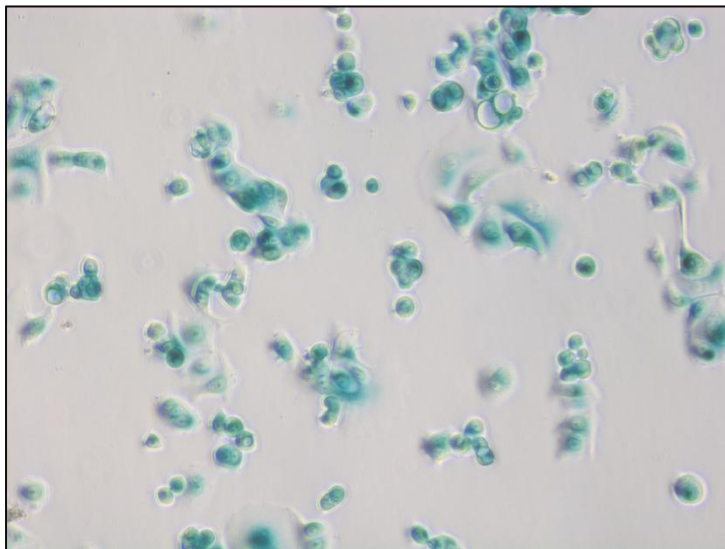


TRABAJO DE FIN DE GRADO

**Estudio de la actividad senolítica en células tumorales tras
quimioterapia**



Margarita Franco Sanmartín
Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Fisiología
Tutor: Fernando Domínguez Puente
Cotutor: Manuel Collado Rodríguez
Convocatoria de septiembre
Curso 2020-2021

ÍNDICE

1. RESUMEN
2. INTRODUCCIÓN
 - 2.1 Causas de senescencia
 - 2.1.1 Senescencia replicativa
 - 2.1.2 Senescencia prematura inducida por estrés (SIPS, por sus siglas en inglés)
 - 2.1.3 Senescencia inducida por activación de oncogenes (OIS)
 - 2.1.4 Senescencia por tratamiento con quimioterápicos
 - 2.2 Características de la senescencia
 - 2.2.1 Parada del ciclo celular
 - 2.2.2 SASP
 - 2.2.3 Morfología
 - 2.2.4 Presencia de DNA-SCARS y SAHFs
 - 2.2.5 Tinción β -galactosidasa Asociada a Senescencia (Tinción SA- β -Gal)
 - 2.2.6 Rutas
 - 2.3 Senescencia, envejecimiento y cáncer
3. MATERIALES Y MÉTODOS
 - 3.1 Cultivos Celulares
 - 3.2 Purificación de plásmidos
 - 3.3 Transfección y transducción
 - 3.4 Expresión de los plásmidos
 - 3.5 Clonogenicidad
 - 3.6 Tinción β -galactosidasa asociada a senescencia
 - 3.7 Extracción y cuantificación de proteínas
 - 3.8 Western blot
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN
 - 5.1 Expresión de RB y Cyclin E1
 - 5.2 Caracterización de senescencia celular
 - 5.2.1 Cambios morfológicos
 - 5.2.2 Tinción β -galactosidasa asociada a senescencia
 - 5.3 Clonogenicidad
6. CONCLUSIONES
7. REFERENCIAS

1. RESUMEN

La senescencia celular es un fenómeno consistente en la detención estable de la proliferación celular. Todas las células somáticas adultas normales están sometidas a este proceso y entran en senescencia debido a su activación por diversos estímulos. Sin embargo, las células cancerígenas consiguen escapar a esta parada del ciclo celular dando lugar a la formación de tumores, por lo que podemos considerar a la senescencia como un mecanismo de protección frente al cáncer. No obstante, se ha comprobado que, pese a haber superado dicho obstáculo, algunas células tumorales pueden entrar en senescencia mediante el tratamiento con quimioterápicos. Palbociclib es un ejemplo de quimioterápico que actúa en la vía ciclina D-cdk4/6-RB inhibiendo directamente a las kinasas cdk4/6, con lo que el ciclo celular no puede progresar y se induce la entrada en senescencia de las células tumorales. No obstante, se observó que algunas células tumorales son resistentes al efecto de Palbociclib y no entran en senescencia tras su administración. Esto es debido a alteraciones genéticas que producen defectos como pueden ser la ausencia de proteína RB o la sobreexpresión de ciclina E1. En el presente trabajo se usan vectores lentivirales para reducir la expresión de RB y para inducir la sobreexpresión de ciclina E1 en la línea celular tumoral de mama MCF-7. Con ello, tratamos de comprobar que dichos vectores son capaces en esta línea celular de impedir la entrada en senescencia pese al tratamiento con Palbociclib y generamos unas líneas celulares estables modelo de resistencia al fármaco.

2. INTRODUCCIÓN

La senescencia celular se caracteriza por ser un proceso que consiste en la parada estable del ciclo celular. Fue definida por Hayflick y Moorhead en 1961, mientras trataban de conseguir una línea celular humana estable para utilizar en sus experimentos. Lo que se encontraron es que tras un determinado número sucesivo de divisiones celulares, las células dejaban de dividirse y adoptaban una morfología característica (1). Se estableció como límite de Hayflick el número de divisiones máximo que puede sufrir una célula antes de entrar en senescencia.

Sin embargo, las células cancerígenas pueden proliferar indefinidamente en cultivo sin entrar en senescencia celular. Por ello, se ha descrito este proceso de parada del ciclo celular como un mecanismo de protección frente al cáncer (2).

2.1 Causas de senescencia

Hay distintos estímulos o estresores que pueden desencadenar senescencia celular (3).

2.1.1 Senescencia replicativa

Es la mencionada anteriormente definida por Hayflick y Moorhead; aunque ellos no sabían la causa de su hallazgo, posteriormente se descubrieron los telómeros, que son secuencias de ADN repetido varias veces que están en los extremos de los cromosomas y que impiden que se pierda material genético (se evita su degradación y recombinación) (4). En las células somáticas adultas las ADN polimerasas no son capaces de replicar estos telómeros, por ello en cada división celular se pierden bases nucleicas pertenecientes a éstos y cada vez los telómeros se hacen más cortos (5).

