

TESI DOCTORAL

**CARACTERITZACIÓ DE LA RESPOSTA DE CÈL·LULES
TUMORALS A LES MITRAMICINES**

Marc Bataller Chardi
Barcelona, maig de 2009

RESULTATS.

4. RESULTATS.

L'etapa prèvia al disseny de posteriors experiments va ser determinar la densitat del inòcul inicial per a cada línia cel·lular que ens assegura que treballem en condicions de creixement exponencial.

4.1. DETERMINACIÓ DE LA DENSITAT INICIAL DEL INÒCUL.

Les corbes de creixement de les diferents línies cel·lulars HCT116 es varen obtenir mitjançant el cultiu de diferents densitats d'inòcul inicial, durant diferents temps. Es varen preparar un rang de densitats d'inòcul compreses entre $6,25 \times 10^2$ i 1×10^4 cèl·lules per pou en un volum de 100 μ l. El temps d'incubació va ser variable: 0, 24, 72, 96, fins 120 h. La densitat del inòcul adequat es va seleccionar d'acord amb la detecció colorimètrica a una longitud d'onda de 570 nm del formazà produït pel trencament de l'anell de tetrazoli del MTT (veure Materials i Mètodes). Aquest mètode va permetre seguir l'augment de l'activitat metabòlica relacionada amb l'augment en el nombre de cèl·lules. D'aquesta manera, es pot saber quant temps és necessari per a tenir el cultiu en fase de creixement exponencial a una densitat donada.

La Figura R1 mostra que l'absorbància és directament proporcional al nombre de cèl·lules HCT116 p53+/+ sembrades en el inici de l'assaig. En les corbes de creixement s'observen una fase de latència, una exponencial i una fase de saturació. La densitat d'inòcul cel·lular de $2,5 \times 10^4$ cèl·lules/ml inicialment sembrades va presentar una relació lineal entre absorbància i densitat del inòcul en tots els temps. Per a cultius de densitats inicials superiors a $2,5 \times 10^4$ cèl·lules/ml la relació de linealitat no va ser bona, així com per a densitats inferiors. Tant les cèl·lules HCT116 p53-/- com les cèl·lules HCT116 p21-/- es comporten exactament igual que les cèl·lules HCT116 p53+/+, com a conseqüència, segons els resultats, les condicions òptimes de densitat d'inòcul cel·lular van ser a partir de $2,5 \times 10^4$ cèl·lules/ml, amb una duració màxima d'assaig, des del inici de l'experiment fins 120 h. D'aquesta manera, com els tractaments amb les Mitramicines començaven 24 hores després d'haver inoculat els

subcultius, els experiments realitzats amb les línies HCT116 partien d'una densitat de 5000 cèl·lules/ml.

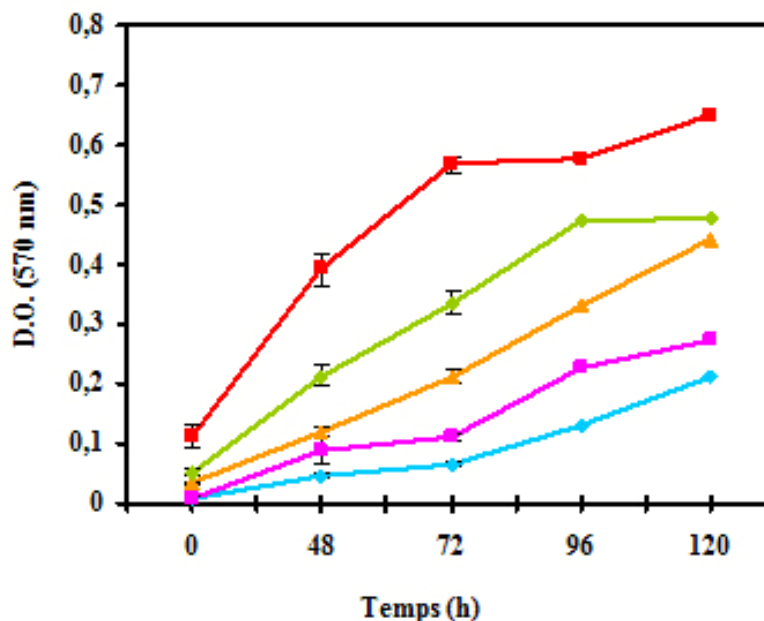


Figura R1. Determinació del nombre de cèl·lules de la línia HCT116 p53+/+ calculada mitjançant l'assaig colorimètric del MTT en microplaques de 96 pous. La duració en hores del cultiu s'indica en el eix d'ordenades. Els resultats representen la Mitjana \pm SD (desviació estàndard) de 6 experiments independents. Inòcul inicial: \blacklozenge 625, \blacksquare 1250, \blacktriangle 2500, \blacklozenge 5000, \blacksquare 10000 cèl·lules/100 μ l.

4.2. DETERMINACIÓ DE LA CAPACITAT DE LES MITRAMICINES D'INHIBIR LA PROLIFERACIÓ EN LES LÍNIES CEL·LULARS HCT116.

La capacitat de la Mitramicina A i Mitramicina SK d'inhibir el creixement cel·lular es va determinar també mitjançant l'assaig colorimètric del MTT. Les cèl·lules es van incubar amb concentracions creixents de cada fàrmac durant 24, 48, 72 i 96 hores, i es va determinar la capacitat de proliferació de les cèl·lules (Materials i Mètodes). A partir dels resultats obtinguts es varen construir les corbes de supervivència que es mostren en la Figura R2.

A partir d'aquests resultats es varen calcular les concentracions de cada molècula que inhibeixen el creixement cel·lular un 50 ó un 75%, dosis IC_{50} e IC_{75} , respecte a les mateixes cèl·lules sense tractar.

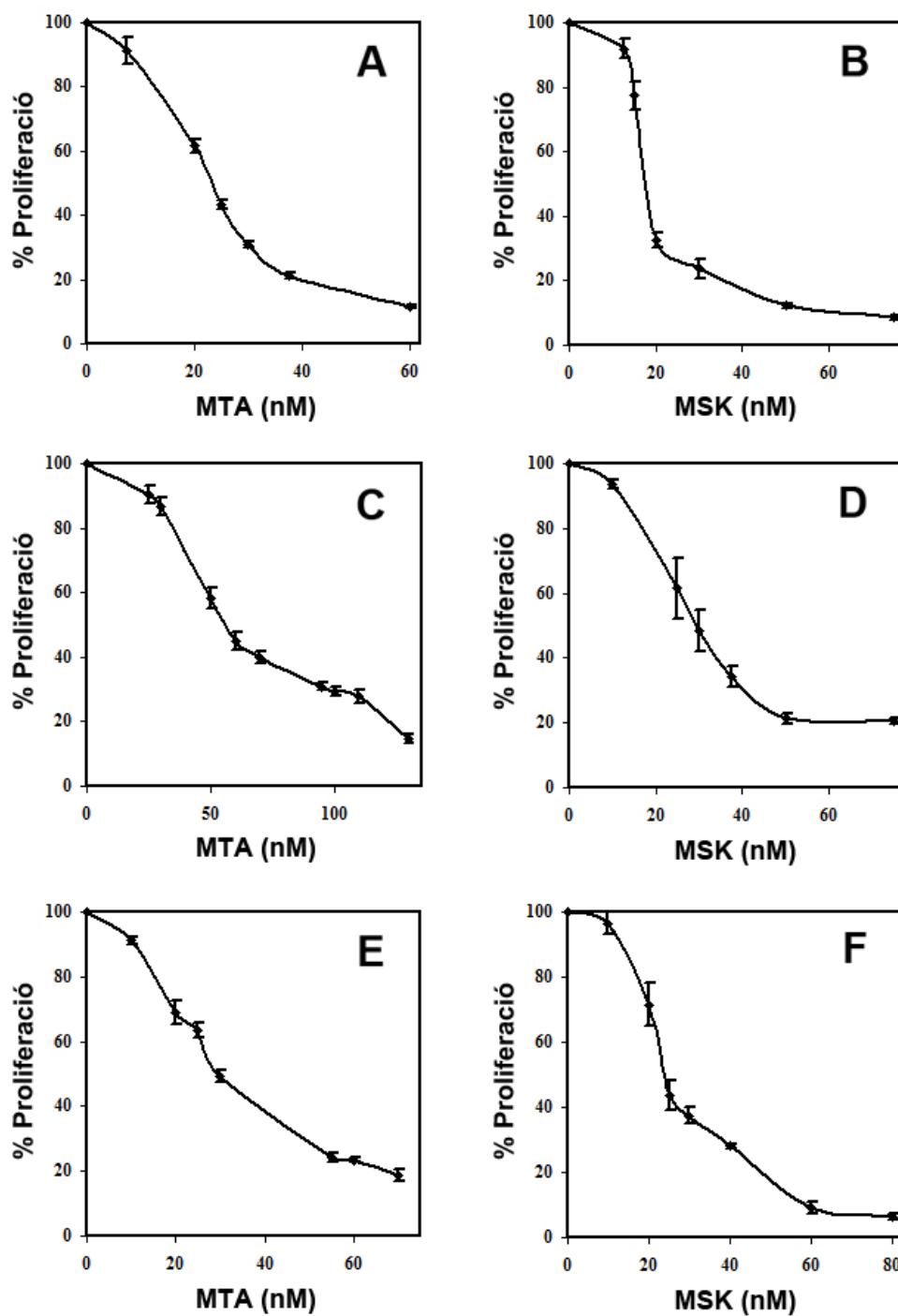


Figura R2. Citotoxicitat de Mitramicina A (MTA) i Mitramicina SK en cèl·lules HCT116 p53+/+ (A i B), HCT116 p53-/- (C i D) i HCT116 p21-/- (E i F). La supervivència es va determinar mitjançant el mètode del MTT en cèl·lules incubades amb les Mitramicines durant 72 hores (veure Materials i Mètodes). Els resultats s'expressen com el percentatge de proliferació cel·lular respecte al control sense tractar, que representa el 100%. Es representa el promig i la SEM de 6-9 experiments independents.

La Taula R1 (panell superior) mostra els valors IC_{50} e IC_{75} calculats per a les cèl·lules HCT116 p53+/+ després de 72 hores de tractament continu amb Mitramicina

A o Mitramicina SK. Les concentracions IC_{50} e IC_{75} obtingudes per la Mitramicina A van ser 22.86 nM i 33.94 nM (valors promitjos) respectivament. En el cas de la Mitramicina SK, el valor obtingut per a la IC_{50} va ser de 17.11 nM, mentre que la IC_{75} tenia un valor de 23.96 nM. En el cas de la línia HCT116 p53^{-/-} (Taula R1, panell central), els valors IC_{50} i IC_{75} calculats per la Mitramicina A van ser 57.28 nM i 124.31 nM respectivament, mentre que les IC_{50} e IC_{75} obtingudes per a la Mitramicina SK van ser 28.86 nM i 47.56 nM, respectivament. El valor IC_{50} per a la Mitramicina A calculada en les cèl·lules HCT116 p21^{-/-} (Taula R1, panell inferior) va ser de 30.40 nM, mentre que la IC_{75} a les 72 hores va ser de 54.14 nM. Les concentracions IC_{50} e IC_{75} obtingudes per a la Mitramicina SK van ser 23.67 nM i 40.97 nM, respectivament. S'ha demostrat que les concentracions de Mitramicina SK necessàries per a inhibir el creixement cel·lular van ser sempre inferiors a les de Mitramicina A.

Taula R1. Valors de les concentracions de Mitramicina A i Mitramicina SK que inhibeixen el creixement cel·lular un 50% (dosis IC_{50}) o un 75% (dosis IC_{75}) en les línies HCT116 p53^{+/+}, HCT116 p53^{-/-} i HCT116 p21^{-/-}. Els valors es varen determinar a partir dels resultats de les corbes de creixement que es mostren en la Figura R2. S'indiquen els valors promig i la SEM de, al menys, sis experiments independents.

HCT116 p53 ^{+/+}	IC_{50} (nM)	IC_{75} (nM)
Mitramicina A	22.86 ± 0.76	33.94 ± 1.09
Mitramicina SK	17.11 ± 1.05	23.96 ± 4.40
<i>Ratio</i> MTA/MSK	1.3	1.4

HCT116 p53 ^{-/-}	IC_{50} (nM)	IC_{75} (nM)
Mitramicina A	57.28 ± 2.74	124.31 ± 27.36
Mitramicina SK	28.9 ± 3.98	47.6 ± 6.71
<i>Ratio</i> MTA/MSK	2.0	2.6

HCT116 p21 ^{-/-}	IC_{50} (nM)	IC_{75} (nM)
Mitramicina A	30.40 ± 1.51	54.14 ± 5.11
Mitramicina SK	23.67 ± 2.27	40.97 ± 1.77
<i>Ratio</i> MTA/MSK	1.3	1.3

D'aquests resultats es dedueix que, al menys en les línies cel·lulars analitzades, la Mitramicina SK es comporta com un agent antiproliferatiu més eficaç. Les diferències entre els valors IC_{75} per a la Mitramicina A i la Mitramicina SK varen ser estadísticament significants per totes les línies cel·lulars (*t-Student*); per a les línies HCT116 p53+/+ i HCT116 p53-/- amb una $p < 0.01$, i per la línia HCT116 p21-/- amb una $p < 0.02$.

Els experiments mostrats en aquesta memòria estan realitzats amb la IC_{75} de Mitramicina SK, perquè ha demostrat tenir un efecte citotòxic a dosis més baixes que la Mitramicina A. La MTA s'uneix de forma més forta al DNA que no pas la MSK *in vitro* (Barceló et al., 2007); així que la major activitat de la MSK podria ser deguda a una millora en l'absorció per part de la cèl·lula (Albertini et al., 2006).

A l'hora de dissenyar els experiments que es mostraran a continuació decidim realitzar tractaments continus amb la IC_{75} de Mitramicina SK durant 72 hores (moment en que es va determinar el valor IC_{75} del fàrmac). Passat aquest període de temps, es va substituir el medi de cultiu per medi lliure de fàrmac. D'aquesta manera, podem estudiar si l'efecte dels fàrmacs es mantenia en el temps, inclòs en absència dels fàrmacs.

4.3. QUANTIFICACIÓ DELS EFECTES CITOTÒXICS I CITOSTÀTICS DE LA MITRAMICINA SK EN LES LÍNIES CEL·LULARS HCT116.

L'assaig del MTT ens permet determinar el percentatge d'inhibició del creixement cel·lular per a la Mitramicina SK. No obstant això, aquest tipus d'assaig no permet discriminar si la inhibició del creixement és deguda a la inducció de la mort cel·lular (efecte citotòxic) o a l'aturada de la progressió del cicle cel·lular (efecte citostàtic). Per aquest motiu, varem realitzar també el recompte cel·lular, i analitzar la distribució de les fases del cicle cel·lular al llarg del temps.

4.3.1. Anàlisi de la viabilitat cel·lular després del tractament amb Mitramicina SK.

El recompte del nombre de cèl·lules vives i mortes després del tractament amb Mitramicina SK, es va realitzar mitjançant la tinció amb blau de tripà, al llarg de diferents temps.

La Figura R3 mostra el comptatge de les cèl·lules vives en les tres línies cel·lulars. En tots tres casos, les corbes de creixement de les cèl·lules control són exponencials, mentre que les cèl·lules tractades pateixen una inhibició del creixement a partir de les 24 hores de tractament i es manté fins a les 72 hores. Un cop el medi de cultiu es substituït per medi lliure de fàrmac, tant la línia cel·lular HCT116 p53^{-/-} com la línia cel·lular HCT116 p21^{-/-} pateixen un decrement del nombre de cèl·lules vives, indicant mort cel·lular. Les cèl·lules HCT116 p53^{+/+} segueixen patint una inhibició del creixement al llarg del temps, tot i l'absència de fàrmac.

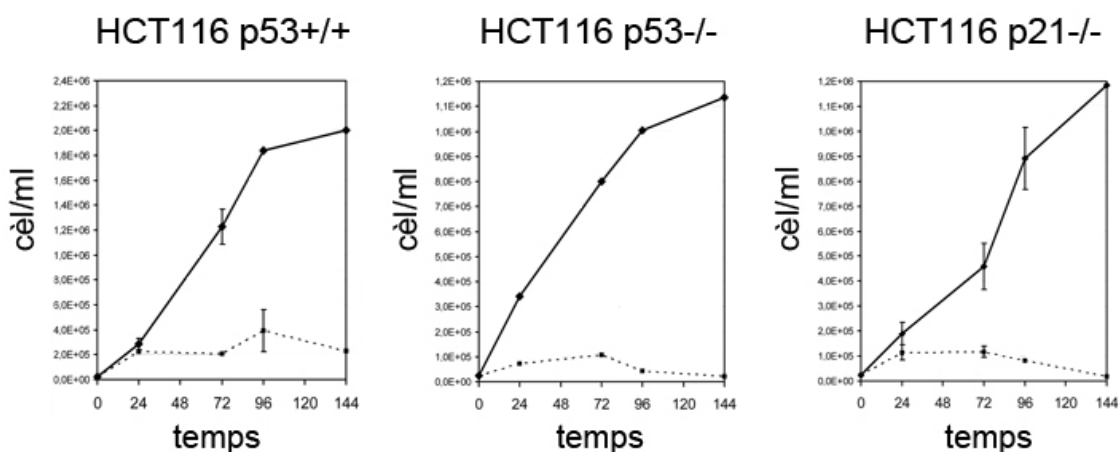


Figura R3. Concentració de cèl·lules (cèl/ml) al llarg de 144 h de tractament amb MSK (concentracions IC₇₅ de cada línia cel·lular). A les 72 h de tractament varem canviar el medi de cultiu i varem afegir medi de cultiu lliure de MSK. (Línia contínua: cèl·lules sense tractar; línia discontinua: cèl·lules tractades amb MSK; mitjana de 3 experiments ± SD)

La Taula R2 mostra la viabilitat cel·lular de les tres línies cel·lulars en front al tractament amb Mitramicina SK. Es pot observar com, a mida que passa el temps, la viabilitat en les cèl·lules HCT116 p53^{+/+} es veu molt poc reduïda en comparació amb les altre dos línies cel·lulars, en les quals la mortalitat, tal com veiem a la Figura R3, s'incrementa un cop hem eliminat el medi de cultiu i hem afegit medi lliure de fàrmac.

Taula R2. Recompte de la viabilitat cel·lular (%) de les tres línies cel·lulars tractades amb la dosis IC_{75} de la Mitramicina SK durant 72 hores amb el posterior canvi de medi de cultiu. Es va realitzar el recompte mitjançant una tinció amb Blau de Tripà de les cèl·lules adherides en la superfície del flascó. Els valors representen la mitjana de 3-6 experiments \pm SD.

	72 h	72 h + 24 h	72 h + 48 h
HCT116 p53+/+	96.9 \pm 2.6	88.6 \pm 6.3	86.6 \pm 9.4
HCT116 p53-/-	90.5 \pm 1.8	68.7 \pm 3.5	27.6 \pm 0.9
HCT116 p21-/-	91.2 \pm 7.3	77.1 \pm 0.2	40.9 \pm 1.4

Les cèl·lules HCT116 creixen adherides al flascó de cultius. Les cèl·lules que moren es van “desenganxant” de la superfície i es troben en suspensió en el sobrenadant. Per aquest motiu, el recompte de la viabilitat es va realitzar en les cèl·lules adherides al flascó i també en les cèl·lules en suspensió. Els resultats que es mostren en la Taula R2 corresponen al recompte de la viabilitat cel·lular en la monocapa (adherides) ja que, en molts casos, els sobrenadants contenen una gran quantitat de fragments cel·lulars (*debris*), impossibilitant realitzar un recompte fiable. Per tant, hem de tenir en compte que la viabilitat cel·lular total en aquests casos (cèl·lules adherides i en suspensió), va ser sempre inferior als valors que es mostren en la Taula R2. Malgrat això, a l'hora de realitzar els experiments posteriors sempre es va utilitzar cèl·lules adherides, ja que són les que presenten una major viabilitat i són les que perduraran en el temps.

