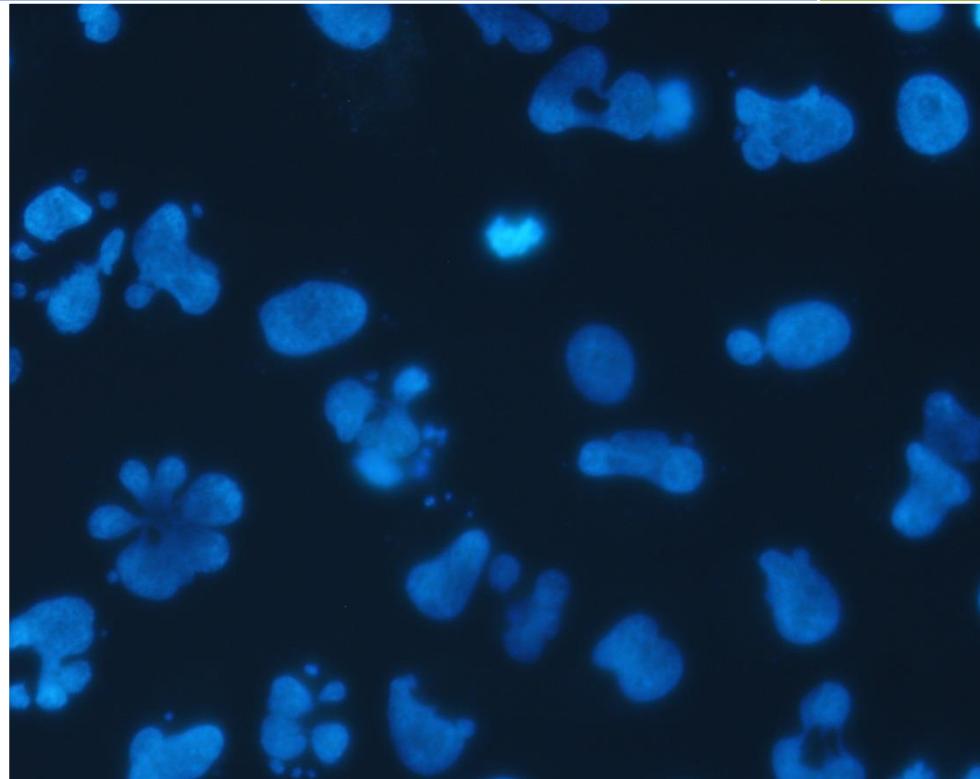




Mecanismo de muerte inducida en células tumorales por la combinación de barasertib y compuestos miméticos de BH3



Alba Roca Portolés

Grado de Biotecnología

Isabel Marzo Rubio

Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular y Celular

2014/2015

INDICE

1.	INTRODUCCIÓN	2
1.1.	Muerte celular.....	2
1.2.	Proteínas implicadas en la regulación de la apoptosis.....	3
1.3.	Fármacos pro- apoptóticos.....	4
1.4.	Fármacos antimitóticos.....	5
2.	ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	6
3.	MATERIALES Y METODOS.....	6
3.1.	Líneas celulares.....	6
3.1.1.	Células A549.....	6
3.1.2.	Células U937.....	6
3.1.3.	Mantenimiento de cultivos celulares.....	6
3.1.4.	Criopreservación de líneas celulares.....	7
3.2.	Contaje directo de las células con un hemocitómetro.....	7
3.3.	Test de Mosmann.....	7
3.4.	Citometría de flujo	8
3.4.1.	Marcaje con AnexinaV-FITC	8
3.4.2.	Análisis ciclo celular: Tinción con yoduro de propidio + RNAsa.....	8
3.5.	Microscopía de fluorescencia; Tinción Hoechst.....	9
3.6.	Ánalisis de proteínas por Western Blot.....	9
3.6.1.	Extracción y fraccionamiento de lisados celulares.....	9
3.6.2.	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.....	10
3.6.3.	Transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa.....	10
3.6.4.	Ánalisis de proteínas por inmunotransferencia y detección de los inmunocomplejos.....	10
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1.	Efecto antimitótico de barasertib.....	11
4.2.	Ánalisis de la sinergia entre barasertib y miméticos de BH3 en células A549.....	14
	Análisis de la sinergia entre barasertib y miméticos de BH3 en células U937.....	18
4.3.	Estudio del tipo de muerte celular inducida por ABT-737 y barasertib.....	21
4.4.	Estudio del ciclo celular y análisis del contenido de ADN de las células A549, tratadas con ABT-737 y barasertib.....	22
4.5.	Ánalisis de la expresión de Bcl-2 y Bcl-X _L por Western Blot.....	24
5.	CONCLUSIONES.....	25
6.	BIBLIOGRAFIA.....	25

RESUMEN

En los últimos años, se han propuesto diferentes antimitóticos como candidatos para el diseño de fármacos antitumorales. En particular barasertib, un inhibidor de Aurora quinasa B se ha descrito que induce la parada del ciclo celular en G2/M, pero tras quitar el fármaco los resultados mostraron que las células pueden seguir varias vías; apoptosis, entrar en senescencia o endoreduplicación, formando células poliploides. Su actividad antitumoral es limitada cuando se usa como agente único, por lo que para potenciarla se podría combinar con otros fármacos apoptóticos como ABT-737 y ABT-199 que son miméticos BH3, los cuales inducen apoptosis inhibiendo las proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas. ABT-737 se une con igual afinidad a Bcl-2, Bcl-X_L and Bcl-W, mientras que ABT-199 solo tiene afinidad por Bcl-2. Los resultados han mostrado que barasertib junto con ABT-737 tienen sinergia en células A549, induciendo apoptosis por la vía dependiente de las caspasas.

ABSTRACT

In the last years, different mitotic regulators have been proposed as drug target candidates for antitumor therapies. In particular barasertib, an inhibitor of Aurora kinase B has been shown to induce cell cycle arrest in G2/M, but after removing it the results showed that cells can follow several routes; apoptosis, senescence or continued cycling and endoreplication after mitotic slippage, generating polyploid cells. Its antitumor activity is limited, when used as a single agent, but it could be combined with other apoptotic drugs such as ABT-737 and ABT-199, which are a Bcl-2 Homology 3 (BH3)-mimetic that induce apoptosis by inhibiting pro-survival Bcl-2 proteins. ABT-737 binds with equal affinity to Bcl-2, Bcl-X_L and Bcl-W, while ABT-199 only has affinity to Bcl-2. The results have shown that barasertib with ABT-737 have synergy in A549 cells, inducing apoptosis by the caspase-dependent pathway.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Muerte celular

En los tejidos existe un equilibrio entre muerte y proliferación celular, que en determinados casos se rompe y da lugar a diversas patologías. Uno de los principales mecanismos de muerte celular es la apoptosis, descrita por Kerr en 1972. Este es un mecanismo encaminado a la eliminación de células dañadas, infectadas, que resultan imprescindibles para el organismo o que pueden ser potencialmente dañinas. Se puede definir como el conjunto de reacciones bioquímicas que tienen lugar en la célula y que concluyen con su muerte de una forma ordenada. La célula apoptótica sufre una serie de cambios morfológicos característicos que son: reducción del volumen celular, fragmentación y condensación nuclear, alteración de la membrana plasmática y aparición de protuberancias irregulares y separación de los componentes celulares en el interior de los cuerpos apoptóticos. Uno de los eventos tempranos durante la apoptosis es la translocación de la fosfatidilserina a la superficie externa de la membrana plasmática, la cual representa una señal quimiotáctica para los fagocitos encargados de eliminar estas células y los cuerpos apoptóticos resultantes de este proceso. Puesto que la célula apoptótica es fagocitada por macrófagos o por células vecinas, evita la respuesta inflamatoria local ocasionada en la necrosis, cuando la célula, al romperse, libera su contenido al medio. (1)

1.2. Proteínas implicadas en la regulación de la apoptosis

La activación de la apoptosis es un proceso controlado estrictamente y regulado por la interacción de un gran grupo de proteínas. Entre estas proteínas se distinguen dos familias: las caspasas y las proteínas de la familia Bcl-2. La apoptosis se puede producir por dos vías, la intrínseca y la extrínseca (Figura 1.1 A). Las caspasas participan en ambas vías ya que una vez activadas son responsables de la destrucción de componentes claves de la estructura celular. En la vía intrínseca o mitocondrial las proteínas de la familia Bcl-2 regulan la permeabilización de la membrana mitocondrial y la salida al citosol de proteínas apoptogénicas (Figura 1.1 B). Las proteínas de esta familia comparten al menos uno de los dominios de homología a Bcl-2 (BH) y se subdividen su vez en tres grupos: antiapoptóticas como Bcl-2, Bcl-X_L o Mcl-1, proapoptóticas multidominio como Bak y Bax y sólo-BH3 como Bim, PUMA, Noxa, Bid (Figura 1.2). Los dominios BH de las proteínas antiapoptóticas forman una cavidad hidrofóbica que permite la interacción con las proteínas sólo-BH3. Además, poseen un dominio hidrofóbico C-terminal que facilita su inserción en la membrana externa mitocondrial donde se encuentran generalmente, aunque también se pueden encontrar en el citosol o unidas a la membrana del retículo endoplasmático. Estas proteínas evitan la ejecución de la apoptosis por unión directa a las proteínas proapoptóticas. (1)

La vía intrínseca se activa por señales de estrés intracelular, producida por ejemplo determinados fármacos antitumorales, induciendo o activando a las proteínas proapoptóticas “solo-BH3” que activan a las proteínas efectoras Bax y Bak, las cuales permeabilizan la membrana mitocondrial mediante la creación de un canal proteico (MAC) en ella (2). Hay dos modelos de esta activación; el modelo directo sugiere que hay dos tipos de proteínas “solo-BH3”; las activadoras que activan directamente a Bax y Bak, o las sensibilizadoras, que se unen a las antiapoptóticas liberando a las activadoras para que activen a Bax y Bak. El modelo indirecto sin embargo sugiere que las proteínas antiapoptóticas actúan neutralizando a Bak y Bax y cuando las “solo-BH3” se inducen se unen a las antiapoptóticas y se liberan Bak y Bax (2). La permeabilización mitocondrial provoca la salida de citocromo c y activación de la caspasa 9 en un complejo macromolecular denominado apoptosoma, iniciándose de este modo la fase de ejecución. Esta vía también puede ser independiente de caspasas ya que entre los factores apoptogénicos que se liberan de la mitocondria se encuentran algunos cuya acción es independiente de las mismas, como AIF o EndoG (3).

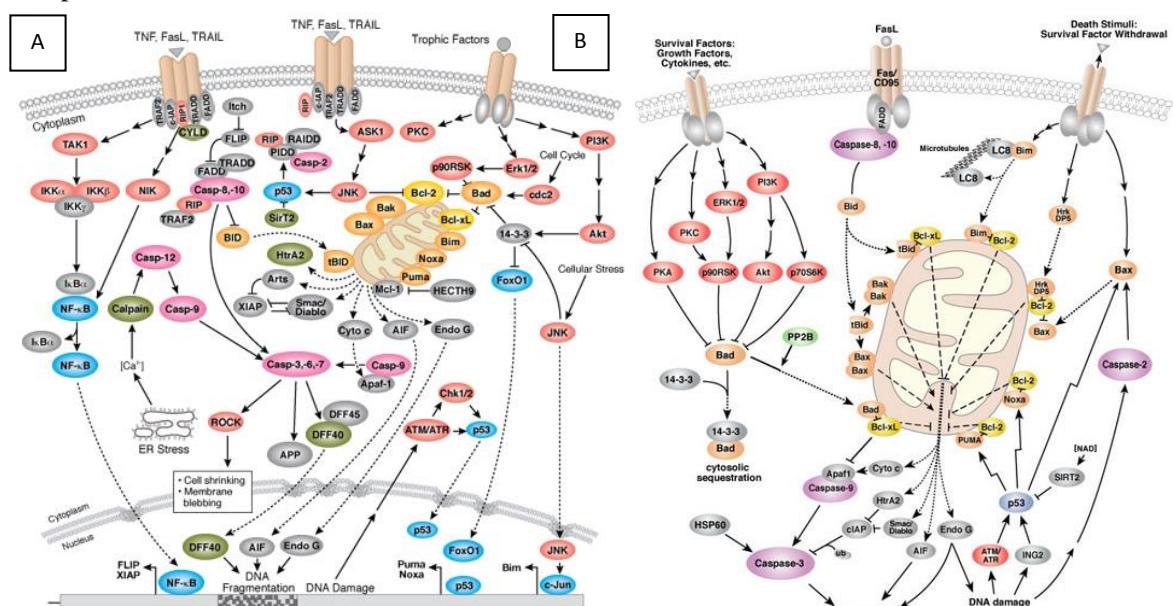


Figura 1.1 Regulación de la apoptosis. Vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis (A). Regulación de la vía intrínseca de la apoptosis y proteínas implicadas (B). Cell Signaling Technology. [2008, actualizado 2012].



Figura 1.2. Proteínas de la familia Bcl-2. L D Walensky. BCL-2 in the crosshairs: tipping the balance of life and death. Cell Death and Differentiation (2006) 13, 1339–1350.

1.3 Fármacos pro-apoptóticos

En base a la potente acción proapoptótica de las proteínas “solo-BH3” se han desarrollado en los últimos años moléculas que mimetizan el dominio BH3 como posibles terapias antitumorales. Dos de estos compuestos son el ABT-737 y el ABT-199, desarrollados por la compañía de farmacéutica con sede en EE.UU., Abbott (4). (ver estructuras en anexo 1).

In vitro se ha visto que el ABT-737 se une con igual afinidad, e inhibe, a Bcl-2, Bcl-X_L y Bcl-W ($K_i < 1\text{nM}$) (ver anexo 2), y que tiene poca afinidad por MCL1 y BFL1/A1 (5). Induce la apoptosis mediante la disociación de los complejos pre-existentes entre proteínas pro y antiapoptóticas de la familia de Bcl-2. El ABT-737 ha mostrado actividad como agente único en algunas leucemias (se ha visto resultado el leucemia mieloide (6)), linfomas y cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) (5). En células con Bcl-2 fosforilado o con Mcl-1 aumentado, ABT-737 se ha descrito que es inactivo y la inhibición de la fosforilación de Bcl-2 y la reducción de expresión Mcl-1 reestablecen la sensibilidad a ABT-737 (7).

ABT-737 no se puede administrar por vía oral, por lo que se creó un derivado biodisponible oralmente, el ABT-263, conocido como navitoclax, pero ambos producen trombocitopenia dosis-dependiente en los pacientes. Este efecto adverso se debe a que inhibe a Bcl-X_L ya que esta proteína es crítica para mantener la viabilidad de las plaquetas circulantes (8). Para disminuir este efecto secundario se diseñó el ABT-199 que también es un mimético de BH3, pero con alta inhibición de Bcl-2 ($K_i < 1\text{nM}$) y sin unión significativa a Bcl-X_L ($K_i \sim 50\text{nM}$) ni Bcl-W ($K_i > 200\text{ nM}$).

