2 hojas de papel Whatman, la membrana de nitrocelulosa, el gel y otras 2 hojas del mismo papel, todos ellos impregnados en tampón de transferencia, en equipos de transferencia semisecos (*Bio-Rad*), teniendo en cuenta el sentido de la corriente eléctrica para que las proteínas se transfirieran de los geles a las membranas (geles en el cátodo y membranas en el ánodo). Ambas transferencias se llevaron a cabo a 20 V y 400 mA durante

una hora y cuarto, y pasado este tiempo, se recuperaron las membranas y se tiñeron con rojo Ponceau (0,1 % en acético al 5 %, *Merck*) para comprobar cómo se habían desarrollado las transferencias.

3.6.4 Análisis de proteínas por Western Blot

Las proteínas transferidas a las membranas se analizaron utilizando anticuerpos específicos y los marcadores de peso molecular relativos detectados. Tras la tinción con rojo Ponceau, se lavaron las membranas con agua destilada para eliminar los restos de colorante y se bloquearon con leche desnatada en polvo al 5 % (p/v) disuelta en tampón B (solución de lavado que contiene NaCl 0,12 M, Tris/HCl 10 mM pH 8, Tween-20 0,1 % (p/v) y timerosal (0,1 g/L) en PBS pH 7,4) o con albúmina al 5 % disuelta en PBS, durante media hora con agitación a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, las membranas se lavaron 3 veces durante 10 minutos con tampón B bajo agitación moderada. Finalizado el lavado, se añadió el anticuerpo primario anti-fosfo Bcl-2 o anti-fosfo Bcl-X_L, dependiendo de la proteína que se quisiera detectar, y se incubaron a 4 °C durante toda la noche en un agitador. Los dos anticuerpos eran monoclonales específicos obtenidos en conejo (*Santa Cruz*) y se diluyeron 1:1000 en PBS-Tween-20 al 0,1 %, 0,05 % de azida de sodio y 5 % BSA.

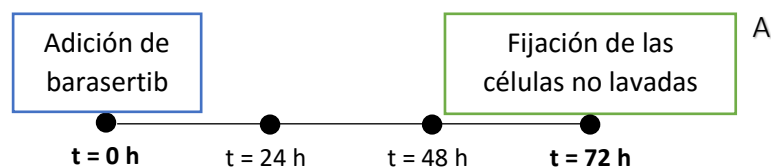
Tras la incubación, se recuperaron los anticuerpos y se lavaron las membranas 3 veces durante 10 minutos con tampón B y en agitación. A continuación, las membranas se incubaron durante una hora con el anticuerpo secundario “anti-rabbit” IgG policlonal obtenido en cabra, marcado con peroxidasa y diluido 1:20000 en el mismo volumen de leche utilizada para el bloqueo y tampón B. Finalizado el tiempo, se eliminó el anticuerpo y las membranas se lavaron 3 veces durante 10 minutos con tampón B en agitación. Posteriormente, las membranas se incubaron durante 2 minutos con 300 o 400 µL del sustrato de la peroxidasa (kit PierceTM ECL Western Blotting Substrate (normal) o PierceTM ECL Plus Western Blotting Substrate (fuerte), *Thermo Scientific*), se eliminó el sustrato y cada membrana se colocó en una funda de plástico transparente encajada en un “cassette” de revelado, donde se eliminaron las burbujas que podían haber quedado presionando con un trozo de papel. Finalmente, en una habitación con luz adecuada para el revelado, se colocó un fragmento de una película fotográfica (CL-XPosureTM Film, *Thermo Scientific*) sobre la región de la funda donde se encontraba cada membrana y se expuso en primer lugar durante 5 minutos, y cuando no se obtuvieron resultados en ese tiempo, se expuso entre 30 y 45 minutos. Pasado el tiempo de exposición, cada película se reveló sumergiéndola en revelador, agua destilada y fijador, por este orden.

De forma análoga a la detección de Bcl-2 y Bcl-X_L fosforiladas, se realizó un control de carga revelando la β-actina en cada Western Blot. En ambos casos, se utilizó el anticuerpo primario anti-β-actina monoclonal obtenido en ratón (*Sigma-Aldrich*) y un anticuerpo secundario “anti-mouse” IgG conjugado con peroxidasa, así como el sustrato normal.

4 Resultados y discusión

4.1 Análisis del ciclo celular y del contenido de DNA de las células A549 tratadas con barasertib

En primer lugar se estudió el efecto de barasertib sobre el ciclo celular tras un tratamiento continuo durante 72 horas y tras un tratamiento durante 48 horas con este fármaco, seguido de un lavado e incubación durante 96 horas en medio completo (Fig. 4). El objetivo de este experimento era verificar si los cambios inducidos por barasertib eran reversibles y desaparecían al eliminar el fármaco del medio de cultivo.



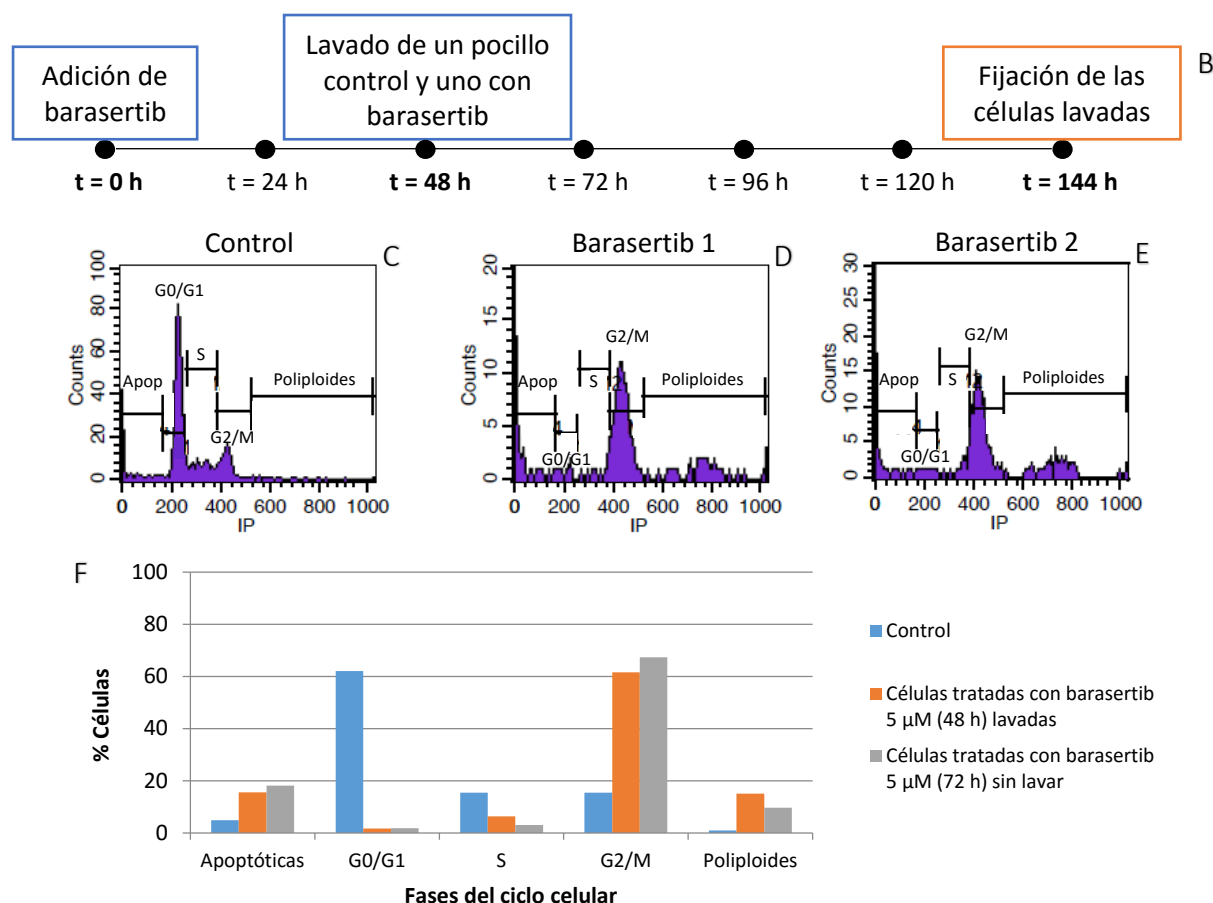


Figura 4. Ciclo celular de las células A549 tras el tratamiento con barasertib. Los esquemas temporales (A y B) describen de forma cronológica el tratamiento de las células. Para ello, se sembraron 10^4 células en 3 pocillos de una placa de 12 pocillos y 10^5 células en otros 3 pocillos. Los primeros se tomaron como control (C) mientras que los restantes se trataron con barasertib 5 μ M durante 48 o 72 horas (D y E). Una vez finalizados los tratamientos, se realizó el marcaje con yoduro de propidio de todas las células. En la gráfica (F) se representa el porcentaje de células control y tratadas con barasertib 5 μ M a distintos tiempos en cada fase del ciclo celular.

