

Estudio celular y molecular de los procesos de muerte programada en líneas tumorales sensibles a agentes citostáticos.

Eulalia González-Carrión^{1,2, a}, Aránzazu García Grande²

1. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. 2. Unidad de Citometría de flujo y Separación Celular Instituto Investigación Puerta de Hierro-Segovia de Arana (IDIPHISA).

a. lali.gonzalez@edu.uah.es

Palabras clave: Apoptosis; MGMT; agente citostático; TUNEL; Anexina; MSP

Resumen

La apoptosis es una muerte celular programada (MCP) que mantiene el equilibrio entre supervivencia y muerte. Un correcto funcionamiento de las vías apoptóticas contribuye a mantener la integridad genómica mientras que un defecto en la apoptosis puede derivar en el desarrollo de cáncer. Frecuentemente las células tumorales desarrollan mecanismos moleculares con el objetivo de evadir la apoptosis y adquirir resistencia a los agentes citostáticos mediante la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 o la mutación de genes supresores de tumores como p53. La alteración en la función de estas proteínas puede derivar en el silenciamiento de los promotores de genes implicados en la reparación del ADN como MGMT. Actualmente la regulación de la apoptosis se considera una diana terapéutica prometedora para el tratamiento del cáncer, lo que ha llevado al desarrollo de agentes citotóxicos cuya función es inducir apoptosis en células tumorales. En este trabajo se presenta un proyecto para analizar in vitro los efectos biológicos a nivel celular y molecular provocados por los agentes citostáticos camptotecina, rituximab, y nivolumab en líneas tumorales de carcinoma de pulmón, H1299, y linfoma no Hodgkin, RL, mediante el uso de técnicas de cuantificación celular (Anexina V-FITC e IP, TUNEL) y el estudio molecular de conversión por bisulfito y PCR de metilación. Se presentan diferentes ensayos dosis-respuesta que permiten estudiar la apoptosis provocada por estos agentes citostáticos y conocer el estado de metilación del promotor de la enzima MGMT. La evaluación molecular y celular ofrece la posibilidad de entender los mecanismos moleculares desarrollados en las células y determinar la dosis óptima para los diferentes tratamientos. Si los resultados obtenidos son prometedores, en el futuro sería conveniente estudiar el efecto sinérgico entre los agentes, ya que esto podría permitir la mejora y desarrollo de tratamientos que puedan llegar a clínica.

Cita: González-Carrión, Eulalia; García Grande, Aránzazu (2020) Estudio celular y molecular de los procesos de muerte programada en líneas tumorales sensibles a agentes citostáticos. *dianas* 9 (2): e202009fa08. ISSN 1886-8746 (electronic) journal.dianas.e202009fa08 <http://www3.uah.es/dianas?e202009fa08>.
URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Copyright: © González-Carrión E, García-Grande A. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Introducción

La **muerte celular programada (MCP)** es un proceso fundamental para el desarrollo embrionario, el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos, la eliminación de células dañadas, el envejecimiento y la regulación de la viabilidad celular mediante hormonas y factores de crecimiento [1]. Anomalías en la muerte celular programada pueden derivar en el desarrollo de enfermedades como cáncer (baja velocidad de muerte celular) o enfermedades neurodegenerativas (alta velocidad de muerte celular) [1]. La muerte celular programada, como son la **apoptosis** y **autofagia**, se desencadena por necesidades fisiológicas. Por otro lado, la muerte celular regulada, puede ser modulada por fármacos o genéticamente, como por ejemplo la **pyroptosis**. Por último, la muerte celular accidental se produce por condiciones físicas o químicas extremas, es decir, es una muerte celular no programada. Un ejemplo de ello es la necrosis [2].

En el estudio nos vamos a centrar en la apoptosis, pero primero describiremos brevemente los diferentes tipos de muerte celular mencionadas.

La **autofagia** es una muerte celular programada no apoptótica independiente de caspasas. Se produce principalmente por privación de nutrientes. Se caracteriza por ser un proceso catabólico donde se forman unas vesículas denominadas autofagosomas, las cuales invaginan el material citoplasmático para, posteriormente, fusionarse con los lisosomas y producir la degradación del material intracelular (Figura 1) [3]. La **pyroptosis** está clasificada como un tipo de muerte celular regulada, pero al igual que la apoptosis, también es un tipo de muerte celular programada. Morfológicamente se caracteriza por la condensación de la membrana nuclear, la fragmentación del ADN, formación de poros en la membrana plasmática y ruptura de esta, provocando la liberación de mediadores proinflamatorios como IL-1 β e IL-18 (Figura 1) [4, 5]. La **necrosis** se produce por daño tóxico, traumático o hipóxico afectando a

numerosas células. Desde el punto de vista morfológico se produce incremento del tamaño celular, desintegración de los orgánulos y finalmente pérdida de la integridad de la membrana celular liberando los componentes intracelulares al medio, entre ellos las alarminas, causando una fuerte respuesta inmunitaria [1].

Apoptosis

La **apoptosis** es una muerte celular programada dependiente de caspasas. Se produce cuando la célula pierde su individualidad o funcionalidad. Morfológicamente se caracteriza por el mantenimiento de la integridad de la membrana celular, colapso del citoesqueleto, condensación de la cromatina y reducción del tamaño celular seguido de la fragmentación de la membrana nuclear produciendo la formación de cuerpos apoptóticos que envían señales químicas a células adyacentes y a los macrófagos para ser fagocitados, lo cual requiere ATP [1]. Durante el proceso apoptótico se produce la activación masiva de caspasas y dependiendo de cuáles se activen se desencadena la vía extrínseca o intrínseca [1].

La activación de la **vía extrínseca** se produce por ligandos externos, TNF y FasL, que se unen a sus respectivos receptores de muerte, TNFR1 y Fas (Figura 1). Esta unión provoca cambios conformacionales en la parte citosólica del receptor donde están los dominios de muerte (DD) a través de los cuales se une el complejo de señalización inductor de muerte o DISC. Esta plataforma regula la activación de las pro-caspasas iniciadoras 8 y 10. La activación de estas caspasas inicia una serie de procesos proteolíticos que conllevan la activación de las caspasas efectoras 3 y 7 provocando la ejecución de las vías de la apoptosis [6].

