



Trabajo Fin de Grado

Mecanismos de muerte celular inducida por
compuestos antimitóticos en la línea de cáncer
colorrectal HCT116

Blanca Ortiz de Solórzano Reig

Isabel Marzo Rubio

Facultad de Ciencias
Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular y Celular

2016

Índice

0. RESUMEN	2
0. ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Apoptosis	3
1.1.1 Familia Bcl-2	4
1.2 Muerte celular y tratamientos antitumorales	5
1.2.1 Microtúbulos y su dinámica	6
1.2.2 Mitosis y Aurora quinasas	7
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS	10
3.1 Líneas celulares	10
3.1.1 HCT 116	10
3.1.2 Mantenimiento de líneas celulares.....	10
3.1.3 Determinación de la viabilidad celular del cultivo.....	11
3.2 Ensayo de toxicidad	11
3.2.1 Condiciones ensayos	11
3.2.2 Marcaje con anexinaV.....	11
3.3 Ensayo clonogénico.....	12
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
4.1 Cambios en la morfología	13
4.2 Estudio de toxicidad.....	15
4.2.1 Vincristina.....	16
4.2.2 Docetaxel.....	17
4.2.3 Barasertib	18
4.3 Ensayo clonogénico.....	19
4.4 Discusión general	21
5. CONCLUSIONES.....	23
5. CONCLUSIONS.....	23
BIBLIOGRAFÍA	24

O. RESUMEN

Los fármacos antimitóticos producen desviaciones en el ciclo mitótico de las células y se ha visto que son eficaces agentes antitumorales, ya que causan daños celulares que además de inhibir la proliferación de las células desencadenan mecanismos de muerte celular entre los que destaca la apoptosis. Dentro de los antimitóticos existen diferentes grupos en función de su naturaleza y sus dianas celulares. Los taxanos y los alcaloides de la vinca son compuestos que actúan sobre la dinámica de los microtúbulos, inhibiendo su polimerización y despolimerización, respectivamente. Por otra parte, en los últimos años se han desarrollado moléculas que actúan como inhibidores de las aurora quinasas, proteínas importantes en la regulación del ciclo celular.

Este trabajo estudia los efectos de tres fármacos antimitóticos (uno de cada uno de los tipos mencionados): vincristina, docetaxel y barasertib en la línea celular de cáncer colorrectal HCT116, utilizando células WT y Bak/Bax DKO resistentes a la apoptosis. Se ha realizado un ensayo de toxicidad en el que las células se han tratado con estos compuestos durante diferentes tiempos y se ha medido la muerte celular por apoptosis mediante la unión a anexinaV-DY634 por citometría de flujo. También se han llevado a cabo estudios morfológicos y un ensayo clonogénico.

La vincristina y el docetaxel han demostrado tener un potente efecto antitumoral en estas células, produciendo efectos que desencadenan la apoptosis. El barasertib, sin embargo, no tiene tanta capacidad de provocar apoptosis en esta misma línea celular y se observa el fenómeno denominado “slippage” que da lugar a células multinucleadas y que han perdido la capacidad de proliferar.

O. ABSTRACT

Antimitotic drugs produce deviations in the mitotic cycle in cells and they have been reported to be effective antitumor agents because they cause cellular damage that inhibits cellular proliferation as well as triggering cell death mechanisms, in which apoptosis stands out. Within antimitotic drugs there are different groups depending on their nature and cell targets. Taxanes and vinca alkaloids are compounds that target microtubules and affect their dynamics by inhibiting their polymerization and depolymerisation, respectively. On the other hand, in the last years Aurora kinase inhibitors, key regulators of cell cycle, have been developed.

This project aims to study the effects of three antimitotic (belonging to each of the groups mentioned above): vincristine, docetaxel and barasertib in the colorectal cancer cell line HCT116, using WT and Bax/Bak DKO apoptotic resistant cells. These drugs have been assayed in a toxicity test for different periods of time and the induction of apoptosis had been measured by annexinV-DY634 binding and flow cytometry. Also, morphology studies and a clonogenic assay have been performed.

Vincristine and docetaxel have proved to have a potent antitumor effect in these cells, triggering apoptosis. However, barasertib doesn't have such capacity of unleashing apoptosis in this cell line. Instead, we have observed a slippage phenomenon which leads to multinuclear cells which have lost the proliferation capacity.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Apoptosis

La apoptosis es un proceso de muerte controlada muy regulada de modo que el destino de las células individuales cumple las necesidades del organismo, eliminando las células que ya no son necesarias en los tejidos, bien porque ya han realizado su función o porque estén irreversiblemente dañadas. Las señales apoptóticas conducen a una serie de eventos moleculares y bioquímicos que terminan cuando los macrófagos ingieren la célula apoptótica, sin producirse respuesta inflamatoria porque no se libera el contenido celular.

Según el “Nomenclature Committee on Cell Death” (NCCD) durante el proceso de apoptosis se producen una serie de modificaciones morfológicas entre las que destacan el redondeamiento de la célula, la retracción de los seudópodos, reducción del volumen celular, condensación de la cromatina, fragmentación nuclear, ausencia de modificaciones de los orgánulos citoplasmáticos y burbujeo (“blebbing”) manteniendo la integridad de la membrana plasmática¹.

Dentro de las proteínas implicadas en la regulación de la apoptosis destacan dos familias: las caspasas y las de la familia Bcl-2 (1.1.1 Familia Bcl-2). Las caspasas son los últimos efectores, desencadenando eventos característicos de la apoptosis mediante la escisión de proteínas celulares, como ICAD, que fragmentará el DNA nuclear; las láminas nucleares, provocando la fragmentación nuclear; o proteínas del citoesqueleto, desencadenando la fragmentación celular y vesiculización de membrana.

En los mamíferos la apoptosis se puede producir por dos vías relacionadas entre sí: la intrínseca y la extrínseca, en función de si las señales que las desencadenan provienen del interior celular, vía intrínseca, o del exterior, vía extrínseca (Figura 1).

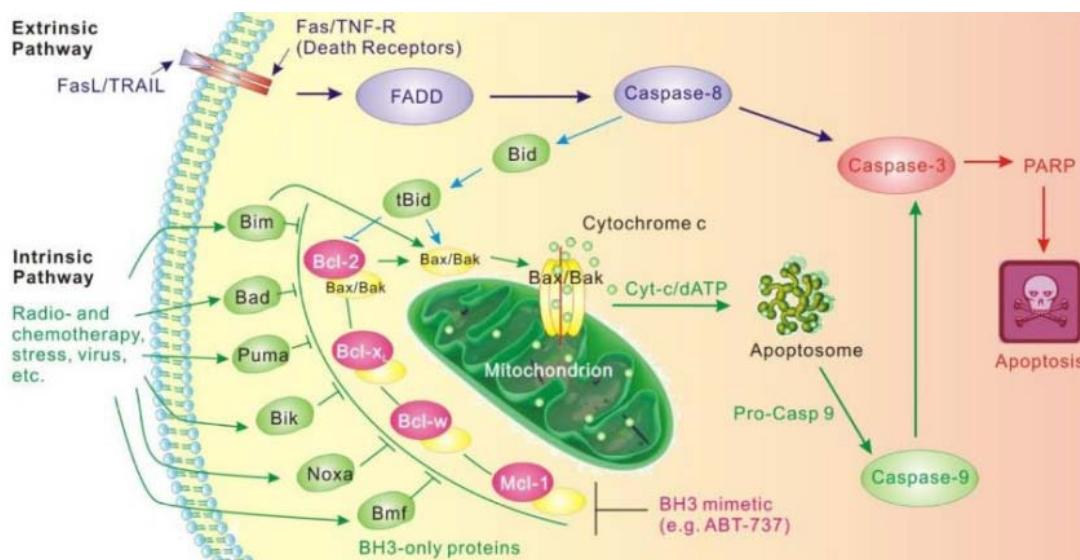


Figura 1. Cascadas de apoptosis celular extrínseca e intrínseca. (Bajwa et al., 2012)²

En la vía extrínseca, la señal se recibe gracias a receptores que se unen por su región extracelular a ligandos mortales, iniciando una cascada de señalización citosólica que culmina con la preactivación de Casp-3, la caspasa ejecutora principal.

La vía intrínseca, se activa como respuesta a una serie de señales de estrés intracelular. Como respuesta, proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2, se insertan en la membrana mitocondrial y la permeabilizan, permitiendo la salida de factores apoptogénicos (citocromo c, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, AIF y EndoG) al citosol.

El citocromo c va a provocar la formación del apoptosoma que activará a la Casp-9 que a su vez activará a otras caspasas entre las que destaca Casp-3. Smac/DIABLO y Omi/HtrA2 inactivan proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs). AIF y la endonucleasa G entran en el núcleo donde provocan la condensación de la cromatina y la fragmentación del DNA.³

1.1.1 Familia Bcl-2

En mamíferos esta familia consta aproximadamente de 20 proteínas que actúan regulando la apoptosis en las mitocondrias. Según los dominios de homología que presentan se clasifican en tres grupos funcionales: antiapoptóticas, proapoptóticas multidominio y proapoptóticas “solo-BH3”. El destino de la célula está determinado por el equilibrio de la actividad proapoptótica y antiapoptótica de los miembros de esta familia, que se regulan mutuamente. Cuando las proteínas “solo-BH3” son activadas al recibir una señal de muerte, estas interaccionan con las proteínas antiapoptóticas, que en situación basal inhiben a las proapoptóticas multidominio, que quedan liberadas llevando a cabo su acción mortal (Figura 2).