Llegado un punto se alcanza un tamaño mínimo de los telómeros y es cuando la célula deja de dividirse (se ha alcanzado un límite determinado de divisiones) y así se evita la proliferación de estas células con los telómeros acortados (6).

Sin embargo, las células tumorales son capaces de evitar esta senescencia replicativa debido a que expresan la enzima telomerasa que añade nuevas repeticiones a los extremos de los cromosomas, impidiendo con ello el acortamiento de los telómeros tras las sucesivas divisiones celulares. (7)

2.1.2 Senescencia prematura inducida por estrés (SIPS, por sus siglas en inglés)

Existen distintos estresores que inducen senescencia por estrés. Entre los más estudiados están el estrés oxidante, la exposición a radiación ultravioleta, la hiperoxia, el deterioro de la autofagia, inhibición del proteasoma, entre otros (8). La parada proliferativa que supone la senescencia es un mecanismo de defensa ante la proliferación de células con el ADN deteriorado.

El nivel de daño acumulado en una célula determinará si una célula continúa su proliferación, entra en senescencia, entra en apoptosis o se necrosa (9).

2.1.3 Senescencia inducida por activación de oncogenes (OIS)

Los oncogenes son versiones mutantes de genes que promueven una excesiva proliferación celular. La sobreexpresión de algunos oncogenes como *RAS*, *RAF*, *AKT*, *E2F1/3*, *Ciclina E*, *MOS* y *CDC6* (8), puede inducir también senescencia como mecanismo antitumoral (10). En esta parada del ciclo celular se puede observar la sobreexpresión de los supresores de tumores p53, p16 y p21.

Mutaciones en el oncogén *RAS* y la supresión de la expresión de p53 y p16 (11) son las mutaciones más frecuentes en tumores.

2.1.4 Senescencia por tratamiento con quimioterápicos

Los quimioterápicos ejercen su función causando un daño en el ADN o inhibiendo una vía esencial para que progrese el ciclo celular, lo que resulta en apoptosis o senescencia de las células tumorales. Hasta hace poco la única forma de actuar era induciendo apoptosis, pues se creía que las células tumorales no podían entrar en senescencia; pero Roninson demostró que estas células sí tienen la capacidad de experimentar este fenómeno (12-10). Esto ocurre in vitro y se ha visto que también ocurre in vivo, ya que al extraer tejidos de pacientes tratados

también se observan células senescentes. Esto constituye un mecanismo de supresión del desarrollo tumoral mediante estos quimioterápicos y puede influir en el mayor o menor éxito de la terapia (11).

Debido a todo lo anterior, la senescencia causada por fármacos antitumorales es una alternativa interesante para la terapia del cáncer, que podría además tener menos efectos secundarios que muchas otras terapias que se utilizan.

2.2 Características de la senescencia

2.2.1 Parada del ciclo celular

La característica más importante de las células senescentes es la parada del ciclo celular en la fase G1. Se ha definido que las células quiescentes presentan una parada del ciclo celular reversible y las células senescentes una parada irreversible (12). No obstante, en años recientes se ha puesto en duda que la senescencia sea una parada irreversible, ya que en 2003 se logró revertir la senescencia replicativa al inactivar p53 en fibroblastos humanos de la línea BJ y también se logró demostrar que cuando p16 se encontraba en niveles altos, la senescencia se mantenía, mientras que cuando bajaba se revertía la senescencia. Sin embargo, en el mismo trabajo les fue imposible revertir la senescencia de fibroblastos humanos WI-38, por lo que se sugirió que no es un evento universal para todas las células (13).

2.2.2 SASP

Las células senescentes presentan la secreción de un complejo patrón de citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, metaloproteinasas y especies reactivas de oxígeno, conocido de manera global como SASP (*Senescence Associated Secretory Phenotype*). El SASP modifica el microambiente y tiene actividad autocrina y paracrina (14).

El SASP puede tener efectos pleiotrópicos aparentemente antagónicos, ya que puede activar al sistema inmunológico para la eliminación de las células senescentes, puede reforzar la propia senescencia, la proliferación, la diferenciación, la angiogénesis. Pero por otra parte puede estimular a las células para convertirse en tumorales (15).

2.2.3 Morfología

Estas células sufren cambios morfológicos, son células aplanadas y de mayor tamaño, llegando a doblar el de sus vecinas no senescentes. Suelen también tener un citoplasma con proyecciones alargadas (1,11).

2.2.4 Presencia de DNA- SCARS y SAHF's

Las células senescentes suelen presentar daño o "cicatrices" en el ADN denominados focos DNA-SCARS (*Segments with Chromatine Alterations Reinforcing Senescence*) (16) y cambios en la heterocromatina denominados SAHF's (*Senescence Associated Heterocromatin Foci*) (17).

Hay evidencia de que los SAHFs promueven la expresión de RB y así se produce una represión estable de genes con papeles determinantes en la progresión del ciclo celular.

Un grupo de proteínas que son parte de SAHFs son las proteínas grupo A de alta movilidad, las cuales al ser inactivadas junto con p16, impiden la entrada en senescencia inducida por oncogenes. Sin embargo, no en todos los modelos de senescencia se ha observado de formación de SAHFs (18).

2.2.5 Tinción β -galactosidasa asociada a senescencia (tinción SA- β -Gal)

El marcador más utilizado para detectar senescencia es la tinción SA B-Gal, que supone la detección de la actividad β -Galactosidasa a pH 6. Este marcador permite diferenciar las células senescentes de las quiescentes, pues esta actividad no está aumentada en la quiescencia (19).

En las células senescentes hay un aumento de la masa lisosomal que supone un aumento de la actividad β -Galactosidasa. Este aumento permite que la actividad sea detectada a un pH subóptimo (óptimo sería a pH 4) (20, 21).