D'aquests resultats es pot deduir que la IC_{75} de la MSK provoca una inhibició de la proliferació en les tres línies cel·lulars, tot i això, la línia HCT116 p53+/+ és més resistent al tractament amb MSK que la resta de línies cel·lulars. A més, el canvi de medi de cultiu, després del tractament, provoca una disminució dràstica de la viabilitat en les línies cel·lulars HCT116 p53-/- i HCT116 p21-/-.

4.3.2. Anàlisi de les pertorbacions del cicle cel·lular induïdes per la Mitramicina SK.

Si es compara els resultats de l'assaig del MTT (Figura R2) amb els resultats de la viabilitat cel·lular, s'observa que la inhibició del creixement cel·lular no sempre estava associada a la inducció de la mort cel·lular (Taula R2). Com exemple, 25 nM MSK inhibeix a les 72 hores de tractament continu, el creixement del 75% de les cèl·lules HCT116 p53+/+ (Figura R2), no obstant, la viabilitat cel·lular després de 72 hores amb aquest tractament és de gairebé un 97% (Taula R2). A partir d'aquests resultats es dedueix que la inhibició del creixement cel·lular podria estar causada, al menys inicialment, per l'aturada de la progressió del cicle cel·lular en alguna de les seves fases. Per aquest motiu, decidim realitzar una tinció amb iodur de propidi i analitzar la distribució de les diferents fases del cicle cel·lular en un citometre de flux.

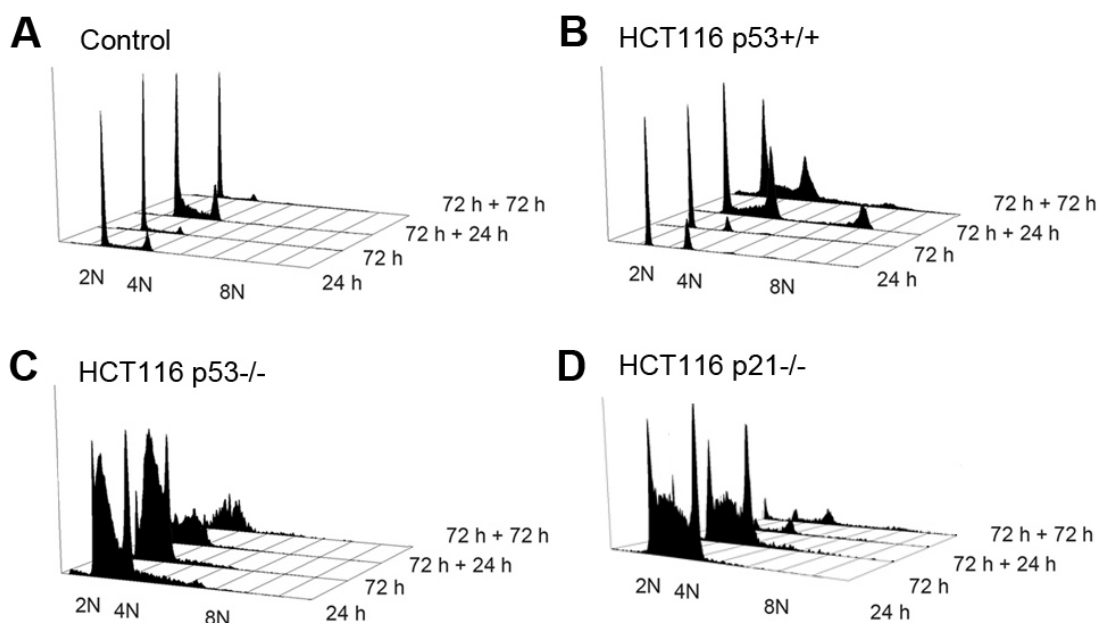


Figura R4. Alteracions en la distribució del cicle al llarg del temps induïdes per la Mitramicina SK sobre les línies cel·lulars HCT116 p53+/+ (B), HCT116 p53-/- (C) i HCT116 p21-/- (D). La distribució del cicle cel·lular es va determinar mitjançant la tinció amb iodur de propidi de les cèl·lules i el seu posterior anàlisi en un citometre de flux. Es van realitzar, al menys, 3 experiments independents, amb resultats similars.

La Figura R4 mostra les variacions temporals en la distribució del cicle cel·lular de les cèl·lules tractades amb la IC₇₅ de MSK determinada a les 72 hores per cada línia

cel·lular, tenyides amb iodur de propidi i analitzades en un citometre de flux. Es va realitzar en paral·lel l'anàlisi de la distribució del cicle cel·lular de cèl·lules sense tractar (control). En totes les línies cel·lulars analitzades, les cèl·lules control mantenen un patró de distribució constant al llarg del temps, típic de les cèl·lules que proliferen amb normalitat, amb la majoria de cèl·lules en la fase G1 (Figura R4A).

L'anàlisi del cicle cel·lular va revelar que el tractament continu durant 72 hores en les cèl·lules HCT116 p53+/+ amb la IC₇₅ de MSK provocava una aturada en la fase G1 (més del 80% del total de la població), el que comportava una desaparició total de cèl·lules en fase S (Figura R4B). Un cop eliminat el medi que contenia el fàrmac i afegit medi de cultiu fresc, va aparèixer, en 24 hores, una població amb una ploïdia superior a 4N, la qual representava aproximadament el 22% del total de la població, encara que la resta de la població semblava que es recuperava, atès que la distribució del cicle era similar a la del control. Aquesta distribució es va mantenir fins passades al menys 72 hores d'haver canviat el medi de cultiu, moment en que també es va observar l'aparició d'un pic sub-G0/1, corresponent a cèl·lules mortes. D'aquests resultats es deduïa que la MSK provocava una forta aturada del cicle cel·lular en fase G1, però quan varem analitzar el seu efecte un cop varem canviar el medi de cultiu i consegüent eliminació de la MSK lliure en el medi, provocava l'aparició de poliploïdies que es mantien al llarg del temps. Tenint en compte la importància tant de *p53* com de *p21^{WAF1}* en el control del cicle cel·lular, en la mort cel·lular i en la formació de poliploïdies (veure Introducció), varem considerar de gran interès analitzar l'efecte de la MSK sobre les línies cel·lulars HCT116 p53-/- i HCT116 p21-/-.

La Figura R4C mostra la distribució de les fases de les cèl·lules HCT116 p53-/- tractades amb la IC₇₅ de MSK. S'observa com el tractament durant 72 hores va provocar una acumulació de cèl·lules tant en fase S com en fase G2/M. A les 24 hores de tractament també s'observa una petita i poc definida població amb una ploïdia superior a 4N (3% de la població). Varem observar que, després del canvi de medi, les cèl·lules es morien de forma dràstica. Les cèl·lules es trobaven al sobrenadant, la gran majoria mortes (anàlisi mitjançant la tinció amb Blau de Tripà).

El tractament de les cèl·lules HCT116 p21-/- amb la IC₇₅ de MSK durant 72 hores, també va induir una aturada en la fase G2/M com a les cèl·lules HCT116 p53-/- i

l'aparició d'una població de ploïdia superior a 4N poc definida de gairebé el 8% de la població (Figura R4D). L'aturada en la fase S no era tan pronunciada com en les cèl·lules HCT116 p53^{-/-}, i a més no seguia un patró normal. En aquesta línia cel·lular també varem observar que el canvi de medi de cultiu provocava la mort cel·lular. D'aquests resultats es pot deduir que la MSK provocava en les cèl·lules HCT116 p53^{-/-} i HCT116 p21^{-/-} un alteració total del cicle cel·lular.

4.3.3. Anàlisi de la proliferació cel·lular induïda per la Mitramicina SK.

Es va realitzar un assaig addicional per tal de confirmar amb tota seguretat que la Mitramicina SK provoca una inhibició de la proliferació cel·lular a les tres línies cel·lulars fins a les 72 hores.

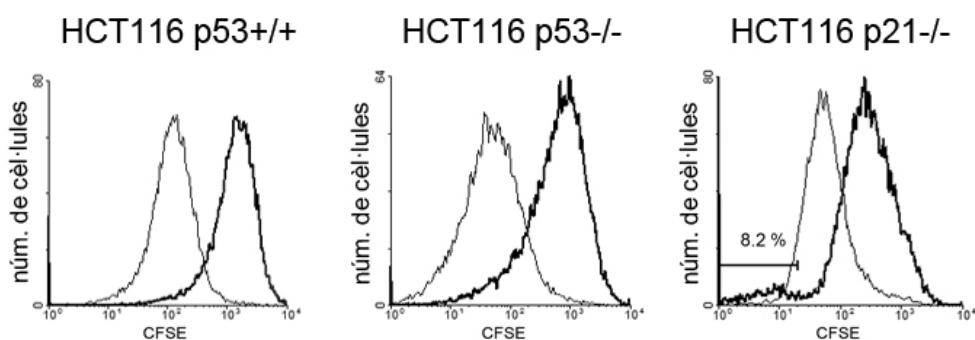


Figura R5. Tinció amb CFSE després de 72 hores de tractament amb la IC₇₅ de MSK per cada línia cel·lular. La línia prima representa les cèl·lules sense tractar. La línia gruixuda representa les cèl·lules tractades. Es varen realitzar experiments independents per triplicat i es van obtenir resultats similars.

En un principi l'aturada del cicle cel·lular en qualsevol fase hauria de provocar una inhibició de la divisió cel·lular. Per aquest motiu es van tnyir les cèl·lules amb CFSE i es va monitorar la divisió de les cèl·lules tractades. Quan les cèl·lules tnyides amb CFSE es divideixen, reparteixen el colorant de manera equitativa entre les cèl·lules filles, resultant en la reducció de la fluorescència quan són analitzades al citometre de flux (Materials i Mètodes). Les cèl·lules que han deixat de proliferar donen valors més elevats de fluorescència quan s'analitzen al citometre de flux. Els resultats obtinguts amb la tnció de CFSE (Figura R5) confirmaren que, efectivament, les cèl·lules tractades amb la IC₇₅ de MSK durant 72 hores proliferaven com a conseqüència de l'aturada del cicle cel·lular. Només en el cas de les HCT116 p21^{-/-} varem observar una

petita població (aprox. 8,2%) que sí que proliferava, escapant de l'aturada del cicle cel·lular i que podrien correspondre al 8% de cèl·lules poliploides que es van observar a les 72 hores de tractament (Figura R4D).

4.4. ANÀLISI DE LA SENESCÈNCIA CEL·LULAR INDUÏDA PER MITRAMICINA SK.

Per comprovar si els tractaments que produïen l'aturada del cicle cel·lular en les fases G1 i G2/M (Figura R4) estaven relacionades amb la inducció de la senescència cel·lular, es va determinar l'activitat SA- β -galactosidasa lisosomal a pH 4.0 i pH 6.0 (Materials i Mètodes). En ambdós casos (cèl·lules tractades i cèl·lules sense tractar) varem detectar activitat enzimàtica a pH 4.0 (Figura R6B). No obstant això, només les cèl·lules HCT116 p53^{+/+} tractades amb la IC₇₅ de MSK a les 72 hores varen presentar activitat SA- β -gal lisosomal a pH 6.0, coincidint en el moment en que la majoria de les cèl·lules estaven aturades en G1 (Figura R5). Aproximadament el 55% de les cèl·lules HCT116 p53^{+/+} tractades amb MSK a les 72 hores van ser capaces de processar el substrat X-gal a pH 6.0 (Figura R6A). En el cas de les línies cel·lulars HCT116 p53^{-/-} i HCT116 p21^{-/-} no es van trobar evidències clares de presència de senescència tot i l'aturada en G2/M que presenten les dues línies cel·lulars.

També varem comprovar l'activitat enzimàtica lisosomal en el moment del canvi de medi de cultiu, ja que representa un punt clau en el comportament de les cèl·lules analitzades. Com era d'esperar a les línies cel·lulars HCT116 p53^{-/-} i HCT116 p21^{-/-} no es va observar cap activitat enzimàtica lisosomal associada a la senescència ja que la gran majoria de cèl·lules estaven mortes. Mentre que el percentatge de cèl·lules HCT116 p53^{+/+} analitzades després del canvi de medi de cultiu que presentaven activitat enzimàtica lisosomal associada a senescència es va reduir considerablement.

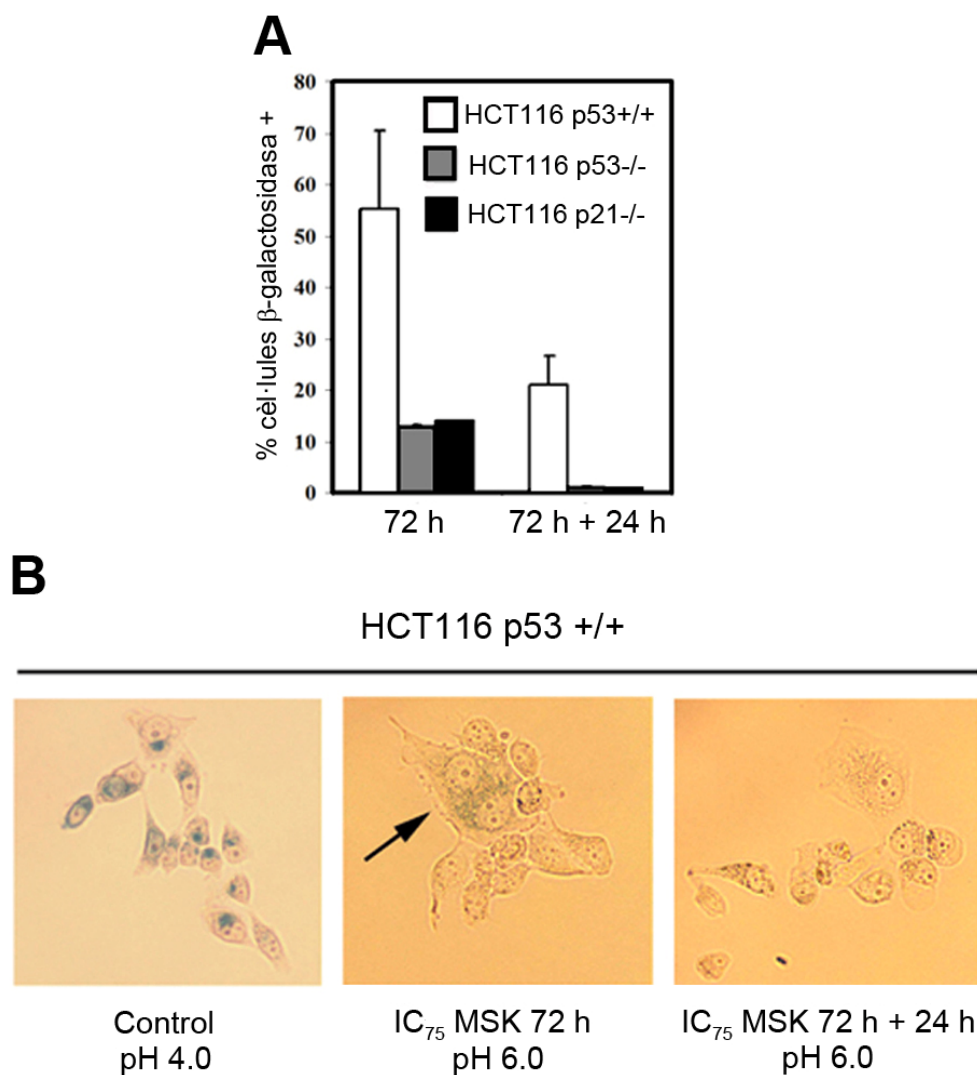


Figura R6. Determinació de l'activitat SA-β-gal lisosomal a pH 6.0 en cèl·lules HCT116 tractades amb la IC₇₅ de MSK. Les tincions es van realitzar a les 72 hores de tractament i a les 24 hores de canviar el medi de cultiu. (A) Percentatge de cèl·lules amb activitat SA-β-gal lisosomal a pH 6.0 per cada línia cel·lular i temps analitzats. El resultat mostra la mitjana de 3 experiments independents ± SD. (B) Imatges representatives de cèl·lules sense tractar (control) tenyides a pH 4.0 on es demostra que totes les cèl·lules són positives a la tinció, cèl·lules tractades amb la IC₇₅ de MSK durant 72 hores (la fletxa indica la presència d'una cèl·lula positiva per la tinció a pH 6.0) i cèl·lules tractades amb la IC₇₅ de MSK durant 72 h + 24 h negatives per la tinció a pH 6.0.

Per verificar la pèrdua de senescència de les cèl·lules HCT116 p53+/+ varem analitzar la dispersió directa (FS) i dispersió lateral (SS) de les cèl·lules tractades amb la IC₇₅ de MSK a les 72 hores i a les 24 hores posteriors al canvi de medi de cultiu. Les cèl·lules senescentes tenen una mida major i un augment de granularitat citoplasmàtica (veure Materials i Mètodes). Un augment en el FS es correlaciona amb un augment en la

mida de les cèl·lules, mentre que un augment en el SS es correlaciona amb un augment en la granularitat citoplasmàtica.

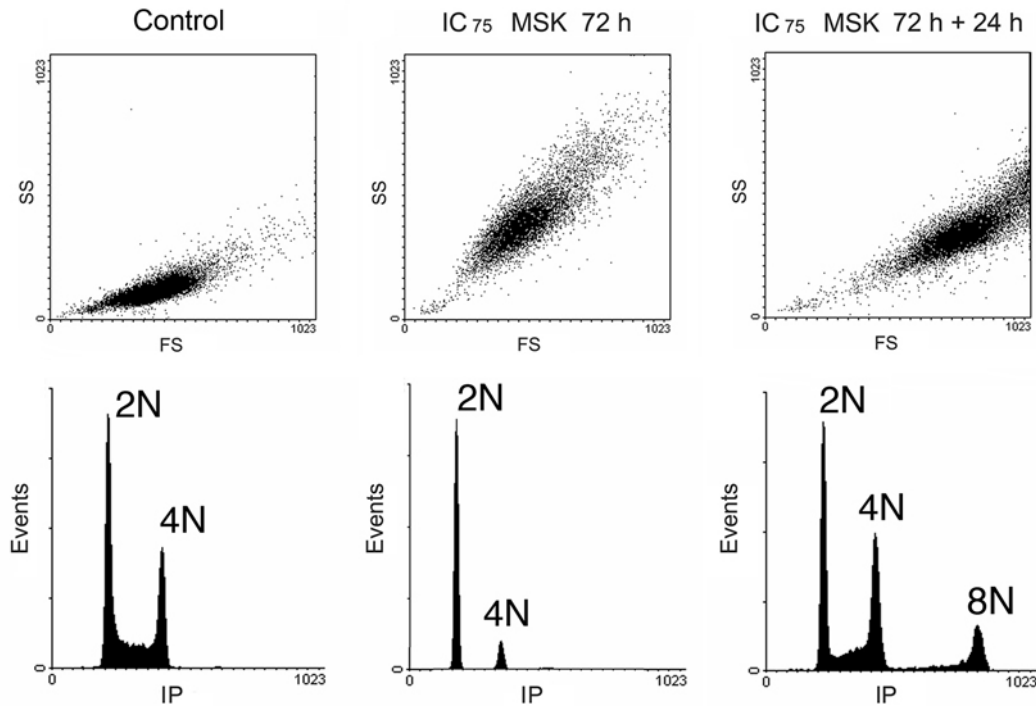


Figura R7. Determinació de la mida i granularitat de les cèl·lules HCT116 p53+/+ tractades amb la IC₇₅ de MSK a les 72 hores i 24 hores després d'haver canviat el medi de cultiu, i la distribució del cicle cel·lular corresponent a cada condició. Es varen realitzar experiments independents per triplicat amb resultats similars.

La Figura R7 mostra com, en les cèl·lules HCT116 p53+/+ tractades amb la IC₇₅ de MSK a les 72 hores, els valors tant de FS com de SS augmentaven respecte a les cèl·lules sense tractar (control), moment en que coincidia l'aturada del cicle cel·lular en la fase G1 i l'aparició d'un fenotip senescent (Figura R6). Quan varem analitzar aquests dos paràmetres 24 hores després de canviar el medi de cultiu, varem veure com, tot i que la dispersió directa (FS) seguia elevada, la dispersió lateral (SS) va disminuir indicant la pèrdua de granularitat citoplasmàtica però no de la grandària de les cèl·lules.