Bax y Bak son proteínas apoptóticas multidominio, que en situación basal existen como monómeros inactivos unidos a proteínas antiapoptóticas como Bcl-2: Bax en el citosol y Bak anclado a la membrana mitocondrial externa. Estas dos proteínas desempeñan un papel crucial en la vía intrínseca de la apoptosis y la inactivación simultánea de los genes Bak y Bax bloquea completamente la apoptosis inducida por dicha vía. Una vez activadas Bax y Bak forman oligómeros en la membrana mitocondrial externa, lo que desencadena la liberación de factores apoptogénicos del espacio intermembrana mediante la formación de poros o mediante la interacción con otras proteínas de la membrana (Figura 2).⁴

La interacción entre estas proteínas para formar los dímeros implica el secuestro del dominio BH3 de una de las moléculas por un bolsillo hidrofóbico que se forma entre los dominios BH1, BH2 y BH4 de la otra molécula⁵. Para que esta interacción se lleve a cabo estas proteínas tienen que haber sido activadas, y aunque no se sabe exactamente cómo se produce esta activación se barajan dos modelos: activación directa o indirecta (Figura 2).

En la activación directa las proteínas “solo-BH3” (como Bid, Bim o Puma) se unen directamente a Bax y Bak. En el modelo indirecto, Bax y Bak se activan porque las proteínas “solo-BH3” desplazan a las proteínas antiapoptóticas. Esta activación va a provocar que Bax se trasloque a la membrana mitocondrial externa y que tanto Bax como Bak expongan su dominio BH3 con el que formarán los homodímeros simétricos.⁶

Tras esto se formarán homo-oligómeros por interacción de las α-hélices 6, que contienen cisteínas que forman uniones con los mismos residuos de otro dímero⁶. Es posible que Bax y Bak no actúan solas sino que cooperen con otras proteínas mitocondriales para la formación del poro, como canales dependientes de voltaje u otros canales de membrana.⁷

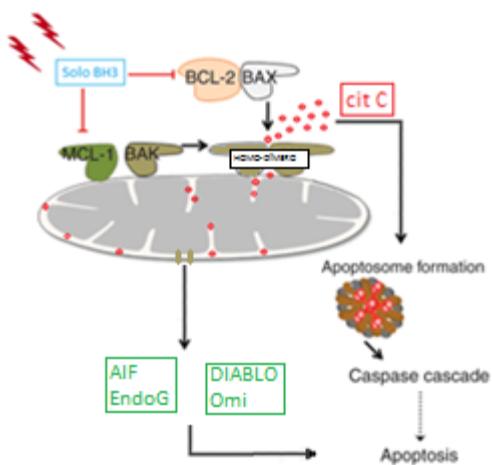


Figura 2. Función de las proteínas de la familia Bcl-2 en la vía mitocondrial de la apoptosis.
(Imagen obtenida de Samuel et al., 2010 y modificada por mi)⁸

1.2 Muerte celular y tratamientos antitumorales

La integridad de un organismo depende del balance entre proliferación, diferenciación y apoptosis, que es necesario que estén regulados correctamente porque el desequilibrio entre estos, ocasiona enfermedades importantes como el cáncer.

Muchos de los tratamientos antitumorales utilizados en la actualidad centran su acción en la inducción de la apoptosis. La principal ventaja de esta estrategia terapéutica es que es selectiva de células tumorales, ya que, a diferencia de las células normales, las células tumorales deberían estar destinadas a morir, y son muy dependientes de las alteraciones en las vías de señalización de la apoptosis para mantenerse vivas.

Por ellos, muchas terapias actualmente en desarrollo contra diferentes tipos de cáncer son terapias destinadas a actuar o bien sobre proteínas implicadas directamente en alguna de estas dos vías principales de apoptosis, o en proteínas reguladoras de la muerte celular por apoptosis.

Este trabajo se centra en fármacos antimitóticos, que inducen muerte celular porque afectan al proceso de mitosis de las células, en concreto en antimitóticos que realizan esta función mediante la interacción con los microtúbulos y con quinasas reguladoras de la mitosis.

1.2.1 Microtúbulos y su dinámica

Los microtúbulos son componentes del citoesqueleto implicados en la regulación de la proliferación, diferenciación y apoptosis. Son estructuras dinámicas por la constante polimerización y despolimerización de heterodímeros de α y β tubulina, prueba de ello es que se reorganizan completamente durante la mitosis. El conjunto de microtúbulos presente en las células interfásicas se disgrega y las subunidades libres de tubulina se reensamblan para formar el huso mitótico, responsable de la alineación de los cromosomas en la metafase y de la separación de estos en la anafase⁴. Existen moléculas que, por interacción con los microtúbulos, han demostrado ser antimitóticos y son útiles como agentes antitumorales.

Este es el ejemplo de los taxanos (pacitaxel y docetaxel), que interaccionan con la tubulina polimerizada y previenen la despolimerización. Otros, los alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina y vinorelbina), interaccionan con la tubulina monomérica impidiendo su polimerización. Se ha demostrado que los efectos causados por estos compuestos promueven la apoptosis en células tumorales⁹.

Uno de los fármacos utilizados en este trabajo es la vincristina, un alcaloide vegetal producido por *Catharanthus roseus* que impide la formación de los microtúbulos en la célula, bloqueando la progresión de la mitosis y, por tanto, la división celular.¹⁰ Estructuralmente se considera una molécula “dimérica” porque comprende dos dominios, vindolina (VDL) y catarantina (CTN) reorganizada (Figura 3).¹¹

Esta molécula se une a la tubulina e induce la asociación de esta molécula en homopolímeros lineales, inhibiendo el auto-ensamblaje de la tubulina para formar los microtúbulos, y causa su disolución¹¹. Esto afecta en particular a los microtúbulos implicados en la formación del huso, deteniendo la célula en metafase.¹²

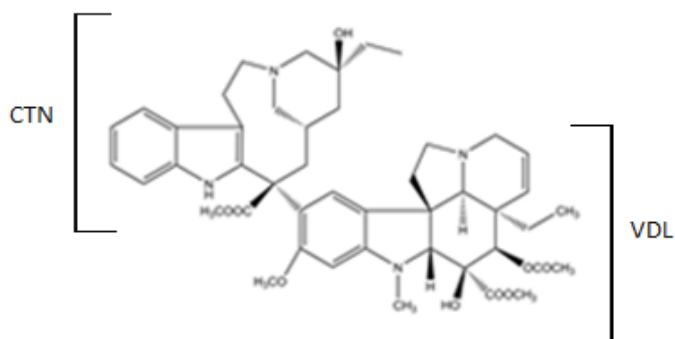


Figura 3. Fórmula química de la vincristina. En su estructura se diferencian dos partes: vindolina (VDL) y catarantina (CTN)

Fue aprobada por primera vez en el año 1963 y actualmente se usa en el tratamiento de leucemia aguda, linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin, neurosarcoma, rabdomiosarcoma y tumor de Wilms.¹³

Otro de los fármacos utilizados es el docetaxel, un compuesto obtenido por síntesis química a partir de 10-deacetylbaicalein III, un taxano extraído de *Taxus baccata*¹⁴. Su mecanismo de acción consiste en promover la formación de microtúbulos e inhibir su despolimerización, por lo que el ciclo celular queda bloqueado durante las fases G2 y M.¹⁵

Este compuesto, se une a uno o dos de los sitios de unión presentes en los microtúbulos: en el lumen (sitio interno de la subunidad β de la tubulina) y en el poro (sitio externo que incluye las subunidades α y β de diferentes heterodímeros).¹⁶

Se lleva utilizando desde el año 2006 para tratar distintos tipos de cánceres como el de mama, el cáncer de pulmón no microcítico, cáncer avanzado de estómago, cáncer de próstata metastásico y cáncer de cabeza y cuello.¹⁷

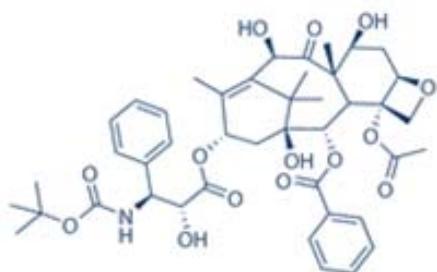


Figura 4. Fórmula química del docetaxel

Los fármacos que afectan a la polimerización o despolimerización de los microtúbulos pueden inducir la fosforilación de Bcl-2.¹⁸ Como consecuencia de esta fosforilación, Bcl-2 pierde la habilidad de formar heterodímeros con Bax/Bak, dejando esta libre para que ejerza su acción formando poros en la membrana mitocondrial.