Se utiliza el sustrato cromogénico 5-bromo 4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal) o su análogo fluorescente la fluorescein-di- β -D-galactopiranosido (FDG) (22).

2.2.6 Rutas

La parada del ciclo celular que caracteriza a la senescencia se mantiene estable debido a las rutas ARF-p53-p21 y p16-cdk4-pRB, que son rutas supresoras de tumores (23). Cada una de estas rutas actúa debido a estímulos diferentes y posee diferencias según de qué especie se trate. No es necesario que estén las dos rutas activadas para que las células entren en senescencia, pero sí existen interacciones entre ellas y se modulan la una a la otra (24).

Estas rutas se encuentran al inicio de la cascada de senescencia, por lo que los tumores pueden adquirir mecanismos de retroalimentación para bloquear el resultado de senescencia a pesar de expresar altos niveles de estos marcadores. Debido a esto, para definir un cultivo celular como senescente, varios marcadores deben ser identificados conjuntamente.

- Ruta ARF-p53-p21

P53 es un factor de transcripción cuya actividad se encuentra aumentada por la proteína ARF en respuesta a una gran variedad de formas de estrés celular (25). A su vez, p53 promueve la expresión de p21.

Una reducción en la expresión de p53 o p21 puede llegar a impedir la senescencia o revertir el proceso cuando este ya se ha producido.

- Ruta p16-cdk4-Rb

Las proteínas del retinoblastoma (RB) son una familia de proteínas que se encargan de reprimir la expresión génica y con ello la progresión del ciclo celular. Para realizar dicha

función, RB se une e inhibe factores de transcripción de la familia E2F (formados por dímeros de la proteína E2F y por una proteína DP). De este modo la célula queda estancada en la fase G1 del ciclo celular. Además, el complejo RB-E2F/DP también produce la unión de una histona deacetilasa (HDAC) a la cromatina, lo cual también disminuye la transcripción de factores que promueven la entrada en fase S (26).

Cdk4/6 son unas proteínas quinasas dependientes de las ciclinas D que se encargan de fosforilar a las proteínas del retinoblastoma (RB), inhibiendo así su unión con E2F/DP y permitiendo así la progresión del ciclo celular. Uno de los reguladores de esta ruta es p16, que inhibe la actividad de cdk4, de modo que al activarse p16 se impide la proliferación celular (por lo que es un importante supresor de tumores) (27).

Los inhibidores de cdk4/6, como Palbociclib, se utilizan en la actualidad como terapia frente al cáncer ya que impiden la fosforilación de RB y, como consecuencia, reprimen al factor de transcripción E2F, impidiendo con ello la progresión del ciclo celular y causando la entrada en senescencia de las células tumorales. De este modo, con estos inhibidores de cdk4/6 se busca la senogénesis (inducción de senescencia) (28).

Esta ruta es paralela a la de p53, ya que RB depende también de la expresión de p21. Cuando p53 está activo, induce la expresión de p21, y a su vez este inhibidor de cdk4 inhibe la fosforilación de RB y por tanto se produce la entrada en senescencia.

Además, la ruta de p16-cdk4-RB es la encargada de la generación de SAHFs, silenciando de forma permanente los genes necesarios para la progresión del ciclo celular (15).

2.3 Senescencia, envejecimiento y cáncer

La cantidad de células senescentes en un organismo aumenta con la edad, y este número también es mayor en patologías relacionadas con el envejecimiento. Se pueden observar marcadores y características de senescencia en tejidos o cultivos celulares con más envejecimiento que otros. Por ejemplo, se ha observado en organismos con mayor actividad de p53 de lo normal, que muestran síntomas de envejecimiento prematuro (29).

La senescencia también se asocia con la pérdida de pluripotencia de las células madre, limitándose así la capacidad regenerativa de los tejidos y contribuyendo al envejecimiento (30).

La tinción de SA- β -Gal también se ve aumentada en tejidos de células más envejecidos que en los más jóvenes (10).

Ya hemos mencionado que la senescencia es un mecanismo protector frente al cáncer debido a la parada del ciclo celular (impide la proliferación de las células) (31).

En las lesiones neoplásicas premalignas las células senescentes son abundantes, mientras que en estadios más avanzados del cáncer están casi ausentes (10).

Por tanto, la pérdida de la capacidad de senescencia es un paso muy importante en el crecimiento tumoral, que se debe fundamentalmente a mutaciones en las rutas ARF-p53-p21 y p16-cdk4-RB.

Sin embargo, a pesar de este efecto supresor de tumores de la senescencia, también se ha observado un efecto favorable a la tumorigénesis debido a senescencia, mediante la promoción de rasgos de cáncer y la inactivación del sistema inmunológico. Así que hay un efecto dual y aparentemente contradictorio en el rol de la senescencia en relación con el cáncer (32).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cultivos celulares

Las células HEK293T (Human Embryonic Kidney 293 cells, células de riñón embrionario humano 293) y MCF-7 (Human Breast Adenocarcinoma cells, estrogen receptors positive, her2/neu negative; células de adenocarcinoma de mama humanas, receptores de estrógeno positivas, her2/neu negativas) empleadas en los experimentos realizados, se cultivaron con medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, medio de Eagle modificado por Dulbecco, Sigma), suplementado con 10% de FBS (Fetal Bovine Serum, Suero Fetal Bovino, Sigma), 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma) y 1% de glutamina (Sigma). Se realizaban pases de mantenimiento cada 3 días, manteniéndolas en un incubador cuyas condiciones eran 37° y 5% de CO₂.

Para la congelación de estas células en crioviales, se utilizó FBS (Fetal Bovine Serum, Suero Fetal Bovino, Sigma) al 10% de DMSO (dimethyl sulfoxide, dimetil sulfóxido, Sigma).

3.2 Purificación de plásmidos

Los plásmidos de interés con los que posteriormente se iba a hacer transfección y transducción se hallaban en el interior de bacterias *Escherichia coli*, por lo que fue necesario extraerlos (purificarlos).