En estudios clínicos se ha visto que el ABT-199 tiene eficacia en CLL (leucemia linfocítica crónica), en Linfoma no Hodgkin (NHL) y mieloma múltiple. (8-9).

1.4 Fármacos antimitóticos

Las proteínas Aurora son una pequeña familia de serina / treonina quinasas que se expresan durante la mitosis y se han propuesto como posibles dianas para fármacos antitumorales. Las células de mamíferos poseen tres isoformas, Aurora A, B y C que tienen diferentes localizaciones subcelulares y funciones distintas. La Aurora quinasa B es el componente catalítico del CPC (chromosome passenger complex) que está implicado en numerosas funciones de la mitosis como controlar el alineamiento y la segregación de los cromosomas (detecta si uno de los dos cinetocoros hermanos se ancla simultáneamente a MTs generados por ambos polos) y en la formación del anillo contráctil para la división del citoplasma (citocinesis) (Fig. 1.3)(10).

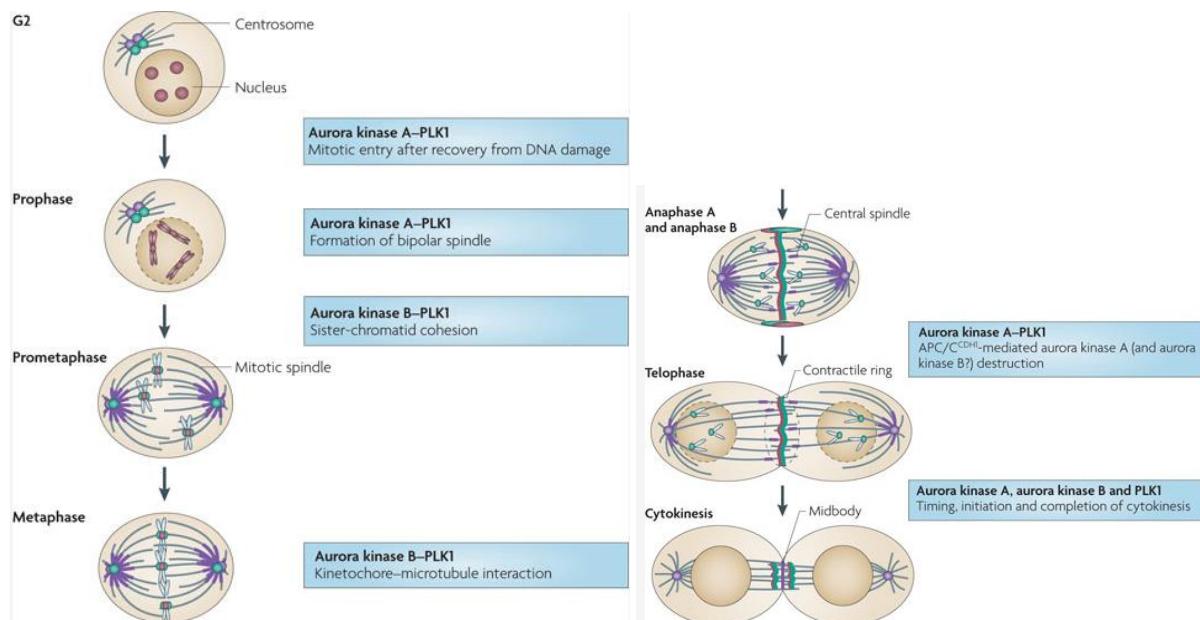


Figura 1.3. Control de la mitosis por las Aurora quinasas. Susanne M. A. Lens, Emile E. Voest & René H. Medema. Shared and separate functions of polo-like kinases and aurora kinases in cancer. Nature Reviews Cancer 10, 825-841.

Como era de esperar, la desregulación de las quinasas Aurora tiene consecuencias intracelulares drásticas, esto hace que sean un objetivo de los fármacos antitumorales. Se han desarrollado varios inhibidores de Aurora quinasas, pequeñas moléculas que se unen al sitio activo de la enzima (bolsillo donde se une el ATP) para su uso como agentes anticancerígenos. Entre estos está el barasertib (ver estructura en anexo 1), que es un inhibidor muy potente y selectivo de Aurora B ($K_i = 1 \text{ nM}$) (ver anexo 3) en comparación con Aurora A ($K_i = 1,4 \text{ M}$) y tiene una alta especificidad frente a otras 50 quinasas (11). De acuerdo con la inhibición de la quinasa Aurora B, la adición de barasertib a las células tumorales *in vitro* induce la desalineación de los cromosomas, impide la división celular y, en consecuencia reduce la viabilidad celular e induce la muerte celular. (11)

Los resultados publicados hasta ahora parecen indicar que la actividad antitumoral como agentes únicos *in vivo* de estos compuestos es limitada. Se ha visto respuesta en un 19-25% de pacientes con leucemia mieloide, sin embargo, los tumores sólidos parecen no responder al barasertib. (10) Pero, es probable que la combinación de compuestos antimitóticos con otros compuestos que activen la vía de la apoptosis pudiera potenciar la actividad antitumoral. (10)

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

En los últimos años se han desarrollado diversos compuestos como posibles agentes anticancerígenos. Un ejemplo son los miméticos de BH3, que tienen afinidad por los bolsillos hidrofóbicos de proteínas antiapoptóticas, por lo que liberan proteínas proapoptóticas que producirán la salida del citocromo c de la mitocondria, induciendo así la apoptosis en las células. Y por otro lado también se han desarrollado fármacos que inhiben proteínas clave implicadas en el control de la mitosis. Algunos de ellos están siendo evaluados en ensayos clínicos, pero la actividad antitumoral de los antimitóticos como agentes únicos es limitada por lo que para potenciarla se podrían combinar con otros fármacos apoptóticos.

En base a estos antecedentes se pretende estudiar la efectividad del barasertib, un antimitótico junto con fármacos apoptóticos como el ABT-737 y ABT-199. Para ello los concretos objetivos propuestos son:

1. Analizar la posible sinergia entre barasertib y los miméticos de BH3; ABT-737 y ABT-199 en las líneas celulares tumorales humanas A549 y U937.
2. Estudiar el tipo de muerte celular inducida por barasertib, solo o en combinación con ABT-737 y ABT-199.
3. Analizar la expresión de las proteínas Bcl-2 y Bcl-X_L en líneas celulares humanas tras su tratamiento con barasertib.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Líneas celulares

3.1.1 Células A549.

Son células de adenocarcinoma de pulmón. Al ser células adherentes se cultivan en medio DMEM suplementado con un 10% de suero fetal bovino, 2 mM Glutamina y antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml). Para hacer subcultivos las células adherentes han de ser tripsinizadas durante entre 5 y 15 minutos a 37°C. Para ello hay que añadir una cantidad necesaria de tripsina (0.25% (w/v) Trypsin-1 mM EDTA-Na₄ in HBSS w/o Ca-Mg) que cubra la capa de células y observarlas al microscopio invertido para ver que las células se han dispersado/despegado (adquieren forma redondeada). Para parar la acción de la tripsina hay que añadir medio completo (DMEM). (12)

3.1.2 Células U937.

Son células de leucemia mieloide, esta línea celular se derivó por Sundstrom y Nilsson en 1974 a partir de células malignas obtenidas de la efusión pleural de un paciente con linfoma histiocítico. Se trata de células en suspensión que se cultivan con medio RPMI 1640 suplementado con un 10% de suero fetal bovino, 2 mM Glutamina y antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml). Para hacer subcultivos basta con reemplazar el medio del cultivo con medio fresco cada 3-4 días. La densidad máxima ha de estar entre 1 x 10⁵ y 2 x 10⁶ células viables/ml. (13)

3.1.3 Mantenimiento de cultivos celulares.

Ambas líneas celulares se cultivaron rutinariamente en frascos de cultivo de 25 cm² (volumen máximo de células en suspensión 20 ml y células máximas adherentes 10⁵ a 2x10⁵ en 5ml) ó 75 cm² (volumen máximo de células en suspensión 40 ml y células máximas adherentes 3x10⁵ a 6x10⁵ en 15ml).

Las células se cultivaron en un incubador termostatizado, a 37°C, en aire saturado de humedad y con un 5% CO₂. A los 3 o 4 días de cultivo, se realizó el pase de los cultivos. Todas las manipulaciones con células se realizaron en campanas de flujo laminar vertical en condiciones estériles.

3.1.4 Criopreservación de líneas celulares.

Aproximadamente 10⁷ células se centrifugaron a 1000 r.p.m durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante, se resuspendieron en 500 µl de medio completo (DMEM para las A549 y RPMI para las U937) conteniendo 10% de DMSO, ya que es un crioprotector que se utiliza para evitar los daños en las células durante la congelación, y se trasvasó el contenido a un criotubo de congelación estéril. Los viales fueron introducidos rápidamente en un congelador a -80°C. Pasadas al menos 24 horas, los viales se almacenaron en un contenedor de nitrógeno líquido (-196°C) hasta su utilización.

Para descongelar las células, se añadió lentamente a los criotubos un pequeño volumen de medio completo correspondiente a cada tipo celular, hasta la descongelación de las células. En este momento, la suspensión se añadió a un tubo de fondo cónico con 15 ml de medio completo, y rápidamente (ya que el DMSO a temperatura ambiente es tóxico para las células) se centrifugó a 600 r.p.m durante 5 minutos. Tras la centrifugación y la eliminación del sobrenadante, se resuspendió el pellet de las células en 5-10 ml de medio completo. Una vez las células se recuperaron de la descongelación, se sembraron a la densidad normal.

3.2 Contaje directo de las células con un hemocitómetro

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

Los cálculos que se llevaron a cabo para determinar la densidad celular fueron:

$$\text{densidad} = \frac{\text{Nº células viables} \times \text{factor de dilución} \times 10^4}{\text{Nº cuadrantes contados}}$$

Siendo 10⁴ el factor de corrección por el volumen de la cámara.

3.3 Test de Mosmann.

Este método fue desarrollado por Mosmann en 1983 y fue modificado en 1986 por Francois Denizot y Rita Lang (14). Se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, en un compuesto coloreado de color azul (formazán). Los cristales de formazán son insolubles en agua pero pueden solubilizarse con disolventes orgánicos, siendo la cantidad de formazán formado proporcional al número de células metabólicamente activas. Midiendo la absorbancia se puede determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas y por lo tanto es muy utilizado para medir la proliferación celular, lo que incluye tanto inhibición del crecimiento como muerte celular. (15)

Las células A549 se cultivaron a una densidad de 4×10^4 cel/ml y las U937 a 1×10^6 cel/ml, en placas de 96 pocillos de fondo plano, con un volumen de 100 μl /pocillo (2×10^3 células /pocillo para A549 y 5×10^4 células/pocillo para U937). Se sembraron 5 pocillos por punto experimental, en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de fármaco. El cultivo se incubó en la estufa durante 24 y 48 horas. Transcurrido este tiempo se añadió a cada pocillo 10 μl de una disolución de MTT (5 mg/ml) con una pipeta de repetición. Las placas se incubaron 2-3 horas a 37°C y se centrifugaron durante 10 minutos para las células adherentes, y 20 minutos para las de suspensión, a 2500 r.p.m.

Se eliminó el sobrenadante de los pocillos por inversión de la placa sobre papel de filtro. Los cristales de formazán se disolvieron añadiendo a cada pocillo 100 μl de DMSO y agitando en una placa vibradora. Se midió la absorbancia de los pocillos a 550 nm en un lector de placas. El blanco se hizo con el medio de cultivo adecuado para cada tipo celular y sometido a este mismo procedimiento.

3.4 Citometría de flujo

3.4.1 Marcaje con AnexinaV-FITC

Uno de los métodos para detectar la apoptosis en estadios tempranos es comprobar la localización de la fosfatidilserina en la membrana plasmática. La fosfatidilserina es un tipo de fosfolípido que en células viables se mantiene en la monocapa interior de la membrana celular. Cuando se empieza a desencadenar el proceso de la apoptosis, la fosfatidilserina migra a la capa externa de dicha membrana. Esta localización puede ser detectada fácilmente ya que la Anexina V se une específicamente a la fosfatidilserina en una reacción dependiente de calcio. Las moléculas de Anexina V se marcan con diferentes fluoróforos para detectar apoptosis mediante diversas técnicas como citometría. (16).

En este trabajo se ha utilizado Anexina V unida a la molécula fluorescente verde FITC (isocianato de fluoresceína) ($\lambda_{\text{abs}}=490$ nm, $\lambda_{\text{em}}=514$ nm).

Las células (5×10^4) control o tratadas se recogieron en microtubos incluyendo el sobrenadante, ya que en él se encuentran las células muertas y si no se sobreestimaría la viabilidad. Las células adheridas se recuperaron mediante tratamiento con tripsina y se unieron al sobrenadante anterior. Se centrifugaron durante 5 min a 1000 r.p.m., se descartó el sobrenadante y cada muestra se resuspendió en 300 μl de Anexina V-FITC en tampón ABB (Annexin Binding Buffer: Hepes/NaOH 10 mM pH 7.4, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2.5 mM). Se dejaron incubar durante 15-20 minutos en oscuridad y se analizaron en un citómetro FACScalibur (Becton-Dickinson). Los resultados obtenidos por citometría se analizaron utilizando el programa informático Cell Quest Pro.

3.4.2 Análisis ciclo celular: Tinción con yoduro de propidio + RNAsa

El yoduro de propidio es un intercalante y una molécula fluorescente con una masa molecular de 668,4 KDa que se puede utilizar para teñir las células. Cuando está ligado a los ácidos nucleicos, la excitación de la fluorescencia máxima es de 535 nm y la emisión máxima es de 617 nm. Se une al ADN por intercalación entre las bases con poca o ninguna secuencia de preferencia y con una estequiometría de una molécula de colorante por 4-5 pares de bases de ADN. También se une al ARN, por lo que para distinguir entre tinción del ARN y del ADN se requiere un tratamiento con nucleasas. La tinción con yoduro de propidio proporciona información sobre el contenido de DNA, permitiendo distinguir y cuantificar, mediante la utilización de un citómetro de flujo, la distribución de las células a lo largo de las diferentes fases del ciclo celular (proporción de células en G0/G1, S, G2/M, células muertas y poliploides). (17)

Se recogieron 5×10^4 células, se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se fijaron con 500 µl de etanol al 70% preenfriado en hielo. El etanol se añadió gota a gota sobre las células, mezclándolas suavemente con un vórtex para resuspender las células y evitar la formación de agregados. Una vez fijadas, las células se guardaron a -20°C hasta su análisis, normalmente tras 24 horas. Pasadas estas 24h, las células se lavaron con 300 µl de PBS, se centrifugaron 10 minutos a 2500 r.p.m. y se resuspendieron en 200 µl de la solución de PI/RNasa (Immunostep). Tras una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, las muestras fueron analizadas en el citómetro de flujo y los datos se procesaron con el programa informáticos Cell Quest Pro.