La activación de la **vía intrínseca** se desencadena por señales pro-apoptóticas como el estrés oxidativo e intracelular, daño en el ADN y alta concentración de Ca^{2+} (Figura 1). Las diferentes vías de respuestas convergen en la mitocondria a través de la activación de los miembros pro-apoptóticos de la familia **Bcl-2**. Estas proteínas provocan la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria (MOMP), generando poros por los que se produce la salida de citocromo C, factor inductor de apoptosis (AIF), endonucleasa G y las proteínas Smac/Diablo. El citocromo C se asocia con Apaf-1 y con la pro-caspasa-9 para formar el apoptosoma, el cual hidroliza la pro-caspasa-3. La caspasa-3 activa se encarga de ejecutar la apoptosis al igual que en la vía extrínseca. De forma paralela, AIF y la endonucleasa G se translocan al núcleo para producir la fragmentación del ADN mientras SMAC/DIABLO inhiben la actividad anti-apoptótica de la familia de los inhibidores de proteínas de apoptosis (IAP) [6].

Tanto la vía extrínseca como la vía intrínseca están interconectadas ya que una vez activada la caspasa-8 por la vía extrínseca, esta activa a la proteína pro-apoptótica de la familia Bcl-2, Bid, provocando la permeabilización de la membrana mitocondrial, la apertura del poro y la activación de la caspasa-9 [6].

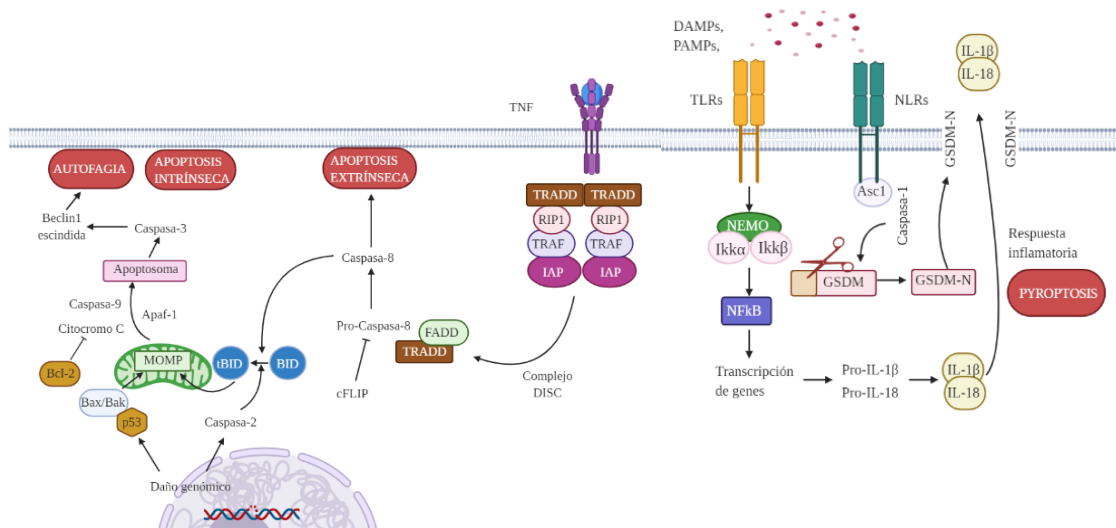


Figura 1.- Esquema de las vías de señalización canónicas de apoptosis extrínseca e intrínseca, autofagia y pyroptosis. Imagen realizada con BioRender.com.

Proteínas implicadas en muerte celular como dianas terapéuticas

El cáncer se considera una de las causas de mortalidad principales en los países desarrollados [7]. Se conoce que la alteración en las vías apoptóticas está relacionada con la patogénesis de carcinomas y la resistencia a los tratamientos antitumorales, por lo que la regulación de la apoptosis se presenta como una de las dianas terapéuticas más prometedoras del futuro para el tratamiento del cáncer [8]. Por este motivo, se han desarrollado tanto agentes citostáticos que permitan la mejora del tratamiento, como nuevas técnicas de cuantificación de apoptosis que faciliten el estudio de estas afecciones [9].

Los **agentes citostáticos** son un grupo de medicamentos utilizados para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades. Existen diferentes clases según su mecanismo de acción: agentes alquilantes, sales de platino, antimetabolitos, alcaloides vegetales, hormonas, antihormonas, isótopos radiactivos, antitumorales y anticuerpos monoclonales, de uso más reciente [9]. La mayoría de ellos actúan sobre el ADN impidiendo su replicación o sobre los mecanismos de proliferación celular induciendo la apoptosis. El éxito de estos agentes radica en las diferencias moleculares y metabólicas entre las células sanas y las células tumorales que hacen que estas tengan mayor tasa de replicación. Sin embargo, para el tratamiento de neoplasias hematológicas, la quimioterapia citotóxica implica el desarrollo de efectos tóxicos graves, por lo que no ha resultado ser óptima [9]. Debido a esto, el surgimiento de los anticuerpos monoclonales en la última década ha supuesto un gran avance para el tratamiento de trastornos linfoproliferativos por su capacidad para atacar células tumorales de forma directa y específica [9]. Estos anticuerpos se emplean como una terapia inmunoterapéutica, ya que utilizan agentes dirigidos específica y directamente contra proteínas cuya expresión es muy alta y estable en células tumorales, pero ausente en tejidos importantes. Por ejemplo, el antígeno **CD20** se considera un blanco terapéutico óptimo, pues su expresión es alta en linfomas de células B y ausente en células progenitoras hematopoyéticas [10]. Otro caso destacable es el del receptor de muerte celular programada, **PD-1**, ya que su ligando PDL-1, cuya expresión es mayor en células tumorales, les confiere un blindaje contra las células T [11].

A pesar de las ventajas que confiere la inmunoterapia, la mayoría de los agentes anticancerígenos que afectan a los procesos de MCP van dirigidos hacia oncogenes inductores de tumores como **Bcl-2**, cuya función es evitar la apoptosis [12]; enzimas implicadas en la replicación del ADN como las **topoisomerasas** [10]; o genes supresores de tumores como **p53**, implicado en el desencadenamiento de la apoptosis [13]. La proteína p53 tiene gran importancia ya que regula positivamente numerosos genes, entre los cuales se encuentran las proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2, como BAX, cuya regulación es importante en el proceso apoptótico [14]. También se sabe que la expresión del gen que codifica para la enzima **metilguanidina-ADN metiltransferasas (MGMT)** está regulada por p53. La proteína MGMT se utiliza como marcador molecular por la asociación de la metilación de su promotor a la respuesta de los agentes alquilantes. La función de esta enzima consiste en reparar el daño del ADN causado por la adición de grupos alquilo en la posición O⁶ de la guanina, ya que los agentes alquilantes pueden generar metilaciones aberrantes en el genoma que desencadenen la apoptosis [15]. Determinadas alteraciones en la función o expresión de las proteínas p53 y Bcl-2, como en las vías en las que intervienen o en la transducción de señales, pueden llevar al aumento de proliferación celular y generación de tumores [12, 14, 15].