Las células control analizadas se encuentran mayoritariamente en la fase G0/G1 del ciclo celular (Fig. 4C), en menor medida aparecen células en las fases S y G2/M y una proporción muy pequeña son células apoptóticas y poliploides (células que duplican su contenido de DNA pero no llevan a cabo la citocinesis) (Fig. 4F). Sin embargo, la mayor parte de las células tratadas con barasertib 5 μ M, independientemente del lavado posterior, se localizan en la fase G2/M (Fig. 4D y 4E), un menor porcentaje son células apoptóticas y poliploides y de forma anecdótica aparecen células en las fases G0/G1 y S (Fig. 4F).

La duración de la fase G1 varía dependiendo del tipo celular. Generalmente, esta fase dura de 8 a 10 horas en las células de mamífero, aunque en algunos casos puede reducirse a minutos o unas pocas horas, o puede alargarse semanas o incluso meses^[31]. Si se toma como referencia una célula de rápida división humana típica que tiene un ciclo celular de 24 horas, la fase G1 abarcaría alrededor de 11 horas, la fase S aproximadamente 8 horas, la fase G2 unas 4 horas y la fase M una hora, siendo la fase G1 la de mayor duración del ciclo celular. Por lo tanto, es lógico que la mayor parte de las células control se encontraran en esta fase del ciclo celular, ya que es el periodo en el que las células crecen y son activas desde el punto de vista metabólico^[32], mientras que el resto de las células se distribuyen entre las fases de menor duración. Además, la observación de una pequeña población de células apoptóticas y poliploides en el cultivo control se debe a la muerte basal que presentan todos los cultivos y a que la poliploidía es un evento muy poco común en los animales, respectivamente^[33].

El hecho de que la mayoría de las células se encuentren en la fase G2/M tras el tratamiento con barasertib podría ser consecuencia de un arresto mitótico prolongado o también de un proceso conocido como “deslizamiento mitótico” (en inglés, “mitotic slippage”), que se produce cuando las células “escapan” de la parada en mitosis sin haber llevado a cabo la citocinesis. Tras un deslizamiento mitótico, las células pueden tener diferentes destinos: la muerte celular, la entrada a un estado de senescencia o el inicio de un nuevo ciclo de división que da lugar a un estado de poliploidía (endorreduplicación)^[16]. Sin embargo, con el marcaje con yoduro de propidio no es posible distinguir si las células están bloqueadas en mitosis o si se ha producido el deslizamiento mitótico y la entrada en senescencia, ya que en ambos casos poseen el doble de dotación cromosómica que la inicial, 4n. Por lo tanto, se necesitan técnicas específicas para determinar si existen células en este estado.

Teniendo en cuenta el factor del lavado en las células tratadas con barasertib, los resultados obtenidos indican que el porcentaje de células en la fase G2/M y subdiploides (apoptóticas) es ligeramente superior en aquellas células a las que no se les cambió el medio. Este hecho puede deberse a que barasertib ha actuado durante más tiempo, pudiendo afectar a un mayor número de células. Sin embargo, cuando se sustituye el medio por medio nuevo, la acción del fármaco es más corta en el tiempo, de manera que el efecto sobre las células no es tan agresivo como en el caso anterior, por lo que se observan más células en la fase S y poliploides que cuando el fármaco permanece en el medio.

Por lo tanto, estos resultados permiten concluir que el fármaco antimitótico barasertib produce la parada del ciclo celular en la fase G2/M en las células A549 y promueve la aparición de células apoptóticas y poliploides. Además, si el fármaco se elimina tras 48 horas de actuación y se añade medio fresco, la proporción de células apoptóticas y en fase G2/M disminuye y la de células poliploides y en fase S aumenta con respecto a las células a las que no se les cambia el medio. Es decir, el destino final de las células tratadas con este fármaco depende del tiempo de exposición al mismo, pudiendo experimentar la muerte celular, entrar en senescencia o sufrir endorreduplicación. Además, estos resultados indican que barasertib tiene un efecto irreversible puesto que no se observan células con una dotación cromosómica 2n aunque se elimine el fármaco.

4.2 Detección de la senescencia celular inducida por barasertib en células A549 mediante la medición de la actividad β -galactosidasa

Como se ha indicado en el apartado anterior, uno de los posibles destinos de las células tras la salida de un arresto mitótico es la entrada en un estado de senescencia. Para evaluar esta posibilidad en las células A549 tras el tratamiento con barasertib se realizó la medición de la actividad de la enzima β -galactosidasa lisosomal.

Dado que el fármaco impide la división y proliferación celular, se utiliza una densidad de un orden de magnitud mayor en los pocillos a los que se va a añadir barasertib para tener suficiente cantidad de células y poder visualizar bien las que se colorean de azul.

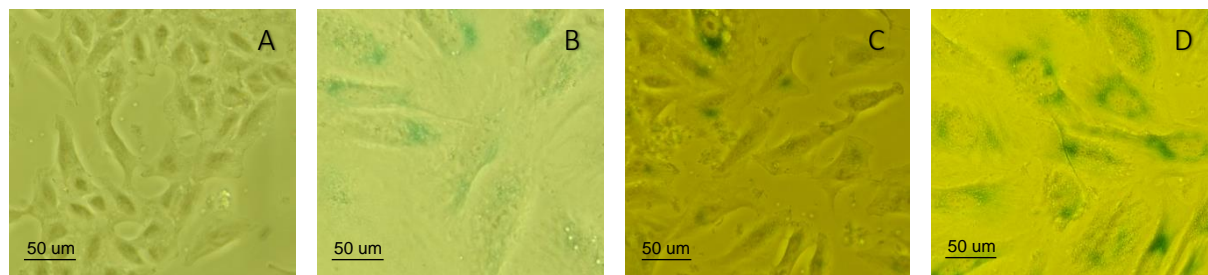


Figura 5. Medición de la actividad de la β -galactosidasa en células A549 tratadas con barasertib. Se sembraron $3 \cdot 10^3$ y $3 \cdot 10^4$ células en 2 pocillos de una placa de 12 pocillos, tomando las primeras como control (A y C). A las 24 horas se añadió barasertib 5 μ M al pocillo con mayor densidad celular (B y D), se dejó actuar

durante 48 horas y entonces se cambió el medio a ambos pocillos por medio DMEM completo. Pasados 4 días, se realizó la tinción con X-gal de acuerdo con el protocolo descrito en el apartado 3.3 de Materiales y métodos, y las células se fotografiaron transcurridas 6 (A y B, x20) y 24 horas (C y D, x20) desde la tinción.

Las imágenes de microscopía invertida obtenidas muestran el estado de las células control (Fig. 5A y 5C) y el de las tratadas con barasertib 5 μ M (Fig. 5B y 5D) a las 6 y 24 horas de la tinción. En todos los casos, las células conservan su propiedad de adherencia y su morfología, lo que permite observar los cambios morfológicos inducidos por barasertib, como el aumento de tamaño celular y nuclear y la aparición de vacuolas en las células tratadas con el fármaco (Fig. 5B). El hecho de que las células tratadas con barasertib estén adheridas al sustrato, y además, presenten un tamaño mucho mayor que las control, parece indicar que estas células salen de la mitosis de una forma relativamente rápida.

Con respecto a las células control, a las 6 horas no se observan células teñidas de azul; sin embargo, sí se observan algunas células coloreadas pasadas 24 horas desde la tinción. La aparición de células teñidas en esta población se debe a que siempre existe un mínimo porcentaje de células senescentes en los cultivos celulares y, probablemente, a que al prolongar el tiempo de incubación también se detectan niveles basales de actividad β -galactosidasa. No obstante, en relación a las células tratadas con barasertib, a las 6 horas de la tinción comienzan a observarse células coloreadas de azul, y a las 24 prácticamente la totalidad de las células se observan teñidas intensamente, y por lo tanto, senescentes.

En conclusión, estos resultados complementan a los obtenidos en el estudio del ciclo celular de las células A549, y analizados en conjunto prueban que el fármaco antimitótico barasertib a la concentración ensayada, induce la parada del ciclo celular y deslizamiento mitótico, tras el cual, un porcentaje de células experimenta endorreduplicación o apoptosis (Fig. 4F), mientras que la mayoría de las células entran en senescencia.

4.3 Células A549 H2B-GFP

Con el fin de seguir la evolución de los núcleos celulares en la línea celular A549 cuando estas células se exponían a barasertib y otros fármacos, se generaron las células A549 H2B-GFP siguiendo el protocolo indicado en el apartado 3.4 de Materiales y métodos. Estas células contienen integrado en su genoma el cDNA de la Histona H2B fusionado con el gen de la GFP de la medusa bioluminiscente *Aequorea victoria*, de manera que al transcribirse y traducirse esta información genética, se genera una proteína de fusión entre la Histona H2B y la proteína fluorescente verde (Anexo 6). Dado que la Histona H2B es una proteína estructural que participa en la formación del nucleosoma, la unidad básica de empaquetamiento de la cromatina en los organismos eucariotas, la proteína de fusión generada permite visualizar la cromatina en células vivas.

