



Universidad de Valladolid

Implicación de las proteínas proapoptóticas multidominio en la inestabilidad genómica y el cáncer

Trabajo de fin de máster

Máster en Investigación Biomédica

Lucía Álvarez Frutos

Tutorizado por Laura Senovilla

Valladolid, 2022

ABREVIATURAS	2
RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	3
CICLO CELULAR	3
<i>Fases del ciclo celular</i>	3
<i>Control del ciclo celular</i>	4
<i>Ploidía</i>	5
RESPUESTA AL DAÑO EN EL ADN	7
SENESCENCIA.....	8
APOPTOSIS.....	9
<i>Familia de proteínas Bcl-2</i>	9
CARACTERÍSTICAS DEL CÁNCER	10
<i>Inestabilidad genómica y tetraploidía</i>	11
<i>Proliferación y senescencia en el cáncer</i>	12
<i>Resistencia a la apoptosis en el cáncer</i>	13
HIPÓTESIS	13
OBJETIVOS	14
MATERIAL Y MÉTODOS	14
MATERIALES	14
ANTICUERPOS	14
LÍNEAS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVOS	14
CITOMETRÍA DE FLUJO	15
<i>Ensayo de muerte celular</i>	15
<i>Ensayo de senescencia</i>	15
ENSAYO DE CAPACIDAD CLONOGÉNICA	16
WESTERN BLOT	16
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	17
RESULTADOS.....	18
<i>La ausencia de proteínas proapoptóticas multidominio causa resistencia a la apoptosis inducida por oxaliplatino</i>	18
<i>La inducción de la tetraploidía se correlaciona con un incremento en la mortalidad en células WT, DKO y TKO</i>	18
<i>La ausencia de Bok reestablece la capacidad clonogénica de las células DKO</i>	20
<i>La ausencia de BOK restaura los niveles de senescencia de las células DKO tras la tetraploidización</i>	21
DISCUSIÓN.....	24
CONCLUSIONES.....	26
BIBLIOGRAFÍA.....	27

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico
ATM: Proteína quinasa ataxia telangiectasia mutada
ATR: Proteína ataxia telangiectasia relacionada con Rad3
Bad: Proteína agonista de la muerte celular asociada a BCL2
Bak: Proteína antagonista/asesina de BCL-2
Bax: Proteína X asociada a BCL-2
Bcl-2: Proteína de linfoma de células B 2
Bcl-XL: Proteína de linfoma de células B extragrande o Proteína similar a BCL-2 1
Bcl-W: Proteína similar a BCL-2 2
Bim: Proteína similar a BCL-2 11
CDK: Quinasas dependientes de ciclina
CDKI: Proteínas inhibidoras de las CDK
Chk1: Proteína quinasa de punto de control 1
Chk2: Proteína quinasa de punto de control 2
CIP proteína que interactúa con la CDK
DDR: Respuesta al daño del ADN
DiOC₆(3): 3,3'-dihexiloxalocarbocianina
DKO: Doble knock-out (dos genes defectivos)
INK4: inhibidores de CDK4
KIP: proteína inhibidora de quinasas
Mcl-1: Proteína de diferenciación celular de la leucemia mieloide inducida
MOMP: Permeabilización de la membrana externa mitocondrial
Noco: Nocodazol
OXAL: Oxaliplatino
PBS: Tampón salino fosfato
PI: Yoduro de propidio
pRb: Proteína del retinoblastoma
TKO: Triple knock-out (tres genes defectivos)
TNFR: factor de necrosis tumoral
WT: Wild type (tipo salvaje)

RESUMEN

El ciclo celular conlleva una secuencia ordenada de acontecimientos. Debería ser un proceso libre de errores. Para ello existe una compleja red de proteínas que cuando se producen errores durante el ciclo celular se conducen a la detención de este de manera transitoria (quiescencia) o permanente (senescencia). Si el error es grave y los puntos de control del ciclo celular funcionan, se produce la muerte celular mediante la activación de programas de muerte celular.