Objetivos

El **objetivo principal** de este trabajo es la evaluación *in vitro* de los efectos biológicos ejercidos por distintos agentes citostáticos en diferentes líneas tumorales bajo condiciones de dosis-respuesta mediante un amplio abordaje metodológico. Como **objetivos específicos** se han planteado: i) estudio celular de apoptosis en líneas tumorales sensibles a agentes citostáticos y ii) análisis epigenético del efecto de los agentes citostáticos sobre las líneas celulares: estudio de la metilación del promotor del gen MGMT.

Material y métodos

Cultivos celulares

En este estudio se emplearán las líneas celulares RL y H1299. La línea celular del linfoma no Hodgkin (LNH) RL procede del líquido ascítico, se caracteriza por la presencia de la translocación t(8:14) que resulta en la sobreexpresión del gen anti-apoptótico Bcl-2. La línea celular H1299 procede de un carcinoma de pulmón humano de células no pequeñas (CPCNP) originario de una metástasis del nodo linfático, caracterizada por la falta de expresión de la proteína p53 y la delección parcial de p53 (homocigótica).

Los viales de células se descongelan en un baño de agua a 37°C. Se añade medio de cultivo completo a cada vial y se transfiere el contenido de este a otro tubo con medio completo. Se centrifuga a 1,200 rpm durante 5 minutos y se elimina el sobrenadante. Seguidamente se resuspende el pellet celular en medio de cultivo, se traspanan a un matraz de 75cm³ y se introduce en la incubadora durante 15 minutos para que el medio alcance su pH normal (7-7.6). El cultivo celular para ambas líneas se realiza con medio RPMI-1640, suplementado con 10% de suero fetal bovino (FCS), 1% de penicilina/estreptomina y 1% de Glutamina. La línea celular se incuba en condiciones de esterilidad a 37°C, atmósfera con 90% de humedad y 5% de CO₂. Para mantener un crecimiento exponencial se realizan subcultivos cada 24-48h según el estado de confluencia. Por último, se realiza la detección de contaminación por micoplasma mediante PCR y se congela un vial (STOCK) de los cultivos negativos. La densidad y viabilidad de las células se determinan mediante la técnica de tinción por exclusión de Azul Tripán y una cámara de Neubauer.

Agentes citostáticos

Los agentes citostáticos elegidos para este proyecto son el rituximab, el nivolumab y la camptotecina (Tabla 1). La FDA aprobó en 1997 el uso del **rituximab** para uso clínico en el tratamiento de pacientes con LNH. Como indica la Tabla 1, rituximab se une específicamente al antígeno de membrana CD20 el cual está expresado en más del 95% de células B de LNH [16]. Por otro lado, el **nivolumab**, fue aprobado en 2014 por la FDA para el tratamiento de carcinoma pulmonar. La unión de este anticuerpo al receptor de muerte programada PD-1 potencia la respuesta antitumoral de los linfocitos T contra las células cancerígenas [11]. Por último, la **camptotecina** es un agente químico que induce la muerte de las células cancerígenas cuando se encuentran en mitosis mediante la inhibición de la topoisomerasa I. Esto significa que su acción antimitótica es inespecífica generando muchos efectos secundarios. Para minimizar los efectos adversos en clínica se utilizan derivados sintéticos como el topotecan e irinotecan, ambos aprobados en 1996 por la FDA [17]. El rituximab es específico para la línea celular RL, pero no para H1299, mientras que el nivolumab es específico para H1299, pero no para RL. En cambio, la camptotecina es inespecífica para ambas líneas tumorales. Por todo ello, la justificación para el uso de estos fármacos es la necesidad de comparar y evaluar los efectos celulares y moleculares que generan en líneas tumorales con distinto grado de especificidad.

| Agente citostático | Clasificación | Origen | Mecanismo de acción | Efecto | Uso |
|--------------------|-----------------------|---|---|--|---|
| Rituximab (RTX) | Anticuerpo monoclonal | Quimérico-humano obtenido mediante ingeniería genética [16]. | Unión al Ag de membrana CD20 mediante citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), citotoxicidad anticuerpo-dependiente, activación de la caspasa-3, desregulación de Bcl-2, e inhibición de las vías de supervivencia [16] | Regulación del ciclo celular y activación de la muerte celular programada actuando sobre la proliferación y diferenciación celular [16]. | Linfoma de no Hodgkin [16]. |
| Nivolumab (NVL) | Anticuerpo monoclonal | Humano de tipo IgG4 obtenido mediante ingeniería genética [11]. | Bloqueo del receptor de superficie de las células T, PD-1 (receptor de muerte programada) evitando que el ligando PD-L1 y PD-L2 se una a PD-1, [11]. | Facilita la acción de las células T sobre células tumorales provocando la muerte celular programada [11]. | Carcinoma de pulmón, renal, melanoma, linfoma de Hodgkin clásico (LHc) y cáncer de células escamosas de cabeza y cuello [11]. |
| Camptotecina (CPT) | Alcaloide vegetal | <i>Camptotheca acuminata</i> [17]. | a) Actuación sobre la ADN topoisomerasa I evitando la reparación del ADN [18] b) Regulación positiva de genes pro-apoptóticos mediados por miRNA-125 [10, 18]. | Activación de la muerte celular programada de las células cancerígenas cuando se encuentran en mitosis [17]. | Cáncer de ovario, cervical, colon y cáncer de pulmón de células pequeñas [17]. |

Tabla 1.- Descripción del mecanismo de acción y características principales de los agentes citostáticos rituximab, nivolumab y camptotecina.