Al observarse al microscopio invertido, las células A549 H2B-GFP obtenidas tras el proceso de selección conservan la morfología y las propiedades de adherencia y crecimiento en monocapa de sus células progenitoras (Fig. 6). Además, al igual que las A549, son capaces de permanecer adheridas al sustrato y de mantener el contacto con las células adyacentes durante un tiempo superior al de otras líneas celulares cuando los cultivos llegan a un estado de confluencia, por lo que son resistentes a despegarse del sustrato, y por tanto, a la muerte celular por falta de espacio. Por otra parte, gracias a la fluorescencia aportada por la proteína GFP, se podía controlar el estado general de los núcleos celulares mediante microscopía invertida de fluorescencia (*Nikon TE300/TE200*), donde se podían identificar células en diferentes fases del ciclo celular (Fig. 6C) o células apoptóticas, así como morfologías aberrantes en los núcleos cuando se trataban con fármacos antimitóticos y miméticos BH3 (ver más adelante).

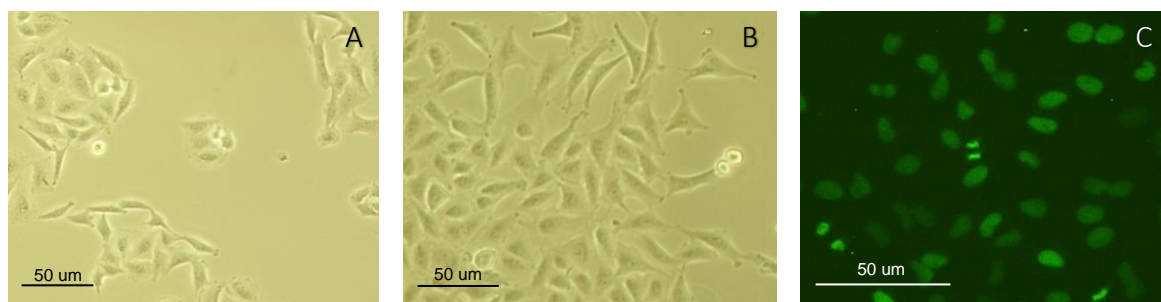
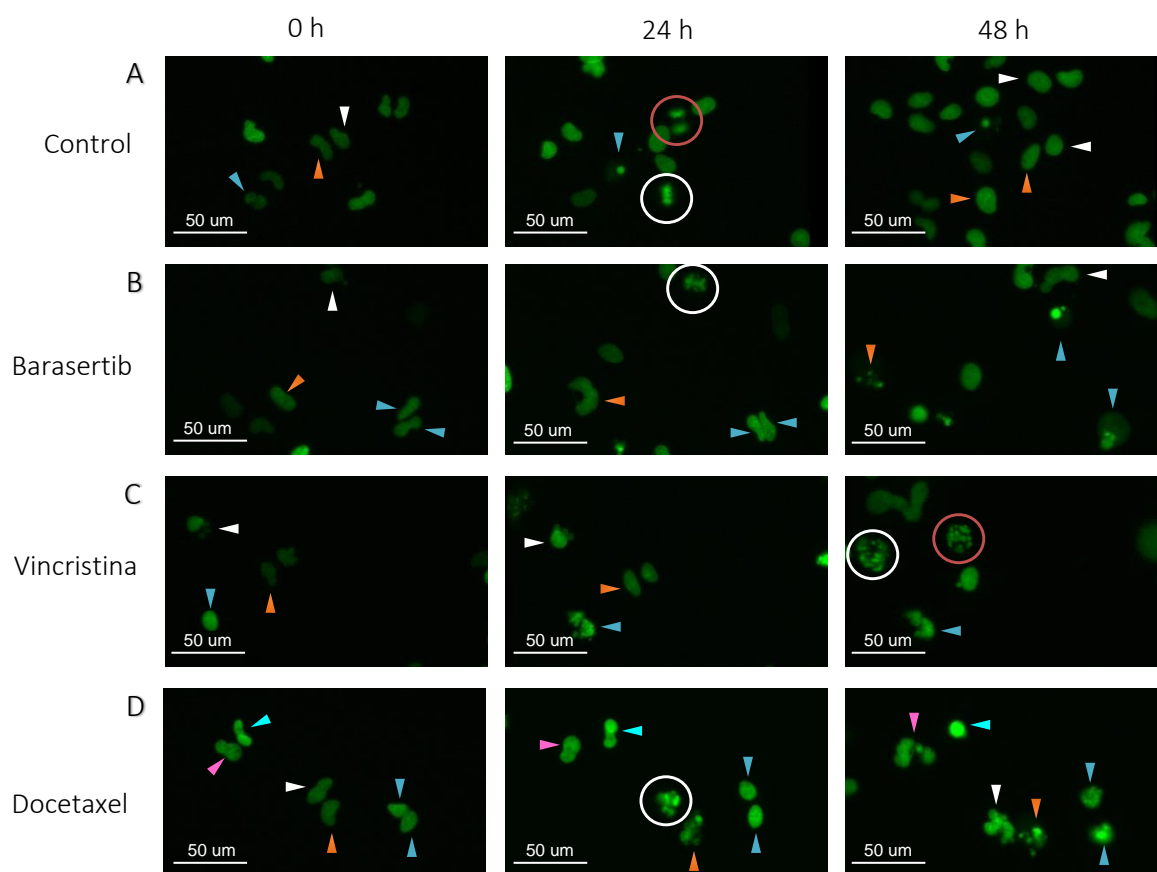


Figura 6. Células A549 (A) y A549 H2B-GFP (B y C) en cultivo de mantenimiento, respectivamente. En ambos casos se sembraron $5 \cdot 10^4$ células totales en un frasco de cultivo de 25 cm^2 . Las células A549 se controlaron mediante microscopía invertida de campo claro (A, x10) mientras que las células A549 H2B-GFP se controlaron con la misma técnica (B, x10) y con microscopía invertida de fluorescencia (C, x10). Se observan células en división en ambas imágenes de campo claro y células en metafase, anafase y telofase en la imagen de fluorescencia.

4.4 Estudio de la muerte celular inducida por diferentes fármacos antimitóticos en células A549 H2B-GFP mediante microscopía “time-lapse”

Otra forma de analizar el efecto que producen distintos fármacos se basa en la microscopía “time-lapse”, una técnica que permite realizar experimentos con células vivas en cultivo según se indica en el apartado 3.5 de Materiales y métodos. En este caso, se utilizaron células A549 H2B-GFP, descritas en el apartado anterior, para seguir la evolución de los núcleos y determinar los tipos de muerte celular que tenían lugar cuando las células se exponían a barasertib. Con el fin de comparar el efecto de este fármaco con otros antimitóticos, en este experimento también se analizó el efecto de vincristina y docetaxel, dos agentes anti-microtúbulos (MTA).