El sembrado de las bacterias se hizo en LB agar (Agar Luria) con ampicilina 100 µg/mL y se dejaron crecer toda la noche en la estufa a 37°. Al día siguiente, se pusieron a precrecer una colonia de bacterias de cada uno de los plásmidos en medio LB (preparado previamente) en matraces Erlenmeyer con ampicilina y se dejaron en el agitador orbital a 200 rpm (revoluciones por minuto) toda la noche. Al día siguiente, se centrifugó en tubos Falcon el contenido de los matraces Erlenmeyer con las bacterias que habían estado creciendo a 3900 rpm.

Lo siguiente fue la purificación de los plásmidos que estas bacterias contenían en su interior con el Kit NucleoBond Xtra Midi (Macherey-Nagel) con sus respectivos buffers. Al final del proceso, hubo que medir en un espectrofotómetro la concentración de cada plásmido obtenido en cada tubo Eppendorf y finalmente guardarlos en el congelador de -20°.

3.3 Transfección y transducción

Para producir los lentivirus se utilizaron las células HEK293T, las cuales fueron sembradas (5×10^6) 8 horas antes de hacer la transfección. Para la transfección se utilizó el plásmido de interés en cada caso y los empaquetadores lentivirales correspondientes, en una proporción 1:(1,1,1,1), empleando 5 μg de ADN en cada placa.

Los plásmidos de interés utilizados fueron: pInducer20 Cyclin E1, plko-*RBI*-shRN19, plko-*RBI*-shRNA19. Los plásmidos de control utilizados fueron: pInducer20 empty vector y plko-sh scrambled. Los plásmidos empaquetadores utilizados: pLp1, pLp2, pLVSVG.

Se preparó una mezcla con los anteriores plásmidos y un reactivo favorecedor de la transfección, el PEI (Polyethylenimine, polietilenimina) en una proporción 1:6 (ADN/PEI) completando con DMEM sin suplementar hasta alcanzar un volumen final de 500 μl por placa p100. Después se procedió a homogeneizar los 500 μl de muestra en un vórtex durante 5 segundos y se dejó incubar 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió esta mezcla a cada una de las placas p100 de HEK293T.

Al día siguiente de la transfección, se lavaron con PBS las placas de HEK293T y se les cambió el medio. También se plaquearon $1,2 \times 10^6$ células por placa p100 de MCF7.

Para realizar la transducción, 12 horas después, se recogió el medio condicionado de las células HEK293T que contiene las partículas lentivirales que portan nuestros plásmidos de interés, sustituyéndolo por medio fresco. El medio recogido se filtró a través de un filtro de PVDF (polyvinylidene fluoride, fluoruro de polivinilideno) de 0,45 μm (JetBiofil), y se le añadió Polybrene (Sigma) a 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, el cual facilita la entrada de las partículas virales en las células. Luego se procedió a sustituir el medio de las MCF-7 sembradas anteriormente por este medio recogido con polybrene. Este proceso se repitió 3 veces durante 36 horas, con incubaciones con medio condicionado cada 12 horas y, en la última ronda, se cambió el medio a las MCF-7 transducidas por medio fresco.

Una vez completada la transducción, fueron seleccionadas con el antibiótico puromicina las células MCF-7 con los plásmidos plko-*RBI*-shRNA19, plko-*RBI*-shRNA63 y plko-sh scrambled a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y el antibiótico G418-Neomicina (Sigma) para las células MCF-7 con los plásmidos pInducer20 Cyclin E1 y pInducer20 empty vector. En este último caso se realizó una curva dosis-respuesta y se concluyó que la concentración deseada a la que sólo sobrevivían las células de interés era 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de neomicina.

3.4 Expresión de los plásmidos

Los plásmidos plko-*RBI*-RNA19, plko-*RBI*-RNA63 son de expresión constitutiva, así que no es necesario añadir ninguna sustancia para que se expresen. Sin embargo, los plásmidos pInducer20 Cyclin E1 y pInducer20 empty vector, son de expresión inducible, por lo que era necesario añadirle doxiciclina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las células cada dos días, en tres ciclos.

3.5 Clonogenicidad

Para ver los efectos del quimioterapéutico Palbociclib, se hizo un estudio de clonogenicidad. Lo primero fue sembrar placas de $1,2 \times 10^6$ células MCF-7 en placas p100 y tratarlas cada tres días con Palbociclib $0,5 \mu\text{M}$ durante 3 ciclos (las células con los plásmidos pInducer20 Cyclin E1 y pInducer20 empty vector, eran tratadas al mismo tiempo con doxiciclina).

Después se sembraron en placas multiwell p6 10.000 células en cada pocillo, sembrando tres pocillos de cada plásmido. Estas células fueron posteriormente tratadas con Palbociclib $0,5 \mu\text{M}$ (y con doxiciclina las MCF-7 con pInducer20 cyclin E1 y con pInducer20 empty vector) cada 3 días durante dos semanas.

A continuación se procedió a la tinción con cristal violeta, para lo cual se lavaron los pocillos de las placas p6 con PBS, después se echó glutaraldehído 4% y se dejó 10 minutos a temperatura ambiente, luego se lavó con PBS dos veces y se procedió a echar cristal violeta y a incubar durante 25 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se lavaron las placas con agua.

Finalmente se procedió a medir la densidad óptica, la absorbancia. Para ello, en la campana de gases, se echó ácido acético al 5 % en cada uno de los pocillos de cada placa p6 ($0,5 \text{ mL}$ por pocillo) y se dejó incubar 5 minutos. Después se echó un triplicado de cada muestra en una placa p96 (100 mL por pocillo), usando el ácido acético como blanco. La absorbancia fue medida en el lector de placas VERSAmax micro plata reader (Molecular Devices) con una longitud de onda de 540 nm .