3.5 Microscopía de fluorescencia; Tinción Hoechst

El colorante utilizado para teñir los núcleos de las células fue Hoechst 33342 ya que se incorpora en el ADN y puede usarse tanto en células vivas como fijadas. Tiene un grupo etilo adicional, que le confiere un comportamiento más lipófilo, lo que le permite atravesar más fácilmente la membrana celular. Este es excitado por la luz ultravioleta y emite fluorescencia azul con un máximo de emisión de unos 461 nm.

Se sembraron 5×10^4 cel/ml en una placa de 24 pocillos (1ml/pocillo) . Este número es el óptimo para su visualización, puesto que las células no se encuentran ni muy dispersas ni muy concentradas. Antes de sembrarlas se colocó un cubre en cada pocillo, el cual fue limpiado previamente para su desinfección con etanol. Las células sembradas se adhieren al cubreobjetos por lo que tras el tratamiento con los fármacos se pueden observar directamente en un microscopio. Para ello, tras la incubación con los fármacos se coloca el cubreobjetos sobre una gota de Mowiol/ Hoechst (2 µg/ml), que previamente se ha depositado en el portaobjetos, colocando la parte donde han crecido las células adheridas en contacto la gota. Tras esperar unas horas para que el colorante penetre en los núcleos y se tiñan bien, se observaron las muestras en el microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 50i).

3.6 Análisis de proteínas por Western Blot

3.6.1 Extracción y fraccionamiento de lisados celulares

Se tomaron 1×10^6 células en tubos de fondo cónico y se centrifugaron 5 minutos a 1000 r.p.m. Se eliminó el sobrenadante, se lavaron con 1 ml de PBS y se transfirieron a microtubos. Se centrifugaron durante 1 minuto a 4000 r.p.m. y se eliminó el sobrenadante con una aguja de vacío. Se colocaron en hielo durante 2 minutos antes de resuspender cada muestra en 15 µl de tampón de lisis 1x para extraer proteínas citoplasmáticas (Tritón X-100 al 1% (v/v), Tris/HCl 50 mM pH 7.6, EDTA 1 mM, ortovanadato sódico 1 mM, pirofosfato sódico 10 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonio 1 mM, fluoruro de sodio 10 mM, leupeptina 10 µg/ml, cloruro de sodio 150 mM y glicerol 10 % (v/v)). Se incubaron 30 minutos en hielo y a continuación se centrifugaron 30 min a 14000 r.p.m. a 4°C y el sobrenadante se transfirió a otro tubo, donde se añadieron además 7,5 µl de un tampón de carga concentrado 3x, con la siguiente composición: Tris/HCl 150 mM pH 7.4, SDS 3%, molibdato de sodio 0.3 mM, pirofosfato sódico 30 mM, fluoruro de sodio 30 mM, glicerol 30 % (v/v), β-mercaptoetanol 30% (v/v) y azul de bromofenol 0.06% (p/v). Finalmente los lisados celulares se guardaron a -20°C hasta su utilización.

3.6.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.

La separación de proteínas celulares en función de su peso molecular se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (12%) que contenían SDS al 0.1% y se realizaron en cubetas de electroforesis de BioRad. Las concentraciones del gel concentrador y separador se encuentran en la siguiente tabla:

Tabla 3.1. Composición química de los geles de electroforesis.

Reactivos	Gel concentrador	Gel separador (12%)
Acrilamida/Bisacrilamida	325 µl	2 ml
0,5M Tris-HCl pH=6,8	630 µl	-
1,5M Tris-HCl pH=8,8	-	1,25ml
agua destilada	1,5ml	1,67ml
10% SDS	25 µl	50 µl
10% APS	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl
Total	2,5 ml	5 ml

Las muestras de lisados se calentaron a 95°C durante 5 minutos, se centrifugaron (30 segundos, 13000 r.p.m) y se cargaron en los pocillos del gel (20 µl/pocillo). Además se cargó 5 µl del marcador de peso molecular (SpectraTH Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas). La electroforesis se realizó a un voltaje de 180 V y 20mA durante 1,5 horas. El sistema se mantuvo refrigerado en un baño con hielo.

3.6.3 Transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa

Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, utilizando un tampón de transferencia (Tris (hidroximetil) aminometano 25mM pH=8,3, glicina 192mM, SDS 3,5nM y metanol 20 % (v/v)). La transferencia se realizó en un equipo de transferencia semiseco de Bio-Rad a 20 V y 400 mA durante 1h 15 minutos. Los papeles Whatman 3MM y la membrana usada para la transferencia se empaparon de este mismo tampón antes de llevarla a cabo. Se colocaron dos trozos de papel Whatman, el gel, la membrana y otros dos trozos de papel Whatman, teniendo en cuenta que la polaridad es la correcta (gel en el cátodo y filtro en el ánodo) para que las proteínas se transfieran del gel a la membrana. Tras finalizado el tiempo se verificó la eficacia de la transferencia tiñendo la membrana con rojo Ponceau (0,1% en acético al 5%, Merck).

3.6.4 Análisis de proteínas por inmunotransferencia y detección de los inmunocomplejos

Las proteínas celulares fijadas en las membranas de nitrocelulosa se analizaron con la ayuda de anticuerpos específicos, y los pesos moleculares relativos de las proteínas detectadas. Tras la tinción con rojo Ponceau, la membrana de nitrocelulosa se bloqueó con leche desnatada en polvo al 5% (p/v), disuelta en PBS, durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación. Una vez bloqueada, se lavó 3 veces durante 5 min con una solución de lavado que contenía: NaCl 0.12 M, Tris/HCl 10 mM pH 8.0, Tween-20 0.1 % (p/v) y timerosal (0.1 g/L) en PBS pH=7.4 (denominada tampón B). Posteriormente se incubó toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario específico para detectar la proteína deseada. Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti Bcl-X_L de conejo (CELL SIGNALLING) y un anticuerpo monoclonal anti Bcl-2 de ratón (CALBIOCHEM). Tras finalizar la incubación, la membrana se lavó 3 veces durante 10 min mediante agitación moderada en tampón B y se incubó con un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (diluido en tampón B y de leche desnatada en polvo 50% (v/v) durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación suave. Finalizada la incubación, se retiró la solución de anticuerpo y se volvió a lavar la membrana 3 veces durante 10 min agitando moderadamente con tampón B.

La membrana se incubó durante un tiempo determinado con el sustrato de la peroxidasa, para ello se utilizó el kit Pierce™ ECL Western Blotting Substrate. Se añadió 1ml por membrana durante 2 minutos. Tras la incubación, la membrana se transfirió a una funda de plástico transparente encajada dentro de un cassette de revelado radiológico y se eliminó por presión el exceso de la mezcla de revelado, procurando que no quedaran burbujas. En un cuarto oscuro con iluminación para revelado fotográfico, se situó una película radiográfica Pierce CL-Xposure™ sobre la funda que contenía la membrana y se expuso durante un tiempo determinado, que varió dependiendo del anticuerpo utilizado entre 5 y 25 minutos. La película radiográfica se reveló sumergiéndola en el revelador, agua destilada y fijador.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Efecto antimitótico de barasertib

En primer lugar se comprobó la capacidad antimitótica de barasertib sobre las células A549. Estas se cultivaron en una placa de 12 pocillos, poniendo en cada pocillo 10^5 células en 2ml de DMEM y se añadió barasertib a algunos pocillos para que la concentración final fuera de 20 μ M. Se dejó actuar el fármaco durante 24h, y pasado el tiempo, se les retiró el medio de cultivo (con fármaco) y se añadió nuevo medio (DMEM completo). Las células parecían más grandes que las control y empezaban a presentar vacuolas (Figura 4.1) Se realizaron distintas fotografías en el microscopio invertido a lo largo de los días para ver la evolución de estas células.

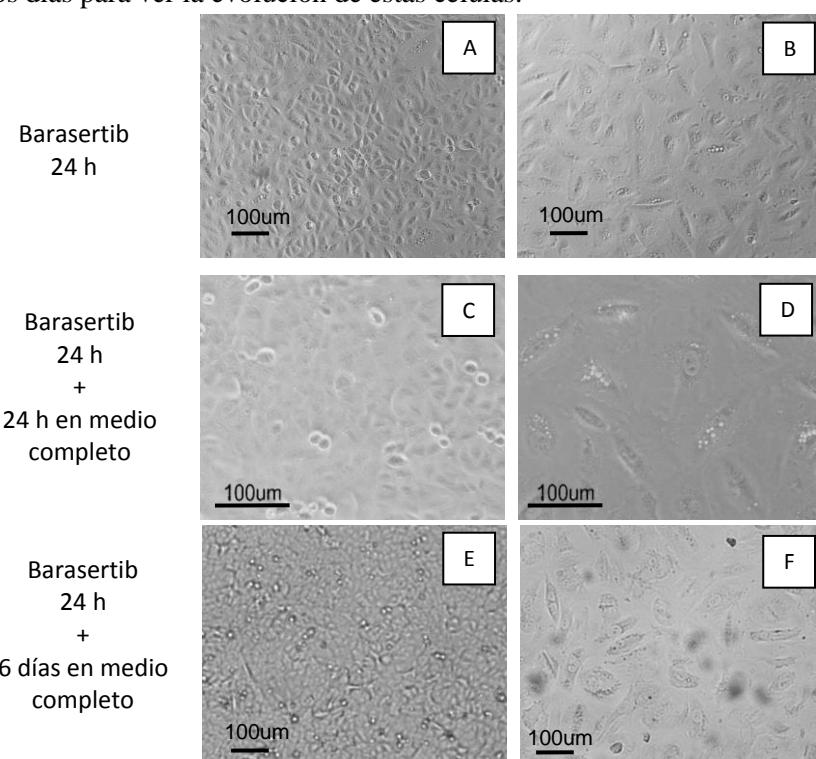


Figura 4.1: Efecto de barasertib sobre la morfología de las células A549. Las células (10^5) se sembraron en placa de 12 pocillos y se añadió barasertib 20 μ M o se dejaron sin tratar durante 24 h. Transcurrido este tiempo se retiró el medio de cultivo y se sustituyó por medio completo. Se tomaron imágenes de las células control (A, C y E) o tratadas con barasertib (B, D y F) a las 24 h (A y B) y tras 24 h adicionales en medio completo (C y D) y tras 6 días (E y F). 10x (A,B, E, F) y 20x (C, D).

Pasados varios días las células control habían alcanzado confluencia y comenzaban a aparecer células muertas debido a la falta de adhesión. Sin embargo las células que habían sido tratadas con barasertib durante 24 horas parecían iguales a lo largo de los días, tanto de tamaño (según siendo más grandes), como de número (no proliferaban) (Figura 4.1).

Con el fin de verificar si las células tratadas durante 24 h con barasertib habían recuperado su capacidad de división celular, transcurridos 19 días se trisnizaron y se pasaron a otro pocillo de la placa de 12, con nuevo medio (2 ml) para que las células control pudieran seguir creciendo y para ver como se comportaban las tratadas con barasertib.

Mediante las imágenes obtenidas (Figura 4.2) y los contajes realizados (Tabla 4.1) se observó que tras el pasaje, las células control se seguían dividiendo llegando a confluencia (Figura 4.2A) mientras que las células que habían sido tratadas durante 24 h no proliferaban. Además, se apreciaban algunas con núcleos irregulares que podría deberse a la inhibición de la mitosis. En los pocillos de las células tratadas con barasertib también se podían observar algunos focos de células más pequeñas que parecían haberse dividido (Figura 4.2D). Estas podrían haber surgido por división de alguna célula a la que no le haya afectado el fármaco y por lo tanto seguía teniendo su capacidad proliferativa.

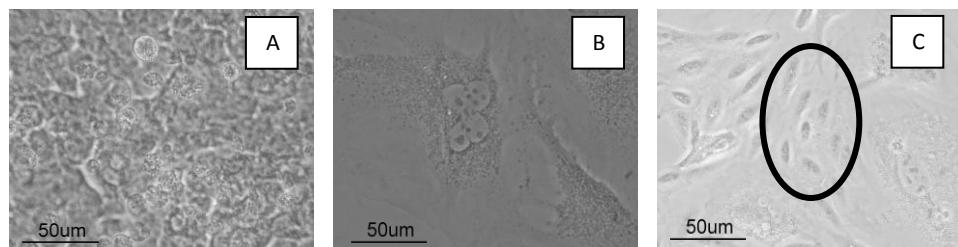


Figura 4.2. Efecto de barasertib en el potencial de división celular a largo plazo. Imágenes tras haber pasado las células A549 a otro pocillo. Las células A549 se sembraron en una placa de 12 pocillos (10^5 células por pocillo) y se dejaron sin tratar (A) o se trataron con barasertib 20 μM (B, C) durante 24 h. Transcurrido 19 días las células se trisnizaron, se resuspendieron en medio completo y se sembraron en nuevos pocillos ($1,635 \times 10^5$ células/pocillo en las células sin tratar y $1,05 \times 10^4$ células/pocillo en las tratadas con barasertib). Se mantuvieron en cultivo y se fotografiaron transcurridos 5 días (A y B) o 6 días (C). 40X

	Nº células tras 19 días	Células resembradas	Nº células pasados 8 días
Control	$5,34 \times 10^5$	$1,635 \times 10^5$	$3,52 \times 10^5$
Tratadas con barasertib	$3,43 \times 10^4$	$1,05 \times 10^4$	$5,5 \times 10^3$

Tabla 4.1. Efecto del Barasertib en el potencial de división celular a largo plazo. Contaje de células. Se contaron las células 19 días después de haber añadido barasertib durante 24h y de haberlo retirado (columna izquierda), algunas de éstas células se pasaron a otro pocillo (columna central) y éstas se contaron a los 8 días (columna derecha).

En el contaje se obtuvieron menos células tratadas con barasertib que las cultivadas, esto puede ser debido tanto a errores experimentales en el contaje o en el establecimiento del cultivo, como a la muerte celular de un porcentaje de células.

Además se analizó el contenido de DNA de estas células tratadas con barasertib durante 24h. Tras haberlas cambiado de pocillo, a los 7 días se fijaron en etanol y se marcaron con yoduro de propidio para analizar el ciclo celular mediante citometría (Figura 4.3).