A partir d'aquests resultats varem deduir que la MSK no provocava senescència en les cèl·lules HCT116 p53-/- i HCT116 p21-/- tot i l'aturada en la fase G2/M del cicle cel·lular que té lloc fins a les 72 hores de tractament. Respecte a les cèl·lules HCT116 p53+/+, l'aturada en la fase G1 del cicle cel·lular sí que va provocar l'aparició d'un fenotip senescent, però aquest efecte no va ser permanent, ja que al canviar el medi de cultiu la presència de la senescència va baixar de forma notable així com la granularitat

citoplasmàtica. Aquesta pèrdua de la senescència podria explicar la reentrada al cicle cel·lular de forma descontrolada i l'aparició d'una abundant població poliploide. Les cèl·lules poliploides tenen una mida més gran que la resta de cèl·lules diploides, la qual cosa podria fer que al calcular la dispersió directa d'una població, aquesta es vegi incrementada, tal com va ocórrer en el nostre cas.

4.5. ANÀLISI DE LA SÍNTESI DE DNA EN CÈL·LULES HCT116 TRACTADES AMB MITRAMICINA SK.

Per comprovar que l'aparició d'una població poliploide era conseqüència d'una ràpida entrada en el cicle cel·lular i la conseqüent replicació del DNA, varem analitzar la síntesi de DNA mitjançant la incorporació de BrdU (veure Materials i Mètodes). Es va afegir BrdU al medi de cultiu, de forma que les cèl·lules que estiguin replicant el podien incorporar al seu DNA. Mitjançant un anticòs específic contra el BrdU que conté un fluorocrom verd es van detectar les cèl·lules que sintetitzaven DNA. A més, tenyint el nucli cel·lular amb iodur de propidi, varem poder veure les diferents etapes de la interfase i analitzar si hi havia alguna anomalia en el cicle cel·lular.

La Figura R8 mostra la distribució de les fases del cicle cel·lular junt amb la capacitat de síntesi de les cèl·lules en fase S d'una població control. La figura mostra la típica imatge en forma de "U" invertida que s'obté quan la població cel·lular prolifera de forma normal en un cultiu cel·lular. No varem analitzar les cèl·lules HCT116 p53+/+ durant les 72 hores de tractament amb la IC₇₅ de MSK, perquè més del 80% de la població estava aturada en la fase G1 i la fase S corresponia només a un 0,7% de la població (Figura R4B). Varem analitzar les cèl·lules HCT116 p53+/+ tractades amb MSK 24 hores després de canviar el medi de cultiu, i varem observar que, com era d'esperar, la població cel·lular amb una ploïdia >4N apareixia després que les cèl·lules en G2 entressin al cicle cel·lular sense acabar de dividir-se i tornant a sintetitzar DNA duplicant la seva ploïdia, tot això es va produir en només 24 hores.

El mateix experiment es va realitzar en cèl·lules HCT116 p53-/- després de 72 hores de tractament amb la IC₇₅ de MSK, moment on varem observar una major acumulació de cèl·lules en fase S i G2/M (Figura R4C). La Figura R8 mostra que les cèl·lules HCT116 p53-/- en fase S del cicle cel·lular no sintetitzaven DNA, ja que no

apareixia la “U” invertida, característica de les cèl·lules en fase S. Al igual que l’aparició d’un pic sub-G1 és representatiu de la mort cel·lular a partir de cèl·lules de la fase G1, una acumulació de cèl·lules en fase S que no sintetitza pot ser deguda a la mort cel·lular a partir de cèl·lules de la fase G2/M. Més endavant s’aprofundirà en aquest punt (veure apartat 4.6.). Tot i que les cèl·lules HCT116 p21^{-/-} també estaven aturades en la fase G2/M del cicle cel·lular, i també presentaven una acumulació de cèl·lules en la fase S (Figura R4), aquestes cèl·lules sí sintetitzaven DNA; a més es va detectar síntesi en les cèl·lules amb una ploïdia >4N. Tot i això, la població detectada en la fase S no estava prou definida, indicant que podria haver una barrejada de cèl·lules sintetitzant i d’altres mortes des de G2/M.

A partir d’aquests resultats varem deduir que en les cèl·lules HCT116 p53^{+/+} la població poliploide que apareixia al cap de 24 hores d’haver canviat el medi de cultiu provenia d’una reentrada en el cicle cel·lular de les cèl·lules en fase G2/M. Aquest fenomen es coneix amb el nom d’endoreduplicació, el qual es caracteritza per una falta de divisió cel·lular seguida per una ràpida entrada en el cicle cel·lular, així les cèl·lules 4N es comporten com cèl·lules en fase G1 i tornen a entrar en fase S replicant el DNA per segona vegada (Chang et al., 2000; Erenpreisa et al., 2005). El resultat és la aparició d’una població 8N.

Tot el contrari va ocórrer en les cèl·lules HCT116 p53^{-/-}. L’acumulació de cèl·lules en la fase S del cicle cel·lular no corresponia a cèl·lules que estaven sintetitzant DNA, sinó a cèl·lules mortes des de la fase G2/M. Així que la mort cel·lular que varem observar tant en el comptatge cel·lular (Figura R3) com en la distribució del cicle cel·lular (Figura R4) no es donava un cop varem canviar el medi de cultiu, sinó que les cèl·lules es morien des de G2/M durant les 72 hores de tractament. Al canviar el medi de cultiu es detectava un increment notable de mort cel·lular (Figura R4).

En el cas de les cèl·lules HCT116 p21^{-/-} sí que varem observar síntesi de DNA, però no era tan clara com en les cèl·lules HCT116 p53^{+/+} ja que l’acumulació de cèl·lules en la fase S semblava ser deguda a una barreja de cèl·lules vives i cèl·lules mortes. Tot i això, l’aparició de síntesi de DNA en cèl·lules poliploides ens indicava que les cèl·lules HCT116 p21^{-/-} presentaven una certa proliferació, tal i com veiem en

la Figura R5. El canvi de cultiu en aquesta línia cel·lular també semblava ser crític per la supervivència cel·lular (Figura R4).

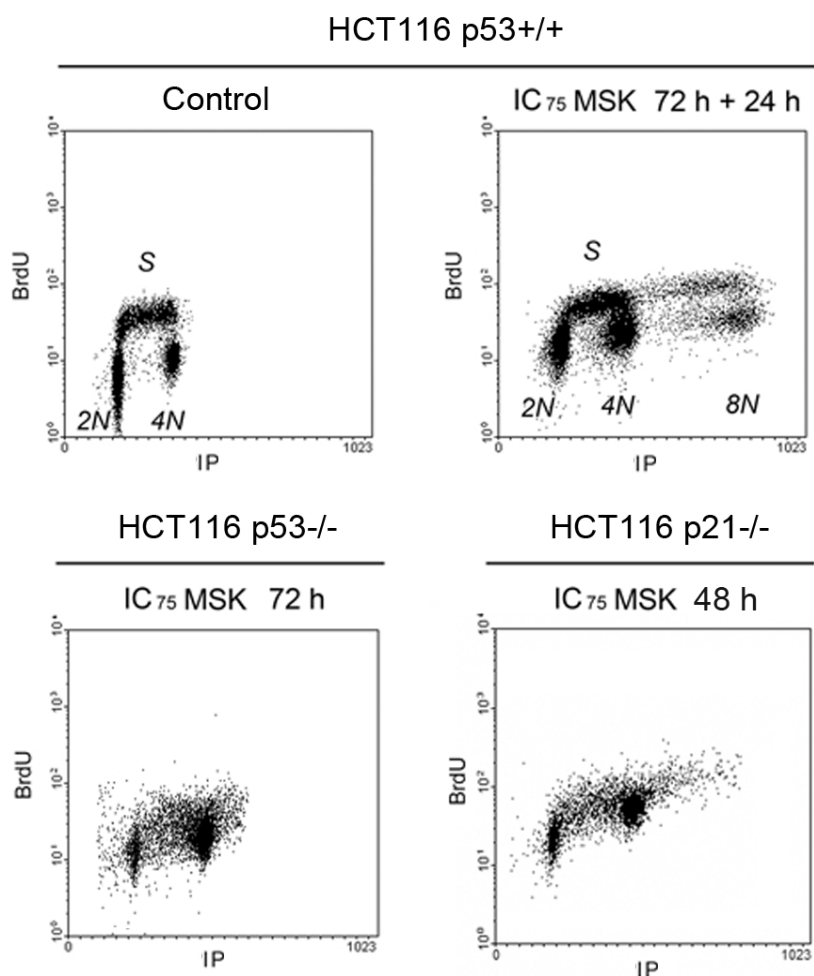


Figura R8. Determinació de la capacitat de les cèl·lules de sintetitzar DNA mitjançant la incorporació de BrdU. El control que es mostra correspon a cèl·lules HCT116 p53+/+ sense tractar, els controls de la resta de línies cel·lulars, es comportava de forma idèntica. Varem analitzar la línia cel·lular HCT116 p53+/+ a les 24 hores del canvi de medi de cultiu, després d'haver tractat amb la IC₇₅ de MSK durant 72 hores. Varem analitzar la línia cel·lular HCT116 p53^{-/-} a les 72 hores del tractament amb la IC₇₅ de MSK i la línia cel·lular HCT116 p21^{-/-} a les 48 hores del tractament amb la IC₇₅ de MSK. Es varen realitzar 3 experiments independents amb resultats similars.

4.6. ANÀLISI DE LA FRACCIÓ MITÒTICA EN CÈL·LULES HCT116 TRACTADES AMB MITRAMICINA SK.

A partir de les observacions realitzades, varem trobar interessant analitzar la fracció mitòtica de les cèl·lules HCT116 tractades amb la IC₇₅ de Mitramicina SK.

Mitjançant un anticòs que reconeix una modificació post-transcripcional de la Histona 3 només present en les cèl·lules en mitosis, podem diferenciar les cèl·lules que es troben en la fase G2 de les que es troben en fase M. Aquesta modificació post-transcripcional és una fosforilació de la serina 10 en la cua de la Histona 3 (H3pS10) i està present des de la profase fins la telofase. Amb aquest assaig es calcula l'índex mitòtic, que és el percentatge de cèl·lules en mitosis d'una població cel·lular. Si, a més, tenim el nucli cel·lular amb iodur de propidi, podem veure en quina fase del cicle es dona la mitosis i analitzar si hi ha alguna anomalia. Les cèl·lules que proliferen de forma normal, on la majoria de cèl·lules es troben en fase G1, l'índex mitòtic sol ser del 2-4%.

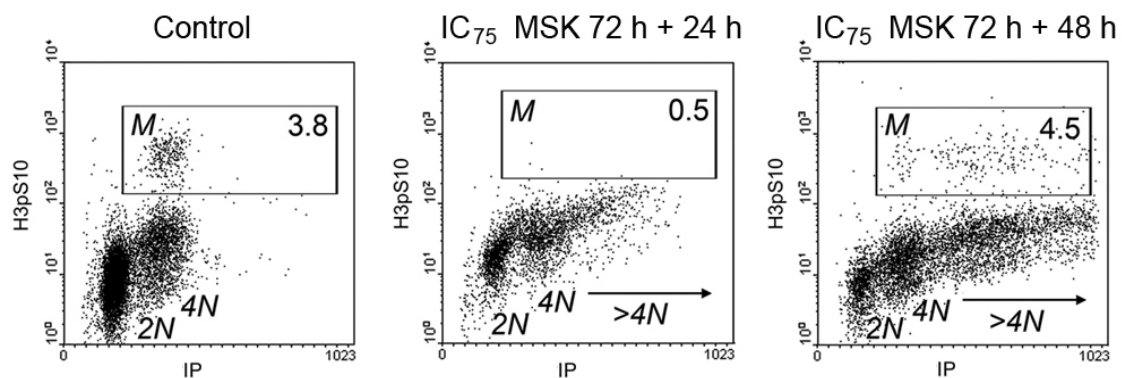


Figura R9. Determinació de l'índex mitòtic en cèl·lules HCT116 p53+/. El control correspon a les cèl·lules analitzades a les 72 h + 24 h, però sense afegir fàrmac, i segueix un patró idèntic al control de les 72 h + 48 h. Varem analitzar la línia cel·lular HCT116 p53+/- a les 24 i a les 48 hores del canvi de medi de cultiu, després d'haver tractat amb la IC₇₅ de MSK durant 72 hores. Experiments independents realitzats per triplicat amb resultats similars.

La Figura R9 mostra la distribució de les fases del cicle cel·lular de les cèl·lules HCT116 p53+/- sense tractar (control) on es pot diferenciar entre les fases G1, G2 i M. Per comprovar si les cèl·lules poliploides que apareixien després del tractament amb la IC₇₅ de MSK, provenien d'un error en la mitosis (normalment degut a que les cèl·lules no completen la citocinesis (Chang et al., 2000)) o un cop estaven en fase G2 no continuaven cap la fase M, sinó que es comportaven com cèl·lules en G1 i tornaven a entrar al cicle cel·lular, varem analitzar l'índex mitòtic en els temps indicats a la Figura R9. A les 24 hores del canvi de medi de cultiu, condició en la que apareixia la població poliploide, varem observar que les cèl·lules no entraven en mitosis, ja que l'índex

mitòtic és de 0,5%. Mentre que 24 hores més tard, l'índex mitòtic va augmentar de forma considerable arribant fins el 4,5%.

Per saber si les cèl·lules HCT116 p53^{-/-}, que com varem observar en la Figura R8 es morien des de la fase G2/M, morien durant, o just després, de la fase M, la qual cosa confirmaria que morien per catàstrofe mitòtica (veure Introducció), o si morien abans d'entrar en mitosis, varem analitzar l'índex mitòtic de les cèl·lules tractades a les 72 hores que era el moment en que veiem una major acumulació de cèl·lules en fase S i el fase G2/M. La Figura R10 mostra com les cèl·lules HCT116 p53^{-/-} sense tractar seguien un perfil normal i el seu índex mitòtic era el correcte. Les cèl·lules HCT116 p53^{-/-} tractades amb la IC₇₅ de MSK durant 72 hores presentaven un índex mitòtic inferior al 1%, indicant que no entraven en mitosis i que la mort cel·lular observada es va produir durant la fase G2 i no durant la mitosis.

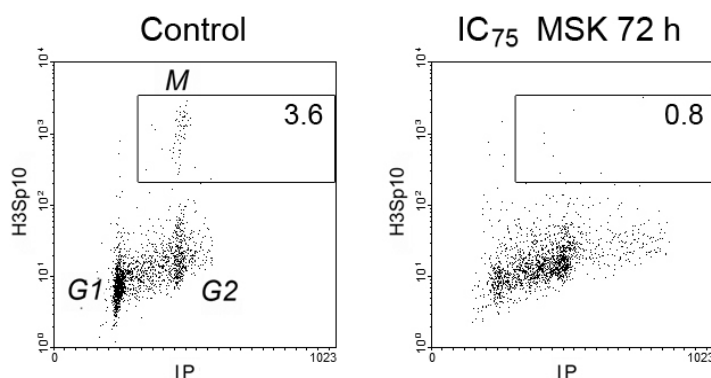


Figura R10. Determinació de l'índex mitòtic en cèl·lules HCT116 p53^{-/-}. El Control correspon a les cèl·lules analitzades a les 72 h sense afegir fàrmac. Varem analitzar la línia cel·lular HCT116 p53^{-/-} després d'haver tractat amb la IC₇₅ de MSK durant 72 hores. Experiments independents realitzats per triplicat amb resultats similars.

La Figura R11 mostra la distribució de les fases del cicle cel·lular i l'índex mitòtic de les cèl·lules HCT116 p21^{-/-} sense tractar (control) i tractades amb la IC₇₅ de MSK durant 48 hores. Varem observar que l'índex mitòtic de les cèl·lules control era lleugerament menor que les altres línies cel·lulars analitzades, indicant que l'absència de *p21* podria reduir l'entrada de les cèl·lules en mitosi. Això explicaria perquè en les cèl·lules tractades l'índex mitòtic era similar a les cèl·lules HCT116 p53^{-/-} però a diferència d'aquestes, la població mitòtica estava ben definida. Si es calcula la *ratio* entre els índex mitòtics de les cèl·lules control i les cèl·lules tractades en aquestes dues

línies cel·lulars, s'observa que en les cèl·lules HCT116 p53^{-/-} la *ratio* és de 4,5 vegades, mentre que en les cèl·lules HCT116 p21^{-/-} només de 2,2 vegades.

A partir d'aquests resultats es va deduir que en les cèl·lules HCT116 p53^{+/+} la endoreduplicació observada a les 72 h + 24 h (Figura R8), no provocava una entrada en la fase M, però 24 hores després un percentatge important de les cèl·lules >4N produïdes per aquesta endoreduplicació entrava en mitosis. En les cèl·lules HCT116 p53^{-/-}, la mort cel·lular observada des de la fase G2/M (Figura R8) ens va fer pensar que possiblement podríem estar davant d'un cas de catàstrofe mitòtica, però al calcular l'índex mitòtic varem observar que les cèl·lules no realitzaven la transició de fase G2 a M i varem deduir que les cèl·lules morien des de la fase G2 sense entrar en mitosis. En les cèl·lules HCT116 p21^{-/-}, on varem trobar una barreja de cèl·lules sintetitzant i mortes en la fase S (Figura R8), també varem observar un decreixement de l'índex mitòtic però no tant notable com en les cèl·lules HCT116 p53^{-/-}, així que només varem poder deduir que la majoria de cèl·lules tractades aturades en la fase G2/M estaven en fase G2 i un baix percentatge entrava en mitosis.

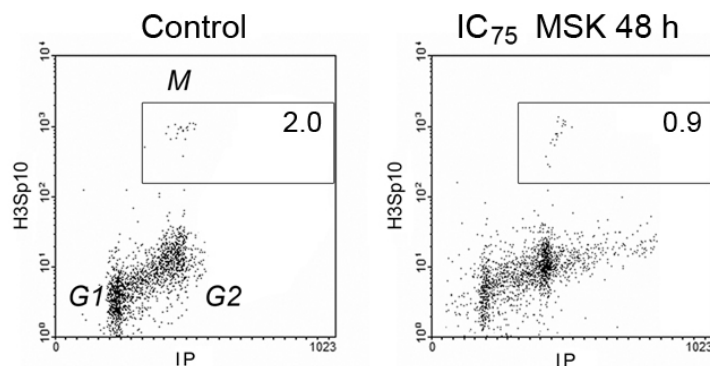


Figura R11. Determinació de l'índex mitòtic en cèl·lules HCT116 p21^{-/-}. El Control correspon a les cèl·lules analitzades a les 48 h sense afegir fàrmac. Varem analitzar la línia cel·lular HCT116 p21^{-/-} després d'haver tractat amb la IC₇₅ de MSK durant 48 hores. Experiments independents realitzats per triplicat amb resultats similars.

4.7. ANÀLISI MORFOLÒGICA DE LA POBLACIÓ POLIPLOIDE.

4.7.1. Anàlisi de la morfologia mitjançant LSC.

Es va analitzar en profunditat les característiques morfològiques de les cèl·lules poliploides derivades del tractament de les cèl·lules HCT116 p53+/+. Per a això es va utilitzar un LSC (*Laser scanning Cytometer*). Es tracta d'un citometre que analitza la distribució del cycle cel·lular de les cèl·lules tenyides amb iodur de propidi, disposades sobre un portaobjectes. El LSC permet treballar amb petits volums de mostra i obtenir imatges de les cèl·lules presents en cada pic, en funció a la intensitat de la fluorescència emesa. Es varen ajustar els paràmetres, de manera que el LSC pogués detectar cèl·lules 8N o de ploïdia superior.

El tractament durant 72 hores + 24 hores de les cèl·lules HCT116 p53+/+ amb la IC₇₅ de MSK, va induir la formació de cèl·lules poliploides (Figura R4). Mitjançant el LSC, varem comprovar que aquest tractament induïa l'aparició d'un pic poliploide, en aquest cas representava més del 34% de la població (Figura R12). Aquestes cèl·lules poliploides presentaven una morfologia mononucleada, en cap cas varem trobar cèl·lules bi- o multinucleades, però una mida del nucli més gran que les cèl·lules 2N i 4N (Figura R12).