1.2.2 Mitosis y Aurora quinasas

Las Aurora quinasas son una familia de tres quinasas (AAK, ABK y ACK) importantes para la segregación adecuada de cromosomas a las células hijas en la mitosis (Figura 5). AAK se encuentra en los centrosomas y en los extremos del huso, donde ejerce su acción en el ensamblaje del huso. ABK se encuentra en los cromosomas y fosforila la histona H3, se encarga del correcto alineamiento de los cromosomas en el plano ecuatorial y la citocinesis. La expresión de ACK está restringida a los testículos, donde tiene un papel importante en la meiosis.¹⁹

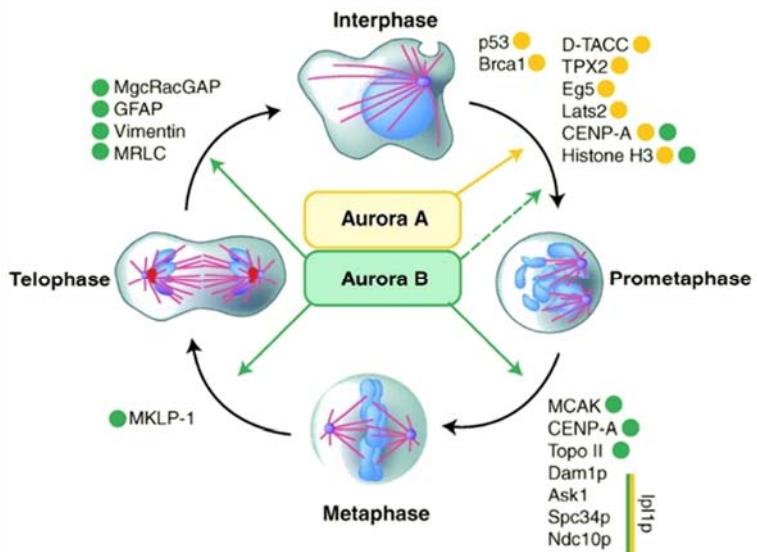


Figura 5. Dianas y puntos del ciclo celular de las aurora quinasas A y B. Los sustratos de la AAK tienen un punto amarillo, mientras que los sustratos de la ABK tienen un punto verde (Gautschi et al., 2008).²⁰

Estas quinasas suelen expresarse más en células tumorales, en particular la ABK se ha relacionado con la poca supervivencia de los pacientes con cáncer de colon metastásico.²¹ En muchos de estos cánceres aparece mutado el gen APC, que fisiológicamente inhibe la expresión de la survivina, y esta a su vez estimula la expresión de ABK.²² De esta manera en los pacientes con este tipo de cáncer, APC no ejercerá su función, se expresará más survivina y por tanto más cantidad de ABK, lo que promueve la mitosis y proliferación celular.

Dirigir tratamientos contra esta quinasa podría ser una buena opción para el tratamiento de, al menos, este tipo de cáncer, ya que se obtendría una eficacia parecida a los agentes citotóxicos convencionales, pero con menos efectos secundarios.¹⁹ Al inhibir esta quinasa, las células quedarán paradas en la metafase con más cantidad de DNA de lo normal (4N/8N), por lo que entrarán en apoptosis.²³

Actualmente hay varios fármacos en estudio que van a tener como diana estas quinasas. El alisertib (MLN8237) y ENMD-2076 son inhibidores de la AAK que se encuentran actualmente en estudios clínicos de fase II para diferentes tipos de tumores. Por otra parte, el barasertib (AZD1152) es un inhibidor específico de la ABK y se encuentra en estudios clínicos de fase II y III.²⁴

El último fármaco empleado en este trabajo es el barasertib, AZD1152, un compuesto que es rápidamente convertido a AZD1152 hidroxi-QPA (AZD1152-HQPA) en el plasma. Es un inhibidor específico de la actividad de la Aurora B quinasa por unión al su sitio activo (bolsillo donde se une el ATP), y esta inhibición provoca un mal alineamiento de los cromosomas y fallos en la citoquinesis que llevan a la muerte celular.^{19,23}

Se han realizado diferentes estudios clínicos en leucemia mieloide aguda (fases I y II)²⁵ y en linfoma difuso de células B grandes (fases I y II)²⁶ con buenos resultados. También se realizó un estudio en tumores sólidos (fase I)²⁷ que ha demostrado que aunque es seguro este tipo de tumores no parecen responder tan bien²⁸.

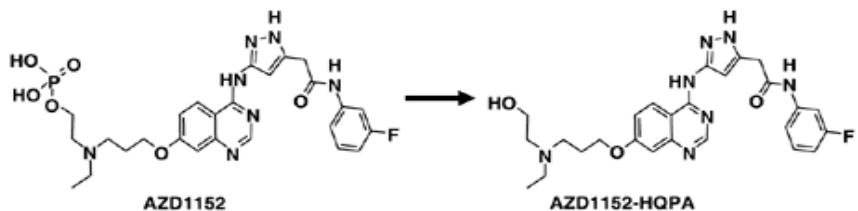


Figura 6. Fórmula química del barasertib. El barasertib es un profármaco AZD1152 que en el plásmido es transformado a AZD1152-HQPA

2. OBJETIVOS

Los agentes antimitóticos, sustancias que producen una desviación consistente del ciclo mitótico de las células,²⁹ se han utilizado tanto para estudiar la mitosis como para encontrar posibles aplicaciones terapéuticas, entre las que destaca el uso de estas sustancias como agentes antitumorales.

Este trabajo pretende estudiar los efectos de tres fármacos antimitóticos (vincristina, docetaxel y barasertib) sobre una línea celular de cáncer de colon (HCT116), dentro de este objetivo principal se plantean los siguientes objetivos concretos:

- Determinar la toxicidad de tres antimitóticos con diferentes dianas celulares y a diferentes tiempos.
- Analizar los cambios que estos fármacos influyen en la morfología de las células.
- Estudiar los posibles cambios irreversibles que estos tres fármacos pueden causar en las células, afectando a la viabilidad de estas tras la retirada del fármaco.
- Estudiar el papel de la vía intrínseca de la apoptosis en la muerte inducida por los tres fármacos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Líneas celulares

3.1.1 HCT 116

En este trabajo se han utilizado las siguientes líneas celulares:

- HCT 116 WT. Son células de tejido epitelial de carcinoma colorectal humano que presentan una mutación en el codón 13 del proto-oncogen Ras³⁰.
- HCT 116 DKO. A las células anteriores se les ha suprimido el gen *Bax* y se ha silenciado el gen *Bak*, con lo que la vía intrínseca de la apoptosis está bloqueada.

Las líneas HCT116 WT y las HCT116 *Bax* KO fueron cedidas por Berg Vogelstein. Las HCT116 DKO fueron creadas en el laboratorio Apoptosis, inmunidad y cáncer mediante transfección con shRNA específicos para *Bak*.

Ambas líneas son adherentes y se han cultivado en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SBF), glutamina 2 mM y antibióticos (penicilina-estreptomicina 110 U/ml y 100 µg/ml respectivamente), a partir de ahora denominado medio completo.

3.1.2 Mantenimiento de líneas celulares

Todas las manipulaciones realizadas con las líneas celulares se han llevado a cabo en condiciones estériles, trabajando siempre en campana de flujo laminar vertical. El material utilizado tanto para el cultivo, como para la manipulación de las células había sido previamente esterilizado, así como los reactivos utilizados en los experimentos realizados.

Las células se han cultivado en frascos de 25 cm² con tapón de filtro que se mantenían en un incubador termostatizado a 37°C, en aire saturado de humedad y con un 5% CO₂. Las células se sembraban a 1·10⁴ cél/ml y cada 3-4 días se realizaban pases de los cultivos. En ocasiones especiales se sembraron a una concentración menor, y en estos casos los pases se realizaban con menor frecuencia.

Para realizar los pases se trataban las células con 3 ml de una disolución de tripsina y se incubaban a 37°C durante 5-10 minutos para que estas se despegasen del fondo. Transcurrido este tiempo se añadía medio completo para parar la reacción y se centrifugaba para eliminar la enzima (5 min, 1000 rpm, TA), obteniendo una disolución con las células en suspensión. La densidad y viabilidad de dicha suspensión se determinaba cómo se indica en el siguiente apartado.

Para la observación de la evolución de los cultivos y la morfología de las células se ha utilizado un microscopio (E600/E400, Nikon) provisto de un equipo de fotografía digital (DXM1200F, Nikon) y se analizaron con el programa de fotografía Nikon ACT-1.

3.1.3 Determinación de la viabilidad celular del cultivo

La determinación de la densidad y la viabilidad de las células se ha realizado de forma rutinaria mediante tinción por exclusión con Azul Trypan, un colorante que penetra solo en células muertas, pues han perdido la integridad de su membrana. De esta manera quedarán de color azul las células muertas, mientras que las vivas y las apoptóticas no se tiñen.

Para ello se mezclaban a partes iguales un volumen del cultivo y una disolución de azul Trypan al 0.4% en NaCl 0.15 M y con ayuda de una cámara de Neubauer hemocitómetro y a través de un microscopio óptico (Optiphot, Nikon) se contaban las células.