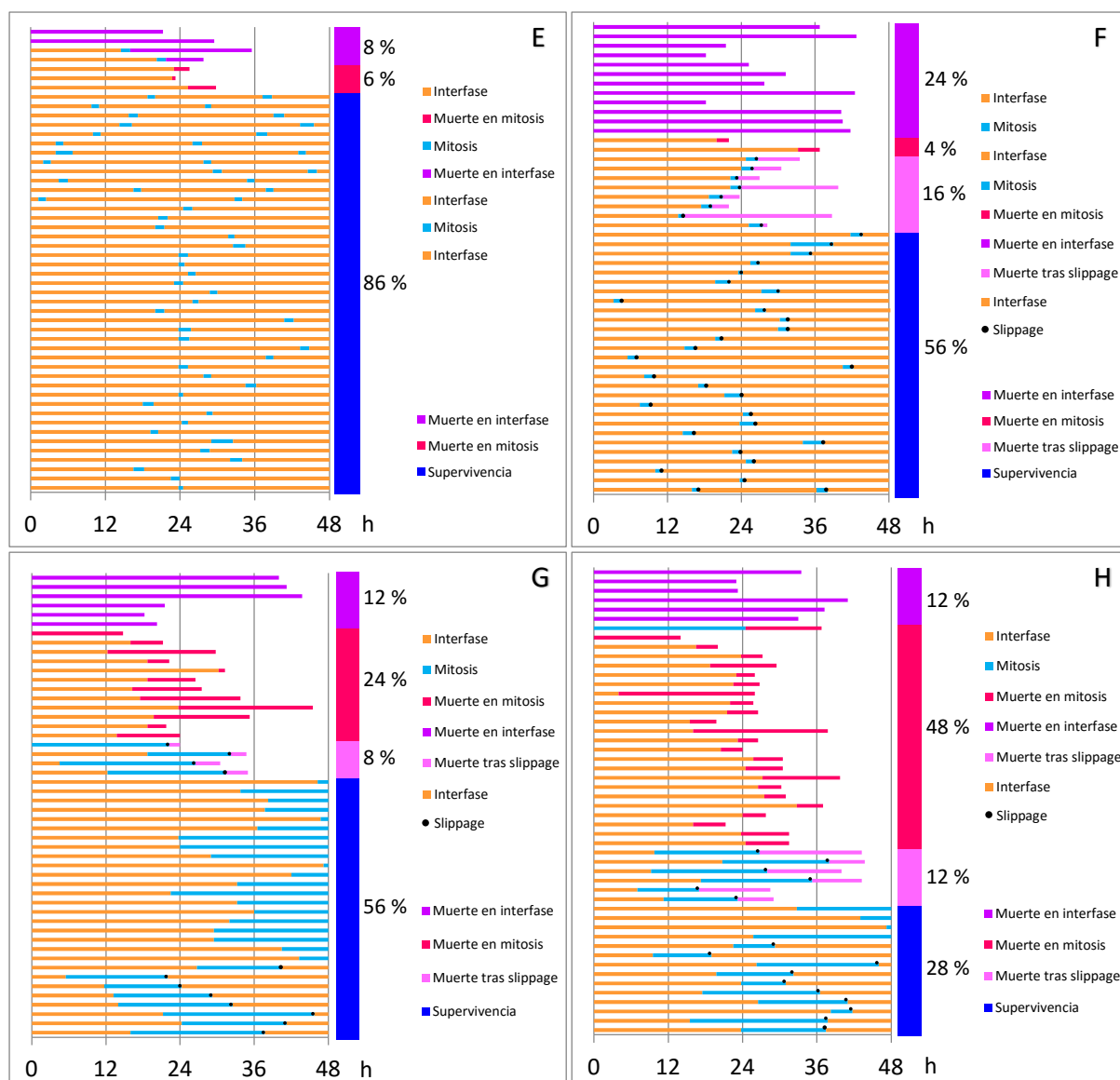


Figura 7. Evolución y destinos finales de las células A549 H2B-GFP tras el tratamiento con barasertib, vincristina o docetaxel. Se sembraron 10^4 células en 4 pocillos de una microplaca de 8 pocillos con fondo de cristal. Tras 24 horas se cambió el medio por medio DMEM sin rojo fenol y se añadieron los fármacos barasertib 5 μ M (B), vincristina 1 μ g/ml (C) o docetaxel 5 μ M (D) a 3 de los pocillos, dejando el último de ellos como control (A). Se tomaron imágenes de 3 posiciones diferentes de cada pocillo a intervalos de 15 minutos durante 48 horas mediante un sistema de microscopía multidimensional Leica AF6000 LX con control en tiempo real, y finalmente, las imágenes se analizaron con programas específicos (en este caso, se muestran imágenes a tiempo 0, 24 y 48 horas). En las imágenes de fluorescencia, los círculos indican las células en mitosis y las flechas de diferentes colores señalan algunos ejemplos representativos para cada tratamiento de células a las que se les hizo el seguimiento. En las gráficas (E-H) se representa la evolución de 50 células analizadas en cada escenario durante todo ensayo, así como el estado en el que se encuentra cada una de ellas a las 48 horas desde la adición de los fármacos (E, control; F, barasertib, G, vincristina, H, docetaxel).

Las imágenes de fluorescencia muestran que las células control presentan una morfología nuclear normal durante todo el ensayo. Además, a las 24 horas de iniciar la toma de imágenes, se pueden observar células en alguna fase de la mitosis, como la metafase y la telofase, aunque también se puede observar alguna célula apoptótica (Fig. 7A). Por otra parte, estas observaciones también quedan reflejadas en la gráfica donde se recoge la evolución de 50 células control durante las 48 horas de seguimiento (Fig. 7E). En ella se muestra que la gran mayoría de células analizadas (86 %) se

mantienen vivas al finalizar el ensayo y que la mitosis abarca un intervalo de tiempo muy corto (entre 1,5 y 2 horas), mientras que un pequeño porcentaje de ellas muere antes de las 48 horas, ya sea en la interfase del ciclo celular (8 %) o durante la mitosis (6 %). Estos resultados indican que las células control se encuentran, en general, en buen estado, lo que les permite crecer y proliferar, tal y como se observa en la gráfica, donde se muestra que una parte de las células lleva a cabo más de una división celular.

Por otra parte, la evolución celular difiere de este escenario cuando las células son expuestas a distintos fármacos antimitóticos. Como ya se ha explicado anteriormente y puede comprobarse de nuevo en este ensayo, las células que sobreviven al tratamiento con barasertib sufren variaciones en el tamaño y morfología nucleares como consecuencia de la salida del arresto mitótico (Fig. 7B) y, si se observan las células por contraste de fase, también se detecta un aumento del tamaño celular. Por otra parte, a las 24 horas, además de núcleos con morfologías aberrantes, también se observan núcleos normales y alguna célula que ha entrado en mitosis pero no consigue resolverla, de manera que sufren arresto mitótico (Fig. 7B). A las 48 horas se siguen observando núcleos normales y aberrantes, así como células muertas, ya sean apoptóticas o no (Fig. 7B). Estas observaciones pueden complementarse al recurrir a la gráfica, donde se indica que la duración de la mitosis al utilizar este fármaco en la mayor parte de las células es similar al tiempo necesario para completar la mitosis en las células control y, de las células analizadas, no se observó ninguna que experimentara dos arrestos mitóticos (Fig. 7F). En cuanto al camino que siguen las células cuando se exponen a este fármaco, un poco más de la mitad de las células (56 %) sobrevive al tratamiento con barasertib durante las primeras 48 horas, mientras que el resto de células terminan muriendo en distintas fases del ciclo celular, principalmente en interfase (24 %), seguida de muerte tras el deslizamiento mitótico o “mitotic slippage” (16 %) o durante el arresto mitótico (4 %) (Fig. 7F). Con respecto a esto, cabe destacar que no se esperaba un porcentaje de muerte en interfase tan elevado, sino un porcentaje similar al registrado en las células control, y que la muerte tras la salida de la mitosis es relativamente rápida.

Si se comparan estos resultados con los obtenidos en el análisis del ciclo celular por citometría de flujo, detallado en el apartado 4.1, el porcentaje de células apoptóticas o muertas en aquel ensayo es aproximadamente un tercio del detectado en este caso (en torno al 15 % en el análisis del ciclo celular frente al 44 % en este ensayo). Esto podría deberse a que el campo analizado (50 células) no fuera representativo de lo que ocurre en el conjunto de las células. Otra posible y más probable explicación a la diferencia de muerte celular encontrada en ambos ensayos puede deberse a que con la técnica de microscopía “time-lapse” se contabilizan todas las células que poseen una morfología indicativa de muerte, mientras que en el análisis del ciclo celular mediante marcaje con yoduro de propidio por citometría de flujo se contabilizan únicamente las células en las que se produce fragmentación del DNA y son hipodiploides. Por otra parte, en este experimento no es posible saber si las células que sobreviven tras la salida del arresto mitótico entran en un estado de senescencia o sufren endorreduplicación. Para determinar esto, sería necesario un intervalo de tiempo de estudio mayor que en este estudio. Resultados de un trabajo anterior indican que estas células no entran en un nuevo ciclo de división celular incluso a tiempos muy largos de cultivo, lo que apoya la hipótesis de su entrada en un estado de senescencia^[34].

En cuanto a las células expuestas a vincristina, no se observan morfologías nucleares aberrantes, a diferencia de lo que ocurriría con barasertib, aunque sí hay alguna célula multinucleada al salir del arresto mitótico (no se muestra). Esta vez, se detectan varias células que, a las 48 horas, se encuentran en arresto mitótico, donde la distribución de la cromatina es distinta a la observada con barasertib; y además, a las 24 horas se puede observar alguna célula muerta (Fig. 7C). Estas observaciones se completan con el análisis de la gráfica, en la que se indica que la duración del arresto mitótico en estas

células es el mayor de todos los registrados, pues aproximadamente la mitad de las células superan las 15 horas en este estadio. En cuanto a su evolución, el porcentaje de células supervivientes tras el tratamiento con vincristina es algo superior a la mitad (56 %), mientras que el resto de células mueren principalmente durante el arresto mitótico (24 %), seguido de muerte en interfase (12 %) y tras el deslizamiento mitótico (8 %) (Fig. 7G).