Las proteínas multidominio proapoptóticas de la familia BCL2, Bax, Bak y Bok, son conocidas por su papel en la vía intrínseca de la apoptosis. Aquí, hemos comprobado como las células de ratón que carecen de Bax y Bak (doble knockout, DKO) y de Bax, Bak y Bok (triple knockout, TKO) son resistentes a la muerte celular tras la inducción de daño en el ADN. Sin embargo, estas células DKO y TKO son sensibles a la muerte celular tras la inducción de la tetraploidía. También hemos confirmado que las células DKO tetraploides tienen menor capacidad proliferativa y aumentan sus niveles de senescencia tras la tetraploidización. Sorprendentemente, tanto la capacidad proliferativa como los niveles de senescencia se revierten cuando se añade la ausencia de Bok (células TKO).

La inestabilidad genómica y la resistencia a la muerte celular son algunas de las características del cáncer. La diferente expresión de las proteínas proapoptóticas multidominio parece afectar a la inestabilidad genómica favoreciendo, o no, la aparición de células tetraploides y a la muerte celular inducida por agentes quimioterapéuticos inductores de daño al ADN o inhibidores de microtúbulos.

INTRODUCCIÓN

CICLO CELULAR

Fases del ciclo celular

El ciclo celular eucariota se divide en cuatro fases secuenciales: G_1 , S, G_2 y M. A las fases G_1 , S y G_2 se las denomina, en conjunto, interfase. La duplicación de los cromosomas sucede en la fase S (S de síntesis del ADN). La segregación de los cromosomas y la división celular ocurren en la fase M (M de mitosis). En la fase M acontecen dos eventos: la división nuclear o carioquinesis y la división citoplasmática o citoquinesis (1–3). Las fases G_1 y G_2 , cuyo nombre viene del inglés “gap” (intervalo), son las fases necesarias para que la célula pueda comprobar que las condiciones son adecuadas antes de que comiencen la síntesis de ADN y la mitosis en las fases S y M, respectivamente. La fase G_1 separa la finalización de la fase M de la iniciación de la fase S. Durante esta fase, la célula lleva a cabo su metabolismo normal, creciendo hasta alcanzar un tamaño crítico que le dará la señal para pasar a la fase S. Mientras, la fase G_2 separa la fase S y la M (4,5). Durante esta fase, los centrosomas se replican y permiten que la mitosis continúe.

Las células no proliferativas de los eucariotas multicelulares suelen entrar en el estado quiescente G_0 y pueden permanecer quiescentes durante mucho tiempo, o incluso indefinidamente (lo que es habitual en las neuronas). Esto es muy frecuente en las células totalmente diferenciadas. Sin embargo, otras células nunca entran en la fase G_0 , sino que continúan dividiéndose durante toda la vida del organismo (por ejemplo, las células epiteliales). Por otro lado, cuando las condiciones no son favorables, las células retrasan su progresión a través del ciclo celular hasta que las condiciones sean las adecuadas. Este sistema de vigilancia está controlado por los puntos de control del ciclo celular (2,3,5) (*Figura 1*).

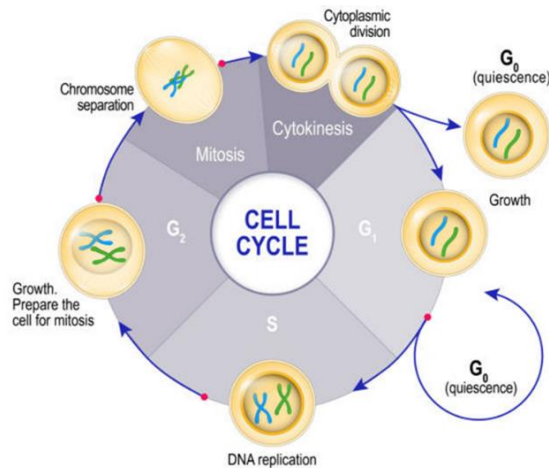


Figura 1. Esquema de la progresión normal del ciclo celular. Secuencias de las fases G_1 , S, G_2 y M. Después de la mitosis, la célula puede diferenciarse, entrar en un estado de quiescencia o reentrar en el ciclo celular. (Fuente: Creative commons images. www.istockphoto.com)