D'aquest resultat varem deduir que les cèl·lules HCT116 p53+/+ 8N que apareixen 24 hores després del canvi de medi de cultiu no eren cèl·lules multinucleades (morfologia típica de cèl·lules amb problemes durant la mitosis), sinó que presentaven un únic nucli, confirmant la hipòtesi que aquestes cèl·lules no entraven en mitosis després de passar per la fase G2, sinó que es comportaven com cèl·lules G1 però amb una ploïdia major.

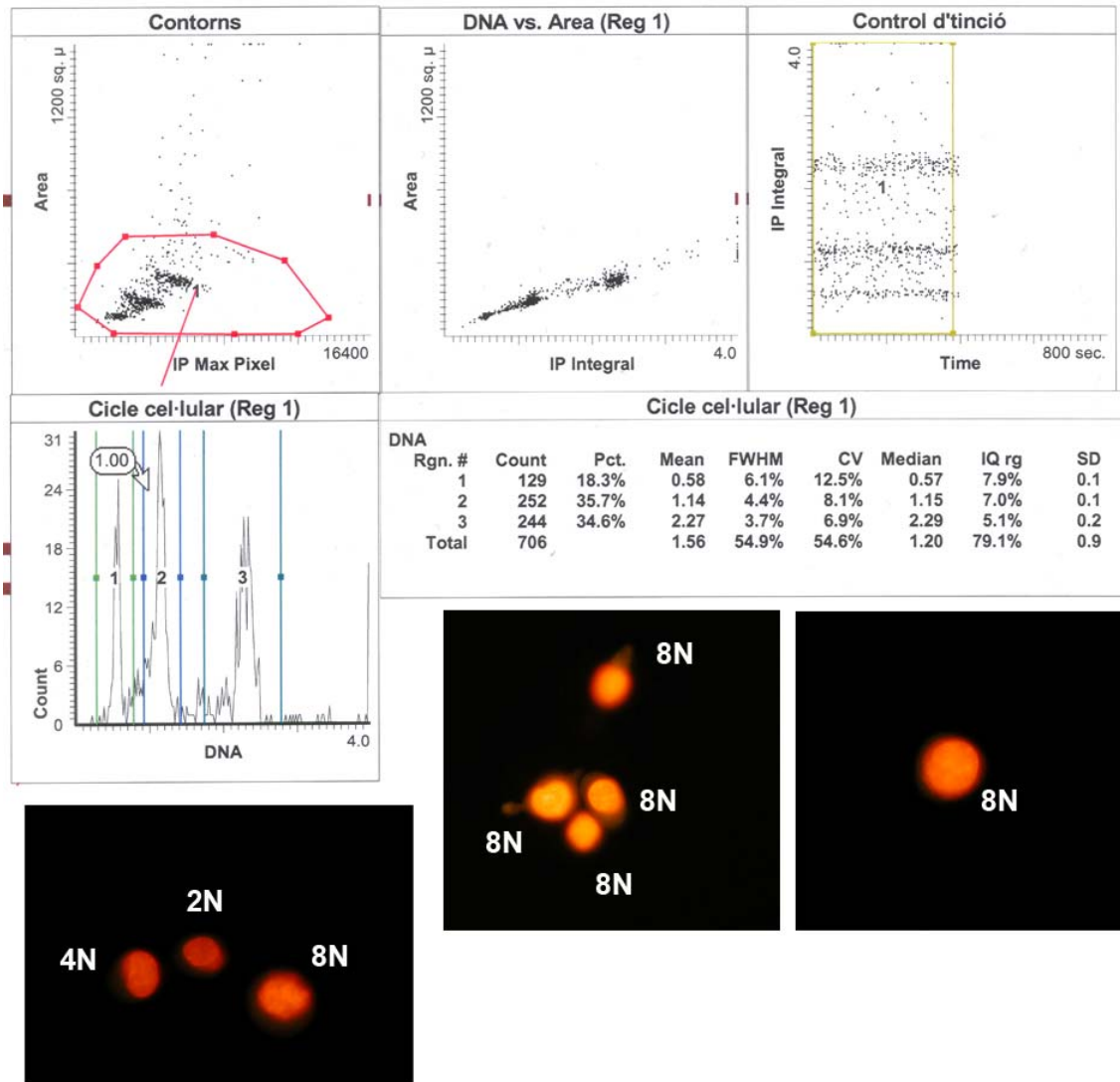


Figura R12. Anàlisi de LSC de les cèl·lules HCT116 p53+/+ tractades amb la IC₇₅ de MSK durant 72 hores + 24 hores. Es mostra la distribució del cicle cel·lular i la morfologia de les cèl·lules presents en el pic 8N, a més d'una comparació de la intensitat de senyal entre les diferents poblacions (fotografia de l'esquerra).

4.7.2. Anàlisi de la morfologia mitjançant microscòpia de fluorescència.

A partir dels resultats obtinguts mitjançant l'anàlisi amb el LSC, ens varem plantejar d'analitzar més detalladament la presència de cèl·lules poliploides. Per això, varem realitzar tincions amb DAPI per detectar els nuclis de les cèl·lules i, en el cas que haguessin mitosis, la formació dels cromosomes. En alguns casos, també es va immunodetectar la β -tubulina per poder comprovar si hi havia malformacions en el fus mitòtic en el cas de la mitosis, o la localització del citoplasma en el cas de les cèl·lules

en interfase. Les tincions es van realitzar en cèl·lules HCT116 p53+/+ a partir del canvi de medi de cultiu, ja que era el moment on s'indueïa la formació de cèl·lules poliploides.

En la Figura R13 es mostra els resultats obtinguts a 24 hores després del tractament amb la IC₇₅ de MSK durant 72 hores. Tal i com varem observar en la Figura R12, no varem ser capaços de trobar cap mitosis, totes les cèl·lules estaven en interfase. La diferència amb el LSC era que en aquest cas no podíem assignar cap poliploidia a les cèl·lules observades, però sí que es podia observar la morfologia de la cèl·lula, gracies a la β -tubulina.

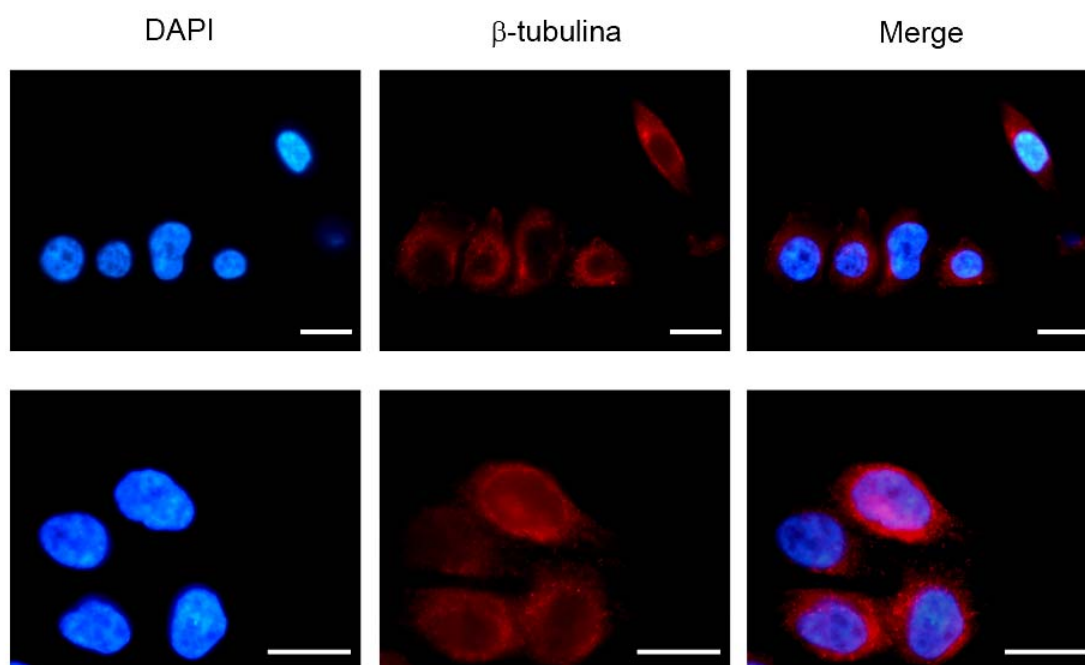


Figura R13. Tinció amb DAPI i immunodetecció de la β -tubulina en cèl·lules HCT116 p53+/+ tractades amb la IC₇₅ de MSK durant 72 hores + 24 hores. Barra = 20 μ m.

En la Figura R14 es mostra els resultats obtinguts a 48 hores després del tractament amb la IC₇₅ de MSK durant 72 hores. Com era d'esperar, varem observar un nombre més elevat de cèl·lules mitòtiques, tal i com varem demostrar en la Figura R9. La gran majoria d'aquestes mitosis presentaven multitud d'aberracions. Varem observar anafases amb separacions incorrectes dels cromosomes (panells superiors a la Figura R14) i metafases i anafases multipolars (Figura R14, panells inferiors). La separació incorrecte de cromosomes podria donar lloc a l'aparició de micronuclis i les aberracions

mitòtiques resultarien en cèl·lules multinucleades, així que varem realitzar les mateixes preparacions a temps més llargs.

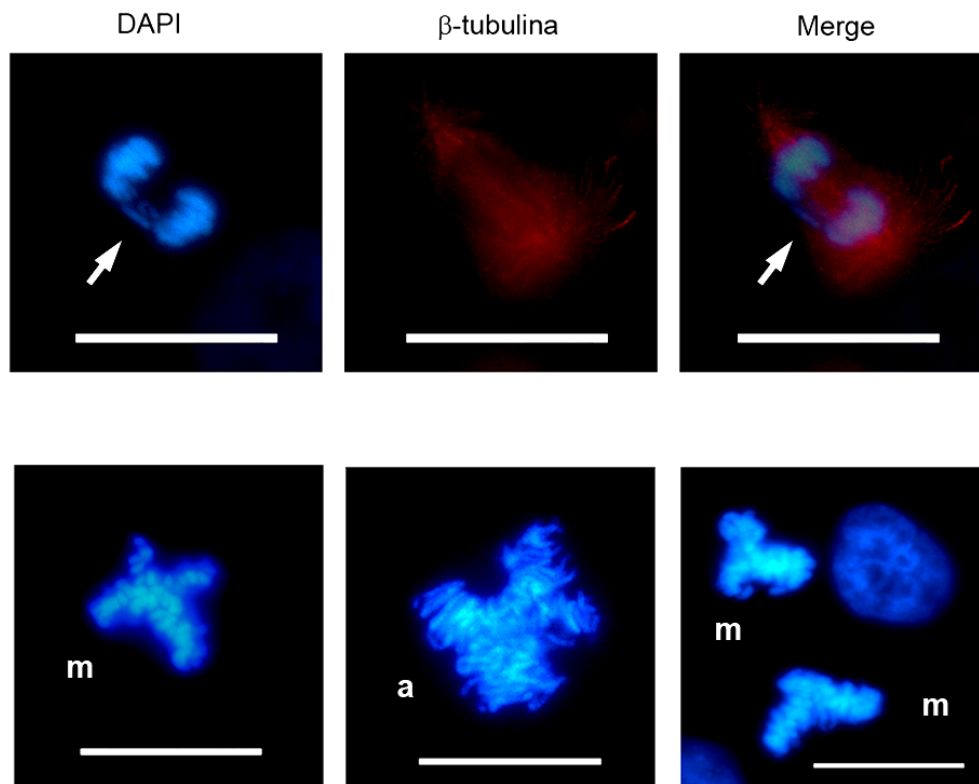


Figura R14. Tinció amb DAPI i immunodetecció de la β -tubulina en cèl·lules HCT116 p53+/+ tractades amb la IC₇₅ de MSK durant 72 hores + 48 hores. La fletxa indica la presència de cromosomes separats incorrectament. S'observa la presència de metafases (m) i anafases (a) multipolars. Barra = 20 μ m.

En la Figura R15 es mostra els resultats obtinguts a 72 hores després del tractament amb la IC₇₅ de MSK durant 72 hores. Observem l'aparició de mitosis aberrants. En el panells superiors de la Figura R15A es mostra clarament una metafase tripolar, deguda a la malformació del fus mitòtic el qual presentava tres pols. La Figura R15A també mostra una anafase on els cromosomes segregaven incorrectament. És necessari destacar que també varem trobar multitud de cèl·lules multinucleades (Figura R15B). Moltes d'aquestes cèl·lules presentaven micronuclis, nuclis multilobulats i ponts nuclears. Els ponts nuclears poden ser deguts a una incorrecte segregació de cromosomes, o a errades en la citocinesis (Andreassen et al., 2001; Erenpreisa et al., 2005). Tot i no poder identificar la ploïdia de les cèl·lules, es pot considerar que la majoria de les cèl·lules poliploides observades presentaven una ploïdia superior a 8N

només comparant la seva mida i intensitat de tinció amb DAPI respecte a la resta de cèl·lules. Hem de puntualitzar que en les preparacions també es van observar cèl·lules amb morfologies totalment normals, ja que com es podia observar en la distribució del cicle cel·lular (Figura R4; HCT116 p53+/+; 72 h + 72 h), la majoria de la població segueix una distribució normal.

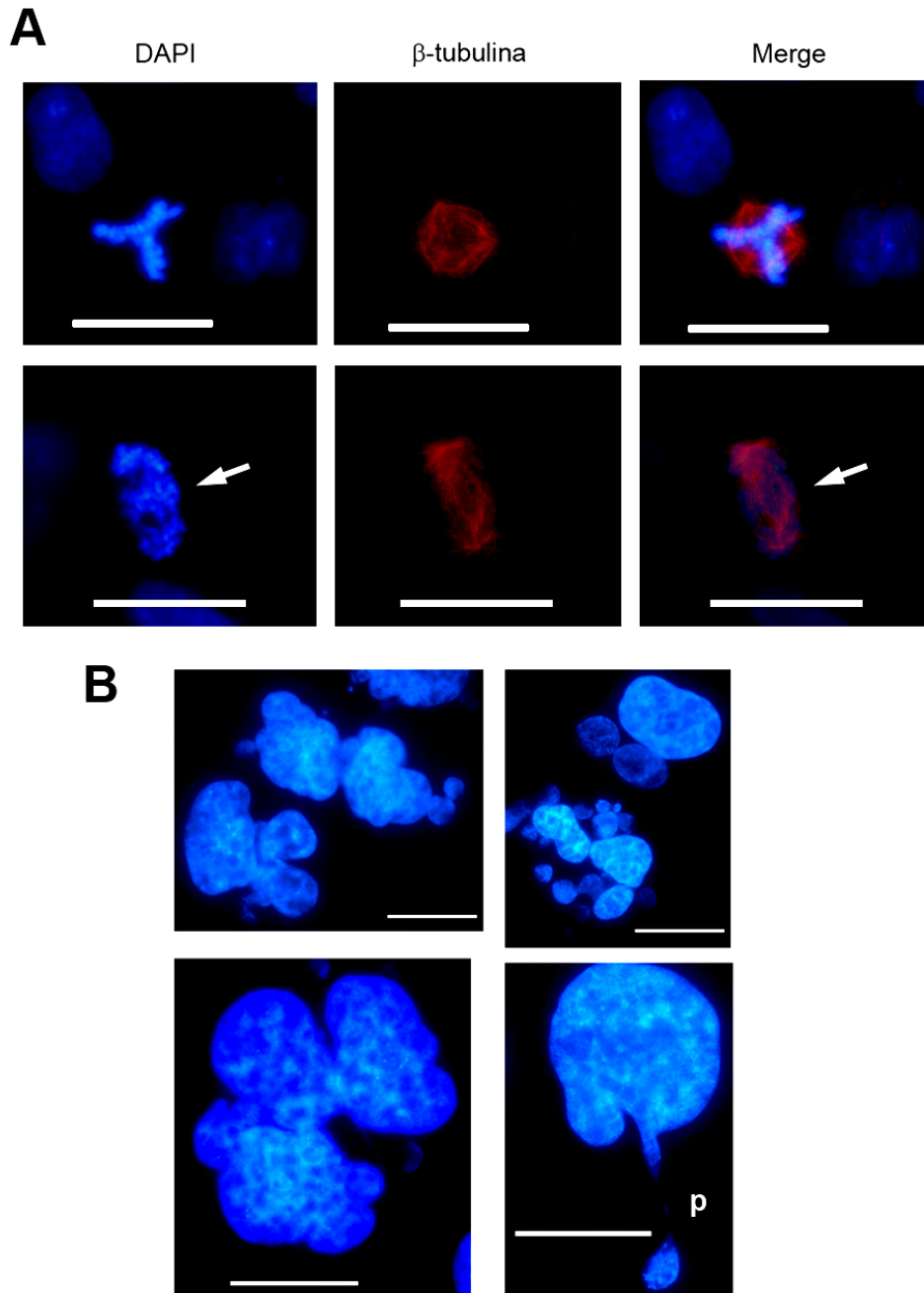


Figura R15. (A) Tinció amb DAPI i immunodetecció de la β -tubulina en cèl·lules HCT116 p53+/+ tractades amb la IC₇₅ de MSK durant 72 hores + 72 hores. La fletxa indica la presència de cromosomes incorrectament separats. (B) Tinció amb DAPI on s'observa varies cèl·lules multinucleades, algunes d'elles amb la presència de micronucleis i la formació de ponts entre nuclis (p). Barra = 20 μ m.

Les mitosis observades en la Figura R9 suggerien un control deficient de la mitosi de les cèl·lules poliploides, tal com indiquen l'observació de mitosis aberrants i de cèl·lules amb una ploïdia molt superior a 8N. Aquests resultats suggerien que al canviar el medi de cultiu després de 72 hores de tractament amb la IC₇₅ de MSK, les cèl·lules HCT116 p53^{+/+} presentaven la morfologia típica de la catàstrofe mitòtica.

Varem realitzar la tinció amb DAPI i la immunodetecció de β -tubulina en les altres dues línies cel·lulars per tal d'observar la morfologia cel·lular i en el cas de que fos possible la presència de cèl·lules mitòtiques i si aquestes presentaven alguna aberració.

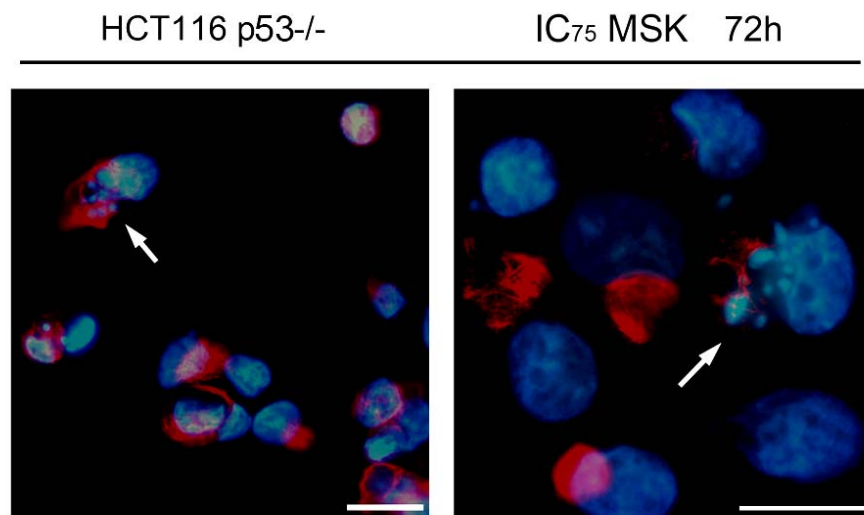


Figura R16. Tinció amb DAPI i immunodetecció de la β -tubulina en cèl·lules HCT116 p53^{-/-} tractades amb la IC₇₅ de MSK durant 72 hores. Les fletxes indiquen la presència de nuclis fragmentats. Barra = 20 μ m.