3.6 Tinción β -galactosidasa asociada a senescencia

Se procedió a retirar el medio, a lavar dos veces con PBS y a la fijar las células a temperatura ambiente 15 minutos con la solución de fijación: 2% formaldehído y 0,2% glutaraldehído. A continuación se lavó con PBS tres veces y se añadió la solución de tinción: 40 mM buffer ácido cítrico/fosfato a pH 6,0, 5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 2 mM MgCl_2 y 1mg/ml del sustrato X-Gal. Se dejó incubar toda la noche, en una estufa a 37° . Al día siguiente se retiró la solución de tinción, se lavó con agua dos veces y se conservó en PBS a 4° .

3.7 Extracción y cuantificación de proteínas

- Extracción

En primer lugar, se obtuvo un pellet seco de los cultivos celulares que teníamos. Para ello se lavaron los cultivos con PBS, y en el último lavado se recogieron las células. Después se centrifugó 5 minutos a 900 rpm, se retiró el medio y se resuspendió el pellet en PBS, volviendo a centrifugar a 5 minutos a 3000 rpm en frío. Después se eliminó el sobreañadarse y se conservó a -80° .

Días después se procedió a la lisis de las células del pellet con tampón RIPA (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1% SDS, 1% Tritón x100, 5 mM EDTA pH 8,0 y 1% desoxicolato sódico) con los inhibidores (1 mM ortovanadato sódico, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 4 mM NaF y cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma). A continuación, se incubó a 4° durante 20 minutos y después se centrifugó 15 minutos a 13.200 rpm a 4° .

- Cuantificación

Las muestras obtenidas de proteínas se cuantificaron mediante el método de Bradford, empleando el kit comercial DC protein Assay Bio-RAD. La recta de calibrando utilizada se construyó con concentraciones crecientes de BSA (Bovine Serum Albumin, albúmina de suero bovino, Sigma), y la absorbancia fue medida en el lector de placas VERSAmax micro plate reader (Molecular Devices) con una longitud de onda de 750 nm.

3.8 Western blot

Las proteínas se separaron mediante una electroforesis utilizando geles al 12% de poliacrilamida (solución 30% Acrilamida/Bis 29:1, BIO-RAD). Lo siguiente fue transferirlas a membranas de PVDF de 0,45 µm (Millipore) y se incubaron con anticuerpos primarios y secundarios, acoplados estos últimos a HRP (Horseradish Peroxidase, peroxidasa de rábano picante). Finalmente, para detectar la presencia de la unión de antígeno-anticuerpo, se utilizó un sistema de quimioluminiscencia basada en ECL (Enhanced ChemioLuminiscence, quimioluminiscencia aumentada), seguido de una exposición a película autorradiográfica y un revelado.

Los anticuerpos utilizados fueron: anti-p-RB (rabbit monoclonal; dilución 1:1000), anti-RB (mouse monoclonal, 1:2000), anti-Cyclin E1 (rabbit polyclonal, 1:1000), anti-β-actina (mouse polyclonal, 1:5000), anti-β-tubulina (rabbit polyclonal, 1:1000).

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las células tumorales durante la tumorigénesis escapan al control de mecanismos supresores de tumores como es la senescencia celular. Pese a ello, algunos tratamientos con agentes quimioterápicos pueden inducir la senescencia celular en estas células. En el presente trabajo se estudia la respuesta de senescencia celular en células tumorales MCF-7 tras la administración del quimioterápico Palbociclib y también la resistencia a la respuesta de senescencia tras la administración de este fármaco en células con una gran disminución de RB y en células con una sobreexpresión de Cyclin E1. Para ello nos hemos propuesto:

- Generar líneas de células MCF-7 con una reducción en la expresión de RB y líneas de células MCF-7 con una sobreexpresión de Cyclin E1.

- Caracterizar la respuesta de senescencia celular tras la administración de Palbociclib en células MCF-7 sin modificaciones, en células MCF-7 con una gran disminución de RB y en células MCF-7 con una sobreexpresión de Cyclin E1.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Expresión de RB y Cyclin E1

El objetivo principal era generar dos líneas de células tumorales humanas MCF-7 con poca expresión de la proteína RB (MCF-7 plko-*RBI*-shRNA19 y MCF-7 plko-*RBI*-shRNA63) y una línea de MCF-7 con una sobreexpresión de Cyclin E1 (MCF-7 pInducer20 Cyclin E1).

Para poder alcanzar dicho objetivo fue necesario primero introducir los plásmidos de interés en las células MCF-7. Para ello, se procedió a la transfección de las mismas mediante la generación de partículas lentivirales en la línea celular HEK293T. Se cotransfectaron dichas células con los plásmidos plko-*RBI*-shRNA19, plko-*RBI*-shRNA63, plko-sh scrambled, pInducer20 Cyclin E1, pInducer20 empty vector, junto con los vectores empaquetadores, lo que permite la generación de partículas lentivirales que portan nuestros genes de interés. Los plásmidos plko-sh scrambled y pInducer20 empty vector sirvieron de controles negativos, pues las células que los contenían no tendrían la reducción en la expresión de la proteína RB ni la sobreexpresión de Cyclin E1 (estas últimas al ser tratadas con doxiciclina), respectivamente.

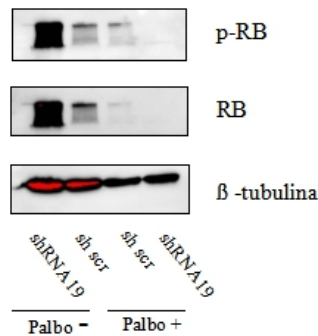
Para controlar el proceso de transfección en HEK293T se utilizó también el plásmido c-fugw, puesto que este plásmido codifica GFP (Green Fluorescent Proteínas), una proteína verde fluorescente que puede ser observada con el microscopio de fluorescencia.

Una vez que se comprobó la eficacia de la transfección, se procedió a la transducción lentiviral de las células MCF-7 y su posterior selección con puomicina (las de los plásmidos plko-*RBI*-shRNA19, plko-*RBI*-shRNA63 y plko-sh scrambled) y con G418 neomicina (las de los plásmidos pInducer20 Cyclin E1 y pInducer20 empty vector).