Diseño experimental del estudio

Para este estudio se siembran por triplicado 130,000-170,000 células/ml en placas de 24 pocillos. Al cabo de 24h las células se tratan con concentraciones crecientes de cada fármaco: RTX (0,2 µg/ml, 2 µg/ml, 20 µg/ml), NVL (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml), CPT (0.5 µM, 1 µM, 2 µM), además de células sin fármaco que se utilizarán como control. Se dejan crecer a 37°C con 5% CO₂. Las mediciones se realizan a las 12h y 24h del tratamiento

Técnicas a aplicar para el estudio celular y molecular de la apoptosis

En esta sección se desarrollan teóricamente los métodos a utilizar para la obtención de datos y el estudio celular y molecular de la apoptosis entre los cuales se encuentra la detección de poblaciones apoptóticas y la evaluación de la integridad de la membrana mediante citometría de flujo utilizando el Kit AnexinaV-FITC e IP, la detección de fragmentación de ADN mediante microscopía confocal utilizando la técnica TUNEL y por último el estudio de la metilación del promotor MGMT mediante conversión con bisulfito y metilación específica de PCR (MSP).

Citometría de Flujo - AnexinaV-FITC e IP

La integridad de la membrana celular se puede estudiar utilizando el procedimiento de **AnexinaV-FITC e IP**. La anexina V es una proteína con capacidad para unirse a los fosfolípidos y específicamente a los residuos de **fosfatidilserina (FS)** de forma dependiente de calcio. En las células vivas el fosfolípido FS está localizado en el lado citosólico de la membrana celular. En la fase inicial de la apoptosis se produce un cambio en la distribución de FS, translocándose hacia la parte externa de la membrana celular. La presencia de FS en la parte extracelular puede ser detectada con Anexina V marcada con isotiocianato de

fluoresceína (FITC). Este ensayo se suele utilizar en combinación con el ioduro de propidio (IP). EL IP penetra en la célula cuando la membrana está dañada, lo que se corresponde a la fase tardía de la apoptosis o a células en estado necrótico [19].

Esta técnica nos permite detectar hasta 4 poblaciones: i) células vivas (AnexinaV-FITC/IP negativas), ii) células en fase temprana de la apoptosis (AnexinaV-FITC positiva, IP negativa), iii) células en fase tardía de la apoptosis (AnexinaV-FITC/IP positivas) y iv) células necróticas (AnexinaV-FITC negativa, IP positiva) [19]. Ejemplo indicado en la Figura 2.

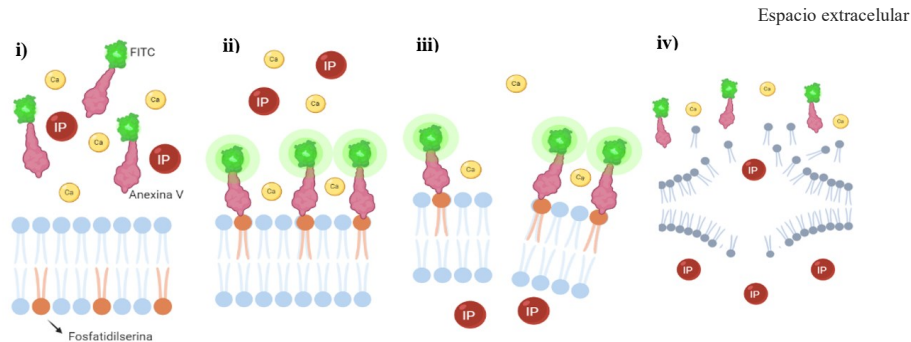


Figura 2.- Fundamentos del ensayo de Anexina V-FITC-IP. **i)** Cuando la célula está en condiciones normales, los residuos de FS se encuentran en la cara interna de la membrana y el complejo Anexina V-FITC no se puede unir, por lo que no emitirá fluorescencia. El IP no puede atravesar la membrana, por lo que no se une al ADN ni emite fluorescencia. **ii)** En la fase temprana de la apoptosis los fosfolípidos se traslocan a la parte externa de la membrana, son detectados por el complejo Anexina V-FITC y emiten fluorescencia. En cambio, se sigue manteniendo la integridad de la membrana por lo que no se detecta señal provocada por IP. **iii)** En la fase tardía de la apoptosis además de detectar la señal procedente del complejo Anexina V-FITC-FS, la célula también presenta pérdida de la integridad de la membrana, por lo que el IP puede pasar al interior, unirse al ADN y emitir fluorescencia. **iv)** Se detectan células necróticas, las cuales no poseen FS en la parte extracelular, pero siguen teniendo la membrana dañada, por lo que emitirá la señal provocado por el IP. Imagen realizada con BioRender.com,

Para llevar a cabo este ensayo se utiliza un kit Anexina V-FITC e IP (Immunostep). Tras el tratamiento con los fármacos a las concentraciones correspondientes y transcurridas 24h, las células se recolectan mediante tripsinización (H1299)/centrifugación (RL), se lavan dos veces con PBS y se centrifugan a 1,500 rpm durante 5 minutos. Seguidamente las células se incuban con 5 µl de Anexina V y 3 µl de IP durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad en 10x TU (Tampón de Unión, 50 ml, 0,1M HEPES/NaOH, pH 7.4, 1.4 M NaCl, 25 mM CaCl₂). Posteriormente, se añaden 200 µl de tampón de unión para mantener unido el calcio durante su análisis en el citómetro de flujo. Como control negativo y para definir el nivel basal de células apoptóticas y necróticas se utilizan células no tratadas. Para determinar la compensación del citómetro de flujo y los cuadrantes además de utilizar células no marcadas se utilizan células marcadas sólo con AnexinaV-FITC (sin PI) y células marcadas con PI (sin AnexinaV-FITC). Este ensayo se realizará con el citómetro de flujo MACSQuant® Analyzer 10 (Miltenyi Biotec). La excitación de los fluorocromos se realiza con láser azul (488nm) las fluorescencias emitidas se recogen en los detectores correspondientes para la fluoresceína (FITC-525 nm) y para el IP (615nm). El análisis de los datos adquiridos se realizará con el programa MACSQUANTIFY (Miltenyi Biotec).

Microscopía confocal - Detección de fragmentación del ADN mediante TUNEL.

Durante el proceso apoptótico se producen fragmentos genómicos cuyos extremos terminales pueden ser marcados con **nucleótidos modificados (dUTP)** mediante la **deoxinucleotidil transferasa (TdT)** (TUNEL). Esta técnica consiste en añadir nucleótidos marcados con un fluorocromo a los extremos 3'-OH libres del ADN de cadena simple o doble en una reacción catalizada por la TdT. Los dUTP se detectan tras una reacción con un anticuerpo conjugado con un fluorocromo, por lo que cuanto más cantidad de fragmentos de ADN haya mayor será la intensidad de fluorescencia. La señal emitida puede ser medida tanto por citometría de flujo como por microscopio de fluorescencia. Los resultados obtenidos se comparan con un control negativo (incubación de la muestra en ausencia de transferasa) y un control positivo (muestra tratada con DNAasa I). La principal ventaja de esta técnica es que permite detectar *in situ* fragmentación real del ADN de forma objetiva [19]. Ejemplo indicado en la Figura 3.