En cèl·lules HCT116 p53^{-/-}, no varem observar cap cèl·lula en mitosis, però si que varem observar una proporció considerable de cèl·lules amb el nucli parcialment o totalment fragmentat (Figura R16). Aquestes cèl·lules també presentaven condensació de DNA, ja que el DAPI tenia amb més intensitat a més zones del nucli. Aquestes dues morfologies són típiques de l'apoptosi. A més, es donava el cas que aquestes cèl·lules molt probablement eren cèl·lules en la fase G2, degut a la mida del seu nucli. Això significa que al calcular la distribució del cicle cel·lular per citometria de flux (Figura R4), aquestes cèl·lules es detectarien entre les fases G1 i G2, és a dir a la fase S, però al tractar-se de cèl·lules mortes és factible la síntesis de DNA (Figura R8). Aquests

resultats indicarien que les cèl·lules HCT116 p53^{-/-} morien des de la fase G2 per apoptosi.

En cèl·lules HCT116 p21^{-/-}, tampoc es va trobar cap cèl·lula mitòtica, però varem poder observar diferents morfologies molt interessants (Figura R17). Varem detectar cèl·lules amb una més d'un nucli les quals no podien ser sinó conseqüència d'errades en la mitosis. Varem observar des de cèl·lules binucleades fins a cèl·lules multinucleades. Aquestes cèl·lules corresponien a les que es van detectar en la distribució del cicle cel·lular en la població >4N (Figura R4). També es varen observar cèl·lules de diferent mida amb una morfologia clarament apoptòtica. Aquests resultats suggereixen que les cèl·lules HCT116 p21^{-/-} tractades amb MSK moren majoritàriament per apoptosi, però no podem descartar que en alguns casos les cèl·lules morin després de patir catàstrofe mitòtica.

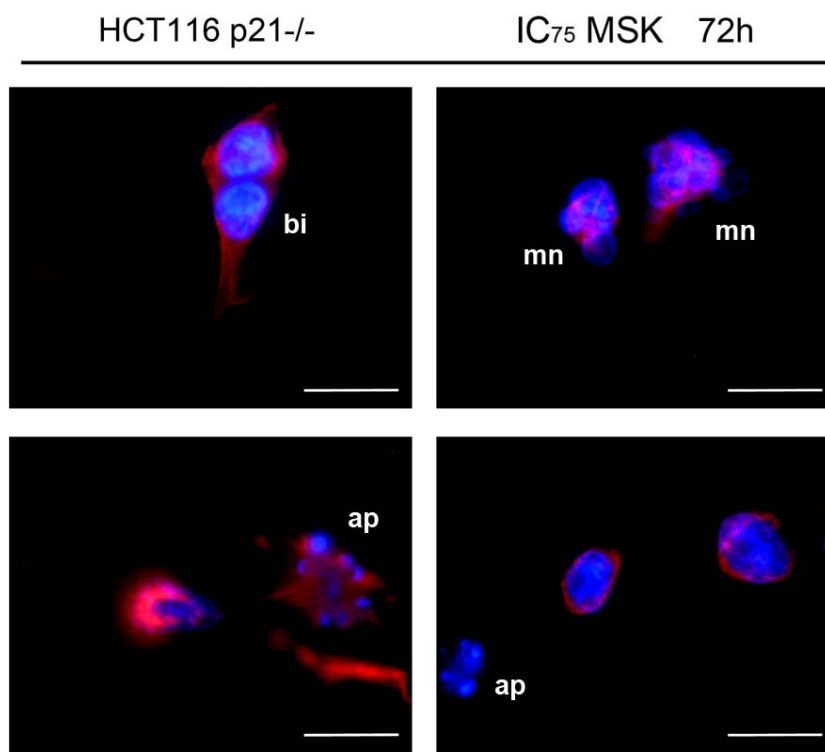


Figura R17. Tinció amb DAPI i immunodetecció de la β -tubulina en cèl·lules HCT116 p21^{-/-} tractades amb la IC₇₅ de MSK durant 72 hores. Varem observar la presència de cèl·lules binucleades (bi), cèl·lules multinucleades (mn) i cèl·lules apoptòtiques (ap). Barra = 20 μ m.

4.8. ANÀLISI DE LA MORT CEL·LULAR PER APOPTOSI O NECROSI.

En funció dels resultats obtinguts en l'apartat 4.7.2., varem analitzar si la mort de les cèl·lules tractades esdevenia per apoptosi o necrosi. D'altra banda, varem decidir explorar si, tal i com s'havia descrit, la catàstrofe mitòtica i apoptosi o necrosi compartien característiques (Castedo et al., 2004; Eom et al., 2005; Mansilla et al., 2006). Varem analitzar els patrons de tinció amb Anexina-V-Fluos i iodur de propidi associats a cada tractament i línia cel·lular per diferenciar les cèl·lules viables, apoptòtiques i necròtiques (Materials i Mètodes). Es van eliminar les cèl·lules presents en el sobrenedant, perquè al no haver fagocitosis, les cèl·lules mortes del sobrenedant acaben rebentant i alliberant el seu contingut al medi, donant com a resultat soroll de fons per la doble tinció de Anexina-V-Fluos i iodur de propidi, fent augmentar el percentatge de cèl·lules en el quadrant de cèl·lules apoptòtiques i/o necròtiques secundaries (veure peu de Figura R18).

La Figura R18A mostra els resultats de citometria de flux obtinguts per a les cèl·lules HCT116 p53+/+. Tot i que només es mostra el control a les 72 hores, la distribució de les cèl·lules sense tractar és molt similar en tots els temps analitzats, presentant una fracció de cèl·lules viables molt elevada i un petit percentatge de mort cel·lular (majoritàriament per apoptosi). A les 72 hores de tractament, no varem observar cap diferència entre cèl·lules control i cèl·lules tractades, indicant que l'aturada en el cicle cel·lular en la fase G1 no provocava mort cel·lular, només una inhibició de la proliferació. Varem analitzar la distribució de les cèl·lules en el moment que apareixen les cèl·lules poliploides i en el moment de l'aparició de mitosis aberrants. Observàrem com a 24 hores després del tractament amb la IC₇₅ de MSK durant 72 hores el percentatge de cèl·lules viables es veu reduït a més del 57% i un augment del percentatge de cèl·lules mortes, repartides principalment per la fracció necròtica. A les 72 hores + 72 hores de tractament, varem observar que el percentatge de cèl·lules mortes va augmentar, però també varem observar una població de cèl·lules que incorporaven més iodur de propidi que la resta de cèl·lules (marcades amb una el·lipse en la Figura R18A). Considerant que en aquest tipus d'experiment el iodur de propidi només tenyeix el nucli de les cèl·lules que tenen la membrana citoplasmàtica danyada (com ara les cèl·lules necròtiques) podem considerar que si dins d'una població cel·lular amb diferents ploïdies les cèl·lules estan morint per necrosi, el iodur de propidi tenyirà

amb diferent intensitat de fluorescència les cèl·lules amb ploïdia normal de les que tenen major ploïdia, podent detectar-les al citometre de flux. A 72 hores després del tractament amb la IC₇₅ de MSK durant 72 hores, tenim una proporció considerable de cèl·lules poliploides que pateixen catàstrofe mitòtica (Figura R15), així que no era estrany observar una doble població necròtica. El percentatge de cèl·lules poliploides detectades en la fracció necròtica i necròtica secundària era 8,6% de la població analitzada (Figura R18A, el·lipse).

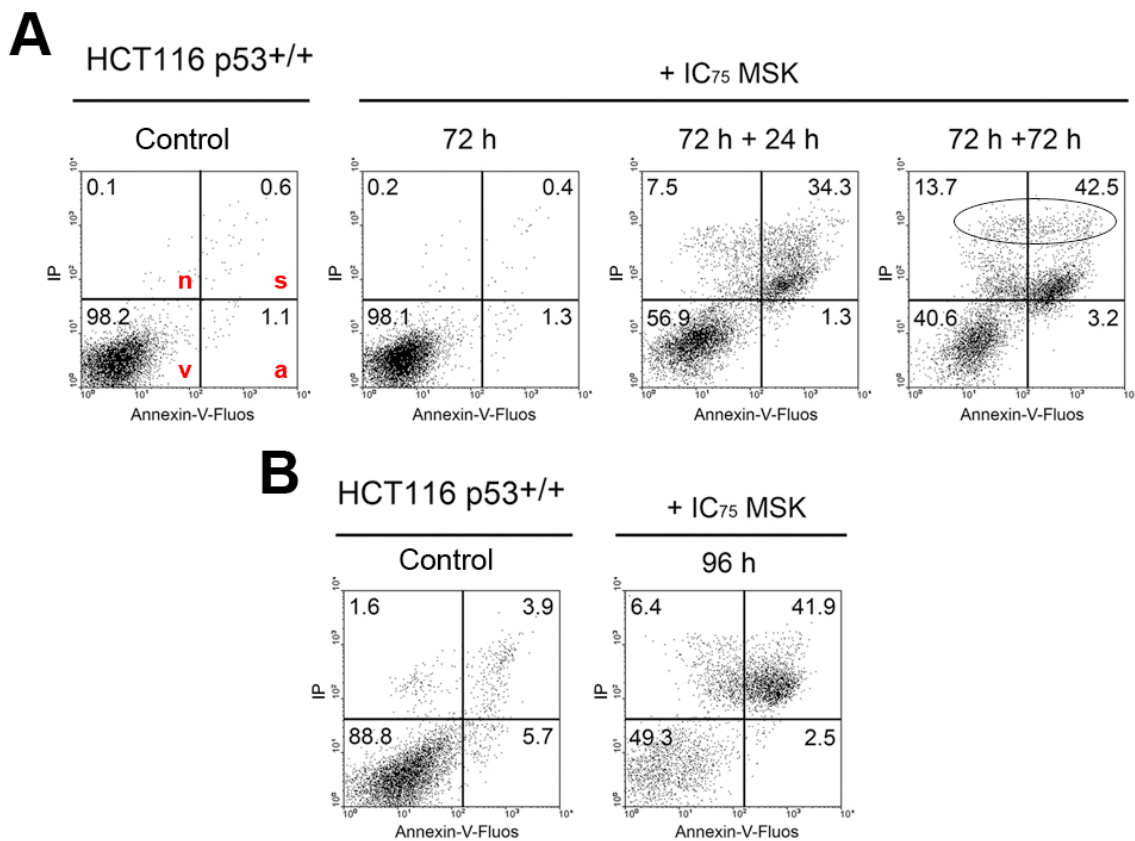


Figura R18. (A) Doble tinció amb Anexina-V-Fluos i iodur de propidi de cèl·lules HCT116 p53+/+ tractades amb la IC₇₅ de MSK. Les cèl·lules, tractades a diferents temps, es varen tenyir i analitzar en un citometre de flux per determinar la proporció de cèl·lules viables (v), apoptòtiques (a), necròtiques (n), i apoptòtiques i/o necròtiques secundàries (s). (B) Doble tinció amb Anexina-V-Fluos i iodur de propidi de cèl·lules HCT116 p53+/+ durant un tractament continu de 96 h amb la IC₇₅ de MSK. Experiments independents realitzats per triplicat amb resultats similars.

La Figura R18B mostra que el tractament continu també provoca la mort per necrosi en les cèl·lules HCT116 p53+/+ tractades amb la IC₇₅ de MSK. A diferència del tractament discontinu, les cèl·lules no sobreviuen més de 120 hores continues de tractament amb MSK. Varem poder quantificar la mort cel·lular a les 96 hores, sent

molt similar al tractament discontinu a 24 hores després del tractament amb la IC_{75} de MSK durant 72 hores. No varem ser capaços de poder quantificar la mort cel·lular a les 120 hores, perquè totes les cèl·lules estaven flotant en el sobrenedant i no havia cap adherida al flascó de cultiu. Igualment varem quantificar les cèl·lules del sobrenedant, però totes es trobaven en el quadrant de les cèl·lules apoptòtiques i/o necròtiques secundàries.

D'aquests resultats es pot concloure que en les cèl·lules HCT116 p53+/+ el tractament amb la IC_{75} de MSK induïa catàstrofe mitòtica amb un fenotip semblant a la necrosi més que no pas al de l'apoptosi. A més, es va demostrar que era la MSK la que produïa la mort per necrosi, i no el simple fet de canviar el medi de cultiu. En aquest cas, el canvi de cultiu afavoria la reentrada al cicle cel·lular i la formació de poliploidies però no evitava la inducció de la mort cel·lular provocada pel fàrmac.

En les cèl·lules HCT116 p53-/-, el tractament amb la IC_{75} de MSK provocava la mort cel·lular a les 72 hores de tractament (Figura R19). Degut a que varem analitzar les cèl·lules adherides al flascó de cultiu, a les 72 hores de tractament varem observar una gran acumulació de cèl·lules en el quadrant de les cèl·lules apoptòtiques i/o necròtiques secundàries (27,4%) suggerint que les cèl·lules HCT116 p53-/- podrien estar morint tant de necrosi com d'apoptosi, així que varem analitzar les cèl·lules 24 hores després de canviar el medi de cultiu i varem comprovar que les cèl·lules HCT116 p53-/- morien per apoptosi tal i com era d'esperar després de veure els resultats de la Figura R16.

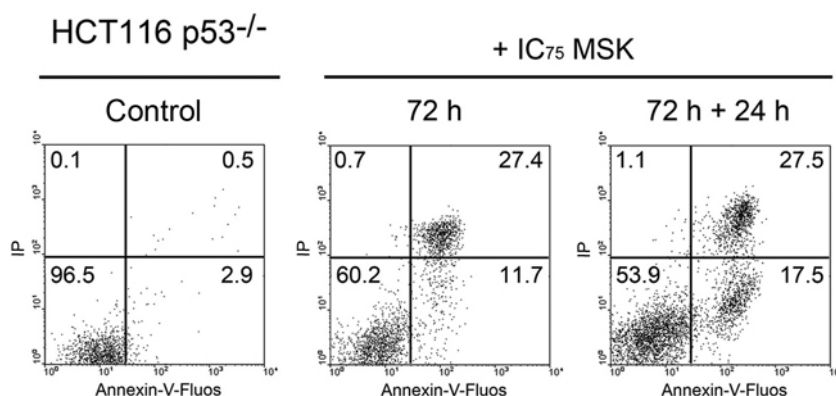


Figura R19. Doble tinció amb Anexina-V-Fluos i iodur de propidi de cèl·lules HCT116 p53-/- tractades amb la IC_{75} de MSK. Experiments independents realitzats per triplicat amb resultats similars.

En les cèl·lules HCT116 p21^{-/-} hem de destacar que les cèl·lules control (sense tractar) presentaven sempre un percentatge de mort cel·lular una mica superior a les cèl·lules control de les altres dues línies cel·lulars (Figura R20). Tot i així, al igual que s'observava en les cèl·lules HCT116 p53^{-/-} les cèl·lules tractades amb la IC₇₅ de MSK presentaven un fenotip clarament apoptòtic a partir de les 48 hores de tractament, augmentant la mortalitat al llarg del temps. Així que si una part de la població moria per catàstrofe mitòtica, com varem deduir en la Figura R17, aquesta seguia un comportament apoptòtic, i en cap cas necròtic com en el cas de les HCT116 p53^{+/+}.

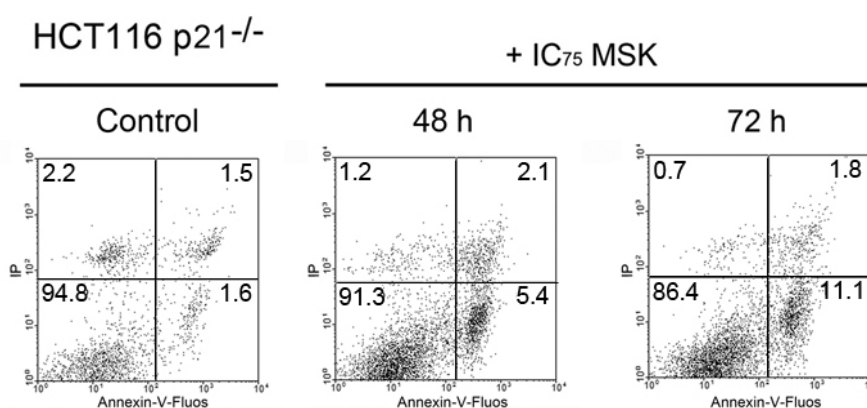


Figura R20. Doble tinció amb Anexina-V-Fluos i iodur de propidi de cèl·lules HCT116 p21^{-/-} tractades amb la IC₇₅ de MSK. Experiments independents realitzats per triplicat amb resultats similars.

Aquests resultats demostraven que la MSK provocava l'activació de l'apoptosi en les línies HCT116 p53^{-/-} i HCT116 p21^{-/-}. S'ha de remarcar la importància d'observar apoptosi en les cèl·lules deficientes en p53, atès que es tracta d'una proteïna involucrada en l'activació de l'apoptosi. Això ens indica que el tractament amb MSK en les cèl·lules HCT116 p53^{-/-} pot activar una via de l'apoptosi independent de p53.

4.9. ANÀLISI DE L'ACTIVACIÓ DE LES CASPASES 2 I 3.

La catàstrofe mitòtica és un fenomen que es pot donar tant de forma independent com dependent de l'activació de les caspases (Mansilla et al., 2006). Conseqüentment, varem determinar si en el moment en que els diferents tractaments amb MSK induïen la mort cel·lular, les caspases 2 i 3 eren actives.

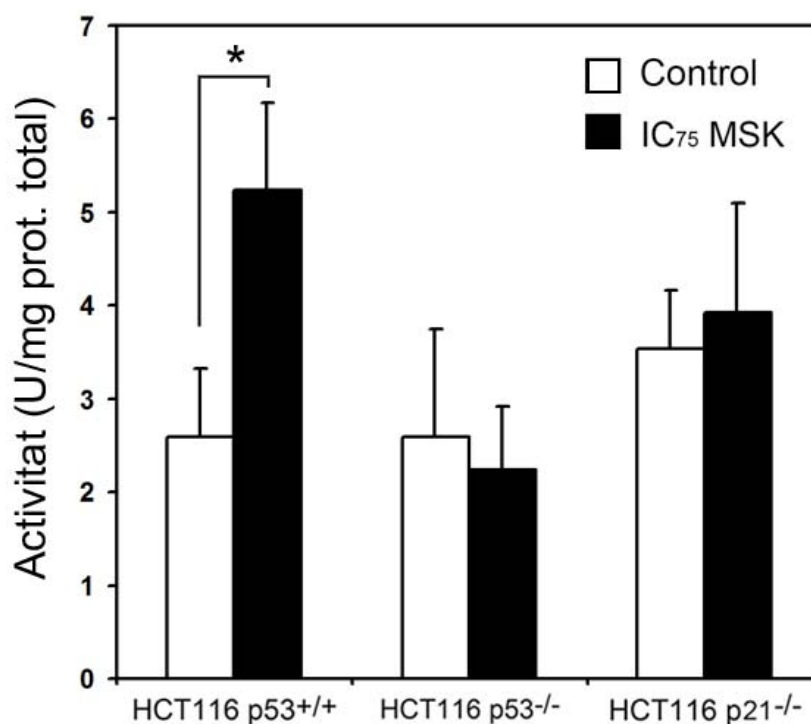


Figura R21. Determinació de l'activació de la caspasa 3 durant el procés de mort cel·lular induïda per MSK. Els temps de tractament corresponen al moment on es va detectar major mort cel·lular (72 h + 72 h en el cas de les HCT116 p53^{+/+}; 72 h en el cas de les HCT116 p53^{-/-} i HCT116 p21^{-/-}). L'activitat de la caspasa 3 es va determinar mitjançant un assaig colorimètric (Materials i Mètodes). Els valors són les mitjanes \pm S.D. d'experiments independents realitzats per triplicat. Diferències estadísticament significatives * $p < 0,02$ (*t-Student*).