Este experimento se repitió, pero esta vez añadiendo barasertib a 5 μM durante 24h. Se utilizó menor concentración ya que se vio mediante el test de Mosmann que esta concentración ya era suficiente

para detener la mitosis en las células (Resultados capítulo 2). Se añadieron 5×10^4 células en cada pocillo de una placa de 24 pocillos y pasadas las 24h se cambió el medio a DMEM. Se dejaron durante 5 días y se fijaron en etanol. (Figura 4.3)

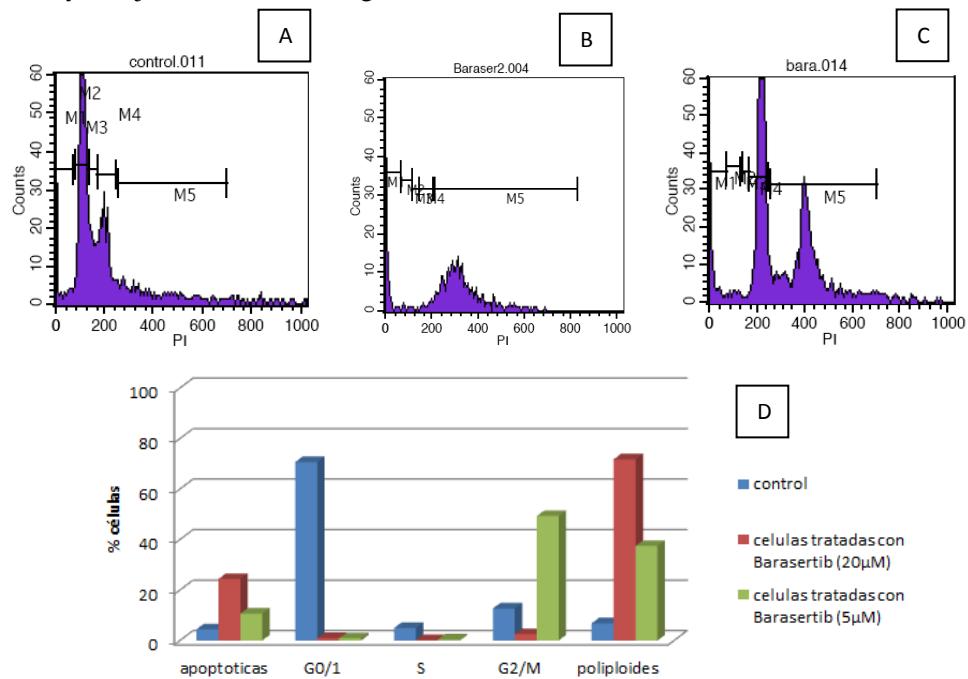


Figura 4.3. Ciclo celular de las células A549 tras ser tratadas con barasertib. Las células fueron tratadas durante 24h con barasertib ($20\mu\text{M}$), se retiró el medio de cultivo y se sustituyó por medio completo. Se analizó su contenido de DNA a los 7 días con tinción de yoduro de propidio (B). También fueron tratadas durante 24h con barasertib ($5\mu\text{M}$), se retiró el medio de cultivo y se sustituyó por medio completo. Se dejaron 5 días y se analizó su contenido de DNA (C). El gráfico muestra el porcentaje de células, tanto tratadas como sin tratar, en cada fase del ciclo celular (D).

Se puede apreciar que, tras eliminar el fármaco a $20\mu\text{M}$ y dejarlas varios días en nuevo medio, la mayoría de las células son apoptóticas o poliploides. Al ser tratadas con $5\mu\text{M}$, también aumentó la proporción de células poliploides y apoptóticas, pero aparece un mayor porcentaje de células que tienen el doble de dotación cromosómica, (el pico a 400 en la Figura 4.3.B), es decir la mayoría de ellas están retenidas en la fase G2/M del ciclo celular. Esto puede ser debido a que estas células se dejaron menos días en los pocillos que las anteriores. Y el menor porcentaje de apoptóticas puede ser porque la concentración de barasertib era menor. El hecho de que aparezcan células apoptóticas justificaría la menor densidad obtenida en el contejo de células tras los 8 días de haberlas pasado a otro pocillo de la placa (Tabla 4.1).

Según estos resultados, se observa que barasertib es un antimitótico y produce parada del ciclo celular en G2/M. Además si se deja actuar el fármaco durante 24h pero después se elimina el medio y se añade nuevo medio, las células siguen sin poder dividirse y aparecen poliploides, es decir, las células duplican su ADN pero no son capaces de dividir el citoplasma. Lo que indicaría que han entrado en senescencia o que han sufrido endoreduplicación.

Las células tratadas con fármacos antimitóticos provocan una parada en el ciclo celular, pero después de esta se han observado varios resultados posibles: un arresto crónico o arresto reversible, (si las células pueden volver a dividirse tras la retirada del fármaco antimitótico), muerte celular, senescencia, o salida de mitosis a una condición poliploide (endoreduplicación) (18) (ver anexo 4).

Se ha demostrado que dependiendo del fármaco antimitótico y la línea celular tratada, las células pueden seguir una vía u otra (19). El tratamiento de células de tumores sólidos humanos cultivadas con un inhibidor de la Aurora quinasa A, mostró un número de cambios morfológicos y bioquímicos asociados con la senescencia. Entre estos se incluye; el aumento del tamaño celular y nuclear, aparición de vacuolas en el citoplasma, estabilización de p53 y p21 y hipofosforilación de pRb (20), sin embargo otro antimitótico, vincristina, inducía apoptosis en la línea celular A549 (21).

Además se estudió los efectos de Aurora quinasa B en la senescencia celular en fibroblastos humanos y células endoteliales y sus niveles se reducían durante la senescencia. Su sobreexpresión en células viejas revirtió parcialmente los fenotipos de senescencia y su disminución aceleró la senescencia celular por lo que esta proteína podría estar implicada en la regulación de la senescencia celular de células humanas primarias través de una vía dependiente de p53. (22)

Estos resultados junto con la aparición de características bioquímicas y morfológicas de senescencia en las células tratadas con barasertib, estas eran más grandes y presentaban vacuolas en el citoplasma, (Fig 4.1) podrían indicar que barasertib está induciendo senescencia en las células A549.

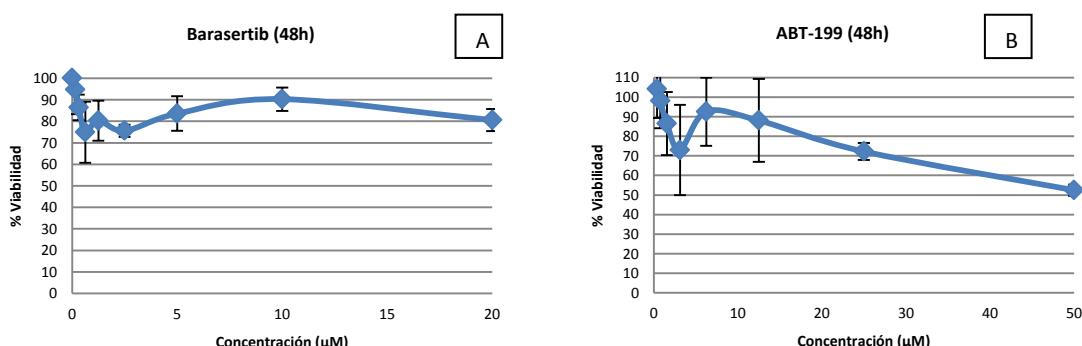
Por lo tanto barasertib es un fármaco antimitótico que detiene a las células en la fase G2/M del ciclo celular, pero que, tras retirar el fármaco las células pueden sufrir apoptosis, senescencia o endoreduplicación (anexo 4).

4.2 Análisis de la sinergia entre barasertib y miméticos de BH3 en células A549

ABT-199 es un nuevo fármaco derivado de ABT-737, específico para Bcl-2. Esta especificidad es la razón por la que ABT-199 produce menos efectos secundarios, sobre todo menor trombocitopenia debido a que no inhibe a Bcl-X_L (8-9). Por otra parte se ha visto eficacia en algunos cánceres y por ello se decidió estudiar su posible sinergia con el barasertib en células A549.

En primer lugar se realizaron curvas dosis-respuesta de las células A549 frente a ABT-199 y barasertib. Para ello se cultivaron en una placa de 96 pocillos con 10^4 cel/pocillo y se añadieron concentraciones crecientes de compuestos tal y como se indica en la Figura 4.4.

Transcurridas 48h se evaluó la viabilidad celular en cada pocillo mediante el test de Mosmann, como se indica en el apartado de Materiales y Métodos. Los resultados se expresan en porcentaje de viabilidad considerando el valor de absorbancia de los pocillos control el 100 %. (Figura 4.4)



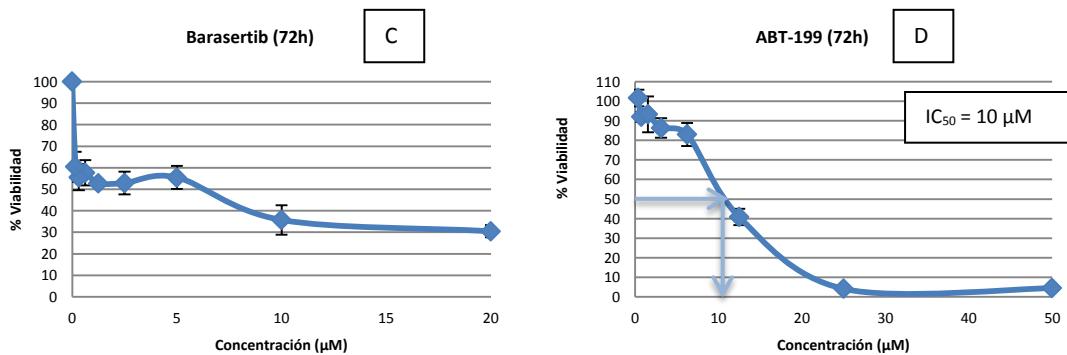


Figura 4.4. Sensibilidad de las células A549 a barasertib y ABT-199. Se sembraron 10^4 cél/pocillo en una placa de 96 pocillos. A las 24 h se añadió a cada pocillo barasertib o ABT-199 a las concentraciones finales indicadas en la gráfica, por quintuplicado. Transcurridas 48 h en cultivo, se añadió a cada pocillo 10 μ L de una disolución 5 mg/ml de MTT y se incubaron durante 3 h. Finalmente los cristales de azul formazán producidos por reducción del MTT se disolvieron en DMSO y se midió la absorbancia a 550 nM (A,B). Se repitió el mismo experimento transcurridas las 72h en cultivo con los fármacos (C, D). Los resultados son media +/-SD de los quintuplicados.

Tras 24h con el fármaco se observaron las células en el microscopio invertido. Las tratadas con barasertib eran más grandes que las control y además estas no proliferaban tanto, lo que podía indicar la parada del ciclo celular, por lo que corrobora los resultados del capítulo 1.

Las células tratadas con ABT-199 durante 24h tenían una densidad parecida a las control. Como no se apreció muerte celular significativa con ninguno de los fármacos, se dejaron actuar durante 48h y se volvieron a observar en el microscopio invertido. Algunas de las células con barasertib se habían despegado de la placa, probablemente porque están detenidas en mitosis, ya que al dividirse las células se desadhieren. En las células con ABT-199 aparecían cuerpos apoptóticos, lo que indicaba que el fármaco inducía muerte celular. Estas suposiciones fueron verificadas tras realizar el test de Mosmann. (Fig. 4.4) debido a que en las curvas dosis-respuesta obtenidas se aprecia que, en las células tratadas con barasertib, al aumentar la dosis del fármaco, no hay un descenso en el número de células viables, es decir no produce citotoxicidad, la viabilidad de las células permanece constante debida a la parada en mitosis. Sin embargo en las células con ABT-199 al aumentar la concentración del fármaco sí que disminuye la viabilidad de las células, por lo que tienen un efecto citotóxico. Se determinó la IC_{50} a del ABT-199 a 72h, siendo esta 10 μ M.

Una vez determinada la sensibilidad de las células A549 a cada uno de los fármacos por separado, se estudió si existía sinergia entre ellos. Para ello se sembraron las células añadiendo diferentes concentraciones de barasertib (las utilizadas en los experimentos anteriores), junto con ABT-199 a una concentración constante en todos los pocillos, inicialmente 5 μ M, ya que a ésta ABT-199 no produce mucha muerte celular por sí solo.

Se midió su viabilidad a las 48h de haber puesto los fármacos y se observó que ésta era menor en las células con fármacos, pero sin embargo no se apreció sinergia entre ambos (Figura 4.5A).

Puesto que no se obtuvo resultado se probó a utilizar una concentración mayor de ABT-199 (10 μ M) y esta vez disminuyó un poco más la viabilidad en las células con la combinación de los fármacos pero tampoco se observó sinergia entre ellos (Figura 4.5B).

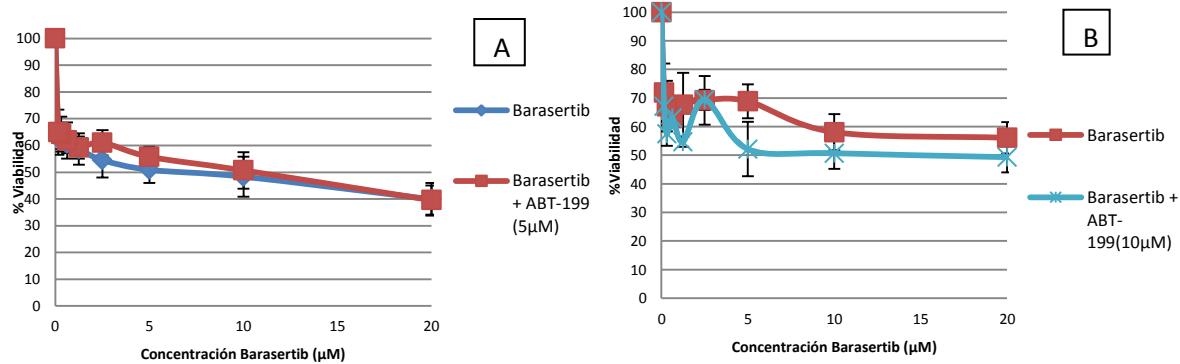


Figura 4.5. Sensibilidad de las células A549 a barasertib y a la combinación de barasertib con ABT-199. Se sembraron 2×10^3 cél/pocillo en una placa de 96 pocillos. A las 24 h se añadió a cada pocillo barasertib o barasertib con ABT-199 (5 μM) en un experimento (A) y barasertib o barasertib con ABT-199 (10 μM) en otro experimento (B), por quintuplicado. Las concentraciones finales de barasertib son las indicadas en la gráfica. Transcurridas 48 h en cultivo, se analizó la viabilidad mediante el test de Mosmann, tal y como se ha explicado en la sección de Materiales y Métodos. Los resultados son media +/-SD de dos experimentos independientes.