La densidad celular se determinaba con la siguiente fórmula:

$$\text{Densidad (cel/ml)} = \frac{n^{\circ} \text{ de células viables} \cdot \text{dilución} \cdot 10^4}{n^{\circ} \text{ de cuadrantes}}$$

La viabilidad se determinaba con la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad (\%)} = \frac{n^{\circ} \text{ de células viables}}{n^{\circ} \text{ de células totales}}$$

Los valores de viabilidad del cultivo admitidos para realizar los experimentos debían ser superiores a 95%.

3.2 Ensayo de toxicidad

3.2.1 Condiciones ensayos

Se ha evaluado la sensibilidad de las líneas HCT116 WT y HACT116 DKO a los tres fármacos, para los que se han cultivado ambas líneas celulares con dichos fármacos. En placas de 24 pocillos se sembraron células a $5 \cdot 10^4$ cel/pocillo, y tras 24 horas, en las que se asentó y comenzó a crecer el cultivo, se añadieron los fármacos para que quedaran en las siguientes concentraciones finales, que se había comprobado previamente que eran las adecuadas para llevar a cabo el experimento:

- Vincristina: 1 µg/ml
- Docetaxel: 5 µM
- Barasertib: 1 µM

Como control negativo se utilizaban células a las que no se añadían fármacos. Las células se dejaban expuestas a los fármacos por períodos de tiempo variables para poder estudiar su efecto. Para evaluar si los fármacos causaban alteraciones irreversibles en las células en una serie de experimentos, tras una incubación de 24 horas se retiraba el medio con fármaco de los pocillos y se sustituía por medio completo

3.2.2 Marcaje con anexinaV

En las primeras fases de la apoptosis, se produce la traslocación de fosfatidilserina desde la membrana plasmática interna a la externa, lo que conduce a la fagocitosis de la célula por macrófagos.¹

La exposición de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana es, pues, un evento temprano indicador de la apoptosis, por lo que, para cuantificar la mortalidad por apoptosis de las células se realizaba un marcaje con anexinaV recombinante. Esta proteína que se une específicamente a este fosfolípido, se ha utilizado unida a DY634 ($\lambda_{abs}/\lambda_{em}$: 635/658 nm, canal FL4).

Para realizar el marcaje de las células, se resuspenden las células de cada pocillo en 100 μ l de ABB (Annexin Binding Buffer: Hepes/NaOH 10 mM pH 7.4, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2.5 mM) con 0.02 μ l de anexinaV-DY364 y se incuban durante 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. El ABB es un medio con calcio que favorece la unión de la anexinaV a las células.

Para cuantificar tras el marcaje se usaba un citómetro de flujo (FACScan BD), para pasar las células se añadían 200 μ l de ABB más a cada tubo. Los resultados obtenidos se analizaron con los programas Cell Quest Pro y Weaser V2.6.1.

3.3 Ensayo clonogénico

En placas de 6 pocillos se sembraron células de ambas líneas celulares a una densidad de 40 cel/ml en un volumen total de 5 ml. Tras 24 horas se añadieron los fármacos a las mismas concentraciones finales usadas en los anteriores experimentos y se mantuvieron en incubación durante 48 horas. Como en los ensayos anteriores el control negativo fueron células que no fueron expuestas a ningún fármaco. Transcurrido este tiempo se retiró el medio con fármacos y se sustituyó por medio completo.

Tras siete días se revelaron las placas con cristal violeta, un colorante catiónico que penetra en las células y se une al DNA. Para ello se añadió a cada pocillo 1 ml de una disolución de cristal violeta (0.5% w/v) y glutaraldehído (6% v/v), para fijar las células y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Tras este tiempo se lavaron las placas en agua y se contaron las colonias.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Cambios en la morfología

Mediante la observación al microscopio se observa que las células tratadas con vincristina o docetaxel (Figura 7.B, Figura 7.C, Figura 8.B y Figura 8.C) presentan una morfología redondeada y que algunas células se despegan del fondo y aparecen flotando con forma redondeada (ejemplos señalados en Figura 7. B y Figura 7.C), aunque este efecto es más pronunciado en las células tratadas con vincristina. Como se ha comentado con anterioridad (1.2.1 Microtúbulos y su dinámica) estos fármacos se unen a la tubulina, proteína del citoesqueleto y que por tanto afectará a la capacidad de adhesión de la células, lo que explicaría que estas se despeguen.

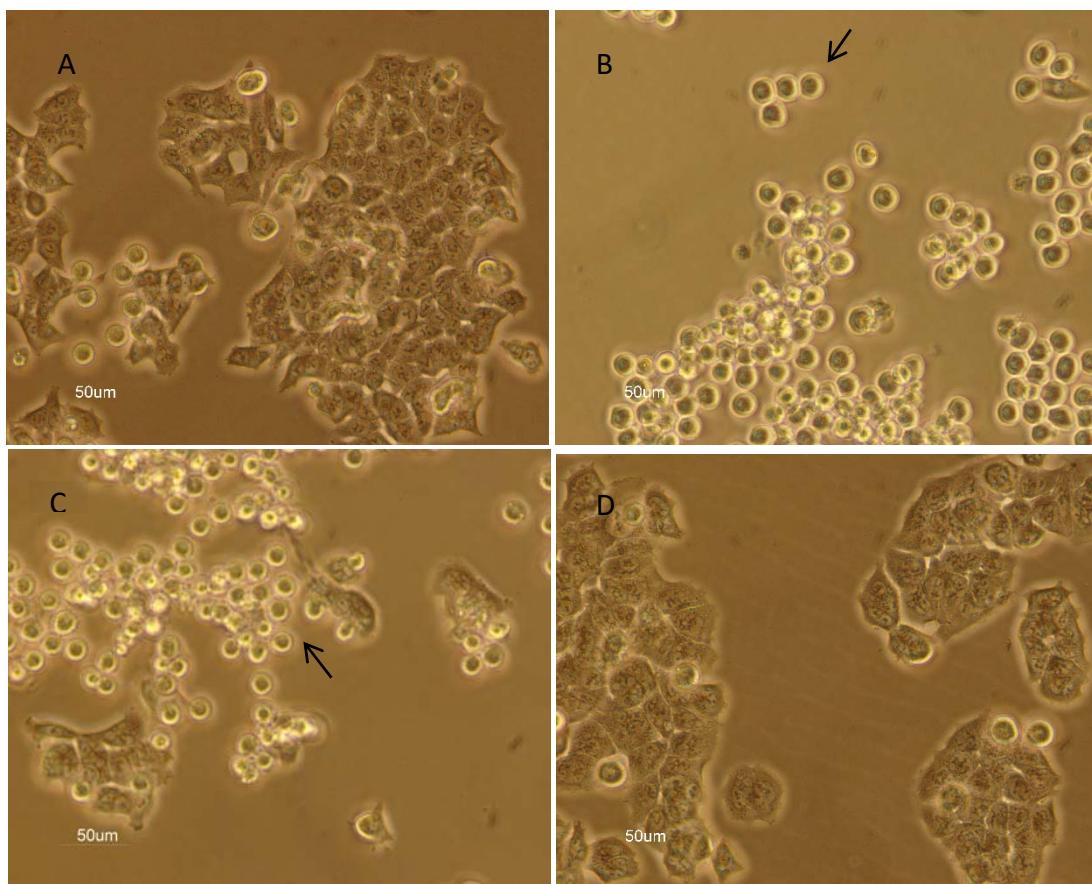


Figura 7. Células HCT116 WT. Sembradas a $1 \cdot 10^4$ cél/pocillo y cultivadas durante 24 horas sin nada (A), con vincristina a $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ (B), con docetaxel a $5 \mu\text{M}$ (C) y con barasertib a $1 \mu\text{M}$ (D). Se señalan con una flecha negra células que flotan con forma redondeada. Fotografías tomadas con el microscopio (E600/E400, Nikon) y el equipo de fotografía (DXM1200F, Nikon).

Por otra parte, este cambio en la morfología es indicativo de un bloqueo de la mitosis, ya que en dicha fase del ciclo celular se produce un aumento del volumen, pérdida de adhesión a la matriz y las células aparecen con forma esférica. En los cultivos control el porcentaje de células con esta morfología es bajo puesto que la mitosis transcurre en un intervalo breve de tiempo y en cada momento solo una pequeña fracción de células se encuentran en mitosis. Sin embargo, el tratamiento con los fármacos antimitóticos

vincristina y docetaxel produce una acumulación de células en mitosis ya que esta no se puede resolver debido al bloqueo de los microtúbulos.

Estos cambios en la morfología se observan tanto en las células WT como en las DKO porque el bloqueo de la mitosis inducido por estos fármacos es anterior a la activación de la vía intrínseca de la apoptosis, con lo que no depende de Bax y Bak.

Las células tratadas con barasertib tienen un tamaño mayor que las no tratadas o las tratadas con vincristina o docetaxel, en muchas de ellas se puede diferenciar en su interior dos núcleos o más (Figura 7. D y Figura 8.D) . El barasertib es un inhibidor de la aurora quinasa B (1.2.2 Mitosis y Aurora quinasas), una proteína implicada en la regulación del ciclo celular y con un papel muy importante en la citoquinesis. Al estar inhibida este proceso no se llevará a cabo correctamente y por eso aparecen células más grandes o con el doble de contenido celular.