Com la caspasa 3 és la principal caspasa efectora de l'apoptosi (Li & Yuan, 2008), es va analitzar l'activitat d'aquest enzim mitjançant un assaig colorimètric, basat en la proteòlisi del substrat de la caspasa 3 activa. Varem realitzar l'anàlisi de les tres línies cel·lulars tractades amb les seves respectives IC₇₅ de MSK en els temps on més mort cel·lular es va detectar (Figura R21). Així que en el cas de les cèl·lules HCT116 p53^{+/+} varem tractar les cèl·lules durant 72 hores i varem incubar-les en medi de cultiu lliure de fàrmac durant 72 hores més. En el cas de les HCT116 p53^{-/-} i HCT116 p21^{-/-} varem analitzar les cèl·lules a les 72 hores de tractament. Els resultats obtinguts per a les tres línies cel·lulars semblaven contradir els resultats obtinguts quan es va analitzar la mort cel·lular mitjançant citometria de flux per la doble tinció amb Anexina-V-Fluos i iodur de propidi (Figures R18, R19 i R20). No varem observar un augment en l'activitat de la caspasa 3 en les cèl·lules HCT116 p53^{-/-} ni HCT116 p21^{-/-} tractades amb la IC₇₅ de MSK, que eren les cèl·lules que morien amb un fenotip clarament

apoptòtic, comparades amb les cèl·lules control. En canvi, sí que varem observar un augment significatiu en l'activitat de la caspasa 3 en les cèl·lules HCT116 p53+/+, les quals, curiosament, morien amb un fenotip necròtic.

Per confirmar aquests resultats varem utilitzar un anticòs que reconeix específicament la forma activa de la caspasa 3 i varem realitzar tant una anàlisi dels nivells de proteïna mitjançant *Western blot* com una immunodetecció mitjançant microscòpia de fluorescència (Materials i Mètodes).

Les extraccions de proteïna es van realitzar a diferents temps, incloent aquells en que no apareixia mort cel·lular i aquells en que sí apareixia per a poder comparar els diferents nivells de proteïna entre les cèl·lules tractades i no tractades, entre els diferents temps, i fins i tot, entre les diferents línies cel·lulars.

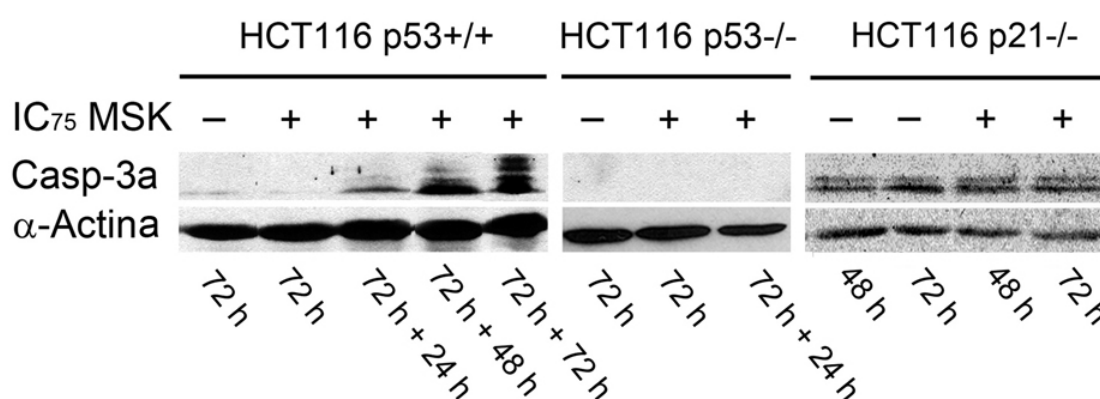


Figura R22. Anàlisi dels canvis en els nivells de la forma activa de la caspasa 3 (Casp-3a) en les tres línies cel·lulars tractades amb la IC₇₅ de MSK mitjançant *Western blot*. Varem utilitzar l'α-actina com a control de càrrega. Experiments independents realitzats per triplicat amb resultats similars.

Es pot observar que la detecció de la forma activa de la caspasa 3 determinada per *Western blot* (Figura R22) correlaciona amb l'activitat detectada per colorimetria (Figura R21). En les cèl·lules HCT116 p53+/+ l'activitat de la caspasa 3 augmenta de manera considerable a partir del canvi de medi de cultiu. Hem de destacar el resultat obtingut en les cèl·lules HCT116 p53-/- i HCT116 p21-/. Mitjançant l'anàlisi de l'activitat de la caspasa 3 per colorimetria no varem observar canvis entre cèl·lules tractades amb MSK i cèl·lules sense tractar (Figura R21). No obstant, el *Western blot* mostrava que la raó perquè no s'observaven canvis era diferent segons la línia cel·lular. Mentre que en les cèl·lules HCT116 p53-/- no hi havia activitat de la caspasa 3 ni en el

control ni en les cèl·lules tractades, en les cèl·lules HCT116 p21^{-/-} presentaven activitat caspasa 3 totes dues condicions. Les cèl·lules HCT116 p21^{-/-} sense tractar presentaven sempre un cert percentatge de mort cel·lular respecte a les altres línies cel·lulars, tal i com es presenta a la Figura R20.

Per confirmar aquests resultats es va immunodetectar la forma activa de la caspasa 3 junt amb la tinció amb DAPI per poder visualitzar el nucli cel·lular amb la finalitat de poder localitzar les cèl·lules mitjançant microscòpia de fluorescència.

La Figura R23A mostra els resultats obtinguts en les cèl·lules HCT116 p53^{+/+} sense tractar després de 72 hores + 72 hores en medi de cultiu. Es va observar que la gran majoria de cèl·lules estaven en interfase i varem trobar un percentatge molt baix de cèl·lules amb activitat caspasa 3. La fletxa en la Figura R23A mostra una cèl·lula control amb el DNA molt condensat i amb la presència de la caspasa 3.

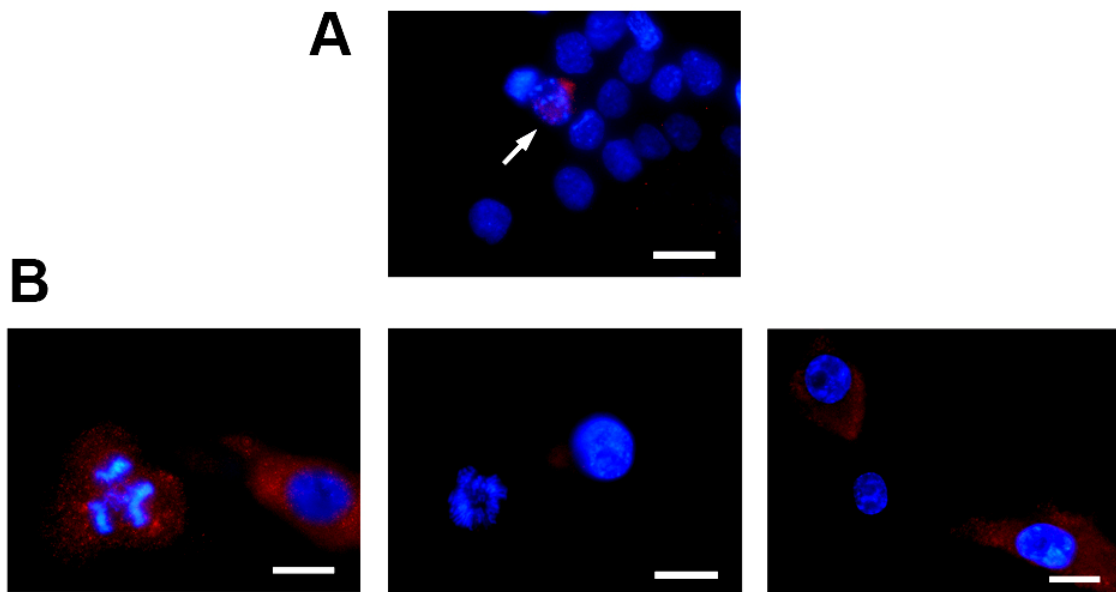


Figura R23. (A) Tinció amb DAPI i immunodetecció de la Casp-3a en cèl·lules HCT116 p53^{+/+} sense tractar durant 72 hores + 72 hores. La fletxa indica la presència d'una cèl·lula amb el DNA condensat i activitat caspasa 3. (B) Tinció amb DAPI i immunodetecció de la Casp-3a en cèl·lules HCT116 p53^{+/+} tractades amb la IC₇₅ de MSK durant 72 hores + 72 hores. Barra = 20 µm.

En les cèl·lules HCT116 p53^{+/+} després de 72 hores del tractament amb la IC₇₅ de MSK durant 72 hores, varem observar que l'activitat de la caspasa 3 era present en la gran majoria de cèl·lules analitzades, fins i tot en aquelles que presentaven aberracions

mitòtiques, corroborant la mort per catàstrofe mitòtica (Figura R23B). La mida dels nuclis en interfase de les cèl·lules tractades, tal i com varem observar en altres immunodeteccions (Figura R15), era major que la de les cèl·lules control, indicant la possibilitat de presentar una ploïdia major del normal.

En les cèl·lules HCT116 p53^{-/-} tractades amb la IC₇₅ de MSK durant 72 hores, s'observa que no hi ha activitat caspasa 3 (Figura R24A). En la imatge es poden observar cèl·lules amb diferents mides que corresponien a cèl·lules en les fases G1 i G2, i fins i tot alguna cèl·lula més gran.

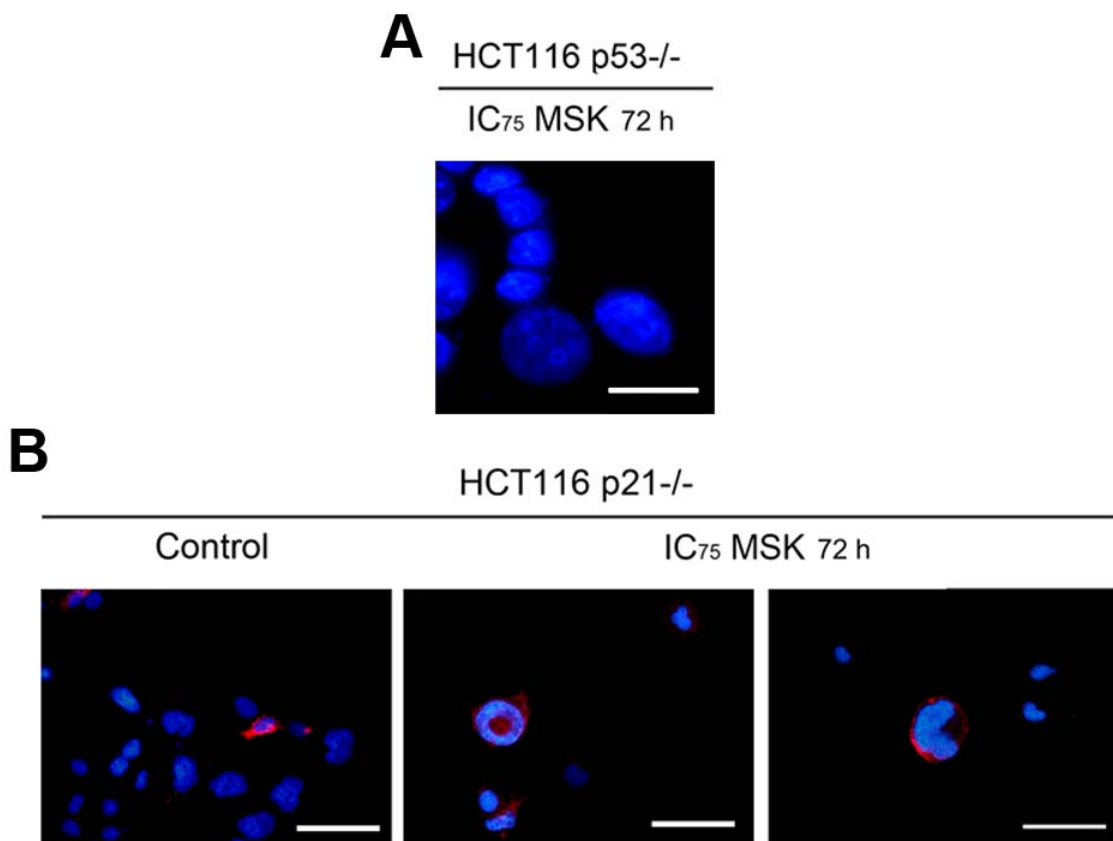


Figura R24. (A) Tinció amb DAPI i immunodetecció de la Casp-3a en cèl·lules HCT116 p53^{-/-} tractades amb la IC₇₅ de MSK durant 72 hores. Barra = 20 µm. (B) Tinció amb DAPI i immunodetecció de la Casp-3a en cèl·lules HCT116 p21^{-/-} sense tractar (Control) i tractades amb la IC₇₅ de MSK durant 72 hores. Barra = 50 µm.

En les cèl·lules HCT116 p21^{-/-}, varem observar que el nombre de cèl·lules positius per l'activació de la caspasa 3 en les cèl·lules no tractades era superior al de les cèl·lules HCT116 p53^{+/+} sense tractar (Figura R24B), coincidint amb el *Western blot* (Figura R22). Les cèl·lules HCT116 p21^{-/-} tractades amb la IC₇₅ de MSK, també

presenten activitat caspasa 3 i varem observar que aquesta es donava majoritàriament en les cèl·lules de mida major i multinucleades, mentre que en les cèl·lules interfàsiques el percentatge de cèl·lules positives era gairebé nul.

Degut al fet que en les cèl·lules HCT116 p53^{-/-} i HCT116 p21^{-/-} tractades amb MSK es va observar apoptosi (Figures R19 i R20) i les cèl·lules no presentaven canvis en els nivells d'activitat de la caspasa 3 respecte al control, es va analitzar també l'activitat de la caspasa 2. La caspasa 2 s'ha descrit com una caspasa iniciadora de la via intrínseca de l'apoptosi (veure Introducció), però també s'ha descrit que pot tenir una funció efectora de l'apoptosi (Krumschnabel et al., 2009).

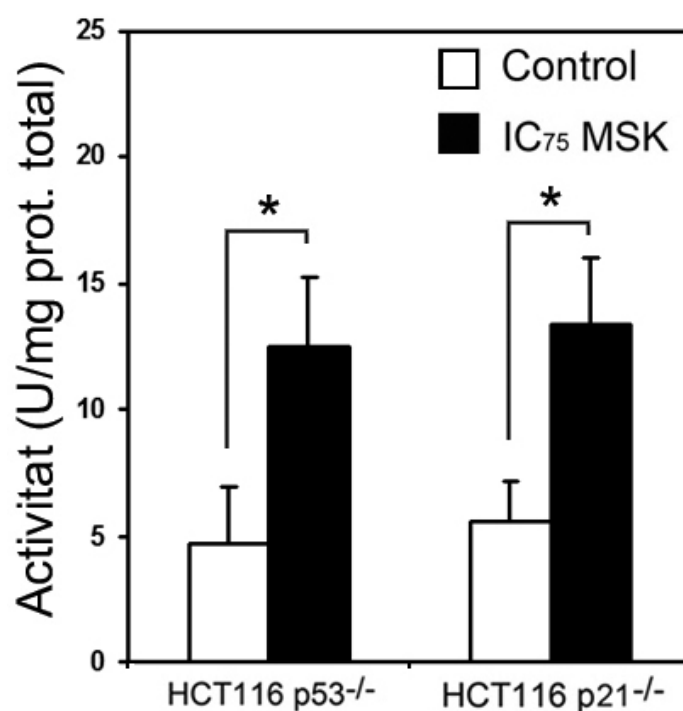


Figura R25. Determinació de l'activació de la caspasa 2 durant el procés de mort cel·lular per apoptosi induïda per la MSK a les 72 hores de tractament en les línies cel·lulars HCT116 p53^{-/-} i HCT116 p21^{-/-}. L'activitat de la caspasa es va determinar mitjançant un assaig colorimètric, basat en la proteòlisis del substrat de la caspasa 2 activa (veure Materials i Mètodes). Els valors són les mitjanes \pm S.D. d'experiments independents realitzats per triplicat. Diferències estadísticament significatives* $p < 0,02$ (*t-Student*).

L'activitat de la caspasa 2 es va analitzar mitjançant un assaig colorimètric sobre les cèl·lules HCT116 p53^{-/-} i HCT116 p21^{-/-} tractades amb la IC₇₅ de MSK durant 72 hores. Varem observar en tots dos casos un augment significatiu de l'activitat de la

caspasa 2 (Figura R25). Aquest resultat ens podria indicar dos possibilitats, o bé la caspasa 2 és la caspasa iniciadora de la senyal apoptòtica, o la caspasa 2 és la caspasa efectora de l'apoptosi.

Si la caspasa 2 era la caspasa iniciadora, activaria la proteòlisi de Bid, la qual cosa provocaria una dissipació del potencial de membrana mitocondrial, amb l'alliberament del citocrom c al citoplasma, formant l'apoptosoma; i un augment de l'activitat de les caspases efectores (caspases 3, 6 i 7) (veure Introducció).

Per comprovar-ho, varem analitzar els canvis de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_{mi}$) en les cèl·lules tractades amb MSK, la qual cosa ens indicaria si aquesta via estava activada. A més, varem utilitzar aquest assaig per comprovar si l'activació de la caspasa 3 en les cèl·lules HCT116 p53^{+/+} era deguda a l'activació de l'apoptosi, o era un efecte del descontrol propi de la necrosi.

Les tres línies cel·lulars tractades amb les seves respectives IC_{75} de MSK es van analitzar en el temps on més mort cel·lular es detectava. Així que en el cas de les cèl·lules HCT116 p53^{+/+} varem tractar les cèl·lules durant 72 hores i varem incubar-les en medi de cultiu lliure de fàrmac durant 72 hores més. En el cas de les HCT116 p53^{-/-} i HCT116 p21^{-/-} varem analitzar les cèl·lules a les 72 hores de tractament. Els resultats obtinguts per les tres línies cel·lulars es mostren a la Figura R26. Tant a les cèl·lules HCT116 p53^{+/+} com a les HCT116 p53^{-/-} tractades amb les respectives IC_{75} de MSK no varem observar un decreixement de $\Delta\Psi_{mi}$ significatiu comparat amb les cèl·lules sense tractar. En les cèl·lules HCT116 p21^{-/-} tractades amb MSK varem observar un decreixement estadísticament significatiu comparat amb les cèl·lules sense tractar.

Aquests resultats suggereixen que l'activitat caspasa 3 detectada en les cèl·lules HCT116 p53^{+/+} tractades amb la IC_{75} de MSK no és deguda a l'activació de l'apoptosi per la via intrínseca, sinó pel descontrol que pateixen les cèl·lules que finalment moren amb un fenotip necròtic. En el cas de les cèl·lules HCT116 p53^{-/-} tractades amb la IC_{75} de MSK, els resultats suggereixen que la caspasa 2 és la caspasa efectora de l'apoptosi, ja que no es va observar una disminució del $\Delta\Psi_{mi}$, indicant que no es podia alliberar el citocrom c, ni la formació de l'apoptosoma. Aquesta pot ser la raó del perquè no veiem

activitat caspasa 3 en aquesta línia cel·lular. Els resultats obtinguts en les cèl·lules HCT116 p21^{-/-} tractades amb MSK suggereixen que la caspasa 2 actua com a caspasa iniciadora. D'aquesta manera, la pèrdua del potencial de membrana mitocondrial activaria l'apoptosoma mitjançant l'alliberament del citocrom c al citosol i la consegüent activació de les caspases efectores, com per exemple la caspasa 3. Aquest resultat ens indica que les cèl·lules HCT116 p21^{-/-} tenen activada la via intrínseca de l'apoptosi.