En un estudio realizado previamente^[35] se demostró que vincristina puede inducir diferentes tipos de muerte celular (apoptosis durante el arresto mitótico o tras la salida del mismo, o catástrofe mitótica) dependiendo de la línea celular utilizada. En concreto, se vio que las células A549 sufrían un deslizamiento mitótico que tenía lugar antes de las 48 horas y que rápidamente daba lugar a la muerte celular, observada a las 72 horas de incubación con el fármaco, en forma de cuerpos apoptóticos con la cromatina condensada, lo que indica una respuesta tardía de las células al fármaco. No obstante, también se observó alguna célula multinucleada^[35].

Sin embargo, en este trabajo la incubación con vincristina duró 48 horas, por lo que las observaciones entre ese estudio y el presente varían. Por ejemplo, a diferencia del estudio anterior, la mayor parte de las células que permanecen vivas a las 48 horas de la adición de vincristina se encuentran en arresto mitótico, y no es posible comprobar si el destino mayoritario coincide con el observado en ese estudio (Fig. 7G). Otro punto de discrepancia entre el presente trabajo y el anterior es el tipo de muerte celular observada, ya que en este trabajo se observa muerte durante el arresto mitótico, en interfase y tras el deslizamiento mitótico (Fig. 7G), mientras que en el citado estudio solo se detectó muerte tras el deslizamiento mitótico^[35]. No obstante, también hay algunos puntos en común entre ambos, como la observación de células multinucleadas, y que aquellas células que salen del arresto mitótico dentro de las 48 horas mueren rápidamente por apoptosis.

Con respecto a las células tratadas con docetaxel, tampoco se observan morfologías aberrantes de los núcleos. Sin embargo, al contrario de lo que sucede con vincristina, apenas se observan células en arresto mitótico a las 48 horas y es más común encontrar células muertas y, en menor medida, multinucleadas tras el deslizamiento mitótico (Fig. 7D), aunque a las 24 horas se pueden ver células que han entrado en mitosis, donde la distribución de la cromatina difiere tanto de la observada con barasertib como con vincristina, e incluso ya se observa muerte celular (Fig. 7D). Si se observa la gráfica, se puede ver que la duración del arresto mitótico en estas células es intermedia entre los tiempos observados en las células control y las tratadas con barasertib y vincristina (Fig. 7H). En relación al efecto citotóxico del fármaco, se puede comprobar que solo un 28 % de las células analizadas sobreviven a las 48 horas de incubación, mientras que las restantes acaban muriendo, principalmente durante el arresto mitótico (48 %), seguido de muerte en interfase (12 %) y tras el deslizamiento mitótico (12 %).

Pese a que la apoptosis es considerada, generalmente, como el principal mecanismo de muerte celular desencadenado por los taxanos, se ha visto que paclitaxel y docetaxel pueden inducir mezclas de muerte por apoptosis y muerte celular mitótica específicas de la dosis y la línea celular utilizadas^[36]. En el caso de las células utilizadas en este ensayo, las A549 H2B-GFP, se observa una mezcla de muerte celular durante el arresto mitótico principalmente, seguida de muerte por apoptosis tras el deslizamiento mitótico y de muerte en interfase, ya sea por apoptosis o de tipo necrótica.

En resumen, las células parten de un buen estado en todos los escenarios pero sufren diferentes cambios en función del tratamiento al que son sometidas. Además, las células de una línea celular son clones, por lo que es de suponer que su comportamiento ante un determinado fármaco debería ser idéntico o muy similar en cuanto al efecto que produce el fármaco y el momento en el que lo hace; sin embargo, como puede observarse en las imágenes y gráficas anteriores, las células analizadas toman diferentes caminos que, salvo en el caso de docetaxel, generalmente llevan a las células a la

supervivencia tras la exposición a los fármacos durante 48 horas, aunque en todos los casos hay células en las que no se observa ningún tipo de cambio durante las 48 horas de seguimiento. Esto concuerda con resultados de otros grupos, que indican que existe variación en la respuesta a este tipo de fármacos incluso dentro del mismo cultivo^[37]. Por otra parte, la disposición de la cromatina durante el arresto mitótico con cada fármaco es diferente, ya que las dianas también lo son; no obstante, el arresto mitótico observado con vincristina y docetaxel es más parecido entre sí que si se compara con el que tiene lugar cuando se utiliza barasertib. Esto se debe a que la diana de vincristina y docetaxel es común, la β -tubulina (aunque el efecto que producen en las células es diferente), mientras que barasertib actúa como inhibidor de la Aurora quinasa B. Sin embargo, ambas proteínas son esenciales en la mitosis, ya que cuando se altera alguna de ellas, se observan mitosis aberrantes que hacen que las células sean incapaces de replicarse.

4.5 Determinación del mecanismo inicial de muerte celular en células A549 H2B-GFP tratadas con barasertib y ABT-737

Una posible estrategia para aumentar la efectividad de los tratamientos antitumorales basados en antimitóticos es su combinación con otros fármacos. Entre los candidatos se encuentran los miméticos BH3, como ABT-737 (inhibidor de Bcl-2, Bcl-X_L y Bcl-w)^[14, 17].

Puesto que el mecanismo de acción de barasertib y ABT-737 es diferente, se pretendió determinar de forma cualitativa cuál era el mecanismo que iniciaba la muerte celular en las células A549 H2B-GFP tratadas con ambos compuestos a la misma concentración final (5 μ M), es decir, se quería especificar cuál de los dos compuestos actuaba primero cuando se combinaban; además, también se observaron los cambios morfológicos que provocaban estos fármacos por separado.

Para ello, se sembraron 10⁴ células A549 H2B-GFP en 500 μ l de medio DMEM completo en 8 pocillos de una placa de 48 pocillos. Tras 24 horas, se cambió el medio por 500 μ l de medio DMEM sin rojo fenol y se añadió barasertib 5 μ M a 2 pocillos, ABT-737 5 μ M a otros 2 pocillos y ambos fármacos a esas concentraciones a otros 2 pocillos, dejando los pocillos restantes como controles, y se dejaron actuar los fármacos. Finalmente, se tomaron imágenes en el microscopio invertido de fluorescencia pasadas 6 y 24 horas desde la adición de los fármacos para determinar qué era lo que les sucedía a las células a tiempos relativamente cortos (Fig. 8).

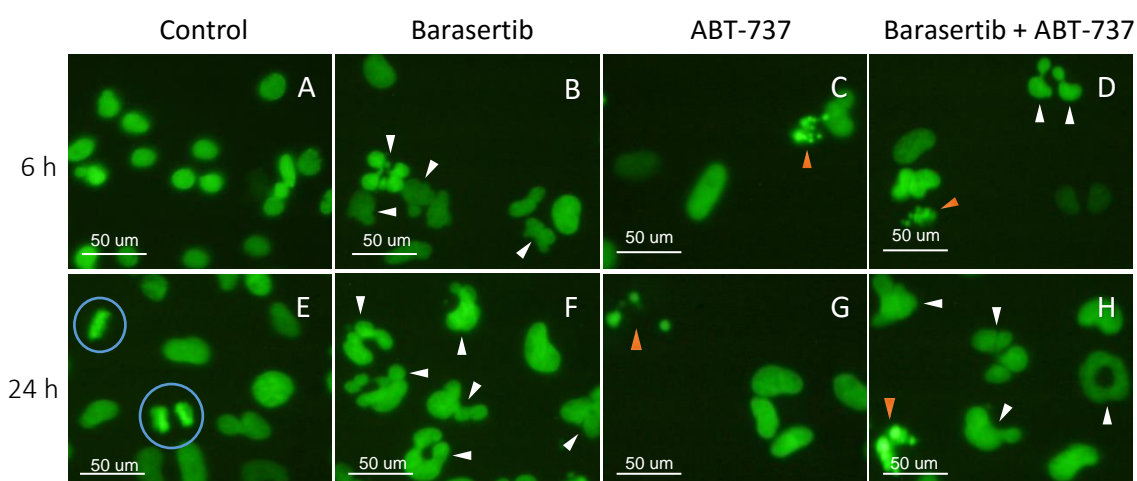


Figura 8. Efecto de barasertib y ABT-737 sobre la morfología nuclear de las células A549. Se sembraron 10⁴ células en 8 pocillos de una placa de 48 pocillos. Pasadas 24 horas, se sustituyó el medio por medio DMEM sin rojo fenol y se añadieron los fármacos según la siguiente distribución: 2 pocillos sin fármacos (controles) (A y E), 2 con barasertib 5 μ M (B y F), 2 con ABT-737 5 μ M (C y G) y otros 2 con ambos fármacos a la misma concentración (D y H). Por último, se tomaron imágenes por microscopía invertida de fluorescencia (x40) a las 6

(A-D) y 24 horas (E-H) desde la adición de los fármacos. Los círculos indican las células en mitosis; las flechas blancas señalan los núcleos aberrantes y las flechas naranjas indican las células apoptóticas.