Las células con los plásmidos plko eran de expresión constitutiva, mientras que a las pInducer20 había que tratarlas con doxiciclina 1 µg/mL para que expresasen los genes de interés.

Por tanto, se sembraron $1,2 \times 10^6$ de células MCF-7 plko-*RBI*-sh-RNA19, de MCF-7 plko-*RBI*-shRNA63 y de MCF-7 plko-sh scrambled y se trataron con Palbociclib cada tres días, en tres pautas. Posteriormente se recogió el pellet seco de dichas células. También se recogió el pellet seco de células MCF-7 plko-*RBI*-shRNA19, MCF7 plko-*RBI*-shRNA63 y MCF-7 plko-sh scrambled que habían sido sembradas ($1,2 \times 10^6$) sin tratar con ningún compuesto.

Se procedió por tanto a la preparación de extractos de proteína, la cuantificación de la concentración de proteína total y la realización de Western blot para comprobar la expresión de p-RB y RB.

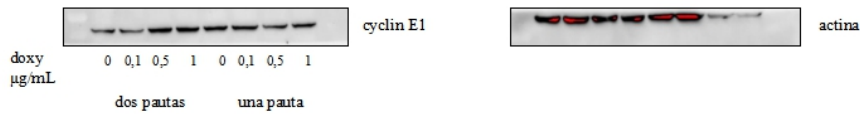


Comprobación de la expresión de la Cyclin E1 en las MCF-7 pInducer20 Cyclin E1 y en las MCF-7 pInducer20 empty vector, tratadas con diferentes dosis de doxyciclina en una pauta y en dos pautas.

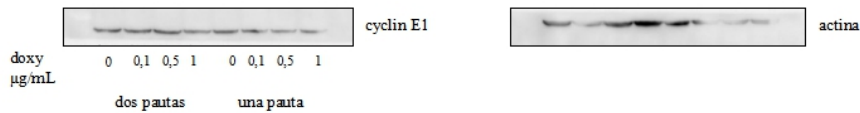
Pudimos observar el efecto esperado, una gran disminución de p-RB y de RB en las MCF-7 plko-*RB1*-shRNA19 con respecto a las MCF-7 plko-sh scrambled (ambas sin tratar con Palbociclib). Y en las MCF-7 plko-*RB1*-shRNA19 y las MCF plko-sh scrambled tratadas con Palbociclib observamos también esa gran disminución de p-RB y de RB, y esta vez ocurre en ambas líneas celulares, como también cabía esperar. Con ello hemos comprobado que el plásmido plko-*RB1*-shRNA19 funciona correctamente respecto a su control negativo.

Por otro lado, se sembraron $1,2 \times 10^6$ células MCF-7 pInducer20 Cyclin E1 y de MCF-7 pInducer20 empty vector. Se seleccionaron con neomicina a $800 \mu\text{g}/\text{mL}$ durante dos semanas cada tres días. A continuación, se sembraron cuatro placas p60 de cada línea celular, con 600.000 células cada placa. A cada placa de las cuatro de cada línea, se le echaron $0 \mu\text{g}/\text{mL}$, $0,1 \mu\text{g}/\text{mL}$, $0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ y $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ de doxiciclina respectivamente. Dos días después se renovaron las dosis de doxiciclina de estas placas y además se sembraron otras cuatro nuevas placas de cada línea celular echándole las mismas dosis de doxiciclina. Y finalmente dos días después de este último paso, se recogió el pellet seco de todas las placas p60. Así que hubo 4 placas de cada línea celular que llevaron dos pautas de las dosis de doxiciclina y otras cuatro placas de cada línea celular que solo llevaron una pauta de cada dosis de doxiciclina. Con el pellet seco se procedió por tanto a la preparación de extractos de proteína, a la cuantificación de la concentración de proteína total y la realización de Western blot para comprobar la expresión de la Cyclin E1.

pInducer20 Cyclin E1



pInducer20 empty vector



Comprobación de la expresión de p-RB y RB en las células MCF-7 plko-*RBI*-shRNA19 y MCF-7 plko- sh scrambled mediante Western blot. Sin tratar con palbociclib y tratadas con palbociclib.

Pudimos observar por tanto cómo la expresión de Cyclin E1 es mayor en las MCF-7 pInducer20 Cyclin E1, que en las MCF-7 pInducer20 empty vector y que, a mayor dosis de doxyciclina, aumentaba un poco la expresión de la Cyclin E1. Por lo tanto, así hemos comprobado que el plásmido pInducer20 Cyclin E1 funciona correctamente respecto a su control negativo.

5.2 Caracterización de senescencia celular

5.2.1 Cambios morfológicos

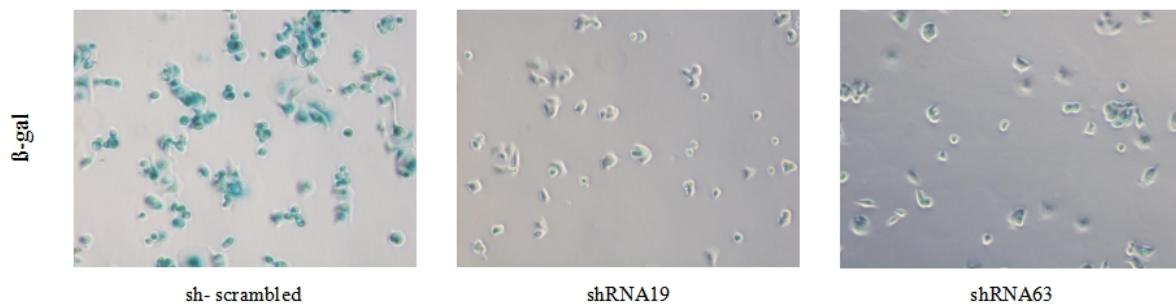
En las células MCF-7 plko-*RBI*-shRNA19, MCF-7 plko-*RBI*-shRNA63, MCF-7 plko-sh scrambled tratadas con Palbociclib 0,5 µM, cada tres días (tres pautas), se pudo observar que las del sh contra RB, proliferaban adecuadamente y no cambiaba su morfología (eran resistentes a Palbociclib); mientras que las del control negativo no proliferaban y adquirían una morfología característica: grandes, aplanadas y con más vacuolas. Por lo tanto, obtuvimos los resultados esperados.