Control del ciclo celular

Los puntos de control del ciclo celular son mecanismos de vigilancia que controlan que los principales acontecimientos del ciclo celular sigan un orden determinado y sin fallos. Entre estos acontecimientos se incluyen el crecimiento hasta el tamaño celular adecuado, la replicación e integridad de los cromosomas, y su segregación precisa durante la mitosis. El sistema de control del ciclo celular desencadena la progresión del ciclo celular en tres puntos de control principales (6): 1) punto de control G_1 o de restricción al final de la fase G_1 , la célula se enfrenta a la "elección" de proseguir el ciclo celular y duplicar los cromosomas o salir del ciclo celular para entrar en quiescencia; 2) punto de control G_2 , en el que se desencadenan los acontecimientos mitóticos iniciales que conducen a la alineación de los cromosomas en el huso mitótico durante la metafase; 3) punto de control M o de transición de metafase a anafase, cuando el sistema de control estimula la separación de las cromátidas hermanas, conduciendo a la finalización de la mitosis (*Figura 2*) (7). En estos puntos de control se detiene el progreso del ciclo celular si cualquier ADN cromosómico se daña o si ciertos procesos no se completan de forma correcta, como la replicación del ADN durante la fase S o la alineación cromosómica durante la fase M. Si el daño al ADN es irreparable se induce la salida del ciclo celular o de la muerte celular. De esta manera se impide la acumulación y la propagación de errores genéticos durante la división (7,8).

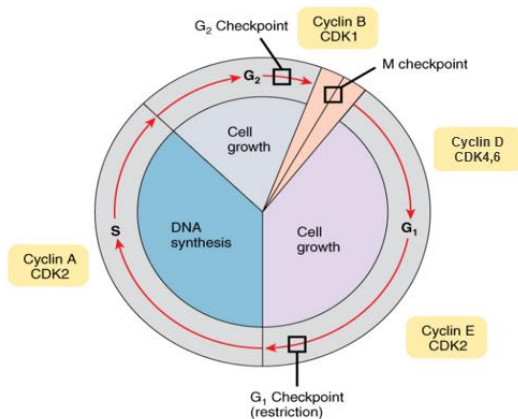


Figura 2. Esquema de los puntos de control a lo largo del ciclo celular. A lo largo del ciclo celular existen tres puntos de control: G_1 , G_2 y M, los cuales están controlados por enzimas quinasas dependientes de ciclinas y ciclinas (Fuente: Creative commons images)

Las quinasas dependientes de ciclina, o CDKs, son las enzimas que regulan el correcto desarrollo del ciclo celular. Las CDKs, a su vez, están controladas por las proteínas

ciclinas (8). Existen diferentes complejos CDK-ciclinas que actúan en distintas etapas del ciclo celular (5) (*Figura 2*). La transición de G₁ a S está bajo el control de los complejos ciclina D-CDK4,6 y ciclina E-CDK2. El complejo ciclina A-CDK2 actúa en la fase S. Además de iniciar la síntesis del ADN, este complejo garantiza que el ADN se replique una vez por ciclo celular (7). La entrada en la mitosis en el punto de control G₂/M está regulado por ciclina B-CDK1.

La actividad de las CDK también está regulada negativamente por pequeñas proteínas inhibidoras de CDK, o CDKI (6). Existen dos principales familias de proteínas inhibidoras de CDK. Por un lado, la familia de proteínas CIP/KIP (proteína que interactúa con la CDK/proteína inhibidora de quinasas, respectivamente) incluye p21^{CIP1} (también llamado inhibidor CDK 1A o CDKN1A), p27^{KIP1} (CDKN1B) y p57^{KIP2} (CDKN1C) que se unen a los complejos ciclina-CDK, formando triméricos inactivos y bloqueando los complejos ciclina-CDK (ciclina E-CDK2, ciclina A-CDK2, ciclina B-CDK1 y, posiblemente, ciclina D-CDK4 y ciclina D-CDK6). Por otro lado, la familia de las proteínas INK4 (inhibidores de CDK4) incluye p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C}, y p19^{INK4D}, los cuales se unen específicamente a CDK4 o CDK6, inhibiendo su actividad quinasa (9). De todos ellos, los más relevantes son p21^{CIP1}, p27^{KIP1}, p16^{INK4A} y p15^{INK4B}. La proteína p21^{CIP1}, la más ampliamente estudiada. Desempeña un papel importante en la respuesta de las células al daño en el ADN. Se une a todos los complejos ciclina-CDK (ciclina-CDK2, -CDK1 y -CDK4/6) e inhibe su actividad y, como resultado, las células se detienen en las fases G₁, S y G₂. Las células con un alto nivel de p21^{CIP1} entran en un estado G₀/quiescente. La proteína p27^{KIP1} se une a los complejos ciclina E-CDK2 o ciclina D-CDK4 e impide su activación. El aumento de los niveles de la proteína p27^{KIP1} detiene o ralentiza el ciclo celular en la fase G₁. La proteína p16^{INK4A} es una proteína que ralentiza la división celular al frenar la progresión del ciclo celular de la fase G₁ a la fase S mediante la inhibición de CDK4. La proteína p15^{INK4B} forma un complejo con CDK4 o CDK6, e impide la activación de las quinasas CDK por la ciclina D, por lo que la proteína funciona como un regulador del crecimiento celular que inhibe la progresión del ciclo celular G₁ (2) (8,10).