Las imágenes obtenidas muestran que los núcleos de las células control (Fig. 8A y 8E) presentan una morfología normal, y además pueden observarse células en alguna fase de la mitosis a las 24 horas, como la metafase y la telofase (Fig. 8E), lo que indica que las células se encuentran en buen estado y están proliferando. Sin embargo, al tratar las células con barasertib, los núcleos adquieren formas aberrantes y no se observan células en división. Estas morfologías anormales comienzan a apreciarse a las 6 horas de añadir el fármaco (Fig. 8B) y se hacen más patentes transcurridas 24 horas (Fig. 8F). Por otra parte, cuando se utiliza ABT-737 se observan algunas células apoptóticas a un nivel similar tanto a las 6 (Fig. 8C) como a las 24 horas de añadir el compuesto (Fig. 8G), pero la morfología de los núcleos no se ve afectada; además, es posible ver alguna célula en mitosis a la que no le ha afectado el fármaco, aunque es una situación poco habitual (no se muestra). Finalmente, cuando se combinan ambos fármacos, a las 6 horas se puede observar alguna célula apoptótica debido a la acción de ABT-737, aunque se aprecia una mayor cantidad de núcleos con morfologías anormales como consecuencia de la acción de barasertib (Fig. 8D). Cuando estas células se observan a las 24 horas, la cantidad de células apoptóticas es similar a la observada a las 6 horas, pero la proporción de núcleos aberrantes es mucho mayor que a las 6 horas (Fig. 8H). Además, tampoco se observan células en división cuando se combinan ambos fármacos.

Por lo tanto, según estos resultados, cuando se utiliza barasertib como agente único, este modifica la morfología de los núcleos, que adquieren formas aberrantes debido a la inhibición de la Aurora quinasa B, que interviene en la segregación cromosómica y la citocinesis, entre otras funciones^[12], lo que hace que no pueda desarrollarse la mitosis correctamente y el ciclo celular se detiene. Al utilizar ABT-737, las células mueren por apoptosis al unirse este compuesto al bolsillo hidrofóbico de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-X_L y Bcl-w^[14]. Finalmente, cuando se utiliza una combinación de ambos fármacos, se observan ambos fenómenos, aunque el efecto predominante es el producido por barasertib. Esto indica que barasertib es, generalmente, el primer fármaco en actuar cuando se utilizan ambos compuestos a iguales concentraciones; sin embargo, en un trabajo previo se observó una fuerte sinergia entre ambos fármacos pasadas 48 horas^[38]. Este dato y los resultados presentados en este trabajo, sugieren que ABT-737 provoca su efecto tras el deslizamiento mitótico, ya que a las 24 horas se observan los núcleos aberrantes característicos de la acción de barasertib pero todavía no se observa apoptosis en un número significativo de células comparado con el observado cuando ABT-737 actúa en solitario.

4.6 Análisis de la expresión de Bcl-2 y Bcl-X_L fosforiladas mediante Western Blot

Las proteínas de la familia Bcl-2 pueden experimentar varias modificaciones post-traduccionales, especialmente fosforilación y ubiquitinación^[18]. En concreto, las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-X_L (ver estructura en Anexo 7) se fosforilan durante la mitosis y se desfosforilan rápidamente cuando las células entran en la fase G1 de la siguiente interfase^[38, 39]. La fosforilación de Bcl-2 en su dominio bucle provoca un cambio conformacional del mismo que le permite unirse con mayor afinidad a las proteínas pro-apoptóticas Bak y Bim, aumentando así la protección contra la muerte celular por apoptosis^[38]. Sin embargo, se ha visto en varios tipos celulares que el nivel de fosforilación de las proteínas Bcl-2 y Bcl-X_L aumenta cuando se produce arresto mitótico, lo que lleva a la inactivación de su función anti-apoptótica^[38].

Puesto que esta modificación post-traducciona tiene un papel importante en la función anti-apoptótica de las proteínas Bcl-2 y Bcl-X_L, se quiso determinar si barasertib tiene algún efecto sobre la fosforilación de estas dos proteínas mediante dos análisis por Western Blot (Fig. 9), utilizando anticuerpos específicos para detectar ambas formas fosforiladas.

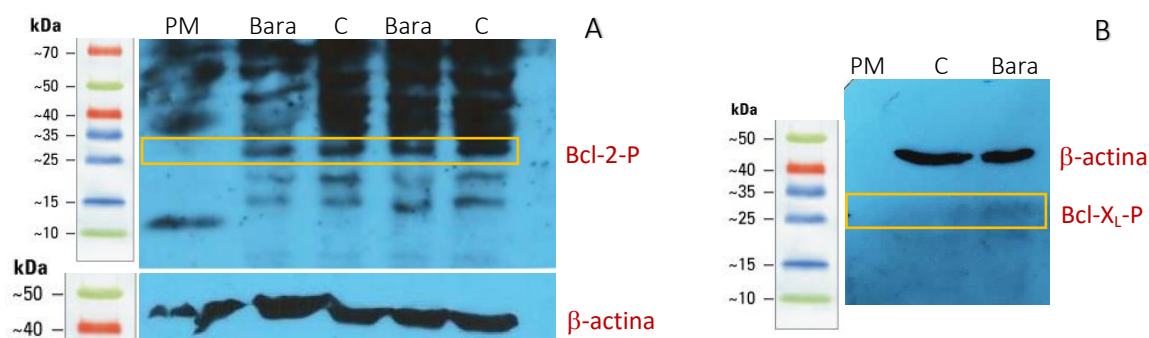


Figura 9. Expresión de las proteínas Bcl-2 y Bcl-X_L fosforiladas en células A549 sin tratar y tratadas con barasertib. Se realizaron extractos celulares de células control o tratadas con barasertib 5 μ M de acuerdo al protocolo explicado en el apartado 3.6 de Materiales y métodos, y se analizó la expresión de Bcl-2 y Bcl-X_L fosforiladas (A y B, respectivamente) mediante Western Blot. Además, en ambos casos se utilizó la β -actina como control de carga (A y B). En naranja aparecen marcadas las bandas correspondientes Bcl-2 y Bcl-X_L en ambos Western y se han añadido las bandas de los pesos moleculares utilizados como referencia. PM, pesos moleculares; C, control; Bara, barasertib.

En el primer Western Blot (Fig. 9A) se observan muchas bandas en todos los carriles, lo que indica que el anticuerpo detecta bandas de manera inespecífica, mientras que en el segundo Western (Fig. 9B) apenas se atisba alguna banda muy tenue en los 2 carriles. Entre todas las proteínas extraídas se encuentran las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-X_L fosforiladas, que se corresponden con las bandas localizadas entre los 25 y 35 kDa, ya que el peso molecular de ambas proteínas es, aproximadamente, de 26 kDa. El resto de las bandas obtenidas se deben a uniones inespecíficas del anticuerpo anti-Bcl-2 fosforilado, como ya se ha indicado. Además, para poder diferenciar si el aumento del grosor de las bandas se debía a la mayor fosforilación de las proteínas de interés o a una mayor carga de proteína total en una determinada muestra, se utilizó la β -actina como control de carga (Fig. 9A y 9B).

En cuanto a Bcl-2 fosforilada, detectada en el primer Western Blot, se observa un nivel de fosforilación muy parecido en todos los carriles, aunque la última muestra control parece tener un mayor nivel de fosforilación que las demás. Sabiendo que barasertib induce la parada del ciclo celular en la fase G2/M, se esperaría una mayor fosforilación cuando las células fueran tratadas con este fármaco que en las células control, y que este estado revirtiera cuando las células entraran de nuevo en la fase G1 del ciclo. Sin embargo, los resultados obtenidos no se ajustan a esta situación, aunque podrían explicarse mediante dos razonamientos. El primero de ellos está relacionado con las dianas de barasertib, ya que aunque se sabe que este compuesto es un inhibidor de Aurora quinasa B, tal vez podría inactivar a otras quinasas del ciclo celular que estuvieran implicadas en la fosforilación de Bcl-2. Otra posible explicación se basa en la acción de barasertib a tiempos relativamente cortos, ya que, como se ha explicado en el apartado 4.2, las células quedan retenidas durante poco tiempo en mitosis y consiguen escapar relativamente rápido de este estado sin realizar la citocinesis, pasando a la fase G1 del siguiente ciclo con una dotación cromosómica de 4n. No obstante, estos resultados deberían comprobarse.

Con respecto a Bcl-X_L fosforilada, detectada en el último Western Blot, la situación es diferente a la anterior. En este caso, apenas se pueden distinguir bandas en ambos carriles del Western, aunque se

puede ver una banda difuminada en las células tratadas con barasertib, y parece que en las células control aparece una banda a la misma altura, aunque mucho más tenue y desdibujada. Este resultado sí refleja lo que sucede en varios tipos de células, ya que la detención del ciclo en la fase G2/M en las células tratadas con barasertib hace que Bcl-X_L sufra una mayor fosforilación, aunque, al igual que en el caso de Bcl-2, este resultado debería comprobarse.