Las células MCF-7 pInducer20 Cyclin E1 y MCF-7 empty vector, fueron tratadas con doxyciclina 1 µg/ml cada dos días (tres pautas) y posteriormente se sembraron $1,2 \times 10^6$ de cada línea y fueron tratadas con Palbociclib 5 µM cada tres días (tres pautas), a la vez que con doxyciclina. Se observó después de este tratamiento que las MCF-7 Cyclin E1 proliferaban correctamente y no cambiaba su morfología (resistencia a Palbociclib), sin embargo las MCF-7 empty vector no proliferaban y su apariencia era grande, aplanada y con más vacuolas.

5.2.2 Tinción β-galactosidasa asociada a senescencia

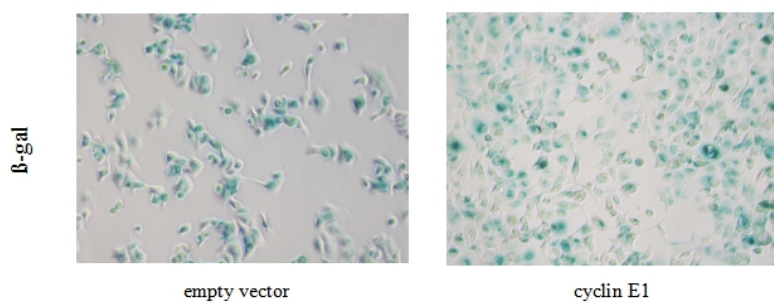
Una vez estudiados los cambios morfológicos producidos en las células tras el tratamiento con Palbociclib, se procedió a realizar una SA- β -Gal. Esta tinción es el marcador más aceptado para identificar la senescencia en un cultivo celular.

En las células senescentes hay un aumento de los lisosomas, por lo que hay un aumento en la enzima β -galactosidasa. Al poner estas células en contacto con el sustrato x-gal a un pH subóptimo (pH 4,0), se forma un precipitado azul. Según haya más o menos tinción, hay más o menos senescencia.



Tinción SA- β -gal en células MCF-7 plko- RB1- shRNA19, MCF-7 plko-RB1- shRNA63 y MCF-7 plko-sh scrambled. El aumento de la proporción de células de color azul en las MCF-7 plko- sh scrambled es debido a un aumento en la proporción de células senescentes.

En las células MCF-7 plko-*RBI*-shRNA19 y plko-*RBI*/shRNA63 tratadas con Palbociclib, se observó un menor porcentaje de células teñidas y una menor intensidad de tinción que en las MCF-7 plko-sh scrambled (estas últimas estaban mucho más teñidas). Por lo tanto, se corroboró así también que las sh-*RBI* son resistentes a Palbociclib (no entran en senescencia).



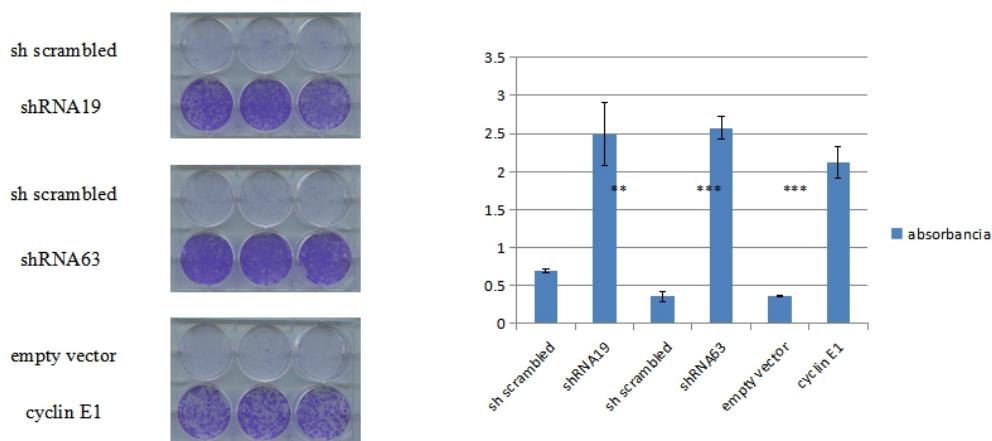
Tinción SA- β -gal en células MCF-7 pInducer20 Cyclin E1 y MCF-7 pInducer20 empty vector. El aumento de la proporción de células de color azul en las MCF-7 pInducer20 empty vector es debido a un aumento en la proporción de células senescentes.

En las células MCF-7 pInducer20 empty vector se observó un mayor porcentaje de células teñidas y una mayor intensidad de tinción con respecto a las MCF-7 pInducer20 Cyclin E1, aunque la diferencia entre la tinción de las células con el plásmido de interés y las células con

el vector vacío es menor que lo observado en las MCF-7 sh-*RBI*. También se observó mucha más proliferación celular en la placa con las células MCF-7 pInducer20 Cyclin E1 que en la placa con las MCF-7 pInducer20 empty vector, lo cual es consistente con que estas últimas presentan mucha más senescencia.

5.3 Clonogenicidad

Las células MCF-7 plko-*RBI*-shRNA19, MCF-7 plko-*RBI*-shRNA63 y MCF-7 plko-sh scrambled, MCF-7 pInducer20 Cyclin E1 y MCF-7 empty vector, después de ser tratadas con Palbociclib 0,5 μ M cada tres días (y en tres pautas) se sembraron en placas multiwell p6 10.000 células en cada pocillo, sembrando tres pocillos de cada plásmido. Y se trataron con Palbociclib 0,5 μ M durante catorce días (las pInducer 20 fueron tratadas al mismo tiempo con doxiciclina). Después se hizo la tinción de cristal violeta y se midió la absorbancia en el lector de placas.