Está completamente demostrado que las células cancerosas mantienen una señalización aumentada de las CDK, interrumpiendo los reguladores del ciclo celular, como las CDKI, lo que conduce a aumento de ciclos celulares, la proliferación celular y la inestabilidad genómica y cromosómica (9). En los cánceres humanos se encuentran mutados con frecuencia los genes que codifican las CDKI (10). Se cree que p21^{CIP1} y p27^{KIP1} suprimen el crecimiento tumoral y detienen la progresión del ciclo celular en las transiciones G₁/S y G₂/M mediante la inhibición de las quinasas ciclina-E/A-CDK2 (9).

Ploidía

La mayoría de las especies nucleadas (eucariotas) son diploides (2n), lo que significa que tienen dos juegos completos de cromosomas, cada uno heredado de cada progenitor. Los organismos y células poliploides son aquellos que contienen un número de cromosomas múltiplo del número haploide (n), superior a dos pares de cromosomas homólogos. Los organismos en los que hay un número anómalo de cromosomas (es decir, un determinado cromosoma o segmento cromosómico está infra- o sobre-representado) se consideran aneuploides. Por lo tanto, la poliploidía se refiere a un cambio numérico en todo el conjunto de cromosomas, mientras que la aneuploidía se refiere a la pérdida o ganancia de uno o más cromosomas (11). Se considera que las células aneuploides, características del cáncer, derivan de las células tetraploides. Las células tetraploides tienen el doble de cromosomas que las diploides, es decir, dos pares (4n) de cromosomas homólogos. La tetraploidización puede ser el resultado de:

- Fusión celular (*Figura 3*), de manera que se generan células multinucleadas que se mantienen detenidas en la fase G₁ del ciclo celular (12).

- Endorreplicación (*Figura 4*), se ha replicado el ADN dos veces consecutivas sin división por mitosis (13).
- Endomitosis (*Figura 5*), células con cromosomas duplicados no logran completar la cariocinesis (división nuclear) o la citocinesis (división celular) y abortan la mitosis (13).