Para realizar este ensayo se utiliza el kit DeadEnd™ TUNELSystem fluorométrico (Promega). Tras el tratamiento con los fármacos a las concentraciones correspondientes y transcurridas 24h, las células se lavan con PBS, se fijan con 5ml de formaldehído 4% durante 15 minutos y se permeabilizan con etanol 70% durante 4h en hielo. A continuación, se añaden 100 µl de tampón de equilibrio (220mM cacodilato de potasio, 25mM Tris-HCL, 0,2mM DTT, 0,25mg/ml BSA, 2,5mM CoCl₂) y se incuban a temperatura ambiente durante 10 minutos. Seguidamente se continúa con el marcaje de los nucleótidos y se añade una

preparación de 100 μ l de la reacción TdT. Tras la incubación, las muestras se lavan con PBS, y se tiñen con TOPRO para marcar los núcleos y se lavan nuevamente con PBS. Finalmente, las muestras obtenidas se observan con el microscopio Confocal Leica SP5. Como control positivo de la reacción se utilizan células tratadas con DNasa I, mientras que para control negativo se prepara una mezcla con 45 μ l de tampón de equilibrio, 5 μ l de mezcla de nucleótidos y 1 μ l de agua autoclavada. Se adquieren 5 campos de cada tratamiento y se realiza el conteo de núcleos TUNEL + mediante el programa Image J. Los resultados se presentan como el tanto por ciento de células TUNEL positivo frente las células totales

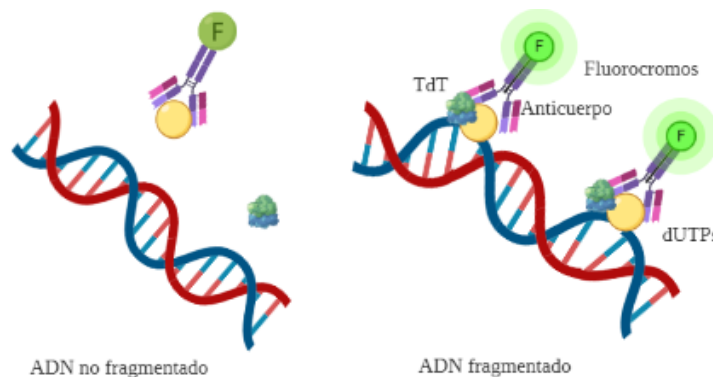


Figura 3.- Fundamentos del ensayo de detección de fragmentación del ADN mediante TUNEL. En condiciones normales la célula posee el ADN intacto, por lo que la enzima TdT no puede unir los dUTPs al extremo 3'-OH y no se detecta señal fluorescente. En cambio, en condiciones citotóxicas donde se ha producido fragmentación del ADN la enzima TdT cataliza la reacción de unión de los dUTPs y pueden ser detectados con un anticuerpo conjugado a un fluorocromo el cual emite fluorescencia. Imagen realizada con BioRender.com.

Estudio molecular - Modificación del ADN con bisulfito sódico y análisis de metilación mediante MSP (Methylation PCR).

Una de las modificaciones epigenéticas más estudiadas en mamíferos es la metilación del ADN, la cual se produce normalmente en los dinucleótidos CpG constituyendo las **denominadas islas CpG** que se concentran de manera repetitiva en las regiones promotoras de los genes. Las secuencias que se encuentran metiladas inhiben la expresión de genes, ya que la presencia de los metilos en las islas CpG provoca un silenciamiento transcripcional. El método de modificación con bisulfito se utiliza para estudiar la metilación del ADN ya que se puede discernir entre secuencias metiladas (M) y no metiladas (U) convirtiendo las citosinas no metiladas en timidinas, mientras que las citosinas metiladas no sufren cambios [20].

Extracción ADN. Se elimina el medio, se recolectan las células mediante tripsinización (H1299) /centrifugación (RL) y se realiza un lavado con PBS. Posteriormente, se procede a purificar el ADN de estas células tratadas. Aunque existen numerosos kits comerciales para obtener ADN genómico, el método clásico de purificación incluye varios pasos (lisis, purificación y precipitación). Para comenzar se añaden 675 μ l de tampón lisis de ADN (1M de Tris pH 8,1, ClNa 2,5M, EDTA 0,5M, SDS 1%), y 20 μ l de RNasa. Tras 5 minutos de incubación, se añade un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico y se agita en vortex. A continuación, las muestras se centrifugan durante 5 min a 13,000 rpm y se recuperan 500 μ l aproximadamente de fase acuosa. Se añade un volumen de cloroformo y se centrifuga nuevamente durante 5 minutos a 13,000 rpm. Por último, para realizar la precipitación del ADN se añade 1 volumen de isopropanol y 0.1 volumen de acetato de amonio. Se incuban las muestras durante 3 horas a -80°C y se centrifugan durante 15 minutos a 13,000 rpm. El sedimento obtenido tras la realización de estos pasos es el ADN purificado, el cual se lava con etanol 70% dos veces. Finalmente, el ADN se resuspende en agua destilada de calidad biología molecular, miliQ estéril. Se mide su concentración por espectrofotometría y se ajusta a una concentración final de 20ng/ μ l.

Conversión con bisulfito sódico. El tratamiento con bisulfito sódico permite determinar el estado de metilación del promotor del gen MGMT en las líneas celulares estudiadas antes y después de los tratamientos con los agentes citostáticos [20].