Por lo tanto, para verificar el efecto real de este fármaco en la fosforilación de ambas proteínas en las células A549, se repetirían de nuevo los ensayos y se cuantificaría la cantidad de proteína en las bandas de interés por densitometría. Además, para detectar mejor Bcl-2 fosforilada se retiraría la zona superior a la de interés para eliminar las uniones inespecíficas del anticuerpo, de manera que este detectaría únicamente la proteína de interés.

5 Conclusiones

Para cerrar el presente documento, aquí se recogen las conclusiones obtenidas del mismo:

1. Barasertib induce la parada del ciclo celular en la fase G2/M en las células A549 y, en función del tiempo de exposición al mismo, las células pueden sufrir muerte celular, endoreduplicación y, en mayor medida, entran en un estado de senescencia.
2. Las modificaciones inducidas por barasertib sobre las células A549 son irreversibles.
3. La línea celular A549 H2B-GFP comparte la morfología, las propiedades de adherencia y crecimiento en monocapa y la resistencia a la muerte por falta de sustrato con su línea parental, las células A549.
4. Barasertib induce mayoritariamente la muerte celular durante la interfase, mientras que vincristina y docetaxel desencadenan la muerte durante el arresto mitótico, principalmente. Los núcleos de las células A549 H2B-GFP tratadas con barasertib adquieren morfologías aberrantes, mientras que al tratarse con ABT-737, las células mueren por apoptosis. Y al utilizar una combinación de ambos fármacos, el efecto de barasertib sobre la división celular precede al efecto pro-apoptótico de ABT-737.
5. Barasertib aumenta el nivel de fosforilación de Bcl-X_L pero parece disminuir la fosforilación de Bcl-2 en las células A549.

Conclusions

To conclude the present document, here are the conclusions obtained from it:

1. Barasertib induces cell cycle arrest in the G2/M phase in A549 cells and depending on the time exposure to it, cells can undergo cell death, endoreduplication and, to a great extent, they enter a state of senescence.
2. Modifications induced by barasertib on A549 cells are irreversible.
3. A549 H2B-GFP cell line shares morphology, adhesion and monolayer growth properties and resistance to death due to lack of substrate with its parental cell line, A549 cells.
4. Barasertib mainly induces cell death during interphase, whereas vincristine and docetaxel principally trigger death during mitotic arrest. Nuclei of A549 H2B-GFP cells treated with barasertib acquire aberrant morphologies, while when they are treated with ABT-737, cells die by apoptosis. And by combining both drugs, the effect of barasertib on cell division precedes the pro-apoptotic effect of ABT-737.
5. Barasertib increases Bcl-X_L phosphorylation level but it seems to reduce Bcl-2 phosphorylation in A549 cells.

6 Bibliografía

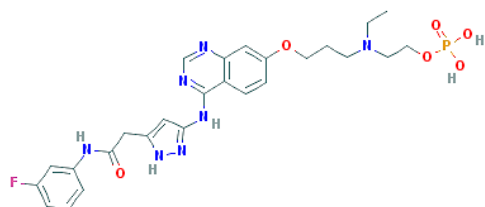
- [1] CTI Reviews., (2016). *Biology*. Cram101 Textbook Reviews (Editor).
- [2] Galluzzi L., Bravo-San Pedro J. M., Vitale I., Aaronson S. A., Abrams J. M., Adam D., (...) & Kroemer G., (2015). Essential *versus* accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death and Differentiation*, 22 (1), 58-73.
- [3] Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abrams J., Alnemri E. S., Baehrecke E. H., (...) & Melino G., (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*, 16 (1), 3-11.
- [4] Kerr J. F. R., Winterford C. M. & Harmon B. V., (1994). Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 73 (8), 2013-2026.
- [5] Mukhopadhyay S., Panda P. K., Sinha N., Das D. N. & Bhutia S. K., (2014). Autophagy and apoptosis; where do they meet?. *Apoptosis*, 19 (4), 555-566.
- [6] Coleman J., Liu R., Wang K. & Kumar A., (2016). Detecting Apoptosis, Autophagy and Necrosis (Abstract). *Apoptosis Methods in Toxicology*, 77-92.
- [7] Marzo I. & Naval J., (2013). Antimitotic drugs in cancer chemotherapy: Promises and pitfalls. *Biochemical Pharmacology*, 86 (6), 703-710.
- [8] Mc Gee M. M., (2015). Targeting the Mitotic Catastrophe Signaling Pathway in Cancer. *Mediators of Inflammation*, 8, 1-13.
- [9] Tao Y., Leteur C., Calderaro J., Girdler F., Zhang P. Frascogna V., (...) & Deutsch E., (2009). The Aurora B kinase inhibitor AZD1152 sensitizes cancer cells to fractionated irradiation and induces mitotic catastrophe. *Cell Cycle*, 8 (19), 3172-3181.
- [10] van Vuuren R. J., Visagie M. H., Theron A. E. & Joubert A. M., (2015). Antimitotic drugs in the treatment of cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 76 (6), 1101-1112.
- [11] Sessa F. & Villa F., (2014). Structure of Aurora B-INCENP in complex with barasertib reveals a potential transinhibitory mechanism. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology Communications*, 70, 294-298.
- [12] Schwartz G. K., Carvajal R. D., Midgley R., Rodig S. J., Stockman P. K., Ataman O. (...) & Shapiro G. I., (2013). Phase I study of barasertib (AZD1152), a selective inhibitor of Aurora B kinase, in patients with advanced solid tumors. *Investigational New Drugs*, 31 (2), 370-380.
- [13] Marzo I. & Naval J., (2008), Bcl-2 family members as molecular targets in cancer therapy. *Biochemical Pharmacology*, 76 (8), 939-946.
- [14] Galluzzi L., Vitale I., Abrams J. M., Alnemri E. S., Baehrecke E. H., Blagosklonny M. V., (...) & Kroemer G., (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation*, 19 (1), 107-120.
- [15] Adams J. M. & Cory S., (2001). Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 26 (1), 61-66.
- [16] Youle R. J. & Strasser A., (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9 (1), 47-59.
- [17] Delbridge A. R. D. & Strasser A., (2015). The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. *Cell Death and Differentiation*, 22 (7), 1071-1080.
- [18] Czabotar P. E., Lessene G., Strasser A. & Adams J. M., (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15 (1), 49-63.
- [19] ATCC, (2014). A549 (ATCC® CCL-185™). [online] Disponible en: http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-185.aspx?geo_country=es#characteristics

- [20] ATCC, (2014). 293T (ATCC® CRL-3216™). [online] Disponible en: http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-3216.aspx?geo_country=es
- [21] Boticario Boticario C. & Cascales Angosto M., (2012). *Innovaciones en cáncer*. Madrid: UNED.
- [22] Settharaksa S., Chakree K., Madaka F. & Charoenchai L., (2014). Difference screening methods for evaluation of anti-cancer activity on cell line. *Bulletin of Health, Science and Technology*, 12 (2), 25-31.
- [23] Mansilla Barrado, S., (2005). Análisis de la expresión génica y de los mecanismos de muerte celular inducidos por la bisantraciclina WP631 en células tumorales humanas (tesis doctoral). Universidad de Barcelona.
- [24] Debacq-Chainiaux F., Erusalimsky J. D., Campisi J. & Toussaint O., (2009). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-βgal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and *in vivo*. *Nature Protocols*, 4 (12), 1798-1806.
- [25] Kain S.R., Adams M., Kondepudi A., Yang T.T., Ward W. W. & Kitts P., (1995). Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization (Abstract). *BioTechniques*, 19 (4), 650-655.
- [26] Sabrina Funke aus Köln, (2009). Targeted cell entry of lentiviral vectors (tesis doctoral). Universidad Johann Wolfgang Goethe, en Fráncfort del Meno.
- [27] Castilho L. R., Moraes Â., M., Augusto E. F. P. & Butler M., (2008). *Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy*. Nueva York: Taylor & Francis Group.
- [28] Ramírez Labrada A. G., (2013). Mecanismo de apoptosis inducida por el inhibidor de quinasas sorafenib en células de mieloma humano (tesis doctoral). Universidad de Zaragoza.
- [29] Miyamoto-Sato E. & Yanagawa H., (2006). Puromycin technology for *in vitro* evolution and proteome exploration. *Viva Origino*, 34.
- [30] Wu R., (1995). *Recombinant DNA Methodology II*. San Diego: Academic Press, Inc.
- [31] Chiras D. D., (2015). Human Biology. 8th Edition. En Esperti C. L. (Eds.), *Chromosomes, Cell Division, and the Cell Cycle*. (pp. 352-365). Burlington: Jones & Bartlett Learning.
- [32] Cooper G. M. & Hausman R.E., (2011). La célula. 5ª Edición. En ASM Press (Eds.), *Ciclo celular* (pp. 653-692). Madrid: Marbán Libros S.L.
- [33] Chen Z. J. & Ni Z., (2006). Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids. *Bioessays*, 28 (3), 240-252.
- [34] Roca Portolés A., (2015). Mecanismo de muerte inducida en células tumorales por la combinación de barasertib y compuestos miméticos BH3 (Trabajo Fin de Grado). Universidad de Zaragoza.
- [35] Galán-Malo P., Vela L., Gonzalo O., Calvo-Sanjuán, Gracia-Fleta L., Naval J & Marzo I., (2012). Cell fate after mitotic arrest in different tumor cells is determined by the balance between slippage and apoptotic threshold. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 258 (3), 384-393.
- [36] Morse D. L., Gray H., Payne C. M. & Gillies R. J., (2005). Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4 (10), 1495-1504.
- [37] Gascoigne K. E. & Taylor S. S., (2008). Cancer Cells Display Profound Intra- and Interline Variation following Prolonged Exposure to Antimitotic Drugs. *Cancer Cell*, 14 (2), 111-122.
- [38] Dai H., Ding H., Meng X. Wei, Lee S-H., Schneider & Haufmann S. H., (2013). Contribution of Bcl-2 Phosphorylation to Bak Binding and Drug Resistance. *Cancer Research*, 73 (23), 6998-7008.
- [39] Terrano D. T., Upreti Meenakshi & Chambers T. C., (2010). Cyclin-Dependent Kinase 1-Mediated Bcl-x_L /Bcl-2 Phosphorylation Acts as a Functional Link Coupling Mitotic Arrest and Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 30 (3), 640-656.