Estos resultados indicaban que no existía sinergia entre barasertib y ABT-199. Dado que previamente se ha descrito que las células A549 sobreexpresan la proteína antiapoptótica Bcl-X_L (21), se decidió analizar la posible sinergia del barasertib con el compuesto ABT-737, ya que éste inhibe tanto a Bcl-2 como a Bcl-X_L.

Se ha descrito que la IC₅₀ a 72h del ABT-737 es 5 μM (23). Para el estudio de la posible sinergia con barasertib se utilizó esta concentración ya que a 48h, previsiblemente presentaría una menor toxicidad.

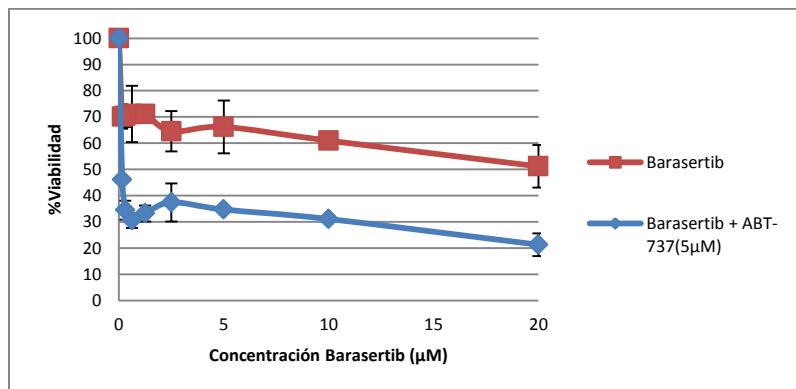


Figura 4.6. Sensibilidad de las células A549 a barasertib y a la combinación de barasertib con ABT-737 (5 μM). Se sembraron 2×10^3 cél/pocillo en una placa de 96 pocillos. A las 24 h se añadió a cada pocillo barasertib o barasertib con ABT-737 (5 μM) a las concentraciones finales indicadas en la gráfica, por quintuplicado. Transcurridas 48 h en cultivo, se añadió a cada pocillo 10 μL de una disolución 5 mg/ml de MTT y se incubaron durante 3 h. Finalmente los cristales de azul formazán producidos por reducción del MTT se disolvieron en DMSO y se midió la absorbancia a 550 nM. Los resultados son media +/-SD de los quintuplicados.

Observando las células al microscopio invertido a 24h se volvía a apreciar que las células tratadas con barasertib eran más grandes que las células control, indicando una parada del ciclo tal y como se había determinado mediante marcaje con yoduro de propidio (Fig. 4.3). Y en las células tratadas con ambos fármacos empezaban a aparecer algunas células muertas y apoptóticas. Tras 48 h de incubación, justo antes de realizar el test de Mosmann, se observó que las células tratadas con barasertib continuaban mostrando tamaño mayor que las control debido al bloqueo de la mitosis, y las células que se habían tratado con ambos fármacos parecían tener menor viabilidad. Tras realizar el test de Mosmann se

pudieron corroborar estos resultados, las células tratadas con barasertib tenían una viabilidad parecida al experimento anterior (50-60% viabilidad), mientras que si se combinaba con ABT-737 a 5 μ M, esta viabilidad disminuía (Figura 4.6). Por lo tanto estos dos fármacos sí que presentan un efecto sinérgico sobre las células A549.

Para corroborar estos resultados, se analizó la viabilidad de las células, sin tratar y tratadas con los distintos fármacos con los que se había visto sinergia (barasertib y ABT-737), mediante citometría de flujo. Las distintas muestras se marcaron con Anexina V-FITC tras 24h y 48h de haber añadido los fármacos.

Los resultados mostraron (Figura 4.7) que en las células control la viabilidad es alta ya que solo hay un 5-6% de mortalidad. Tanto a 24h como a 48h las células tratadas con barasertib tienen un porcentaje de mortalidad similar ya que este fármaco detiene el crecimiento de las células A549 pero no induce muerte celular, según los resultados previos. El bloqueo en mitosis se reflejó además en un aumento del tamaño celular tal y como se observa en los gráficos de puntos (dot-plots) del anexo 5 y 6. A una concentración de 5 μ M de ABT-737, este compuesto no es muy tóxico por lo que a 24h solo hay un 11% de muerte, pero a 48h este porcentaje aumenta. Sin embargo se puede apreciar la sinergia al utilizar ambos fármacos conjuntamente. A la misma concentración de ambos, 5 μ M, hay un 40% de células muertas a 24h y un 56% de muertas a 48h, lo que supone un mayor porcentaje que la suma de ambos fármacos por separado (sería un 28% y un 37% respectivamente).

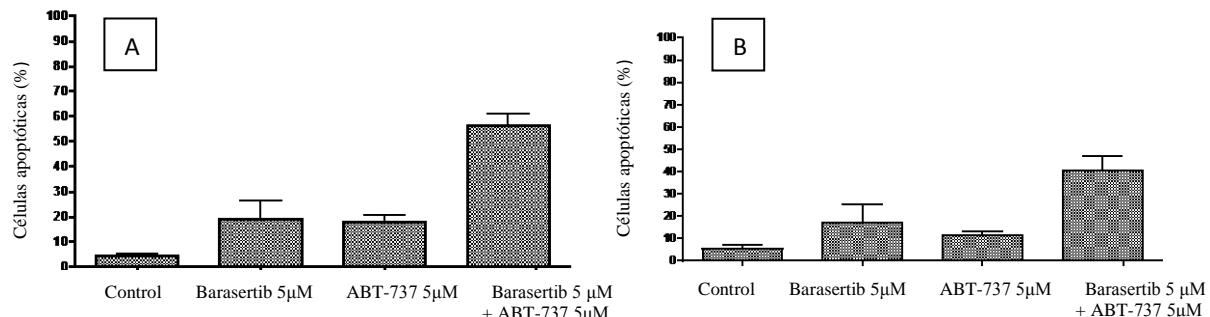


Figura 4.7. Sensibilidad de células A549 a barasertib, ABT-737 y a la combinación de estos. Se sembraron 5×10^4 cél/pocillo en una placa de 24 pocillos. A las 24 h se añadió a cada pocillo barasertib (5 μ M), ABT-737 (5 μ M) o la combinación de barasertib (5 μ M) + ABT-737 (5 μ M), por duplicado. Transcurridas 24 h en cultivo (A) o 48h (B), se añadió a cada muestra Anexina V-FITC y se incubaron durante 15-20 min, como se explica en el apartado de Materiales y Métodos. Finalmente se midió la fluorescencia mediante citometría de flujo. Los resultados son media+/SD de 4 experimentos independientes. (Histogramas de un experimento representativo pueden verse en el anexo 5 y 6).

Esta sinergia también puede confirmarse mediante las imágenes obtenidas en el microscopio. (Figura 4.8). Se puede apreciar que hay un mayor porcentaje de mortalidad en las células tratadas con barasertib y ABT-737 ya que aparecen más células redondeadas, es decir, con morfología apoptótica.

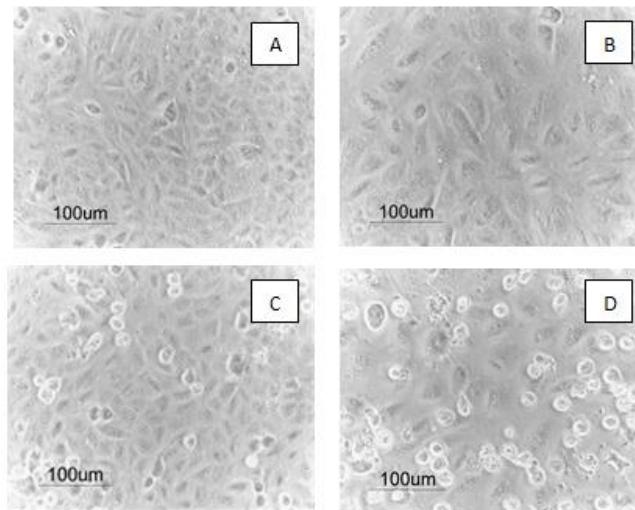


Figura 4.8: Efecto del barasertib y ABT-737 sobre la morfología de las células A549. Las células (5×10^4 cél/pocillo) se sembraron en placa de 24 pocillos (A) y se añadió barasertib 5 μ M durante 24h (B), ABT-737 5 μ M durante 24h (C) y combinación de barasertib 5 μ M y ABT-737 5 μ M durante 24h (D). 20x

Análisis de la sinergia entre barasertib y miméticos de BH3 en células U937

Se probaron estos mismos fármacos en células U937 para ver si los resultados obtenidos eran parecidos en ambas líneas celulares, ya que la línea celular A549 es de un tumor sólido y la línea U937 son células en suspensión. Además porque en artículos se había visto la eficacia de estos fármacos sobre este tipo de cáncer (eficacia de ABT-737 sobre leucemia mieloide) (4).

Primero se evaluó el efecto del barasertib y del ABT-199 a distintas concentraciones por separado. La placa de 96 pocillos esta vez se sembró a una densidad de 10^6 cel/ml ya que eran células en suspensión.

Los resultados del test de Mosmann indican que el barasertib detiene el crecimiento de las células U937, mientras que ABT-199 presenta citotoxicidad ya que la viabilidad se reduce a prácticamente a 0% a partir de concentraciones de 10 μ M (Figura 4.9). La IC₅₀ de ABT-199 fue de 2 μ M a 24h por lo que estas células son más sensibles a este fármaco que las A549. Esto puede deberse a que son células en suspensión y este tipo de células presenta en general mayor sensibilidad al daño químico.

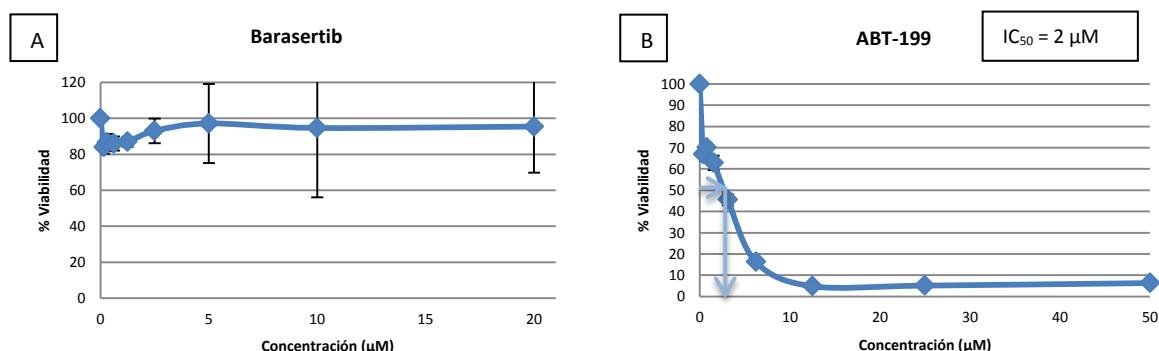


Figura 4.9. Sensibilidad de las células U937 a barasertib y ABT-199. Se sembraron 10^6 cél/ml en una placa de 96 pocillos. A las 24 h se añadió a cada pocillo barasertib (A) o ABT-199 (B) a las concentraciones finales indicadas en la gráfica, por quintuplicado. Transcurridas 24 h en cultivo, se analizó la viabilidad mediante el test de Mosmann. Los resultados son media +/-SD de los quintuplicados.

Al ser más sensibles se analizó la sinergia con una menor concentración, primero con 0,5 μ M, porque suponía una reducción al 80% de viabilidad, y posteriormente se realizaron experimentos con una concentración de 1 μ M. Pero en ningun caso se observó sinergia entre ambos fármacos (Figura 4.10).

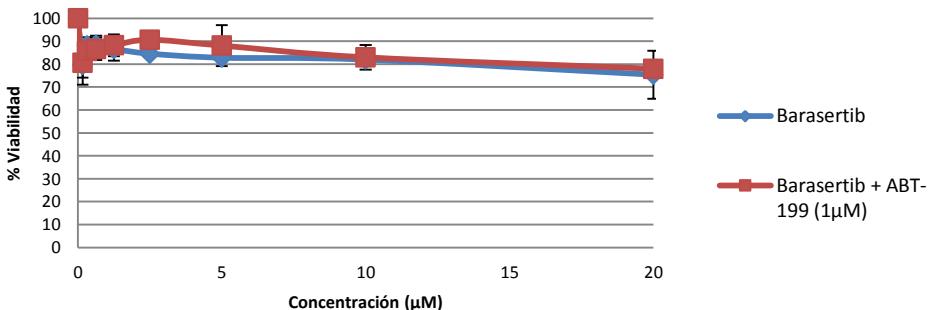


Figura 4.10. Sensibilidad de las células U937 a barasertib y ABT-199. Se sembraron 10^6 cél/ml en una placa de 96 pocillos. A las 24 h se añadió a cada pocillo barasertib o ABT-199 (1 μ M) a las concentraciones finales indicadas en la gráfica, por quintuplicado. Transcurridas 24 h en cultivo, se analizó la viabilidad mediante el test de Mosmann. Los resultados son media +/-SD de los quintuplicados.

Se procedió por lo tanto a analizar el efecto de ABT-737 como en la línea A549 (Figura 4.11). Dado que no se hallaron datos publicados sobre la sensibilidad de esta línea celular a ABT-737 se analizó la misma mediante el test de Mosmann y se obtuvo una IC_{50} a 24h de 4-5 μ M.

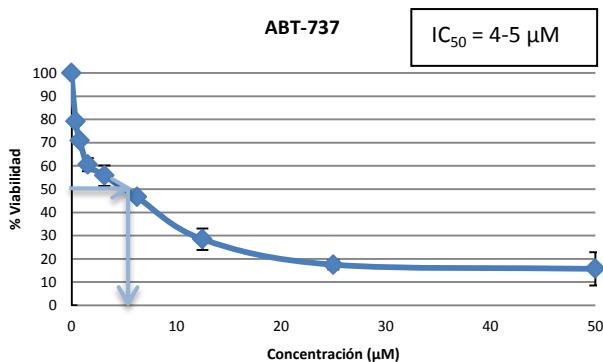


Figura 4.11. Sensibilidad de las células U937 ABT-737. Se sembraron 5×10^4 cél/pocillo en una placa de 96 pocillos. A las 24 h se añadió a cada pocillo ABT-737 a las concentraciones finales indicadas en la gráfica, por quintuplicado. Transcurridas 24 h en cultivo, se añadió a cada pocillo 10 μ L de una disolución 5 mg/ml de MTT y se incubaron durante 3 h. Finalmente los cristales de azul formazán producidos por reducción del MTT se disolvieron en DMSO y se midió la absorbancia a 550 nM. Los resultados son media +/-SD de dos experimentos independientes.