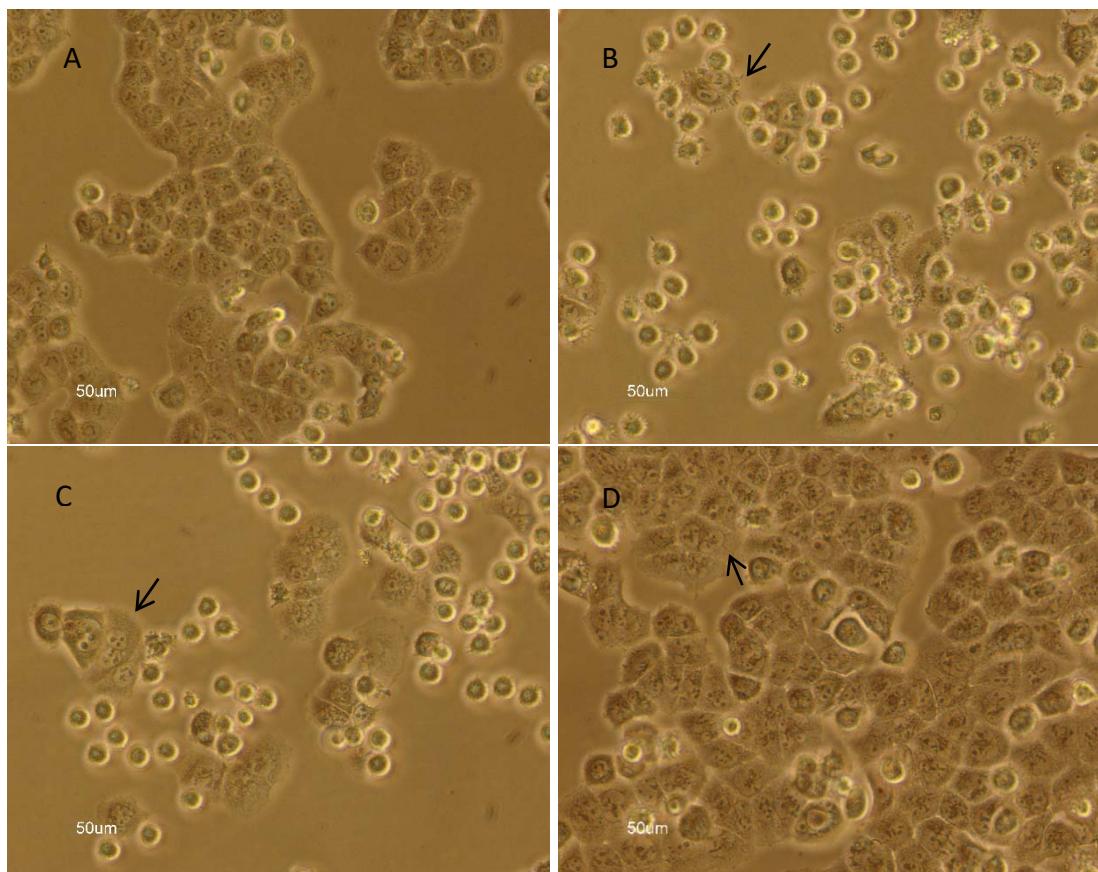


Figura 8. Células HCT116 Bax/Bak DKO. Sembradas a $1 \cdot 10^4$ cél/pocillo y cultivadas durante 24 horas sin nada (A), con vincristina a $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ (B), con docetaxel a $5 \mu\text{M}$ (C) y con barasertib a $1 \mu\text{M}$ (D). Se señalan con una flecha negra células que han sufrido “slippage” en los distintos tratamientos. Fotografías tomadas con el microscopio (E600/E400, Nikon) y el equipo de fotografía (DXM1200F, Nikon).

No obstante, se observan pocas células en mitosis, lo que indica que se ha producido un proceso denominado “slippage” por el que las células pueden salir de la mitosis sin producirse la citoquinesis. (ejemplo señalado en la Figura 8.D), en consecuencia, estas

células presentarán una dotación cromosómica 4n. Este proceso puede estar causado por defectos en el punto de control del ensamblaje del huso (SAC), por degradación gradual de la ciclina B1 que permite la activación del complejo promotor de la anafase (APC/C), o a problemas en la conexión entre la detención mitótica y los mecanismos de muerte celular.²⁸

También se observan células de mayor tamaño y/o multinucleadas en las células tratadas con vincristina y docetaxel (ejemplos señalados en Figura 8.B y Figura 8.C). Como se ha mencionado anteriormente estas células también han sufrido un bloqueo en la mitosis, con lo que también podría haber células que sufrieran este proceso de “slippage”.

Estas observaciones coinciden con lo observado al analizar las células mediante citometría. En los diagramas de puntos en los que se recoge la distribución de células conforme al volumen (dispersión frontal, FSC-H) y complejidad (dispersión lateral, SSC-H) se observan diferencias entre las células control y las células tratadas con los fármacos (Figura 1Figura 9). En el caso de las células tratadas con vincristina y docetaxel la población de células vivas es más homogénea que las células control, y se sitúa en la parte central del gráfico debido a la forma redondeada que adoptan estas células. En cambio, las células tratadas con barasertib difieren más, se encuentran desplazadas en el gráfico porque presentan un tamaño mayor y una forma no tan regular.

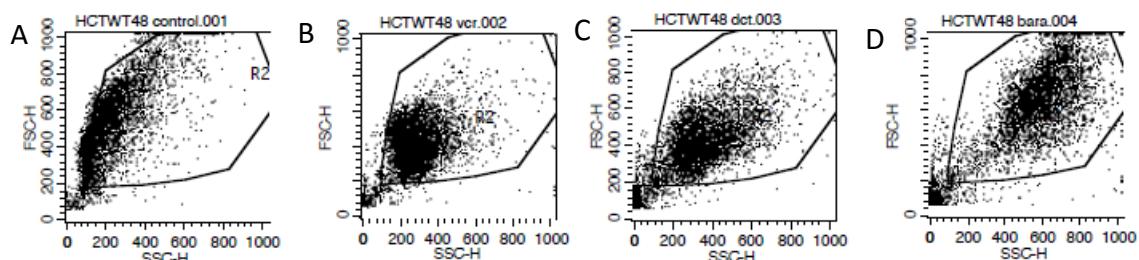


Figura 9. Distribución de células HCT116 WT según su morfología. Células tratadas durante 48 horas con nada (A), vincristina 1 µg/ml (B), docetaxel 5 µM (C) o barasertib 1 µM (D), marcadas con anexinaV-DY634 y analizadas en el citómetro.

4.2 Estudio de toxicidad

Para evaluar la toxicidad de estos tres compuestos sobre las células HCT 116, estas se cultivaron con estos en dos condiciones diferentes: por una parte, se cultivaron expuestas a los fármacos de manera continua durante todo el tiempo que duró el experimento. Por otra parte, se expuso las células a los fármacos y se lavaron, evaluando así la acción de estos fármacos si la exposición de las células a estos era en un corto periodo de tiempo (24 horas). El objetivo de este tipo de experimentos era evaluar si la acción de estos fármacos tras una exposición corta era irreversible e inducía la muerte celular.

Estos experimentos se realizaron simultáneamente en las células HCT 116 wild-type (WT) y las doble knock-out Bax/Bak (DKO), para poder estudiar el papel de la vía intrínseca en la acción de estos fármacos.

4.2.1 Vincristina

En las células tratadas con vincristina se observa un aumento del porcentaje de células apoptóticas que va aumentando conforme aumenta el tiempo de exposición a este fármaco (Figura 10.A). Este aumento es más pronunciado en el caso de las células WT, aumentando mucho la tasa de muerte en las últimas 24 horas de exposición. En las DKO la tendencia es prácticamente lineal y el porcentaje de muerte es menor que en las WT en todos los casos.

En cuanto a las células lavadas tras 24 horas de exposición al fármaco se observa una notable diferencia entre las células WT y las DKO (Figura 10.B). La muerte de las WT sigue una tendencia lineal ascendente, mientras que las DKO experimentan una muerte similar en las primeras 24 horas, pero en las siguientes apenas aumenta ese porcentaje, quedándose en un 30% de muerte aproximadamente. Esto podría indicar que en ausencia de Bax y Bak es necesario que el bloqueo de la mitosis sea continuo para inducir progresivamente la muerte celular.