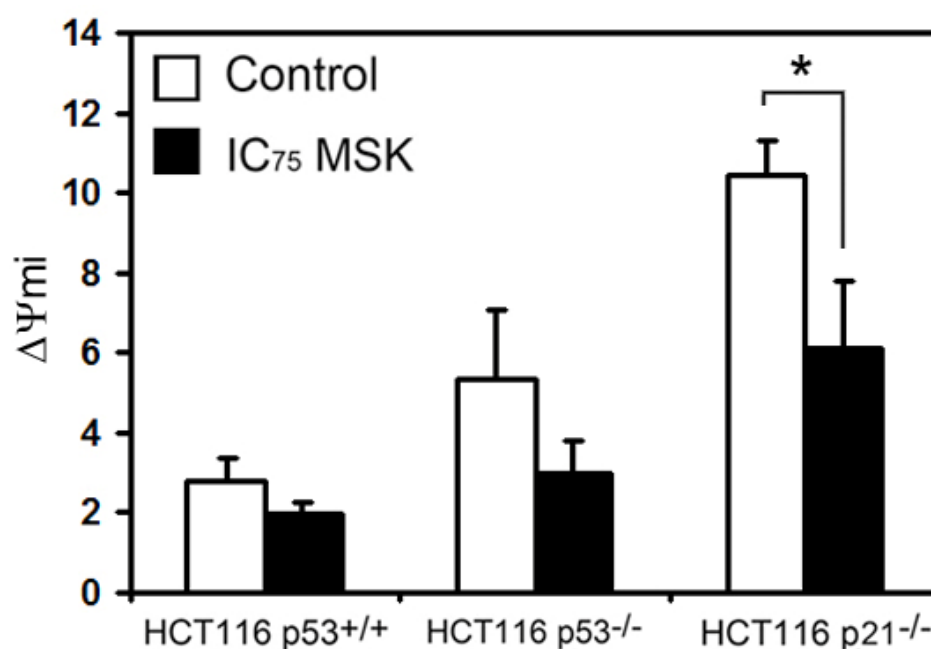


Figura R26. Determinació dels canvis del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_{mi}$) durant el procés de mort cel·lular per apoptosi o catàstrofe mitòtica induïts per MSK. El temps de tractament corresponen al moment on veiem major mort cel·lular (72 h + 72 h en el cas de les HCT116 p53^{+/+}; 72 h en el cas de les HCT116 p53^{-/-} i HCT116 p21^{-/-}). Els canvis de potencial de membrana mitocondrial relatius es van determinar mitjançant un assaig de citometria de flux, basat en la tinció amb la sonda DiIC₁(5) (veure Materials i Mètodes). Els valors són les mitjanes \pm S.D. d'experiments independents realitzats per triplicat. Diferències estadísticament significatives * $p < 0,02$ (*t-Student*).

4.10. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ DE GENS INVOLUCRATS EN LA REGULACIÓ DEL CICLE I LA MORT CEL·LULAR EN LES CÈL·LULES HCT116 TRACTADES AMB MSK.

Els gens *Chk1*, *c-myc*, *ciclina A (cycA)*, *ciclina B (cycB)*, *p21^{WAF1}* i *p53* estan involucrats en el control del cicle cel·lular (veure Introducció). A més, *c-myc*, *p21^{WAF1}* i

p53 tenen una implicació directa en processos d'apoptosi, senescència cel·lular i catàstrofe mitòtica (Roninson, 2002). Es va determinar si l'expressió d'aquests gens variava en cèl·lules HCT116 en presència de la Mitramicina SK.

4.10.1. Anàlisi dels nivells de transcripció en cèl·lules HCT116 *p53*^{+/+} per *Real-Time PCR*.

Es van realitzar experiments de *Real-Time PCR*, utilitzant encebadors específics pels gens *Chk1*, *c-myc*, *ciclina A (cycA)*, *ciclina B (cycB)*, *p21^{WAF1}*, *p53* i *GAPDH* (Materials i Mètodes). Es va utilitzar el gen *GAPDH* com gen control o gen constitutiu.

Els extractes d'RNA es varen realitzar a les 4 hores de tractament per observar l'efecte del fàrmac sobre la transcripció dels gens. Com les cèl·lules HCT116 *p53*^{+/+} tractades amb MSK es comportaren de forma molt diferent un cop es va canviar el medi de cultiu, tal i com s'ha descrit en apartats anteriors, es van obtenir extractes d'RNA a les 4 hores del canvi de medi després de 72 hores de tractament amb la finalitat d'observar si aquest comportament es devia a canvis en la transcripció d'aquests gens.

La Figura R27A mostra els canvis d'expressió dels gens *Chk1*, *c-myc*, *ciclina A (cycA)*, *ciclina B (cycB)*, *p21^{WAF1}* i *p53* en cèl·lules HCT116 *p53*^{+/+} tractades amb MSK durant 4 hores. Canvis significatius d'expressió es van observar en els gens *c-myc*, *ciclina A (cycA)* i *p21^{WAF1}*. En el cas de *c-myc* es va trobar un augment molt considerable en l'expressió del gen. Tant *ciclina A* com *p21^{WAF1}* són essencials per la regulació del cicle cel·lular en la fase G1 i la fase S, així que no era d'estranyar que els seus nivells d'expressió fossin elevats. *Chk1*, *ciclina B* i *p53* no van patir cap canvi significatiu en els nivells d'expressió respecte al control, ja que les proteïnes que codifiquen intervenen majoritàriament en la fase G2/M.

L'anàlisi dels canvis d'expressió d'aquests gens a les 4 hores del canvi de medi de cultiu, en posterioritat al tractament de 72 hores amb MSK (Figura R27B), va mostrar una forta repressió en l'expressió d'aquests gens a excepció de *p21^{WAF1}*. El tractament amb MSK en les cèl·lules HCT116 *p53*^{+/+} inhibia molt significativament tant l'expressió de gens importants en la regulació al llarg del cicle cel·lular com la de gens implicats en la mort cel·lular. L'expressió del gen *p21^{WAF1}* era la única entre els

gens analitzats que encara es mantenia elevada tot i que no als nivells observats a les 4 hores.

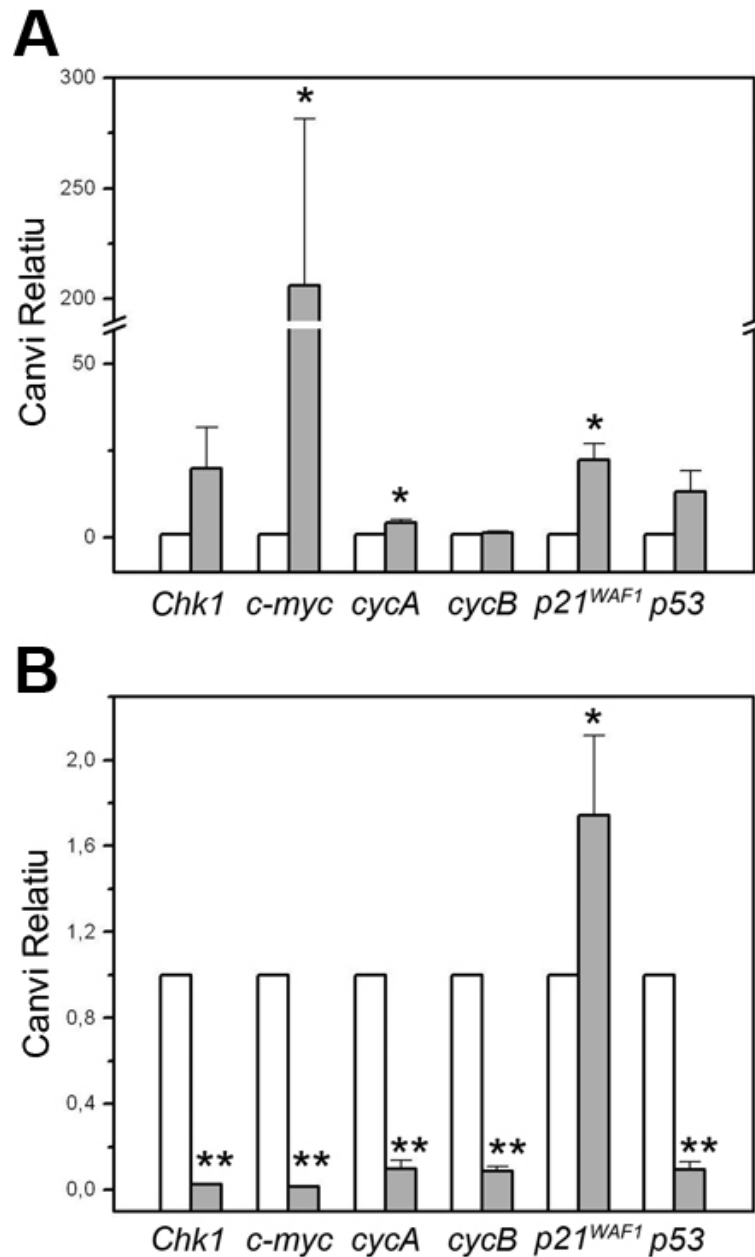


Figura R27. Canvis en la transcripció de varis gens involucrats en el control del cicle cel·lular induïts per la MSK en les cèl·lules HCT116 p53^{+/+}. (A) Efectes sobre la transcripció després de 4 hores de tractament amb la IC₇₅ de MSK. (B) Efectes sobre la transcripció després de 72 hores de tractament amb la IC₇₅ de MSK. Seguit per una incubació de 4 hores en medi sense fàrmac. Els histogrames representen els nivells relatius d'expressió dels transcrits determinats per *Real-Time PCR*. Els valors són les mitjanes ± S.D. de 3 experiments independents. Els valors es van normalitzar utilitzant l'expressió del gen de la Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa com a control. Els canvis són estadísticament significatius en la transcripció de les cèl·lules tractades amb MSK respecte a les cèl·lules sense tractar ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ (*t-Student*).

4.10.2. Anàlisi dels nivells de transcripció en cèl·lules HCT116 p53^{-/-} i HCT116 p21^{-/-} per RT-PCR semiquantitativa.

Experiments de RT-PCR es van realitzar utilitzant encebadors específics pels gens *c-myc*, *ciclina A (cycA)*, *p21^{WAF1}*, *p53* i *GAPDH* (Materials i Mètodes). El gen *GAPDH* es va usar com gen control o gen constitutiu.

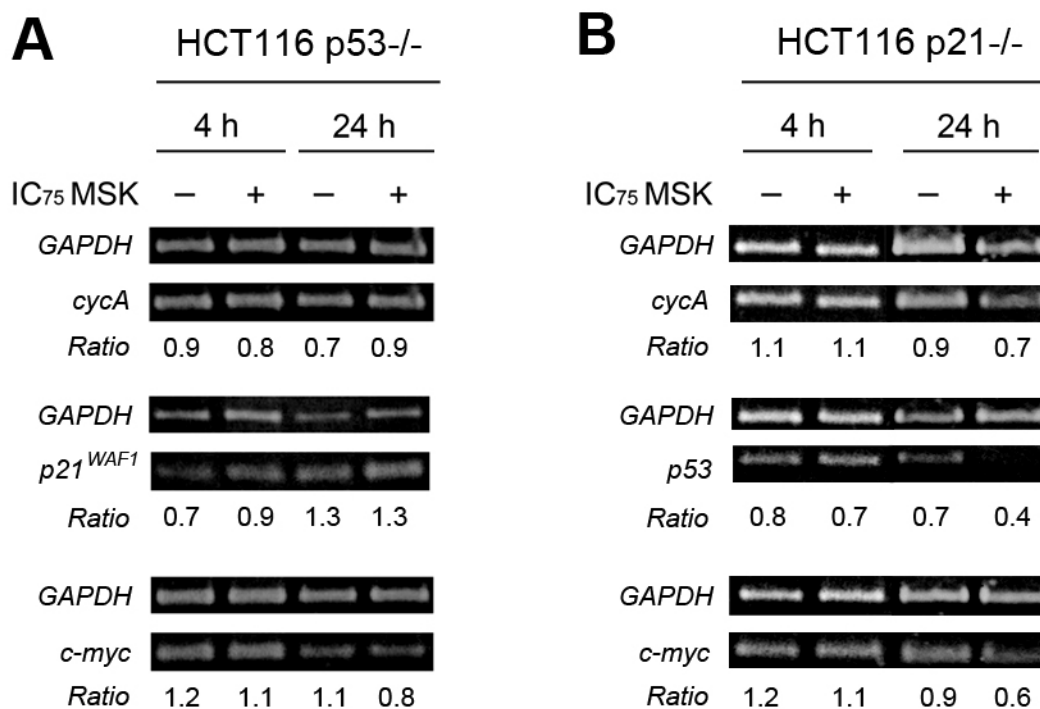


Figura R28. RT-PCR semiquantitativa per a determinar els canvis en la expressió dels gens *cycA*, *p21^{WAF1}*, *p53* i *c-myc*, implicats en els processos d'apoptosi i regulació del cicle cel·lular. (A) RT-PCR semiquantitativa de les cèl·lules HCT116 p53^{-/-} tractades amb la IC₇₅ de MSK durant 4 hores i 24 hores. (B) RT-PCR semiquantitativa de les cèl·lules HCT116 p21^{-/-} tractades amb la IC₇₅ de MSK durant 4 hores i 24 hores. Es va coamplificar en un mateix tub els fragments de cDNA corresponents al gen constitutiu *GAPDH* (control intern) i al gen d'interès. La *ratio* representa la relació entre el senyal del gen d'interès i el gen constitutiu detectat mitjançant el programa *GeneTools Analysis Software* (SynGene) per a cada condició. Experiments independents realitzats per triplicat amb resultats similars.

Es van fer extraccions d'RNA a les 4 hores de tractament per observar l'efecte immediat del fàrmac sobre la transcripció dels gens analitzats. Com tant les cèl·lules HCT116 p53^{-/-} com les HCT116 p21^{-/-} tractades amb la IC₇₅ de MSK es morien un cop es va canviar el medi de cultiu, no era possible obtenir un nombre de cèl·lules suficients

per realitzar els experiments, tot i això també es varem extreure RNA a les 24 hores de tractament, per comprovar si l'expressió dels gens analitzats canviava al llarg del temps.

La Figura R28A mostra els canvis d'expressió dels gens *ciclina A* (*cycA*), *p21^{WAF1}* i *c-myc* després de tractar les cèl·lules HCT116 p53^{-/-} durant 4 hores i 24 hores. També es mostra la relació (*ratio*) entre el senyal del gen d'interès i el del gen *GAPDH*. Així, encara que aquest experiment era semiquantitatiu podíem observar si el tractament augmentava o disminuïa l'expressió d'aquests gens. D'aquesta manera, varem observar que l'expressió de *ciclina A* no canviava, respecte al control, al llarg del temps. Tanmateix, l'expressió de *p21^{WAF1}* semblava augmentar al començament del tractament i després es mantenia als mateixos nivells que el control. En el cas de *c-myc* es va observar una disminució considerable de l'expressió del gen al llarg del temps. En les cèl·lules HCT116 p53^{-/-} varem observar una parada en la fase G2/M del cicle cel·lular (Figura R4C), així que era normal veure un augment de l'expressió de *p21^{WAF1}* ja que és la responsable de regular el cicle cel·lular en absència de *p53*. A més, *c-myc* és un regulador negatiu de *p21^{WAF1}* i la seva expressió es trobava reduïda. La *ciclina A*, la qual regula el pas de la fase G1 i S, no va canviar la seva expressió.

La Figura R28B mostra els canvis d'expressió dels gens *ciclina A* (*cycA*), *p53* i *c-myc* que es van produir quan varem tractar les cèl·lules HCT116 p21^{-/-} durant 4 hores i 24 hores. També es mostra la relació (*ratio*) entre el senyal del gen d'interès i el del gen *GAPDH*. En aquest cas, sí que varem observar que l'expressió de *ciclina A* disminuïa lleugerament respecte al control a les 24 hores de tractament. En els casos on sí que varem observar una disminució important van ser en l'expressió de *p53* i *c-myc*. En les cèl·lules HCT116 p21^{-/-} també varem observar una parada en la fase G2/M del cicle cel·lular (Figura R4D), tot i que el percentatge de cèl·lules en G1 era major que en les cèl·lules HCT116 p53^{-/-}. La reducció de l'expressió de *ciclina A* impediria l'entrada en S de les cèl·lules en la fase G1. En el cas de *p53* i *c-myc* la baixada de l'expressió s'accentuava a les 24 hores de tractament. El sentit d'aquests canvis es discuteixen més endavant (veure 4.10.3. i Figura R31).

4.10.3. Anàlisi dels nivells de proteïnes per *Western blot*.

Varem comprovar si els canvis detectats en els nivells de transcripció després de períodes curts de tractament (4 ó 24 hores) es traduïen en canvis a nivell de proteïna. Per això es van analitzar els nivells de les proteïnes Ciclina B, p53, p21^{WAF1} i c-myc de cèl·lules tractades amb les corresponents IC₇₅ de Mitramicina SK durant diferents períodes de temps. Es van realitzar extractes de proteïnes a diferents temps: des del moment inicial dels tractaments, a diferents intervals, i fins el moment immediatament anterior a la mort de les cèl·lules.

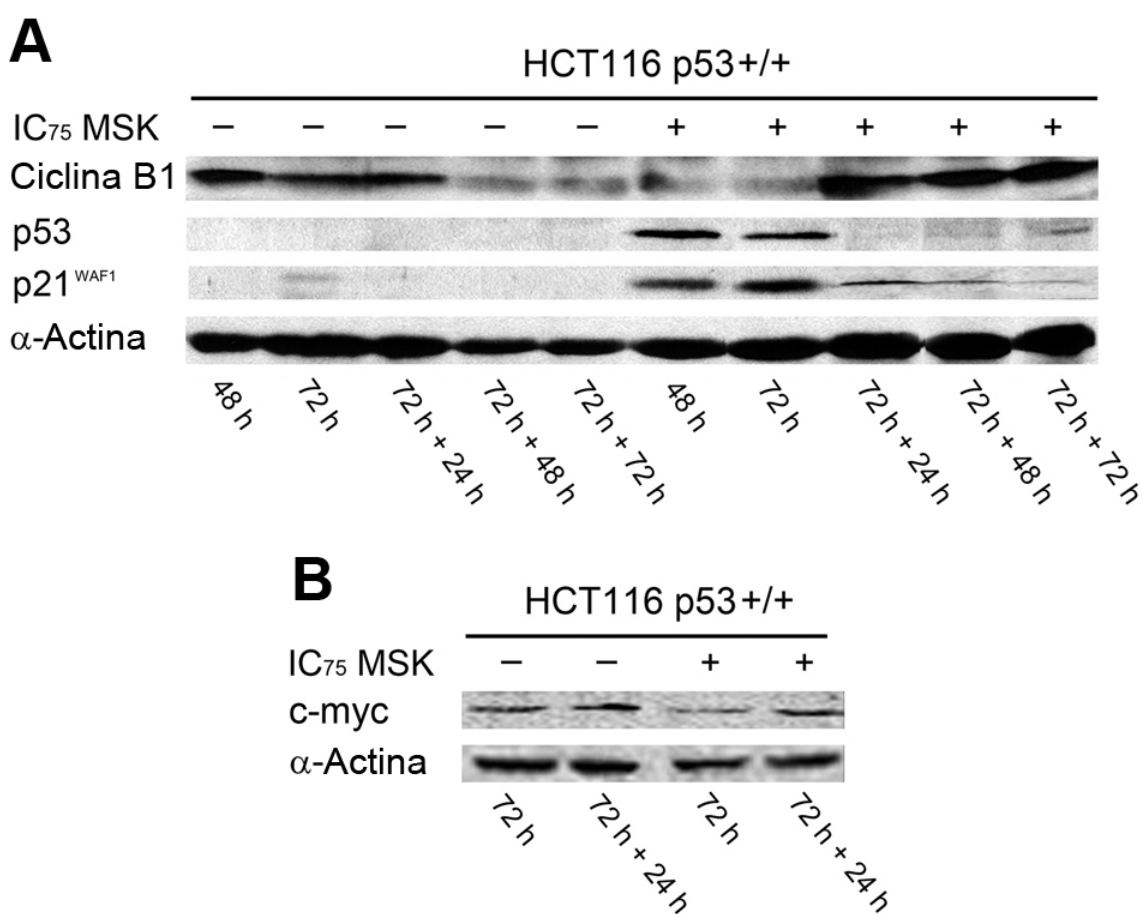


Figura R29. Anàlisi dels canvis en els nivells de les proteïnes Ciclina B1, p53, p21^{WAF1} i c-myc en cèl·lules HCT116 p53+/+ amb la IC₇₅ de MSK. (A) *Western blot* que mostra les variacions en els nivells de les proteïnes Ciclina B1, p53 i p21^{WAF1} des de les 48 hores fins a les 72 hores + 72 hores de tractament. (B) *Western blot* que mostra les variacions en els nivells de la proteïna c-myc a les 72 hores de tractament i 24 hores després del canvi de medi de cultiu. Es va utilitzar l'α-Actina com a control de càrrega. Es varen realitzar dos-tres experiments independents, amb resultats similars.