Se realizaron curvas dosis-respuesta en la línea celular U937 con barasertib y barasertib con ABT-737 a 0,5 μ M, y a 1 μ M para ver si existía sinergia. (Figura 4.12)

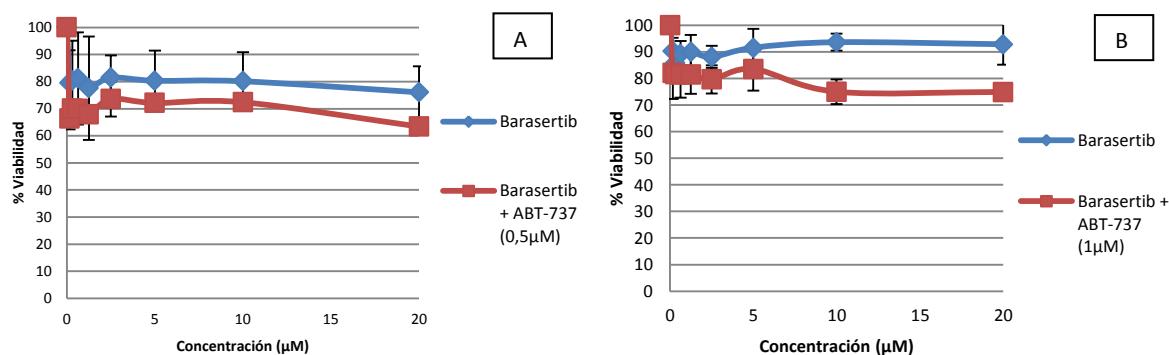


Figura 4.12. Sensibilidad de las células U937 a barasertib y a barasertib con ABT-737. Se sembraron 10^6 cél/ml en una placa de 96 pocillos. A las 24 h se añadió a cada pocillo barasertib o barasertib con ABT-737 ($0,5\mu M$) a las concentraciones finales indicadas en la gráfica, por quintuplicado (A). En otra placa se añadió a cada pocillo barasertib o barasertib con ABT-737 ($1\mu M$) a las concentraciones finales indicadas en la gráfica, también por quintuplicado. Transcurridas 24 h en cultivo, se analizó la viabilidad mediante el test de Mosmann. Los resultados son media +/-SD de dos experimentos independientes.

Los resultados mostraron que la sinergia a 24h entre estos fármacos era poco significativa por lo que se probó a dejarlos actuar durante 48h como en las células A549, pero tampoco pareció obtenerse resultado significativo. (Figura 4.13)

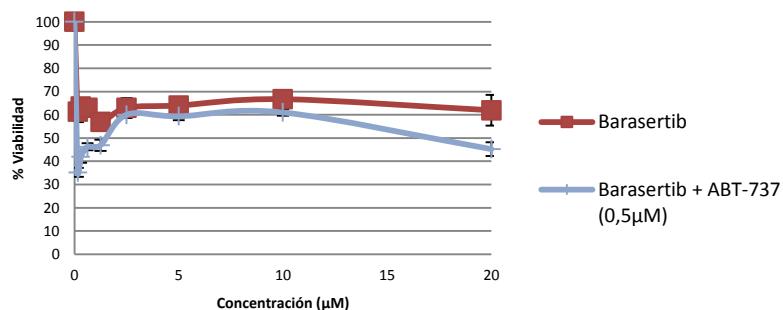


Figura 4.13. Sensibilidad de las células U937 a barasertib y a barasertib con ABT-737. Se sembraron 5×10^4 cél/pocillo en una placa de 96 pocillos. A las 24 h se añadió a cada pocillo barasertib o barasertib con ABT-737 ($0,5\mu M$) a las concentraciones finales indicadas en la gráfica, por quintuplicado. Transcurridas 48 h en cultivo, se analizó la viabilidad mediante el test de Mosmann. Los resultados son media +/-SD de los quintuplicados.

Observando las curvas dosis-respuesta obtenidas no parece que haya mucha sinergia entre ambos fármacos, incluso parece que haya un antagonismo ya que a baja concentración de barasertib ($0,36-5\mu M$) la citotoxicidad de la combinación de los fármacos es mucho mayor que a concentraciones altas ($5-10\mu M$), donde parece que la capacidad antitumoral del barasertib sea la misma que la combinación de ambos fármacos. Por ello, habría que repetir este experimento para poder verificar estos datos.

Tras los resultados de este capítulo se puede observar que tanto ABT-737 y ABT-199 inducen apoptosis en ambas líneas celulares. Sin embargo la sensibilidad frente a estos fármacos es diferente:

Las células A549 son más sensibles a ABT-737 ya que este tiene una IC_{50} a 72h de $5\mu M$, mientras que ABT-199 tiene una IC_{50} a 72h de $10\mu M$. Esto puede ser debido a que ABT-737 inhibe a $Bcl-X_L$, sobreexpresado en esta línea celular (21).

Las células U937, por el contrario son más sensibles a ABT-199, con una IC₅₀ de 2 μM a 24h. Y respecto a ABT-737, tiene una IC₅₀ a 24h de 4-5 μM, lo que podría indicar una mayor dependencia de Bcl-2 en esta línea celular.

Pero tras haber estudiado la sinergia entre barasertib y los compuestos miméticos de BH3, ABT-737 y el ABT-199 en las dos líneas celulares, solo se obtuvo sinergia significativa entre barasertib y ABT-737 a 5 μM en células A549. A distintas concentraciones de barasertib, entre un rango de 20 μM y 0 μM se obtenía una viabilidad celular de entre el 50-70% (respectivamente), mientras que con la combinación de fármacos esta viabilidad disminuía entre el 40-20%. (Figura 4.8).

4.3 Estudio del tipo de muerte celular inducida por ABT-737 y barasertib

Puesto que solo se observó sinergia entre barasertib y ABT-737 en células A549, se procedió a estudiar el tipo de muerte celular en este caso. Como se ha mencionado antes, hay dos vías de muerte celular, la dependiente de caspasas y la independiente de caspasas. Para poder determinar qué tipo de muerte celular inducen se analizaron las células con la combinación de los fármacos y con un inhibidor de caspasas, zVAD, así, si la muerte de las células tratadas con este inhibidor y la combinación de los fármacos disminuye con respecto a las tratadas sin el inhibidor, indicará que se está produciendo muerte celular por la vía de las caspasas.

La muerte celular inducida por barasertib 5μM con ABT-737 5μM se cuantificó mediante citometría marcando las células con Anexina V-FITC y se comparó con los mismos fármacos añadiendo zVAD a 50μM. Antes de realizar la citometría se observaron las placas al microscopio a 24h y a 48h, la muerte en las células con la combinación de los fármacos y zVAD era menor a las que no se había añadido el inhibidor de caspasas (Figura 4.14).

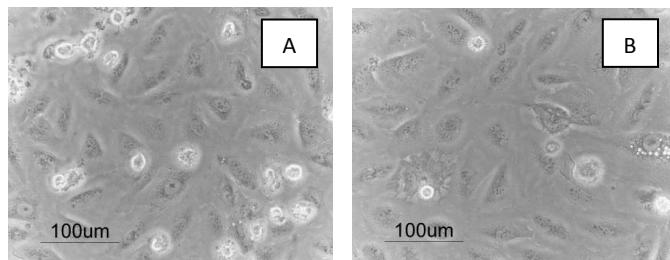
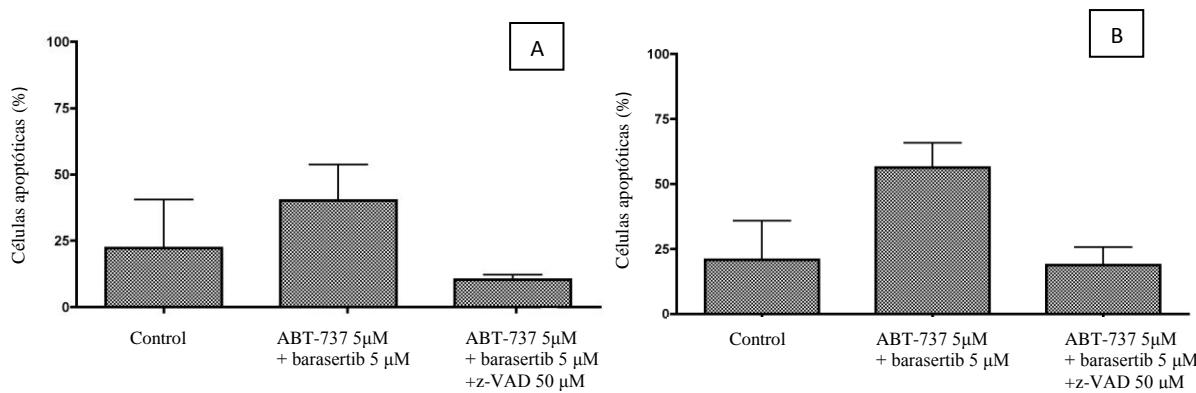


Figura 4.14. Efecto de la combinación de barasertib y ABT-737 con zVAD sobre la morfología de las células A549. Se sembraron 5x10⁴ cél/pocillo en una placa de 24 pocillos. A las 24 h se añadió a cada pocillo barasertib 5μM con ABT-737 (5μM) (A) y además zVAD (50μM) (B). Transcurridas 24h en cultivo se fotografiaron. 20x

Tras los resultados obtenidos de la citometría (Figura 4.15), se puede apreciar que las células tratadas con la combinación de los fármacos y zVAD tienen menor mortalidad, lo que indica que se está produciendo muerte por vía caspasas. Pero la mortalidad no disminuye hasta un porcentaje igual a las células control (5-6%), sino que se queda en un 10% de muerte a 24h y un 19% a 48h. Esto puede ser debido a que o bien hay otra vía de muerte celular independiente de caspasas o, podría indicar que zVAD está inhibiendo la muerte inducida por caspasas de ABT-737 pero todavía se aprecia el efecto de barasertib ya que el porcentaje de mortalidad se asemeja al que se obtiene con las células solo tratadas con barasertib de experimentos anteriores (Fig.4.7).



4.4 Estudio del ciclo celular y análisis del contenido de ADN de las células A549, tratadas con ABT-737 y barasertib.

Se analizó el efecto de los fármacos en la distribución del ciclo celular, ya que muchas drogas pueden producir parada en el ciclo celular, bien en la fase G0/G1 o bien en la fase G2/M, lo que explica el efecto inhibidor del crecimiento de la mayoría de ellas.

Se analizó el contenido de DNA de las células tratadas con barasertib, con ABT-737 (5 μ M), con la combinación de estos fármacos (ABT-737 y barasertib), y con el inhibidor de caspasas (ABT-737 + zVAD y ABT-737 + Barasertib + zVAD). Las células fueron tratadas durante 24h con los fármacos y posteriormente se tiñeron con yoduro de propidio para analizar el ciclo celular mediante citometría de flujo (Figura 4.16).

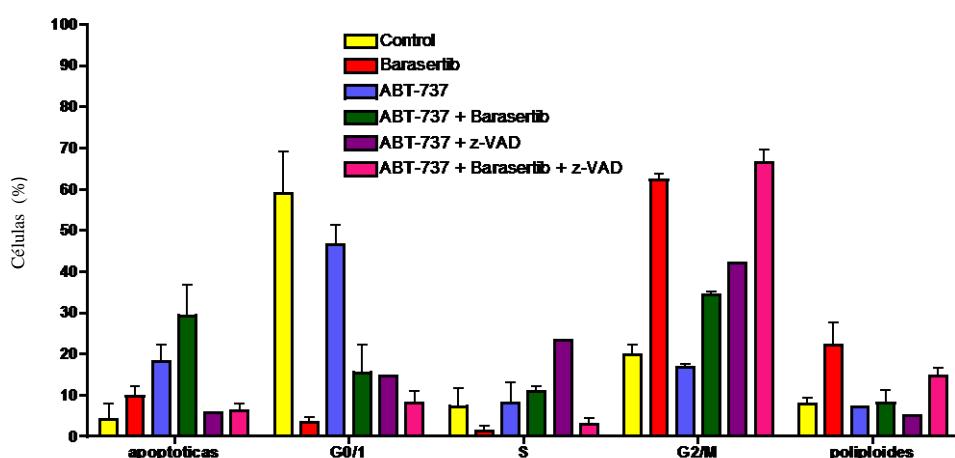


Figura 4.16. Ciclo celular de las células A549 tratadas con barasertib y ABT-737. Se sembraron 5×10^4 cél/pocillo en una placa de 24 pocillos. A las 24 h se añadió a cada pocillo barasertib (5 μ M), ABT-737 (5 μ M) y zVAD (50 μ M), según las combinaciones que se indican en la leyenda de la figura. Se tiñeron con yoduro de propidio de acuerdo con lo descrito en la sección de Materiales y Métodos. (Histogramas representativos en el anexo 8). Los resultados son media+/-SD de 3 experimentos independientes.

Los resultados obtenidos muestran que las células tratadas con barasertib están la mayoría detenidas en la fase G2/M. De normal esta fase solo dura 1-2h del ciclo entero (24h) por lo que el mayor porcentaje de células suele estar en fase G0/1. Además también hay un aumento en el porcentaje de células poliploides debido a que una parte de las células que han duplicado su material genético no han sufrido citocinesis (endoreduplicación), como se había visto en el capítulo 1.

Con ABT-737 se ve un aumento en la proporción de células apoptóticas, pero este aún es más acentuado en la combinación de los fármacos, donde también aparecen las células detenidas en G2/M. Al usar zVAD junto con ABT-737 se observa como el porcentaje de células apoptóticas disminuye. Y al añadir zVAD a la combinación de fármacos también disminuye el porcentaje de células en apoptosis, pero aumenta el porcentaje de células poliploides y detenidas en G2/M.

Por lo tanto se confirmaron los resultados del apartado anterior, ya que al utilizar zVAD y bloquear la vía de las caspasas, se bloquea el efecto de ABT-737 y disminuye el porcentaje de células apoptóticas. Pero sin embargo las células aparecían retenidas en G2/M porque el efecto del barasertib no se inhibía, por ello también en los resultados de la figura 4.15 el porcentaje de mortalidad no disminuía hasta el rango de las células control (5-6%).

Respecto al porcentaje de células poliploides, aumenta cuando se trata las células con barasertib o con la combinación de barasertib, ABT-737 y zVAD, es decir, solo aumentan en respuesta a barasertib cuando no se observan niveles apreciables de apoptosis. Esto indica que la salida del bloqueo y la endoreduplicación solo se producen cuando la apoptosis no se activa.