Tinción de cristal violeta en las MCF-7 plko-*RBI*-shRNA19, MCF-7 plko-*RBI*-shRNA63, MCF-7 pInducer20 Cyclin E1 y sus respectivos controles negativos. La gráfica muestra la absorbancia de cada línea celular; los niveles de significancia son: *** cuando $p < 0,001$, ** cuando $p < 0,01$ y * cuando $p < 0,5$.

Tras dicha tinción, se observó que hubo mucha más proliferación celular de las MCF-7 plko-*RBI*-shRNA19 y en las MCF-7 plko-*RBI*-shRNA63 que en las MCF-7 plko-sh scrambled. Fue algo mayor la proliferación de las MCF-7 plko-*RBI*-shRNA63 que de las MCF-7 plko-*RBI*-shRNA19.

Hubo también una notoria mayor proliferación de las MCF-7 pInducer20 Cyclin E1 comparado con las MCF-7 pInducer20 empty vector.

Después de medir la densidad óptica, se observó una notable mayor absorbancia en las MCF-7 plko-*RBI*-shRNA19, MCF-7 plko-*RBI*-shRNA63 y MCF-7 pInducer20 Cyclin E1 respecto a sus controles negativos.

6. CONCLUSIONES

- Hemos generado con éxito tres líneas celulares tumorales de células de adenocarcinoma mamario MCF-7, dos de las cuales tienen un shRNA contra el gen *RBI* (MCF-7 plko-*RBI*-shRNA19 y MCF-7 plko-*RBI*-shRNA63), y otra línea que presenta una sobreexpresión inducible de la Cyclin E1 (MCF-7 pInducer20 Cyclin E1).

- Se ha comprobado que las MCF-7 plko-*RBI* presentan una disminución drástica de la proteína RB (p-RB y RB). También se ha visto que las MCF-7 pInducer20 cyclin E1 presentan una sobreexpresión de Cyclin E1, que es mayor cuanto mayor es la cantidad de doxiciclina con la que han sido tratadas.

- El tratamiento con Palbociclib no induce senescencia en estas células MCF-7 con el shRNA contra *RBI* ni en las células MCF-7 con sobreexpresión de Cyclin E1.

7. REFERENCIAS

1. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* Marzo de 1965;37:614-36
2. Shay JW, Roninson IB. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene.* 12 de abril de 2004;23(16):2919-33
3. Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell.* 27 de julio de 2007;130(2):223-33
4. Chang B-D, Swift ME, Shen M, Fang J, Broude EV, Roninson IB. Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by chemotherapeutic agent. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 8 de enero de 2002;99(1):289-94
5. Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet.* Agosto de 2005;6(8):611-22
6. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Septiembre de 2007;8(9):729-40
7. Stewart SA, Weinberg RA. Telomeres: cancer to human aging. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006;22:531-57
8. Maciel-Barón LA, Pérez VI, et al. Cellular senescence as a common denominator in age-related diseases. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* Julio-agosto 2017;55(4):490-497
9. Toussiant O, Dumont P, et al. Stress-induced premature senescence or stress-induced senescence-like phenotype: one in vivo reality, two possible definitions? *ScientificWorldJournal.* 29 de enero de 2002. 29;2:230-47
10. Collado M, Serrano M. The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat Rev Cancer.* Junio de 2006;6(6):472-6

11. Serrano M, Lin AW, et al. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16 INK4a. *Cell*. 7 de marzo de 1997. 7;88(5):593-602
12. Roninson IB. Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Res*. 1 de junio de 2003;63(11):2705-15
13. Roberson RS, Kussick SJ, et al. Escape from the therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers. *Cancer Res*. 1 de abril de 2005;65(7):2795-803
14. Prieru A, Peeper DS. Cellular senescence in vivo: a barrier to tumorigenesis. *Curr Opin Cell Biol*. Abril de 2008;20(2):150-5
15. Beauséjour MC, Krtolica A. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J*. 15 de agosto de 2003;22(16):4212-22
16. Coppé J-P, Patil CK, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol*. 2 de diciembre de 2008;6(12):2853-68
17. Rodier F, Muñoz DP, et al. DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J Cell Sci*. 1 de enero de 2011;124(Pt 1):68-81
18. Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol*. 21 de febrero de 2021;192(4):547-56
19. Dimri GP, Lee X, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26 de septiembre de 1995;92(20):9363-7
20. Lee BY, Han JA. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*. Abril de 2006;5(2):187-95
21. Kurz DJ, Decary S. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*. Octubre de 2000;113(Pt 20):3613-22
22. Yang N-C, Hu M-L. A fluorometric method using fluorescein di-beta-D-galactopyranoside for quantifying the senescence-associated beta-galactosidase activity in human foreskin fibroblast Hs68 cells. *Anal Biochem*. 15 de febrero de 2004;325(2):337-43
23. Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*. 25 de febrero de 2005;120(4):513-22
24. Zhang J, Pickering CR, et al. P16INK4a modulates p53 in primary human mammary epithelial cells. *Cancer Res*. 1 de noviembre de 2006;66(21):10325-31

25. Gil J, Peters G. Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Septiembre de 2006;7(9):667-77
26. Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell.* Agosto de 2002;2(2):103-12
27. Serrano M, Hannon GJ, et al. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature.* 16 de diciembre de 1993;366(6456):704-7
28. Mechanism of the CDK4/6 inhibitor palbociclib (PD 0332991) and its future application in cancer treatment (Review). *Oncol Rep.* Marzo de 2008;39(3):901-911
29. Tyner SD, Venkatachalam S, et al. P53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature.* 3 de enero de 2002;415(6867):45-53
30. Banito A, Rashid ST, et al. Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. *Genes Dev.* 15 de septiembre de 2009;23(18):2134-9
31. Lee S, Lee J-S. Cellular senescence: a promising strategy for cancer therapy. *BMB Rep.* Enero de 2019;52(1):35-41
32. Prieto L, Baker D. Cellular senescence and the Immune System in Cancer. *Gerontology.* 2019;65(5):505_512