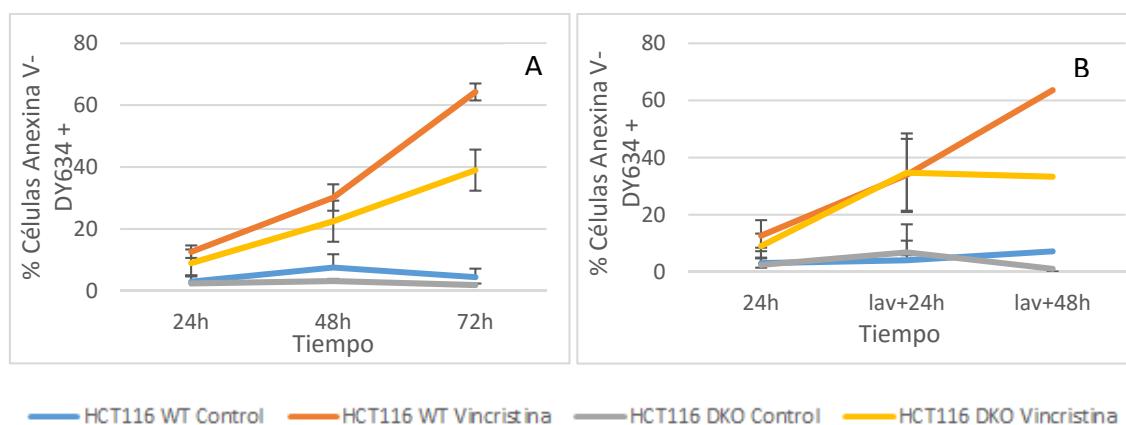


Figura 10. Porcentaje de muerte por apoptosis de células HCT116 tratadas con vincristina. Las células (HCT116 WT y Bax/Bak DKO) se sembraron a $1 \cdot 10^4$ cél/pocillo y tras 24 horas se trataron con vincristina a $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ y se analizó la exposición de fosfatidilserina por marcaje con anexinaV-DY634 y citometría de flujo a diferentes tiempos. (A) Incubación continua de células durante 72 horas con vincristina. (B) Incubación de células durante 24 horas con vincristina y 48 horas en medio completo. Los resultados son media \pm SD de cuatro experimentos independientes.

Tanto en el caso de las células tratadas durante todo el experimento como las que fueron lavadas, se produjo más muerte por apoptosis en las células WT. Esto tiene sentido porque las DKO tienen una de las vías de la apoptosis bloqueada, con lo que es lo esperado que sufran menos apoptosis.

En el caso de las células en las que se retiró la vincristina la diferencia es entre las WT y las DKO es mayor. Una posible explicación para esto sería que el efecto de la vincristina activa irreversiblemente la vía intrínseca de la apoptosis (vía que responde a estrés intracelular como en este caso sería el efecto de la vincristina sobre los microtúbulos, impidiendo su ensamblaje). Esto explicaría que cuando las células ya no están expuestas al fármaco, solo las células con esta vía activa seguirían sufriendo apoptosis a tan alto nivel.

También es posible que las células DKO, aunque no presenten un porcentaje tan alto de muerte por apoptosis, sufren otros mecanismos de muerte celular que en este trabajo no se han estudiado.

4.2.2 Docetaxel

De la misma manera, las células tratadas con docetaxel experimentan muerte por apoptosis, que aumenta de manera proporcional al tiempo de exposición (Figura 11.A). En las células WT en las últimas 24 horas se da un aumento mayor del porcentaje de apoptosis, mientras que en las DKO, en este intervalo de tiempo aumenta poco el porcentaje de células apoptóticas.

En los experimentos en los que las células que solo estuvieron en contacto con el fármaco durante 24 horas se observó una mayor diferencia entre las células WT y las DKO (Figura 11.B). Las WT presentan una curva similar a la de las células que han expuesttas al fármaco todo el tiempo. Las DKO sufren más apoptosis en las primeras 24 horas sin el fármaco que las WT (aunque la diferencia no es mucha), sin embargo, en las siguientes horas este número disminuye mucho.

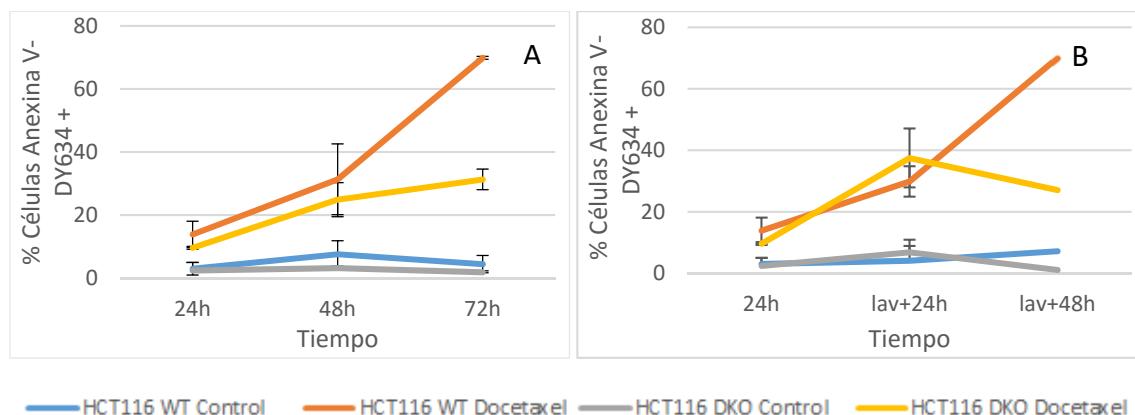


Figura 11. Porcentaje de muerte por apoptosis de células HCT116 tratadas con docetaxel. Las células (HCT116 WT y Bax/Bak DKO) se sembraron a $1 \cdot 10^4$ cél/pocillo y tras 24 horas se trataron con docetaxel a $5 \mu\text{M}$ y se analizó la exposición de fosfatidilserina por marcaje con anexinaV-DY634 y citometría de flujo a diferentes tiempos. (A) Incubación continua de células durante 72 horas con docetaxel. (B) Incubación de células durante 24 horas con docetaxel y 48 horas en medio completo. Los resultados son media \pm SD de cuatro experimentos independientes.

Al igual que ocurre con las células tratadas con vincristina, la diferencia entre las células WT y las DKO tratadas con docetaxel es significativa debido al bloqueo de la vía intrínseca de la apoptosis. En las células que solo han estado expuestas a docetaxel durante 24 horas el efecto es mucho menor en las DKO, lo que también podría ser explicado de la misma manera que la vincristina, con la hipótesis de que este compuesto, que impide el dinamismo de los microtúbulos, causa daños irreparables en la vía intrínseca de la apoptosis. De esta manera, las células DKO o bien pueden sobrevivir porque no sufren el daño de la misma manera o bien mueren por otros mecanismos.

4.2.3 Barasertib

El barasertib provoca un porcentaje de apoptosis bajo, que no varía mucho con el tiempo de exposición (Figura 12.A), y que es mayor en el caso de las células WT. En el caso de las células que se lavaron tras 24 horas de exposición, los porcentajes de células apoptóticas observadas son todavía menores y desciden con el tiempo hasta valores menores incluso que los de las células control (Figura 12.B). En este caso, también las células DKO sufren menor porcentaje de apoptosis, aunque la diferencia es menor con el paso del tiempo.

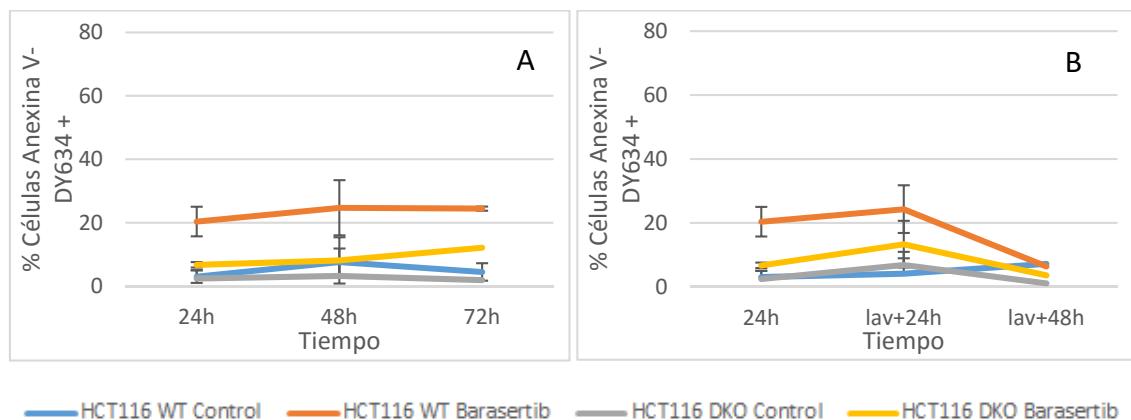


Figura 12. Porcentaje de muerte por apoptosis de células HCT116 tratadas con barasertib. Las células (HCT116 WT y Bax/Bak DKO) se sembraron a $1 \cdot 10^4$ cél/pocillo y tras 24 horas se trataron con barasertib a $1 \mu\text{M}$ y se analizó la exposición de fosfatidilserina por marcaje con anexinaV-DY634 y citometría de flujo a diferentes tiempos. (A) Incubación continua de células durante 72 horas con barasertib. (B) Incubación de células durante 24 horas con barasertib y 48 horas en medio completo. Los resultados son media \pm SD de cuatro experimentos independientes.

En este caso la diferencia entre las células WT y las DKO afecta solo al tratamiento continuo, que como se ha comentado con anterioridad, responde al hecho de que las DKO tienen una vía de apoptosis bloqueada. Las células lavadas tras 24 horas de contacto con el barasertib muestran unos resultados muy similares en los dos tipos de células.