Para caracterizar el efecto de estos compuestos en la línea celular A549 se analizó, además de la exposición de fosfatidilserina y del ciclo celular ya observados, se determinaron otros parámetros moleculares y morfológicos característicos de la apoptosis. Se tiñeron las células con Hoechst y se observaron con el microscopio de fluorescencia tras 24h de haber añadido los fármacos.

Se pudieron apreciar diferencias; los núcleos de las células control (sin tratar) se observaban redondeados y aparecían algunas células en mitosis. Los núcleos de las células con barasertib perdían su forma redondeada y adquirían morfologías diversas que indican mitosis aberrantes, de acuerdo con el mecanismo antimitótico del compuesto. Lo mismo ocurría si a las células se les elimina el fármaco tras 24h de ser tratadas y se les cambia a medio nuevo, a lo largo de los días seguían manteniendo los núcleos irregulares. En las células con ABT-737 a 5 μ M se pudieron observar algunas células en apoptosis (aparecía la cromatina condensada y fragmentada) pero como esta dosis no era muy citotóxica, también aparecían células dividiéndose. En la combinación de ambos fármacos a la misma concentración (5 μ M) había muchas más células en apoptosis (Fig. 4.17).

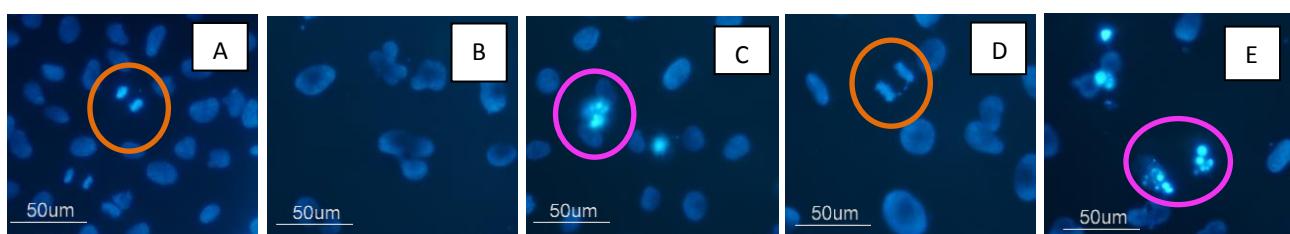


Figura 4.17. Tinción de núcleos de las células A549 con barasertib y ABT-737. Se sembraron 5×10^4 cél/pocillo en una placa de 24 pocillos. A las 24 h se añadió a cada pocillo barasertib (5 μ M) (B) o ABT-737 (5 μ M) (C, D) o con la combinación de barasertib y ABT-737 (5 μ M) (E). Pasadas 24h se tiñeron con Hoesch de acuerdo con lo descrito en la sección de Materiales y Métodos. Se observan células en apoptosis (rodeadas en rosa) y células en mitosis (rodeadas en naranja). 40x

4.5 Análisis de la expresión de Bcl-2 y Bcl-X_L por Western Blot

Como se ha visto en resultados anteriores las células tenían diferente sensibilidad frente a ABT-737 y al ABT-199 y en ninguna de las líneas celulares se encontró sinergia entre barasertib y ABT-199, pero sin embargo, en la línea celular A549 sí que observó sinergia entre barasertib y ABT-737.

Sabiendo que la diferencia entre estos compuestos erradica en la inhibición por Bcl-X_L, se realizó un Western Blot para poder identificar si la diferente sensibilidad estaba relacionada con la expresión de esta proteína. Para ello se extrajeron las proteínas citoplasmáticas de ambas líneas celulares (U937 y A549) y tras haberlas tratado durante 24h o 48 h con barasertib. Se utilizó como control de carga un anticuerpo frente a actina, para poder distinguir si hay sobreexpresión o si el aumento de grosor de la banda del Western Blot es debido a que se ha cargado más cantidad de proteína en esa muestra. Puesto que ambas proteínas tienen un peso molecular de entre 25-30kDa, se comparó la banda obtenida con el marcador de peso molecular para poder determinar si el anticuerpo había reconocido específicamente a estas proteínas. (Fig. 4.22)

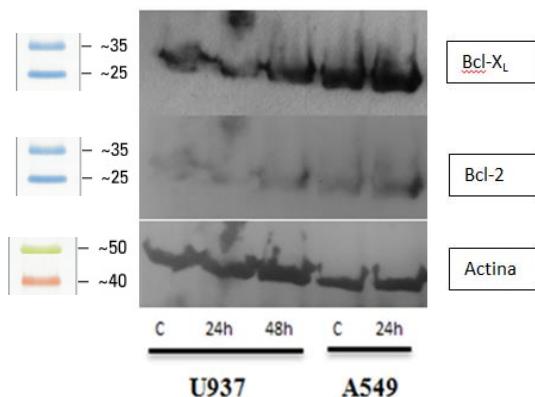


Figura 4.22. Western Blot de las proteínas Bcl-X_L y Bcl-2. Se realizaron extractos celulares (10^6 células)/se extrajeron las proteínas citoplasmáticas tal y como se ha indicado en el apartado de Materiales y Métodos y se analizó la expresión de Bcl-X_L y Bcl-2 mediante western blot en la línea celular A549 y tras ser tratada 24h con barasertib. También en la línea celular U937 y tras ser tratada durante 24h y 48h con barasertib. Se utilizó como control de carga un anticuerpo frente a actina.

Según los datos obtenidos en el Western Blot parece que las células A549 expresan más Bcl-X_L que las U937. Además al tratarlas con barasertib durante 24h aumentan la expresión de esta proteína. Esto podría explicar la sinergia observada entre ABT-737 y barasertib en las células A549 (Capítulo 2).

La línea U937 tiene una expresión similar de Bcl-X_L tanto sin ser tratadas con barasertib como tras 24h con el fármaco, sin embargo tras 48h sí que se puede apreciar una mayor expresión de la proteína, según los resultados del capítulo 2, barasertib con ABT-737 en esta línea celular no parecían tener sinergia, más bien parecía que hubiera un efecto antagonista entre estos, por ello habría que repetir el experimento, como se ha comentado anteriormente, para verificar los resultados.

Con respecto a la expresión de Bcl-2 parece que haya un aumento en su expresión en A549 tratadas con barasertib durante 24h y U937 tratadas durante 48h, pero la variación es pequeña por lo que para determinar si es significativa habría que repetir el experimento cuantificando las bandas por densitometría. El hecho de que Bcl-2 se exprese menos que Bcl-X_L justificaría la eficacia de la combinación de barasertib con ABT-737 y no con ABT-199.

5. CONCLUSIONES

- Barasertib produce parada del ciclo celular en G2/M, tanto en células A549 como en U937. Tras retirar el fármaco las células pueden entrar en senescencia, endoreduplicación o, en menor proporción, sufrir apoptosis.
- ABT-737 y ABT-199 inducen apoptosis tanto en células A549 como en U937 pero con diferente sensibilidad. Las células A549 son más sensibles a ABT-737 y las células U937 son más sensibles a ABT-199.
- La diferente sensibilidad es debida a que las células A549 sobreexpresan Bcl-X_L.
- Barasertib solo ha mostrado sinergia con ABT-737 en células A549, probablemente debido a la sobreexpresión de Bcl-X_L.
- La muerte producida por la combinación de barasertib y ABT-737 es por la vía de las caspasas.

5. CONCLUSIONS

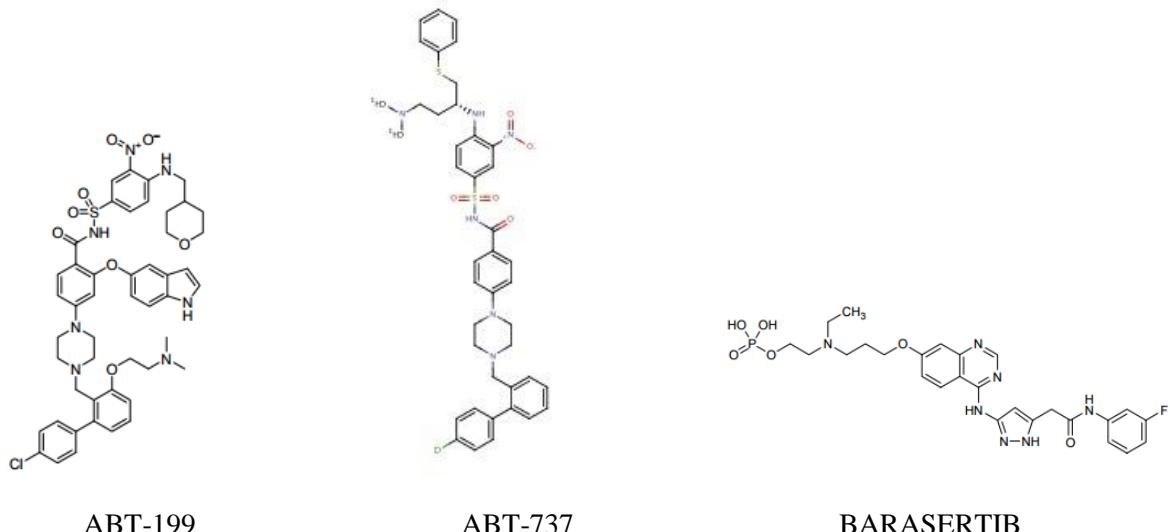
- Barasertib induces cell cycle arrest in G2/M in both A549 and U937 cells. After withdrawing the drug, cells can enter in senescence, endoreduplication or lesser extent, undergo apoptosis.
- ABT-737 and ABT-199 induce apoptosis in both A549 and U937 cells but with different sensitivities. A549 cells are more sensitive to ABT-737 and U937 cells are more sensitive to ABT-199.
- Barasertib has synergy with ABT-737 in A549 cells, probably due to overexpression of Bcl-X_L.
- Death induced by combining barasertib and ABT-737 is by the caspase-dependent pathway.

6. BIBLIOGRAFIA

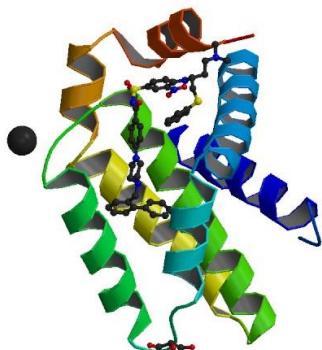
- (1) Ramírez Labrada, A.G. Mecanismo de la apoptosis inducida por el inhibidor de quinasas sorafenib en células de mieloma humano (tesis doctoral). Universidad de Zaragoza; 2013.
- (2) Vela Poves, L. Visualización de las interacciones entre proteínas de la familia Bcl-2 mediante BiFC en células vivas (tesis doctoral). Universidad de Zaragoza; 2013.
- (3) Cregan SP, Dawson VL, Slack RS. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene* 2004; 23:2785-96.
- (4) Oltersdorf T., Elmore S.W., Shoemaker A.R., Armstrong R.C., et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature*, 2005; 435: 677–681
- (5) Rooswinkel R.W., van de Kooij B., Verheij M. and Borst J. Bcl-2 is a better ABT-737 target than Bcl-xL or Bcl-w and only Noxa overcomes resistance mediated by Mcl-1, Bfl-1, or Bcl-B. *Cell Death and Disease* 2012; 3.
- (6) Denis V. Baev, Krawczyk J., O'Dwyer M., y Szegezd E. The BH3-mimetic ABT-737 effectively kills acute myeloid leukemia initiating cells. *Leuk Res Rep*. 2014; 3(2): 79–82.

- (7) van Delft et al.: "The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized." *Cancer Cell*, 2006; 10(5).
- (8) Anderson M.A, David Huang D., y Roberts A. Targeting BCL2 for the Treatment of Lymphoid Malignancies. *Seminars in Hematology*. 2014; 51(3), 219-227
- (9) Billard C. BH3 Mimetics: Status of the Field and New Developments. *Mol Cancer Ther*. 2013; 12(9), 1691-1700
- (10) Marzo I., Naval J. Antimitotic drugs in cancer chemotherapy: Promises and pitfalls. *Biochemical Pharmacology*. 2013; 86, 703-710
- (11) Sessa F., y Villaa F. Structure of Aurora B-INCENP in complex with barasertib reveals a potential transinhibitory mechanism. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*. 2014; 70(3) : 294-298.
- (12) Atcc.org [Internet]. EEUU: 1925. Disponible en: http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-185.aspx?geo_country=es
- (13) Atcc.org [Internet]. EEUU: 1925. Disponible en: <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1593.2.aspx#characteristics>
- (14) Freimoser F.M., Jakob C.A., Aebi M., y Urs Tuor U. The MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] Assay Is a Fast and Reliable Method for Colorimetric Determination of Fungal Cell Densities. *Appl Environ Microbiol*. 1999; 65(8): 3727-3729.
- (15) Denizot F., Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 1986; 89: 271-277.
- (16) Alfaro Moreno E., García Cuéllar C., Dueñas González A. Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones Revista del Instituto Nacional de Cancerología. 2000; 46 (4): 275-280.
- (17) Mansilla Barrado S. 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; 2005.
- (18) Hiroshi Y. Yamada y Gary J. Gorbsky. Spindle checkpoint function and cellular sensitivity to antimitotic drugs. *Mol Cancer Ther December* 2006; 5:2963
- (19) Denise L. Driscoll , Arijit Chakravarty, Doug Bowman, Vaishali Shinde, Kerri Lasky, et al. Plk1 Inhibition Causes Post-Mitotic DNA Damage and Senescence in a Range of Human Tumor Cell Lines. 2014
- (20) Jessica J. Huck, Mengkun Zhang, Alice McDonald, Doug Bowman, Kara M. Hoar, et al. MLN8054, an Inhibitor of Aurora A Kinase, Induces Senescence in Human Tumor Cells Both In vitro and In vivo. *Mol Cancer Res March* 2010; 8: 373
- (21) Galán Malo P., Vela L., Gonzalo O., Calvo-Sanjuám R., Gracia-Fleta L., Naval J., Marzo I. Cell fate after mitotic arrest in different tumor cell is determined by the balance between slippage and apoptotic thereshold. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2012; 258: 384-393.
- (22) Kim H-J., Cho J.H, Quan H. y Kim J.R. Down-regulation of Aurora B kinase induces cellular senescence in human fibroblasts and endothelial cells through a p53-dependent pathway. 2011;585 (22): 3569-3576.
- (23) Cao X., Yap J.L., Newell-Rogers M.K., Peddaboina C., et all. The novel BH3 α -helix mimetic JY-1-106 induces apoptosis in a subset of cancer cell (lung cancer, colon cancer and mesothelioma) by disrupting Bcl-XL and Mcl-1 protein-protein interactions with Bak. *Molecular Cancer* 2013; 12:42.