Para la modificación con bisulfito se emplea el kit EZ DNA Methylation-Gold (Zymo Research). Este kit cuenta con una eficacia de conversión de un 99% y una recuperación de ADN de más de un 80%. Se añaden 5 μ l del tampón de dilución a cada una de las muestras de 20 μ l de ADN, se ajusta hasta un volumen de 50 μ l, se homogeneiza la mezcla y se incuban las muestras a 37°C durante 15 minutos. A continuación, se añaden 100 μ l de reactivo de Conversión CT a cada una de las muestras y se incuban a 50°C durante 12-16 horas en oscuridad. Tras esta segunda incubación se realiza una tercera durante entre $0-4^{\circ}\text{C}$ (en hielo) durante 10 minutos. Para la recuperación del ADN se añaden 400 μ l de tampón de unión a una columna de Zymo-SpinTM donde colocaremos el tubo de recolección. Seguidamente se cargan las muestras en la columna que se ha preparado. Tras esto se cierra la tapa de la columna para evitar la

pérdida de la muestra y se centrifuga a 10,000 rpm durante 30 segundos y se descarta el sobrenadante. Para eluir el material genético se añaden 100 µl de tampón de lavado a la columna y se centrifuga a 1,300 rpm durante 30 segundos. Posteriormente se añaden 200 µl de tampón de desulfonación a la columna, se deja reposar a temperatura ambiente durante 15-20 minutos y se centrifuga a 1,300 rpm durante 30 segundos. Para optimizar la recuperación de ADN la columna con 200 µl de tampón de lavado y se centrifuga a 1,300 rpm durante 30 segundos. Finalmente se transfiere la columna a un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml, se añaden 10 µl de tampón de elución y se centrifuga a 1,300 rpm durante 30 segundos. Las muestras se almacenan a -20°C hasta su uso.

PCR específica de metilación (MSP). Para llevar a cabo este ensayo es necesario el diseño de dos sets de cebadores específicos para estudiar el gen MGMT, uno para la secuencia no metilada y otro para la secuencia metilada. Idóneamente los cebadores diseñados deben contener 2-3 islas CpG para poder discriminar entre secuencias no metiladas y metiladas. Las secuencias de los cebadores detalladas en la Tabla 2 han sido obtenidas a partir del estudio llevado a cabo Ji-Ching Lai y colaboradores [21].

| Secuencia | | | | |
|-------------|---------|----|---|----|
| No metilado | Forward | 5' | TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT | 3' |
| | Reverse | 5' | AACTCCACACTCTTCCAAAAACAAAACA | 3' |
| Metilado | Forward | 5' | TTT CG ACGTT CG TAG GTTTT CG C | 3' |
| | Reverse | 5' | GCACTCTTCC CG AAAA CG AAACG | 3' |

Figura 2.- Secuencias de los cebadores empleados en la MSP para este proyecto, tanto para la reacción de no metilación como para la de metilación. Se han señalado en rojo las islas CpG.

Para llevar a cabo este ensayo se emplean 4 µl del ADN tratado con bisulfito, en un volumen de reacción final de 50 µl. La mezcla de amplificación para una reacción incluye 5 µl de tampón Taq Polimerasa 10X, 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM, 5 µl de dNTPs 2 mM, 0,125 µl de cada uno de los oligonucleótidos 100 µM y 0,2 µl de Taq polimerasa. Las condiciones para la amplificación por PCR se hace según el protocolo de Fernández-Fernández and Esteller [29] en el termociclador Applied Biosystems Veriti™ Thermal Cycler. Las reacciones tanto de no metilación como de metilación se llevan a cabo a una temperatura de anillamiento de 62°C 35 ciclos durante 15s. Los productos de la PCR se analizan en un gel de agarosa. Como control de la MSP se utiliza agua, mientras que para la reacción de no metilación se utiliza el ADN de linfocitos normales previamente tratados con bisulfito sódico. Para el control positivo de la reacción de metilación se utiliza ADN de linfocitos metilados. Ejemplo indicado en la figura 4.

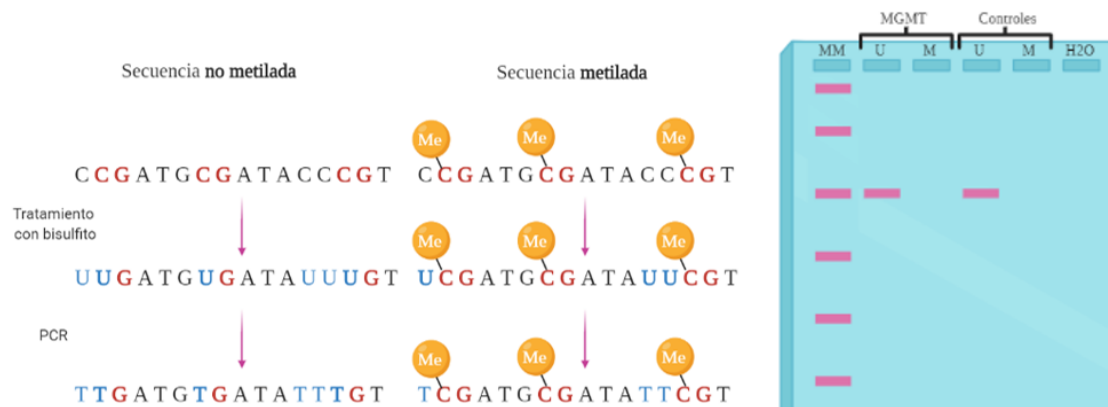


Figura 4.- Fundamentos del ensayo de modificación del ADN con bisulfito sódico y análisis de metilación mediante MSP. Tras el tratamiento del ADN con bisulfito sódico las citosinas no metiladas se transforman en uracilos, mientras que las citosinas metiladas permanecen sin modificación. Este tratamiento convierte un hecho epigenético en una diferencia genética analizable mediante MSP en un gel de agarosa. Imagen realizada con BioRender.com.

Resultados esperables y discusión

Este proyecto pretende evaluar *in vitro* el efecto biológico provocado por los agentes citostáticos RTX, NVL y CPT sobre las líneas celulares tumorales RL y H1299 mediante la aplicación de tecnologías y protocolos a niveles celular y molecular.

El ensayo **AnexinaV-FITC e IP** se ha empleado ampliamente en investigación básica para el estudio de la apoptosis ya que permite detectar hasta cuatro poblaciones celulares distintas [19, 22, 23]. Los datos obtenidos mediante esta técnica son una prueba sensible de la inducción selectiva apoptótica. Debido a esto, una de las grandes ventajas de su utilización es que nos permite descartar que el efecto inductor de muerte provocado por los agentes citostáticos se debe a cualquier otro mecanismo de muerte celular [19].

Al igual que la técnica anteriormente mencionada, **TUNEL** también se utiliza ampliamente en los laboratorios como método directo para la medición de apoptosis ya que nos permite objetivar la presencia o ausencia de células apoptóticas. Durante el proceso de apoptosis las endonucleasas nucleares producen fragmentos genómicos de aproximadamente 200 pares de bases, cuyos extremos son detectados mediante este ensayo. Esta técnica permite la detección de núcleos apoptóticos en estadios muy tempranos, pero no valora el grado de fragmentación del ADN [19, 24].