La Figura R29A mostra els resultats obtinguts amb la línia cel·lular HCT116 p53^{+/+}. El tractament amb la IC₇₅ de MSK va induir un augment inicial de les proteïnes p53 i p21^{WAF1}, d'acord amb els resultats obtinguts a la *Real-Time PCR* (Figura R27A). El canvi de medi de cultiu va provocar una disminució total de p53 i una lleugera disminució al llarg del temps de p21^{WAF1}, coincidint amb els canvis d'mRNA que havíem observat (Figura R27B). Varem observar que Ciclina B1 augmentava de forma molt considerable, un cop varem canviar el medi de cultiu, contradient el que varem observar a la *Real-Time PCR* (Figura R27). Respecte a c-myc (Figura R29B), sí que varem observar una reducció en els seus nivells de proteïna abans del canvi de medi, el que explicaria l'augment de p21^{WAF1}, i un cop varem canviar el medi de cultiu els nivells de c-myc tornaven als seus nivells basals comparat amb el control.

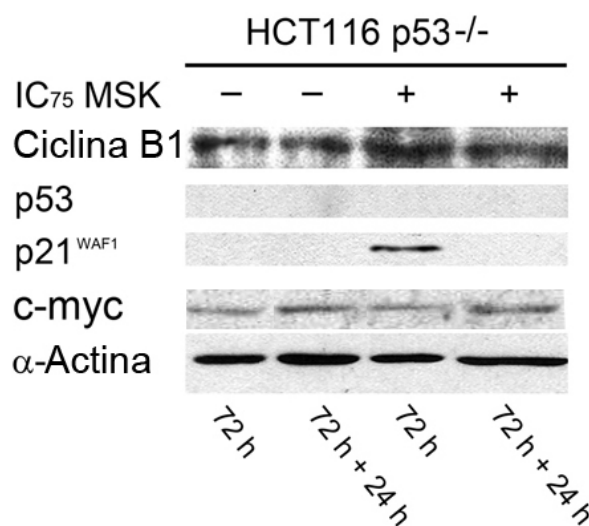


Figura R30. Anàlisi en cèl·lules HCT116 p53^{-/-} amb la IC₇₅ de MSK a les 72 hores de tractament i 24 hores després del canvi de medi de cultiu dels canvis en els nivells de les proteïnes Ciclina B1, p53, p21^{WAF1} i c-myc mitjançant *Western blot*. Es va utilitzar l'α-Actina com a control de càrrega. Es varen realitzar dos-tres experiments independents, amb resultats similars.

Els nivells de proteïnes en la línia cel·lular HCT116 p53^{-/-} tractades amb MSK es mostren en la Figura R30. Els nivells de p21^{WAF1} van augmentar fins a les 72 hores de tractament amb la IC₇₅ de MSK, però el canvi de medi de cultiu provocava una baixada dràstica dels seus nivells. La Ciclina B1 sembla augmentar durant el tractament, aquesta observació junt amb l'augment de p21^{WAF1} explicaria l'acumulació de cèl·lules en fase G2 del cicle cel·lular en cèl·lules deficientes en p53 (Figura R4C). En relació a c-myc, no es veuen canvis en els nivells de proteïna comparant amb les cèl·lules control, el que sembla contradir la baixada en la transcripció observada en la Figura R28A.

Els resultats obtinguts al analitzar els nivells de proteïnes en la línia cel·lular HCT116 p21^{-/-} es mostren a la Figura R31. Com varem comentar anteriorment a partir del canvi de medi de cultiu, la mort cel·lular en aquesta línia cel·lular s'accentuava molt, impossibilitant l'obtenció d'un extracte cel·lular suficient per realitzar l'anàlisi, així que varem analitzar els nivells de les proteïnes des de les 24 hores de tractament amb la IC₇₅ de MSK fins les 72 hores. Els nivells de la Ciclina B1 augmentaven durant el tractament, indicant que la majoria de cèl·lules estaven en fase G2 del cicle cel·lular (Figura R4D). Tal i com varem observar en les altres línies cel·lulars (comparar Figures R27B i R28A amb les Figures R29B i R30), la disminució de la transcripció de *c-myc* no es veia reflectida en una baixada dels nivells de proteïna. El cas de la proteïna p53 va ser el més contradictori ja que, mentre que a les 24 hores de tractament, la transcripció del gen es veia reduïda gairebé al 50% respecte al control (Figura R28B), els nivells de la proteïna augmentaven i perduraven en el temps.

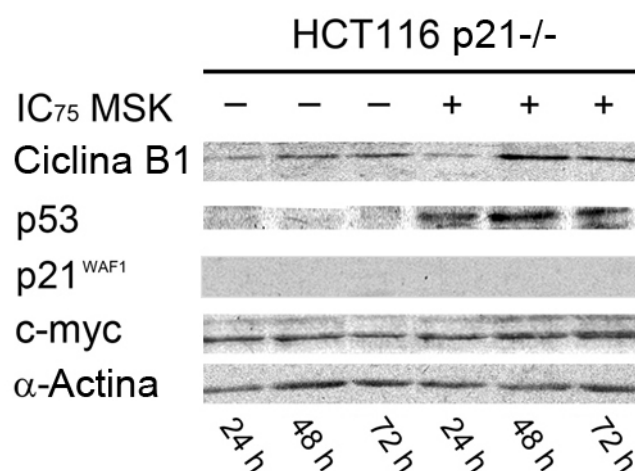


Figura R31. Anàlisi en cèl·lules HCT116 p21^{-/-} amb la IC₇₅ de MSK des de les 24 hores fins a les 72 hores de tractament dels canvis en els nivells de les proteïnes Ciclina B1, p53, p21^{WAF1} i c-myc mitjançant *Western blot*. Es va utilitzar l'α-Actina com a control de càrrega. Es varen realitzar dos-tres experiments independents, obtenint resultats similars.

La Figura R32 presenta la quantificació dels nivells de proteïnes mostrats en aquesta memòria. Varem quantificar aquelles proteïnes que més rellevància tenien a l'hora d'interpretar els resultats o aquelles que no estava gaire clar si els seus nivells augmentaven o decreixien.

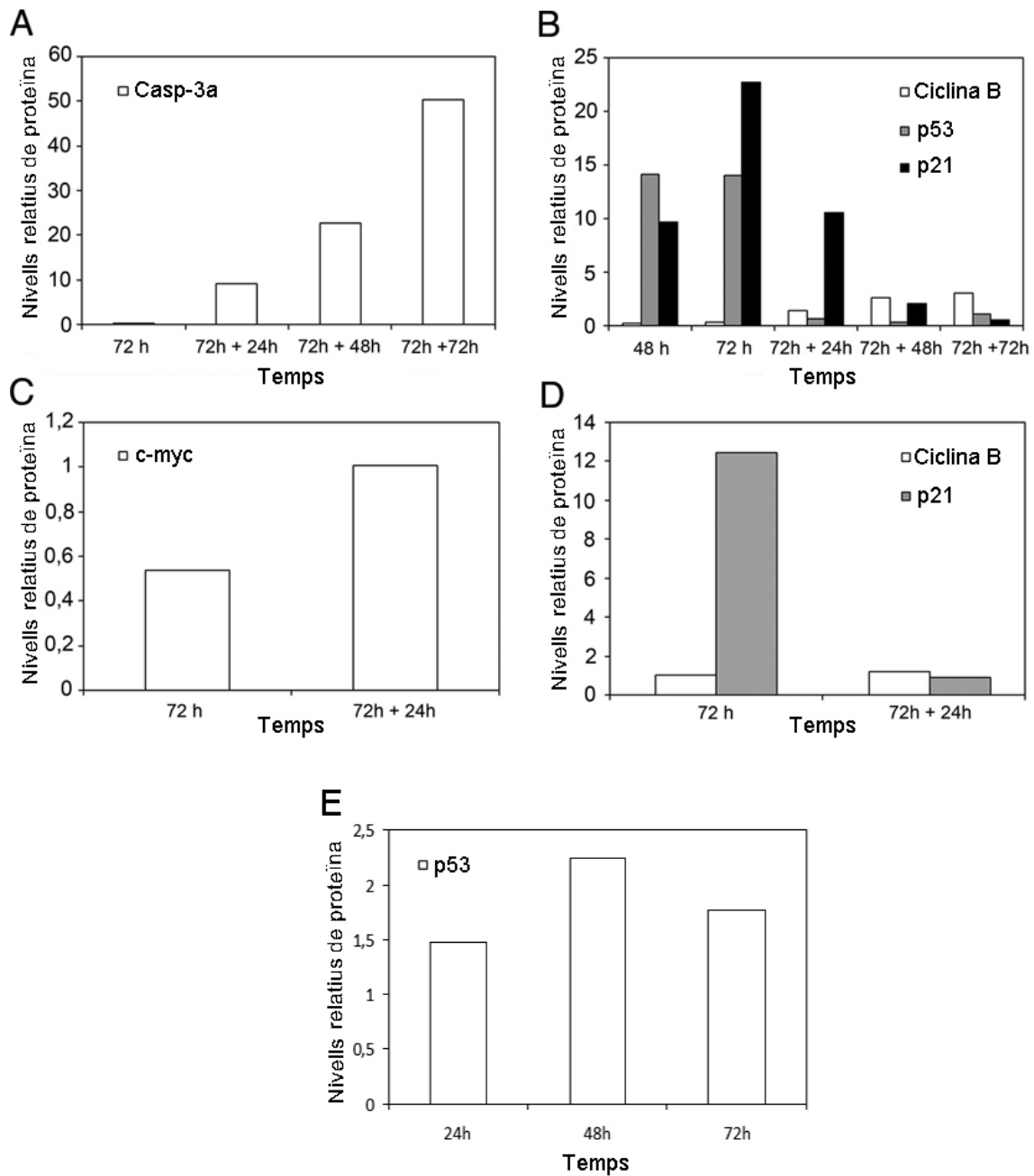


Figura R32. Quantificació dels *Western blots*. (A) Quantificació dels nivells d'expressió de la Casp-3a presentats a la Figura R22 en cèl·lules HCT116 p53^{+/+} tractades amb MSK. (B) Quantificació dels nivells d'expressió de Ciclina B, p53 i p21^{WAF1} presentats a la Figura R29A en cèl·lules HCT116 p53^{+/+}. (C) Quantificació dels nivells de c-myc presentats a la Figura R29B en cèl·lules HCT116 p53^{+/+} tractades amb MSK. (D) Quantificació dels nivells de Ciclina B i p21^{WAF1} presentats a la Figura R30 en cèl·lules HCT116 p53^{-/-} tractades amb MSK. (E) Quantificació dels nivells de p53 presentats a la Figura R31 en cèl·lules HCT116 p21^{-/-} tractades amb MSK. Els valors estan normalitzats respecte als nivells d' α -Actina.

Aquests resultats suggereixen que tot i que la MSK produïa canvis en l'expressió d'alguns gens, aquests canvis no es reflectien en una disminució dels nivells de proteïnes, que poguessin ser detectats per *Western blot*. Molts d'aquests gens tenen seqüències per la unió d'Sp1 en els seus promotors, com ara *c-myc*, *ciclina A*, *ciclina B* i *p21*, així que la disminució dels transcrits podria donar-se com a conseqüència del desplaçament de factors de transcripció com ara Sp1 per la MSK (Mansilla & Portugal, 2008). Però també hem de tenir en compte que altres gens que no presenten aquestes seqüències, com ara *p53*, també presentaven una disminució dels seus transcrits, indicant que la MSK no només pot desplaçar Sp1, sinó que, a més, podria estar afectant a les cèl·lules mitjançant un altre mecanisme independent.

4.11. ANÀLISI DE LA CAPACITAT DE PROLIFERACIÓ DE LES CÈL·LULES POLIPLOIDES.

Després del tractament amb MSK les cèl·lules HCT116 p53+/+ presenten una població poliploide a les 24 hores del canvi de medi de cultiu (Figura R4A). Aquesta població es va analitzar al llarg del temps, observant l'aparició de figures mitòtiques aberrants i cèl·lules multinucleades, indicatiu de catàstrofe mitòtica (Figura R15). Tot i que varem trobar un alt percentatge de mort cel·lular amb fenotip necròtic (Figura R18), també hi havia cèl·lules vives. Per aquest motiu, varem analitzar la capacitat de proliferació de les cèl·lules poliploides mitjançant un assaig clonogènic a les 72 hores de canviar el medi de cultiu després de 72 hores de tractament amb la IC₇₅ de MSK.

L'objectiu de l'assaig clonogènic era comprovar si les cèl·lules poliploides eren capaces de crear colònies, i si no ho eren, analitzar si acabaven morint com a conseqüència de la catàstrofe mitòtica o romanien vives. Per realitzar l'assaig, les cèl·lules HCT116 p53+/+ es van tractar amb la IC₇₅ de MSK durant 72 hores, varem canviar el medi de cultiu i esperar 72 hores més. Mitjançant un citometre de flux MoFlo (DakoCytomation) es van detectar les cèl·lules >4N (Figura R33) i les varem ressemmbrar en una microplaca de 96 pous. També varem ressemmbrar cèl·lules presents en les fases G1 i G2 com a control de la proliferació. Les cèl·lules es van incubar durant 14 dies.

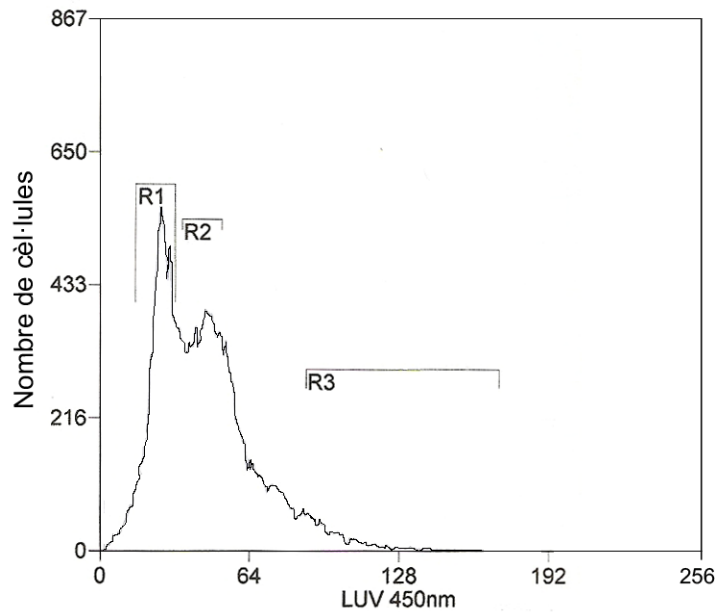


Figura R33. Anàlisi del cicle cel·lular de les cèl·lules HCT116 p53+/+ tractades amb la IC₇₅ de MSK durant 72 hores + 72 hores. Les cèl·lules es van tenyir amb el colorant vital Hoechst 33342. Les regions R1, R2 i R3 corresponen a les cèl·lules 2N, 4N i >4N respectivament.

La Figura R34A mostra el nombre de clons presents en la placa durant els 14 dies d'incubació després d'haver resseminat les cèl·lules poliploides. Es va partir d'una població de 84 cèl·lules repartides cadascuna en un pou diferent. Al cap de 14 dies només quedaven 20 cèl·lules. Cap de les cèl·lules analitzades va ser capaç de formar colònies. La Figura R34B mostra imatges de la formació d'una colònia a partir d'una cèl·lula en fase G1 del cicle cel·lular (2N) i tres cèl·lules representatives de les vint cèl·lules >4N que varen sobreviure als 14 dies d'incubació. Varem observar que les cèl·lules poliploides eren gegants amb un contingut en DNA elevadíssim al final dels 14 dies d'incubació. Degut a que la mortalitat augmentava de manera dependent al temps d'incubació (Figura R34A) podem deduir que aquestes cèl·lules no podien sobreviure molts més dies i que acabarien morint com la resta de les cèl·lules poliploides analitzades.

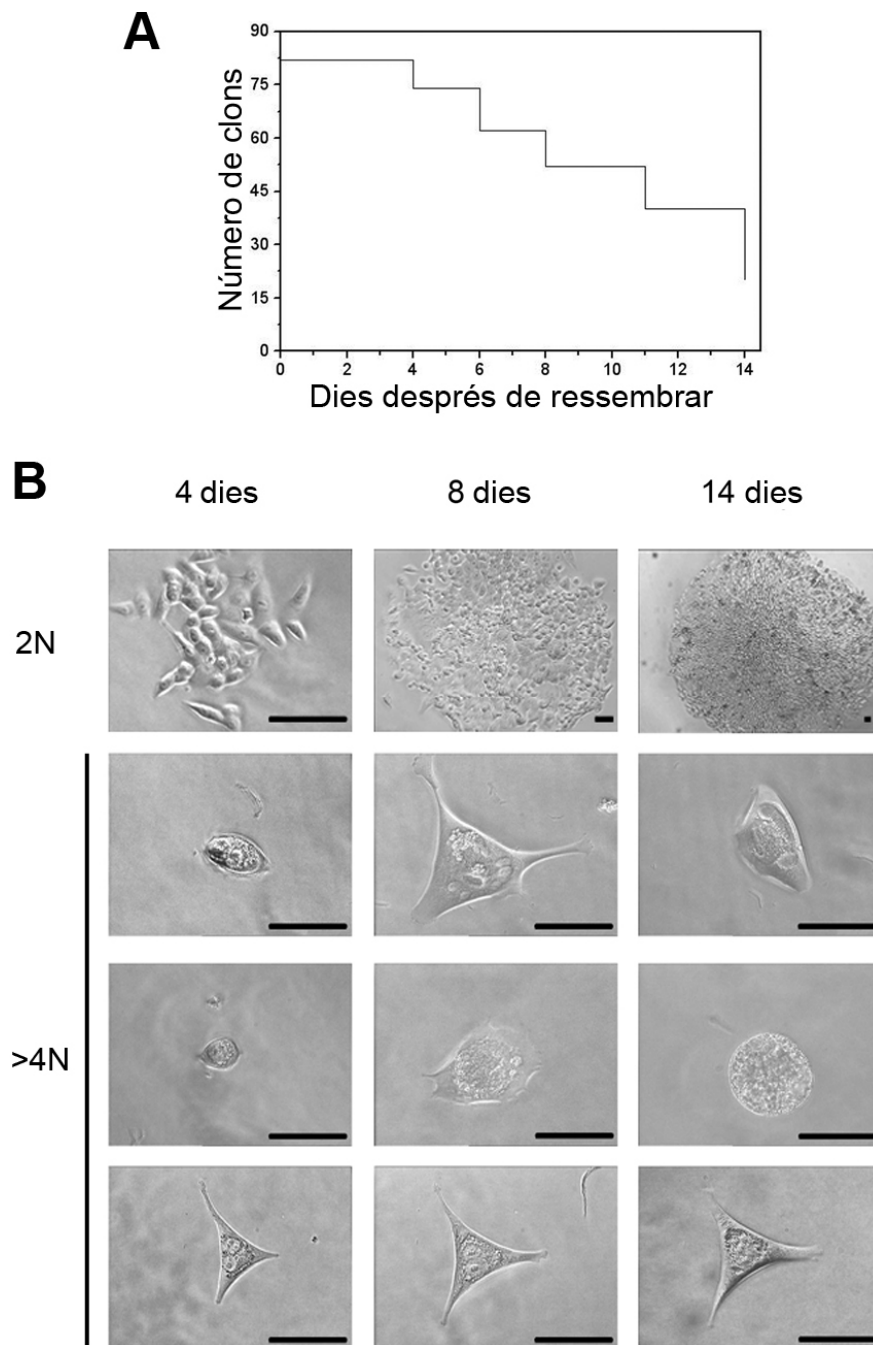


Figura R34. Assaig clonogènic de cèl·lules HCT116 p53+/+ tractades prèviament amb la IC₇₅ de MSK durant 72 hores + 72 hores. Després de la detecció i separació de les cèl·lules >4N, es van ressementar en una microplaca de 96 pous i es van incubar durant 14 dies. (A) Progressió durant el temps del nombre de clons presents en la microplaca. (B) Imatges representatives de la formació de colònies de cèl·lules no poliploides (2N) i seguiment de les cèl·lules poliploides durant el temps (>4N). Barra = 100 µm.