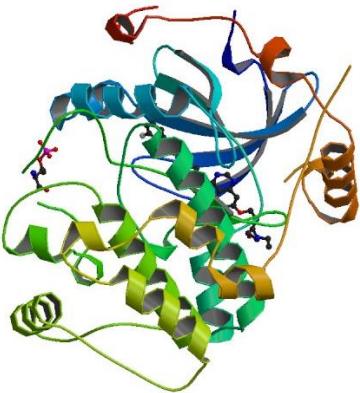
ANEXO 1: estructura miméticos BH3 y barasertib



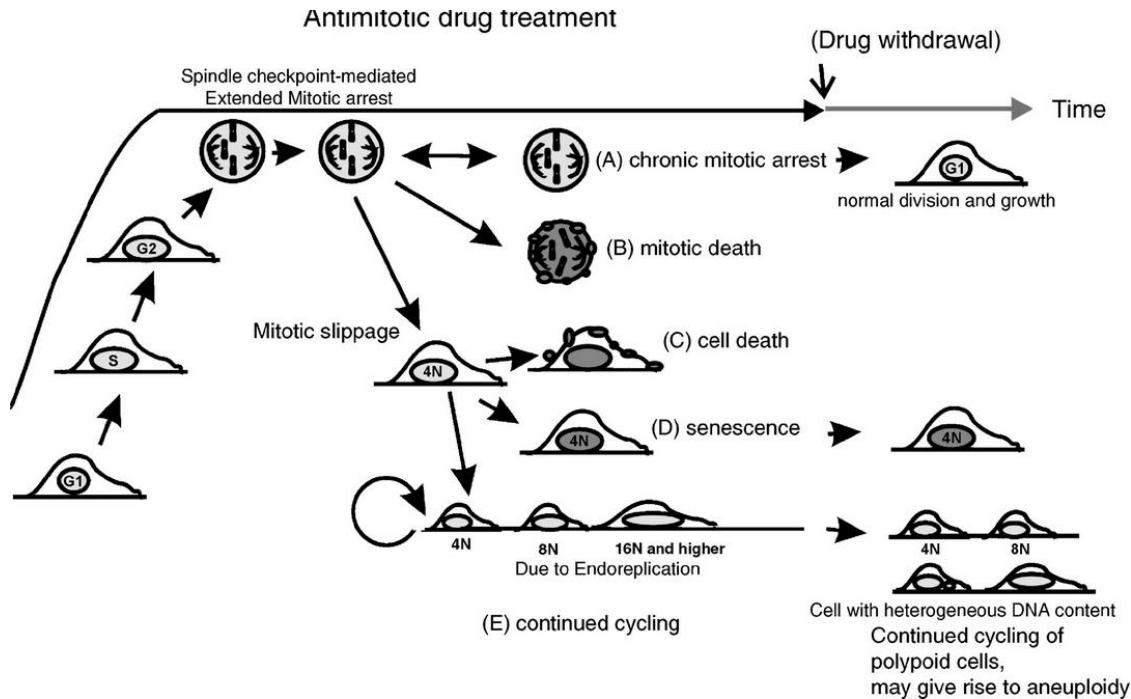
ANEXO 2: Estructura cristalina del Bcl-X_L en complejo con ABT-737



ANEXO 3: Aurora quinasa B en complejo con el inhibidor barasertib



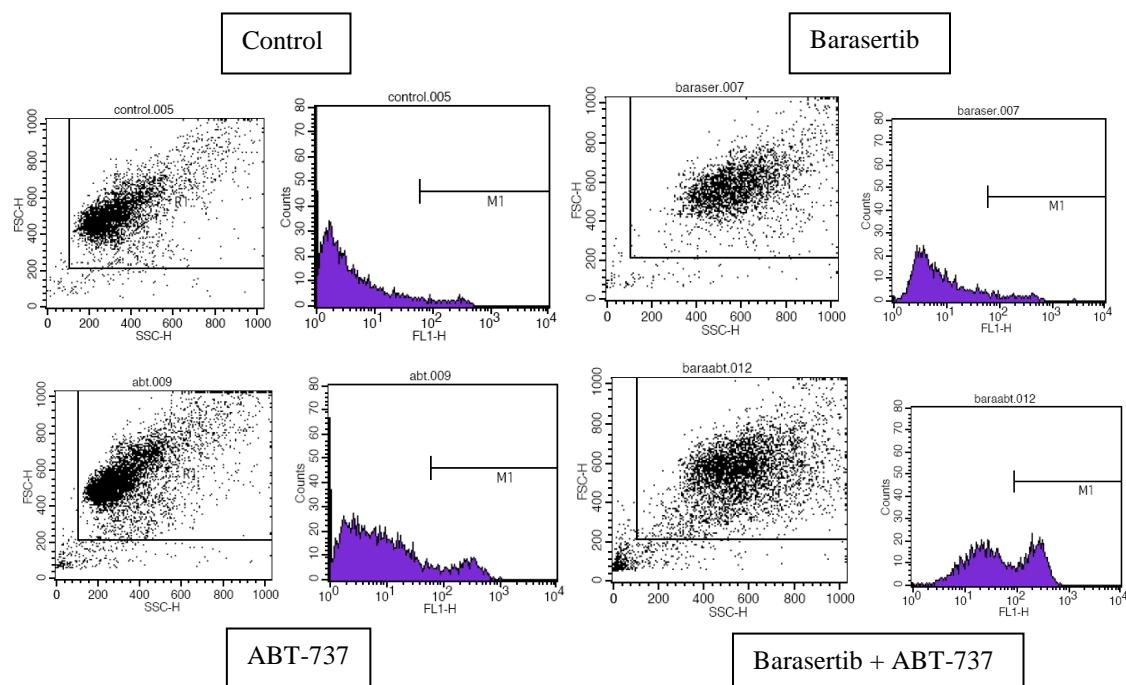
ANEXO 4: Posibles destinos tras un bloqueo prolongado en mitosis.



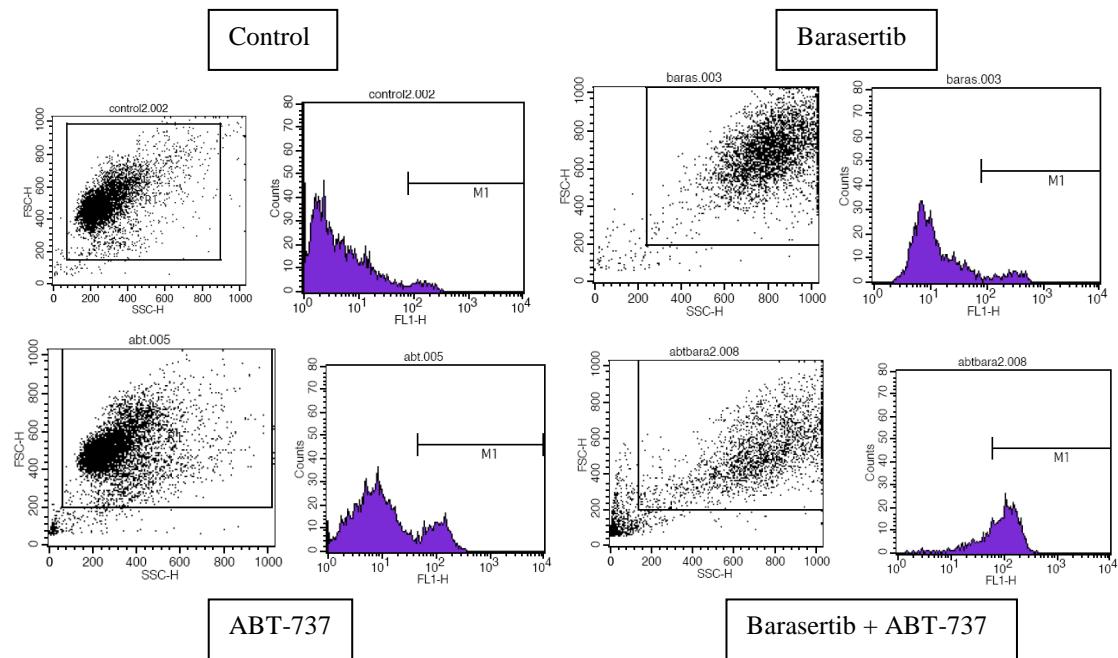
ANEXO 5: Histogramas representativos de células A549 tratadas con barasertib, ABT-737 y la combinación de estos a 24h.

Al analizar las células por citometría de flujo, se clasifican atendiendo a dos parámetros: FSC (Forward Scatter) que indica el tamaño celular y SSC (Side Scatter) que indica la granulosidad de las células. Representado en el gráfico de puntos (dot plot).

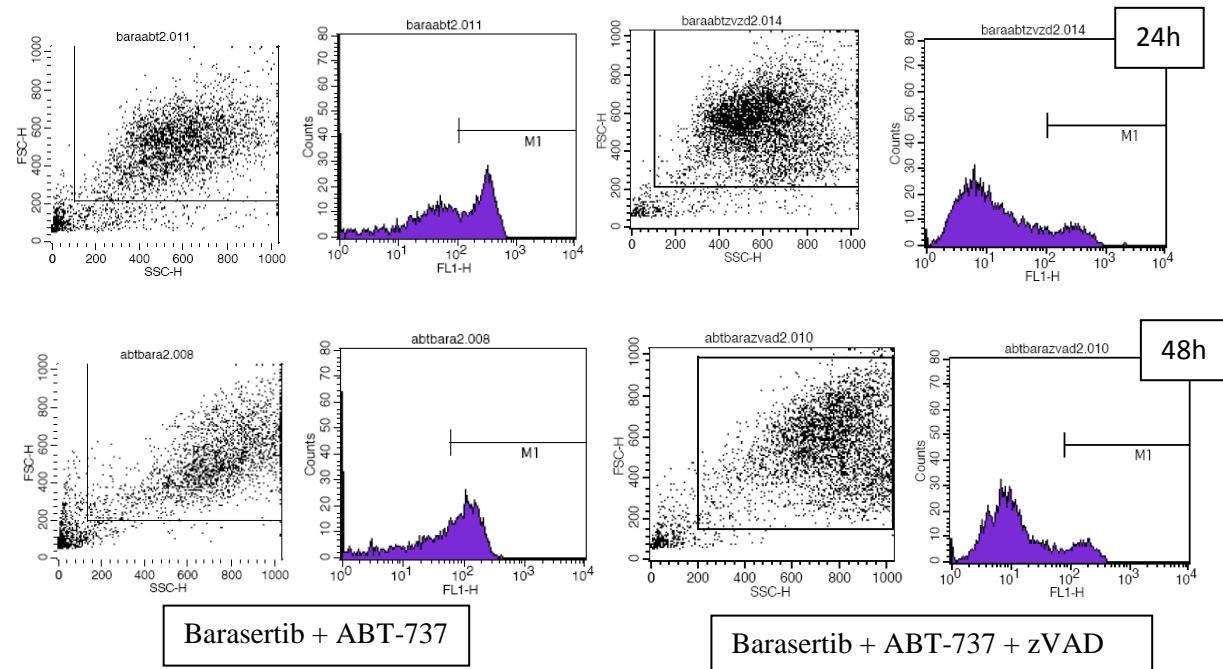
En el histograma se representa el número de células y la fluorescencia emitida (debida a la unión de la Anexina con la fosfatidilserina). Las células con mayor fluorescencia corresponden con las apoptóticas, señaladas en los histogramas con la línea M1.



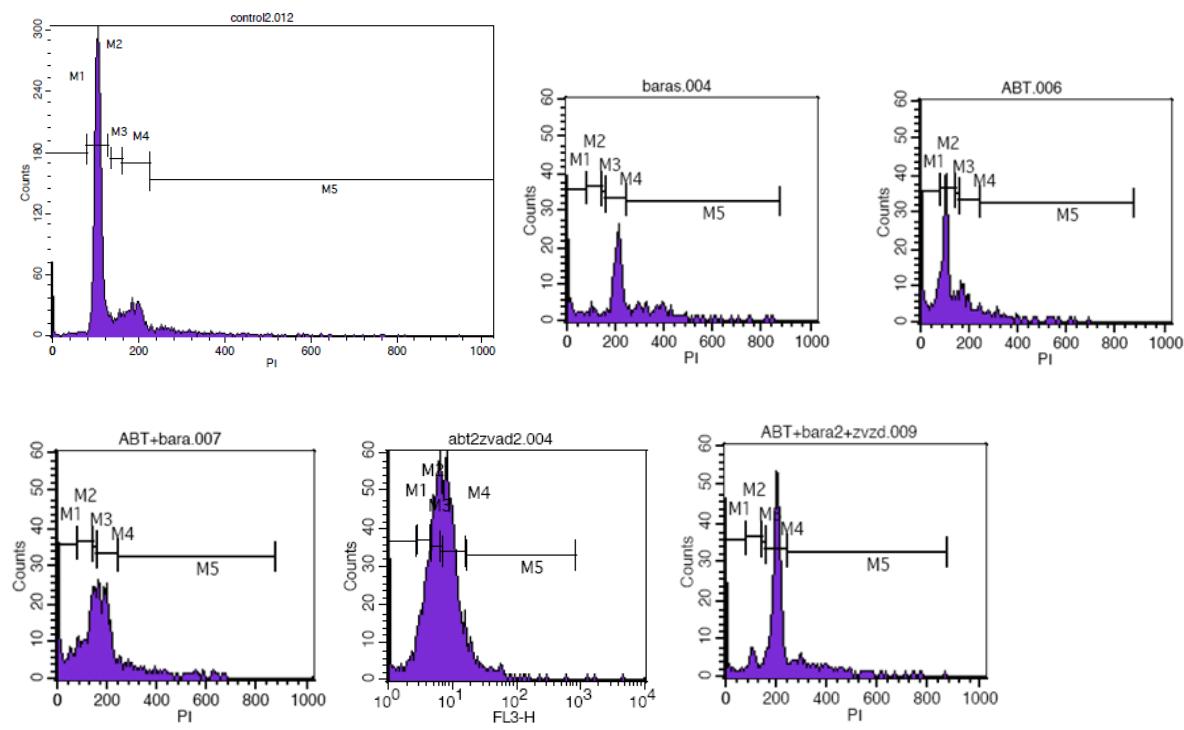
ANEXO 6: Histogramas representativos de células A549 tratadas con barasertib, ABT-737 y la combinación de estos a 48h.



ANEXO 7: Histogramas representativos de células A549 tratadas con barasertib + ABT-737 y barasertib + ABT-737 + zVAD.



ANEXO 8: Ciclo celular de la línea A549, tratada con barasertib, ABT-737 y z-VAD.



Sección	Fase ciclo celular
M1	Apoptóticas
M2	G0/1
M3	S
M4	G2/M
M5	Poliploides