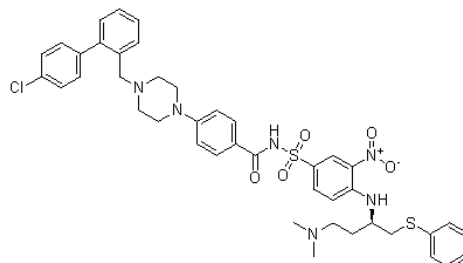
Anexos

Anexo 1

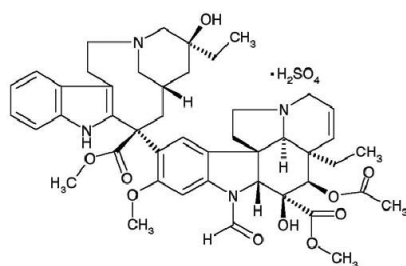
Estructura de los fármacos antimitóticos y miméticos BH3 utilizados.



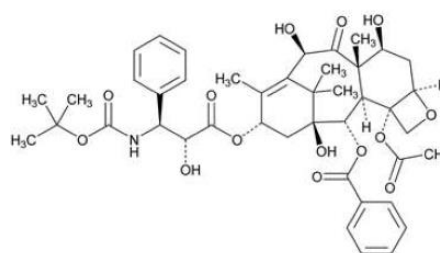
Barasertib



ABT-737



Vincristina



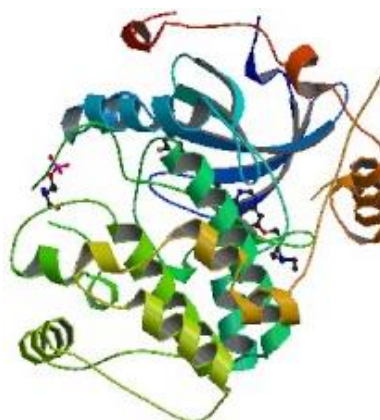
Docetaxel

Anexo 2

Estructura cristalina de Aurora quinasa B humana y de Aurora quinasa B de *Xenopus laevis* en complejo con barasertib.



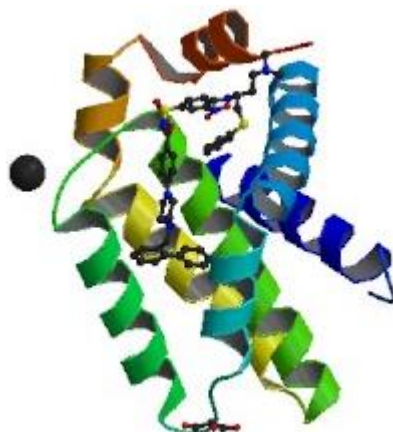
Aurora quinasa B humana



Aurora quinasa B de *X. laevis* con barasertib

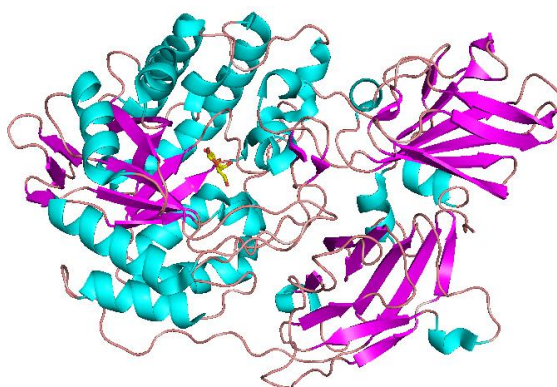
Anexo 3

Estructura cristalina de Bcl-X_L en complejo con ABT-737.



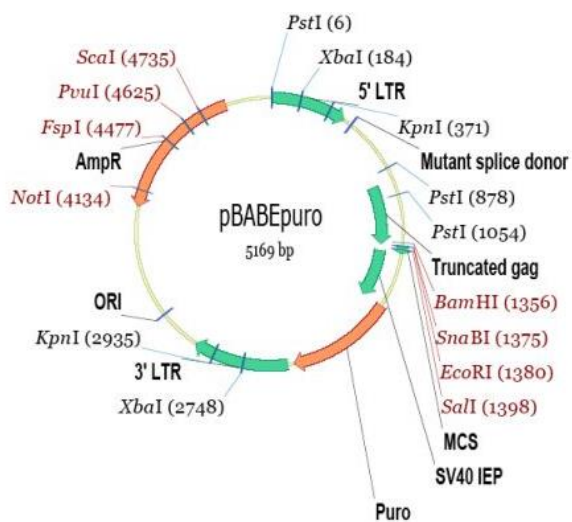
Anexo 4

Estructura cristalina de un monómero de la β -galactosidasa humana en complejo con su sustrato natural, la galactosa.



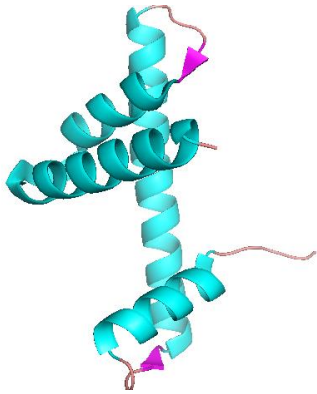
Anexo 5

Mapa del vector pBABEpuro al que se le han introducido el cDNA de la Histona H2B fusionado con el gen de la GFP.

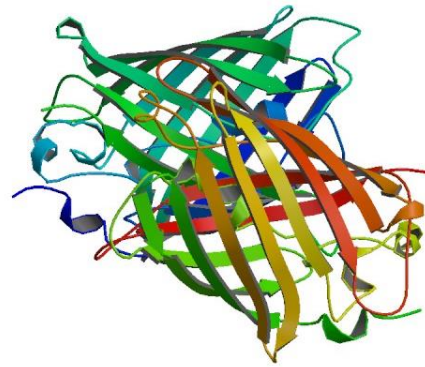


Anexo 6

Estructura cristalina de los componentes de la proteína de fusión.



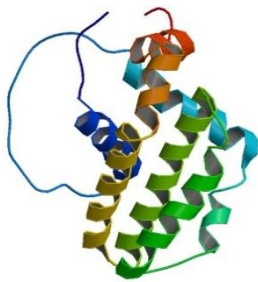
Monómero de la Histona H2B



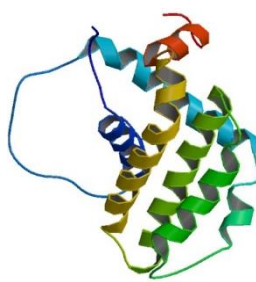
GFP de *A. victoria*

Anexo 7

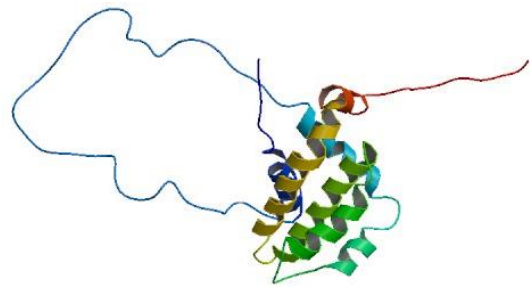
Estructura cristalina de Bcl-2 y Bcl-X_L.



Bcl-2 isoforma 1



Bcl-2 isoforma 2



Bcl-X_L