Podría ser que los daños celulares producidos por el barasertib desencadenasen la muerte celular por otros mecanismos no apoptóticos. Sin embargo, estos resultados siguen la misma línea que los obtenidos en otros ensayos con tumores sólidos que parecen indicar que este fármaco no tiene tanto efecto en estos.²⁷

Otros resultados del laboratorio indican que el barasertib sólo no induce muerte celular en la mayoría de las células, sino que produce salida de la mitosis con doble contenido de DNA y senescencia. Es probable que la combinación del barasertib con otros compuestos que activen la vía de la apoptosis pudiera potenciar la actividad antitumoral²⁸.

4.3 Ensayo clonogénico

Para estudiar el efecto de los fármacos sobre las células a largo plazo, se realizó un ensayo clonogénico, en el que las células estuvieron expuestas a los fármacos durante 48 horas, luego se lavaron y se dejaron crecer durante una semana.

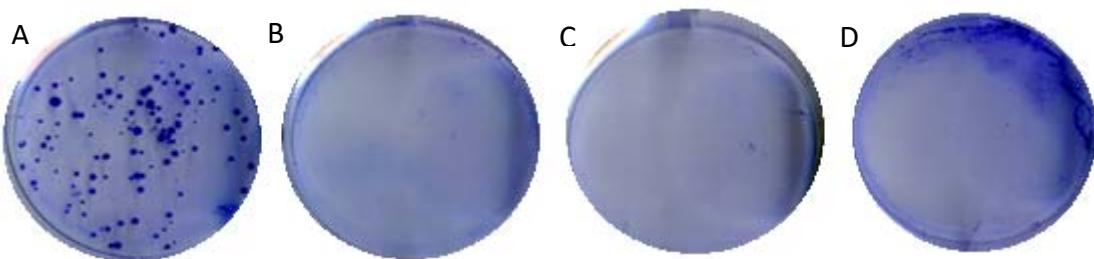


Figura 13. Crecimiento de colonias obtenido en el ensayo clonogénico con las células HCT116 WT. Las células se sembraron a 200 cél/pocillo y tras 24 horas de incubación se añadieron los fármacos, con los que se incubaron 48 horas. Tras siete días adicionales la placa se reveló por una tinción con cristal violeta. El pocillo A corresponde a las células control, el B a las tratadas con vincristina al 1 µg/ml, el C a las tratadas con docetaxel a 5 µM y el D a las tratadas con barasertib a 1 µM.

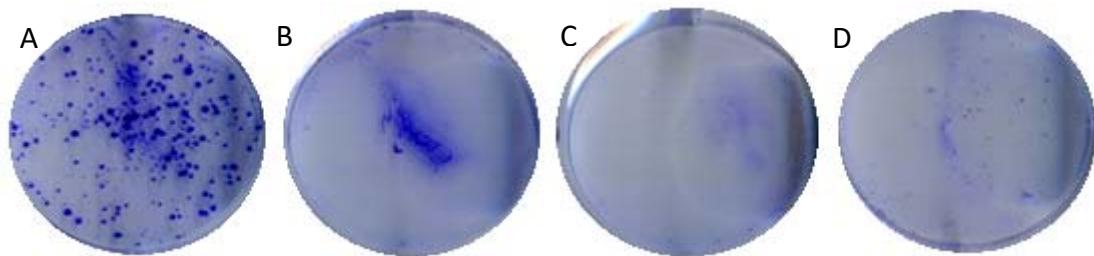


Figura 14. Crecimiento de colonias obtenido en el ensayo clonogénico con las células HCT116 Bax/Bak DKO. Las células se sembraron a 200 cél/pocillo y tras 24 horas de incubación se añadieron los fármacos, con los que se incubaron 48 horas. Tras siete días adicionales la placa se reveló por una tinción con cristal violeta. El pocillo A corresponde a las células control, el B a las tratadas con vincristina al 1 µg/ml, el C a las tratadas con docetaxel a 5 µM y el D a las tratadas con barasertib 1 µM.

En ninguno de los tres casos se observó la aparición de colonias, que solo aparecieron en las células control (Figura 13 y Figura 14). En el caso del barasertib se observaban puntos un poco más teñidos (Figura 14.D), pero que no llegaban a ser una colonia.

Estos resultados difieren un poco de los obtenidos en el estudio de toxicidad analizado en el apartado anterior. En él se veía que, aunque los fármacos ejercían su efecto antimitótico sobre las células, no era tan eficientes, pues aunque la vincristina y el docetaxel consiguieran porcentajes de muerte elevados ninguno de los dos llegaba al 100% como en este ensayo (mucho menos el barasertib). Además, los valores elevados se obtenían tras una exposición continua a los fármacos, en el caso de las células DKO, y en este ensayo las células han estado expuestas a las diferentes sustancias durante solo 48 horas y después fueron lavadas.

Esta diferencia podría indicar que con tiempos de exposición mayores a los fármacos, los efectos irreversibles de estos en las células aumentan considerablemente. Sin embargo, esta diferencia se deba probablemente, a que al estar sembradas a mucha menor concentración, el contacto con el agente va a ser mayor y esto va a provocar que todas las células van a internalizarlo en su interior y ahí este ejercerá su acción mortal y ninguna célula podrá proliferar. Esto significaría que los fármacos son muy eficientes induciendo la muerte de las células una vez que estas los internalizan, y que las células que no han muerto en el ensayo de toxicidad es porque no han llegado a entrar en contacto con el fármaco, no porque este no haya hecho efecto sobre ellas.

Otra posible explicación es que no se haya producido muerte de la totalidad de las células, pero las células supervivientes no hayan podido proliferar para generar colonias de tamaño adecuado para ser visibles. Para comprobar esta hipótesis se observaron las placas al microscopio.

Al observar al microscopio los pocillos de células tratadas con vincristina y docetaxel, no se pueden distinguir claramente células, dando resultados muy parecidos. En el caso de las DKO aparece suciedad y restos celulares teñidos y en el caso de las WT, además de estos restos celulares aparecen estructuras celulares vacías, se ven círculos con el citoplasma retraído teñido.

En el caso del barasertib se observan, tanto en las DKO como en las WT, además de los restos celulares teñidos, estructuras celulares muy grandes que aparecen de manera aislada. Células individuales, o grupos de tres o cuatro células, que por su gran tamaño dan lugar a esos puntos violetas que aparecen en el pocillo sin llegar a ser colonias (Figura 15).

Es decir, que las células tratadas con barasertib, aunque no pueden proliferar no quedan tan dañadas como las tratadas con los otros dos compuestos. Esto sí podría reflejar un menor efecto antitumoral de este compuesto ya que su efecto sería exclusivamente antiproliferativo pero no citotóxico.

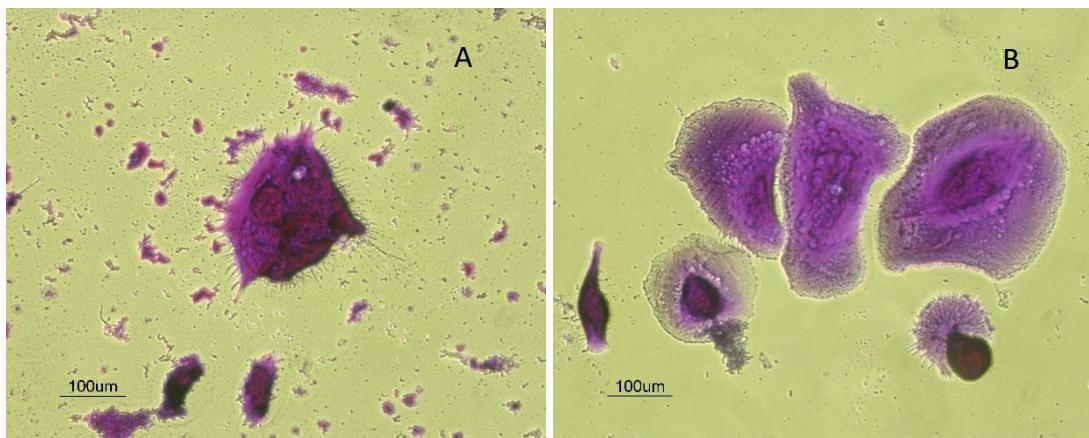


Figura 15. Células HCT116 tratadas en un ensayo clonogénico con barasertib. La imagen A son células WT, y la imagen B son Bax/Bak DKO. Fotografías tomadas tras el revelado con cristal violeta con el microscopio (E600/E400, Nikon) y el equipo de fotografía (DXM1200F, Nikon).

Los resultados obtenidos en este experimento son orientativos, ya que no reflejan la realidad de las células tumorales cuando forman parte de un tumor en el organismo. Ya que, en tumores sólidos, como es el caso del cáncer colorrectal, las células se encuentran muy próximas entre sí, creciendo hacinadas en un espacio pequeño, lejos de las condiciones en las que se realizan estos ensayos, con unas densidades celulares tan bajas.