En este estudio, tras el tratamiento con los agentes citostáticos, se espera que RTX tenga mayor efecto en la línea celular RL, ya que expresa CD20, antígeno al que se une específicamente conforme aumenta la concentración, mientras que NVL debería generar mayor apoptosis en la línea celular H1299 debido a que evita la unión del ligando PDL-1, sobreexpresado en estas células, al receptor PD-1, facilitando la detección y el ataque de las células T provocando la apoptosis [11, 16]. En cambio, CPT es un agente inespecífico para ambas líneas, por lo que el efecto comparado con los anticuerpos se desconoce. Estudios destacan que a dosis bajas la CPT aumenta la activación de caspasas en la línea H1299, pero a medida que se aumenta la dosis las células generan resistencia limitando significativamente la eficacia terapéutica [25]. La especificidad y efectividad de cada uno de los fármacos y dosis, se evaluará analizando la integridad de la membrana y la fragmentación de ADN. En función de estos resultados sería interesante evaluar el efecto sinérgico que pueden tener sobre las células la utilización combinada de los anticuerpos y el alcaloide vegetal (RTX + CPT y NVL + CPT) y evaluar si tanto RTX como NVL pueden sensibilizar las células cancerígenas a la CPT mejorando su actividad anticancerígena.

En cuanto al estudio molecular, la obtención de información de metilación genómica puede resultar muy útil puesto que la metilación de los promotores de genes se da en fases tempranas del desarrollo tumoral y se relaciona con el estadio de la enfermedad en algunos tipos de cáncer. La técnica **MSP** permite valorar el estado de metilación de una secuencia genómica. La ventaja de esta técnica es que es muy sensible, además de muy reproducible [15, 21].

Basándonos en los resultados de los estudios de metilación de Ji-Chin Lai *et al.*, [15, 21] tras la MSP se espera obtener el promotor metilado de MGMT en la línea celular H1299, considerando que en carcinomas pulmonares es común el silenciamiento del promotor MGMT [15]. En este trabajo se ha encontrado una asociación entre la metilación del promotor de MGMT y la proteína p53. Esta relación se ha determinado mediante el silenciamiento utilizando RNAi de p53, lo cual redujo los niveles de expresión de MGMT, mientras que la sobreexpresión de p53 aumentó sus niveles. Una de las características de las células H1299 es la falta de expresión de p53 debido a la delección parcial de la misma, por lo que se esperarían resultados similares [16]. Para la línea celular RL no se han encontrado estudios de metilación en la literatura, por lo que, teniendo en cuenta la existencia de la heterogeneidad tumoral, sería de gran interés investigar este aspecto y relacionarlo con los estudios hechos en otras líneas celulares procedentes de linfoma no Hodgkin [26]. Además, un artículo sobre cáncer de vejiga menciona que la sobreexpresión de Bcl-2, característica de las células RL, podría estar relacionada con el silenciamiento del promotor de MGMT [27]. Sería, por tanto, de gran interés realizar este análisis para posteriormente llevar a cabo estudios que esclareciesen la asociación entre Bcl-2 y la metilación de MGMT.

En cuanto a un posible efecto de los agentes citostáticos sobre el estado de metilación del promotor MGMT, se desconoce si tras el tratamiento se produciría algún cambio en el silenciamiento del gen. Sin embargo, sí se ha visto que la falta de metilación del promotor de MGMT se asocia con la resistencia a los tratamientos oncológicos. Se ha descrito que su silenciamiento aumenta la eficacia de la camptotecina, así pues, se esperaría que para la línea H1299, cuya expresión de MGMT es baja, la camptotecina sea eficaz [28]. No obstante, no hay suficiente bibliografía que relacione de forma contrastada la eficacia de los anticuerpos monoclonales utilizados con el estado de metilación del promotor de MGMT por lo que sería de gran interés realizar este proyecto.

Conclusión

En este trabajo se estudiará el efecto de la apoptosis en dos líneas tumorales H1299 de carcinoma de pulmón y RL de linfoma no Hodgkin, tratadas con RTX, NVL y CPT mediante las técnicas de Anexina V-FITC e IP, TUNEL, conversión con Bisulfito y PCR específica de metilación, además de analizar el patrón de metilación del promotor del gen MGMT. Se han expuesto las características celulares de las líneas escogidas, así como los fundamentos de las técnicas y una descripción de estas. Este proyecto plantea un primer estudio para obtener un mayor entendimiento tanto celular como molecular de los efectos biológicos que tendrán los agentes citostáticos en H1299 y RL, ya que en la literatura consultada se ha encontrado escasa información. Además, se estimará la dosis óptima de los tratamientos para las líneas empleadas. Con el análisis molecular se determinará el estado de metilación de la enzima MGMT en las líneas RL y H1299 y se estudiará si tras el tratamiento con los agentes citostáticos se produce algún cambio en dicho estado metilado del gen.

En el futuro sería oportuno ahondar en los efectos y mecanismos moleculares realizando estudios adicionales con la finalidad de confirmar si el efecto citotóxico se produce mediante apoptosis y no mediante otra MCP distinta. También sería conveniente estudiar el posible sinergismo entre los anticuerpos monoclonales y el alcaloide vegetal. Además, sería de gran interés analizar si el estado de metilación de MGMT está relacionado con la resistencia y efectos generados por los agentes citostáticos en estas líneas celulares. Finalmente se propone el estudio de la asociación entre MGMT y Bcl-2.

Puesto que la investigación básica es necesaria para el avance científico, este proyecto podría arrojar nuevo conocimiento teórico de los procesos de muerte celular en las líneas de linfoma no Hodgkin y carcinoma pulmonar. Asimismo, RTX y NVL han sido aprobados recientemente por la FDA, por lo que los estudios que arrojen información sobre sus efectos en distintas líneas celulares podrían ser beneficiosos. Esto podría derivar en una optimización y mejora de los tratamientos para estas enfermedades.

Agradecimientos

Me gustaría agradecer a Aránzazu García Grande, tutora del TFM y responsable de la Unidad de Citometría de flujo y Separación Celular, y a las demás responsables de las Unidades de Apoyo a la Investigación (Microscopía Confocal, Cultivos celulares, Biología Molecular y Secuenciación de ADN) del Instituto Investigación Puerta de Hierro-Segovia de Arana por la ayuda proporcionada para la realización de este trabajo. También quiero agradecer el apoyo proporcionado a Javier, Nera, Fran, Mari, Paco y Javier.