4.4 Discusión general

Al comparar los resultados obtenidos con los tres fármacos y observar las gráficas se ve que los resultados del tratamiento con vincristina y docetaxel son bastante similares entre sí, mientras que los del barasertib difieren más.

La vincristina y el docetaxel, dan lugar a patrones de muerte celular muy parecidos, tanto en el caso de las células WT que han estado expuestas a los fármacos durante todo el tiempo que dura el experimento como en el caso de los experimentos en que los fármacos fueron retirados. La muerte por apoptosis causada por estos fármacos aumenta de manera directamente proporcional al tiempo, alcanzando en ambos casos valores entre el 60 y 80% de muerte a las 72 horas, tanto en los casos de exposición continua al fármaco, como aquellos en que la exposición al fármaco ha durado solo 24 horas.

De la misma manera, también provocan los cambios en la morfología de las células tratadas, haciendo que estas se despeguen y aparezcan flotando con formas redondeadas.

Para futuras aplicaciones clínicas en el tratamiento de cáncer colorrectal, estos dos fármacos podrían tener un futuro prometedor. Sin embargo, habría que tener en cuenta que en tumores en las que aparecen mutadas Bax y Bak (o quizás también otras proteínas de la familia Bcl-2 con un papel importante en la apoptosis) estos compuestos no serían los más adecuados, ya que su efecto es mucho menor.

En cuanto al barasertib, sus efectos no son tan buenos. Presenta unos porcentajes de muerte inducida muy bajos, mínimos en el caso de una exposición corta. Aunque morfológicamente se ven claramente sus efectos (**Figura 7.D**, Figura 8.D, Figura 9.D), el arresto en la anafase (que no sería compatible con la vida estable y la proliferación de las células) y el aumento de tamaño no parece ser suficiente para provocar la apoptosis.

Estos resultados coinciden con anteriores estudios de barasertib en células HCT116, en los que se observa que este compuesto tiene una baja capacidad de inducción de la apoptosis y requiere de exposiciones prolongadas.¹⁹ Sin embargo, también se ha observado que este mismo compuesto en otras líneas celulares (Colo205 y RKO) de cáncer colorrectal tiene capacidad de inhibir el crecimiento celular con una exposición de 24 horas y posterior lavado y cultivo en medio normal.¹⁹ Estas diferencias pueden deberse a la diferente expresión de proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular y la apoptosis.

5. CONCLUSIONES

- La vincristina y el docetaxel producen efectos similares en la línea celular de cáncer colorrectal HCT116 y presentan una alta toxicidad y una alta capacidad de inhibir la proliferación celular provocando lesiones irreversibles en las células.
- Los fármacos que alteran la dinámica de los microtúbulos, la vincristina y el docetaxel, provocan daños que desencadenan la vía intrínseca de la apoptosis, siendo este el mecanismo de muerte celular mayoritario en las células tratadas con estos compuestos.
- El barasertib no es muy tóxico en la línea celular de cáncer colorrectal HCT116 y tampoco produce una inhibición de la proliferación celular significativa.

5. CONCLUSIONS

- Vincristine and docetaxel produce similar effects in the colorectal cell line HCT116 and present a high toxicity and a significant capacity of inhibiting cell proliferation, causing irreversible damage in cells
- Drugs that alter microtubules' dynamics, vincristine and docetaxel, cause damage that triggers the intrinsic pathway of apoptosis, and this cell death mechanism is the most common in cells treated with these compounds.
- Barasertib is not very toxic in the colorectal cell line HCT116 and it doesn't cause a significant cell proliferation inhibition either.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kroemer, G. *et al.* Classification of Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* **16**, 3–11 (2009).
2. Bajwa, N., Liao, C. & Nikolovska-Coleska, Z. Inhibitors of the anti-apoptotic Bcl-2 proteins: a patent review. *Expert Opin. Ther. Pat.* **22**, 37–55 (2012).
3. R&D System. Apoptosis II : Beyond Cytochrome c ; the Other Mitochondrial Proteins. *R&D Syst. 2004 Cat.* (2004).
4. Cooper, G. M. & Hausman, R. E. *La Célula.* (Marbán, 2010).
5. Michael Sattler, Heng Liang, David Nettlesheim, Robert P. Meadows, John E. Harlan, Matthias Eberstadt, Ho Sup Yoon, Suzanne B. Shuker, Brian S. Chang, Andy J. Minn, Craig B. Thompson, S. W. F. Structure of Bcl-xL-Bak Peptide Complex: Recognition Between Regulators of Apoptosis. *Science (80-).* **275**, 983–986 (1997).
6. Westphal, D., Dewson, G., Czabotar, P. E. & Kluck, R. M. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1813**, 521–531 (2011).
7. Dewson, G. & Kluck, R. M. Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis. *J. Cell Sci.* **122**, 2801–8 (2009).
8. Samuel, S. *et al.* VSV oncolysis in combination with the BCL-2 inhibitor obatoclax overcomes apoptosis resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Mol. Ther.* **18**, 2094–103 (2010).
9. Donaldson, K. L., Goolsby, G. L., Kiener, P. A. & Wahl, A. F. Activation of p34cdc2 coincident with taxol-induced apoptosis. *Cell Growth Differ.* **5**, 1041–50 (1994).
10. Jordan, M. A., Thrower, D. & Wilson, L. Mechanism of Inhibition of Cell Proliferation by Vinca Alkaloids1. *CANCER Res.* **51**, 2212–2222 (1991).
11. Prakash, V. & Timasheff, S. N. Mechanism of interaction of vinca alkaloids with tubulin: catharanthine and vindoline. *Biochemistry* **30**, 873–880 (1991).
12. Moudi, M., Go, R., Yong, C., Yien, S. & Nazre, M. Vinca Alkaloids. *Int. J. Prev. Med.* **4**, 1231–1235 (2013).
13. Drugs.com. Drugsite Trust (EEUU) [actualizado 2 may 2016; revisado 18 jun 2016]. Disponible en: <https://www.drugs.com/>
14. Guérinne-Voegelein, F. *et al.* Relationships between the structure of taxol analogues and their antimitotic activity. *J. Med. Chem.* **34**, 992–998 (1991).
15. Gelmon, K. The taxoids: paclitaxel and docetaxel. *Lancet* **344**, 1267–1272 (1994).
16. Canales, A. *et al.* Insights into the interaction of discodermolide and docetaxel with tubulin. Mapping the binding sites of microtubule-stabilizing agents by using an integrated NMR and computational approach. *ACS Chem. Biol.* **6**, 789–799 (2011).

17. MedlinePlus en español [Internet]. Bethesda (MD): Biblioteca Nacional de Medicina (EE. UU.); [actualizado 15 jul 2014; consulta 18 jun 2016]. Disponible en: <http://medlineplus.gov/spanish/>.
18. Wang, L. G., Liu, X. M., Kreis, W. & Budman, D. R. The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis:a review. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **44**, 355–361 (1999).
19. Alferez, D. G. *et al.* Inhibition of Aurora-B kinase activity confers antitumor efficacy in preclinical mouse models of early and advanced gastrointestinal neoplasia. *Int. J. Oncol.* **41**, 1475–85 (2012).
20. Gautschi, O. *et al.* Aurora kinases as anticancer drug targets. *Clinical Cancer Research* **14**, 1639–1648 (2008).
21. Pohl, A. *et al.* Pharmacogenetic profiling of Aurora kinase B is associated with overall survival in metastatic colorectal cancer. *Pharmacogenomics J.* **11**, 93–99 (2011).
22. Zhang, T. *et al.* Survivin-induced Aurora-B kinase activation: A mechanism by which APC mutations contribute to increased mitoses during colon cancer development. *Am. J. Pathol.* **177**, 2816–26 (2010).
23. Yang, J. *et al.* AZD1152, a novel and selective aurora B kinase inhibitor, induces growth arrest, apoptosis, and sensitization for tubulin depolymerizing agent or topoisomerase II inhibitor in human acute leukemia cells in vitro and in vivo. *Blood* **110**, 2034–2040 (2007).
24. Keen, N. & Taylor, S. Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 927–936 (2004).
25. Löwenberg, B. *et al.* Phase 1/2 study to assess the safety, efficacy, and pharmacokinetics of barasertib (AZD1152) in patients with advanced acute myeloid leukemia. *Blood* **118**, 6030–6036 (2011).
26. Collins, G. P. *et al.* A phase II trial of AZD1152 in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *British Journal of Haematology* **170**, 886–890 (2015).
27. Boss, D. S. *et al.* Clinical evaluation of AZD1152, an i.v. inhibitor of Aurora B kinase, in patients with solid malignant tumors. *Ann. Oncol.* **22**, 431–437 (2011).
28. Marzo, I. & Naval, J. Antimitotic drugs in cancer chemotherapy: promises and pitfalls. *Biochem. Pharmacol.* **86**, 703–710 (2013).
29. Wilson, G. B. The assay of antimitotics. *Chromosoma* **16**, 133–143 (1965).
30. ATCC catalogue [Internet]. ACTT (EEUU) [actualizado; revisado 7 may 2016]. Disponible en: http://www.lgcstandards-atcc.org/?geo_country=es.