Referencias

- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., *et al.* 2018. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25(3), 486-541.
- Pollard, T. D., William C. E., Lippincott-Schwartz, J. and Johnson, G. T. 2017. Chapter 46 - Programmed Cell Death. In *Cell Biology* (Third Edition), Elsevier. 797-815.
- Wong, E., and Cuervo A. M. 2010. Integration of clearance mechanisms: the proteasome and autophagy. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(12), a006734.
- Miao, E.A., Rajan, J.V., and Aderem, A. 2011. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunological Reviews*, 243(1), 206-214.
- Xia, X., Wang, X., Cheng, Z., Qin, W., Lei, L., Jiang, J., *et al.* 2019. The role of pyroptosis in cancer: pro-cancer or pro-“host”. *Cell death and disease*, 10(9), 1-13.
- Bishopric, N.H., Andreka, P., Slepak, T., and Webster K.A. 2001. Molecular mechanisms of apoptosis in the cardiac myocyte. *Current Opinion in Neurology*, 1(2), 141-150.
- Mattiuzzi, C., and Lippi, G. 2019. Current cancer epidemiology. *Journal of epidemiology and global health*, 9(4), 217-222.
- Hassan, M., Watari, H., AbuAlmaaty, A., Ohba, Y., and Sakuragi, N. 2014. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *BioMed research international*.
- Sun, L. M., Liu, Y. C., Li, W., Liu, S., Liu, H. X., Li, L. W., *et al.* 2017. Nivolumab effectively inhibit platinum-resistant ovarian cancer cells via induction of cell apoptosis and inhibition of ADAM17 expression. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 21(6), 1198–1205.
- Erdoğan, İ., Coşacak, M. İ., Aldanmaz, A. N., and Akgül, B. 2018. Deep sequencing reveals two Jurkat subpopulations with distinct miRNA profiles during camptothecin-induced apoptosis. *Turkish Journal of Biology*, 42(2), 113-122.
- Bristol-Myers S. 2019. Opdivo (nivolumab) injection for intravenous infusion prescribing information. *FDA*. Princeton, NJ.
- Sanchez-Vega, F., Mina, M., Armenia, J., Chatila, W. K., Luna, A., La, K. C., *et al.* 2018. Oncogenic signaling pathways in the cancer genome atlas. *Cell*, 173(2), 321-337.
- Levine AJ. 1997. P53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell*, 88(3):323-331.
- Bates, S., and Vousden, KS. 1999. Mechanism of p53-mediated apoptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 55(1), 28-37.

15. Lai, J. C., Cheng, Y. W., Goan, Y. G., Chang, J. T., Wu, T. C., Chen, C. Y., *et al.* 2008. Promoter methylation of O6-methylguanine-DNA-methyltransferase in lung cancer is regulated by p53. *DNA repair*, 7(8), 1352-1363.
16. Salles, G., Barrett, M., Foà, R., Maurer, J., O'Brien, S., Valente, N., *et al.* 2017. Rituximab in B-cell hematologic malignancies: a review of 20 years of clinical experience. *Advances in therapy*, 34(10), 2232-2273.
17. Muñoz Cendales, D. R., and Cuca Suárez, L. E. 2016. Compuestos citotóxicos de origen vegetal y su relación con proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP). *Revista Colombiana de Cancerología*, 20(3), 124-134.
18. Zeng, C. W., Zhang, X. J., Lin, K. Y., Ye, H., Feng, S. Y., Zhang, H., and Chen, Y. Q. 2012. Camptothecin induces apoptosis in cancer cells via microRNA-125b-mediated mitochondrial pathways. *Molecular Pharmacology*, 81(4), 578-586.
19. Banfalvi, G. 2017. Methods to detect apoptotic cell death. *Apoptosis*, 22(2), 306-323.
20. Mikeska, T., and Craig, J. M. 2014. DNA methylation biomarkers: cancer and beyond. *Genes*, 5(3), 821-864.
21. Lai, J. C., Wu, J. Y., Cheng, Y. W., Yeh, K. T., Wu, T. C., Chen, C. Y., *et al.* 2009. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase hypermethylation modulated by 17beta-estradiol in lung cancer cells. *Anticancer Research*. 29(7), 2535-2540
22. Pereira, A. S., Tavares, P., and Limão-Vieira, P. 2019. Chapter 14 - Radiobiological Effects Induced by X-ray (LINAC) Irradiation: Experiments and Modelling. In: *Radiation in Bioanalysis: Spectroscopic Techniques and Theoretical Methods* (Eight edition), Springer Nature. 367-395.
23. Kim, J. H., Chae, M., Kim, W. K., Kim, Y. J., Kang, H. S., Kim, H. S., *et al.* 2011. Salinomycin sensitizes cancer cells to the effects of doxorubicin and etoposide treatment by increasing DNA damage and reducing p21 protein. *British journal of pharmacology*, 162(3), 773-784.
24. Majtnerová, P., and Roušar, T. 2018. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Molecular biology reports*, 45(5), 1469-1478.
25. Chiu, Y. H., Hsu, S. H., Hsu, H. W., Huang, K. C., Liu, W., Wu, C. Y., *et al.* 2018. Human non-small cell lung cancer cells can be sensitized to camptothecin by modulating autophagy. *International journal of oncology*, 53(5), 1967-1979.
26. Kewitz, S., Stiefel, M., Kramm, C. M., and Staeger, M. S. 2014. Impact of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation and MGMT expression on dacarbazine resistance of Hodgkin's lymphoma cells. *Leukemia research*, 38(1), 138-143.
27. Jahed, M., Ebadi, N., Mivehchi, M., Majidizadeh, T., Shahshanipour, M., Asgari, M., *et al.* 2016. MGMT hypermethylation and BCL-2 overexpression associated with superficial bladder cancer and recurrence. *Cancer Biomarkers*, 16(4), 627-632.
28. Morano, F., Corallo, S., Niger, M., Barault, L., Milione, M., Berenato, R., *et al.* 2018. Temozolomide and irinotecan (TEMIRI regimen) as salvage treatment of irinotecan-sensitive advanced colorectal cancer patients bearing MGMT methylation. *Annals of Oncology*, 29(8), 1800-1806.31.
29. Fernandez-Fernandez, A., and Esteller, M. 2007. DNA Methylation Analysis by Bisulfite Sequencing (BS)(PROT34). The EPIGENOME Network of Excellence, Madrid, Spain.