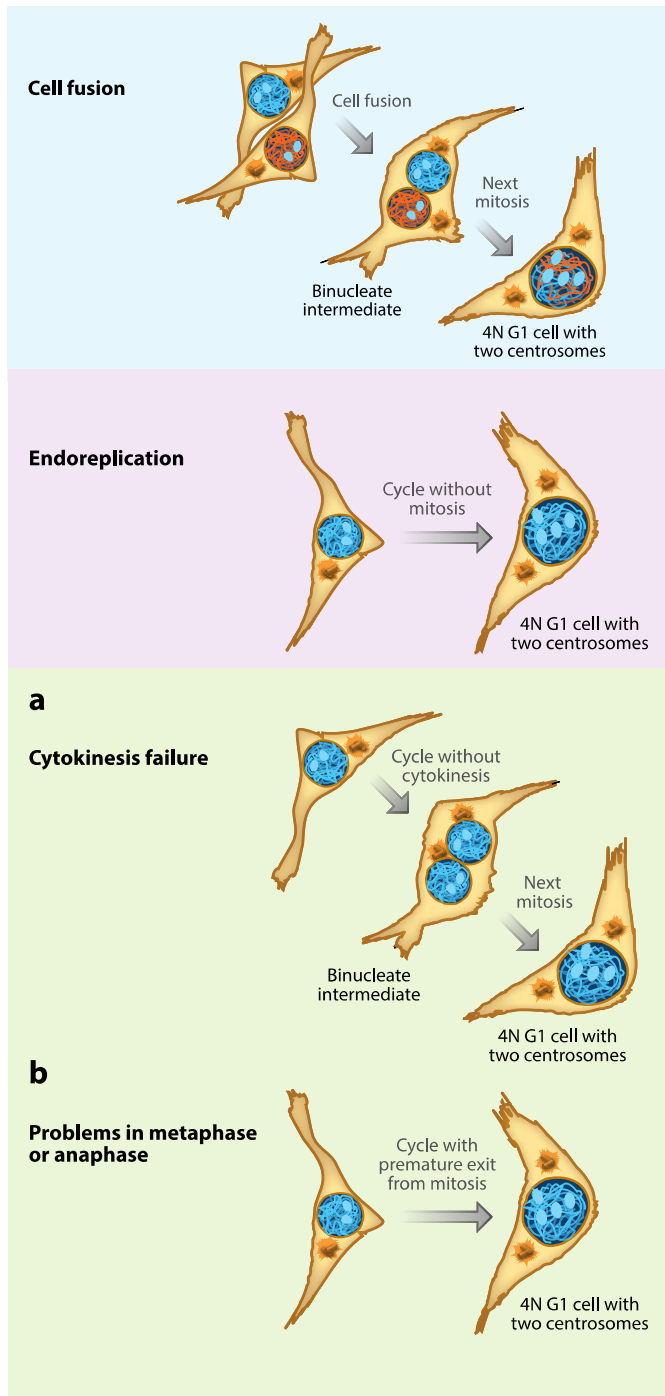


Figura 3. Fusión celular. Las células tetraploides binucleadas ($2 \times 2n$) pueden surgir en presencia de estrés mecánico, o de proteínas virales fusogénicas. Adaptado de Davoli et al. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2011 (14).

Figure 4. Endorreplicación. La endorreplicación se produce cuando una célula diploide, habiendo duplicado normalmente su ADN y sus centrosomas, no consigue entrar en mitosis. Esto da lugar a la formación de una célula tetraploide mononuclear con dos centrosomas. Adaptado de Davoli et al. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2011 (14).

Figura 5. Endomitosis. La no finalización de la división celular debido al fracaso de la citocinesis (a) o la salida temprana de la mitosis sin cariocinesis (b) conduce a la generación de células tetraploides. Adaptado de Davoli et al. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2011 (14)

Aunque la mayoría de las células de los mamíferos son diploides, pueden encontrarse células multinucleadas y endoploides con una frecuencia relativamente alta (0,5-20%), especialmente en tejidos altamente proliferativos (15). En humanos, se ha observado tetraploidía en megacariocitos y algunas células del hígado (16). En algunos escenarios fisiológicos (como la repoblación del hígado con células derivadas de la médula ósea),

los intermedios poliploides generados por fusiones celulares pueden recuperar un genoma diploide y proliferar (17). Sin embargo, las células tetraploides no fisiológicas recién formadas normalmente mueren por apoptosis a través del punto de control de la tetraploidía (18)

RESPUESTA AL DAÑO EN EL ADN

Diversos factores endógenos (por ejemplo, las especies reactivas de oxígeno (ROS) y los radicales libres (FR) resultantes del estrés oxidativo) y exógenos, como las radiaciones (UV, rayos X, rayos γ) y ciertos agentes químicos (polución, quimioterapia, pesticidas, tabaco, etc.), suponen un serio reto para las células a la hora de mantener la integridad del genoma. Estos factores pueden provocar diferentes lesiones en el ADN: discordancia de bases, rotura de cadena simple, rotura de doble cadena, enlaces cruzados entre filamentos o aductos voluminosos/enlaces cruzados entre filamentos, que pueden conducir a la inestabilidad genómica (*Figura 6*). Estas lesiones en el ADN provocan una detención del ciclo celular y la activación de las vías de reparación para eliminar el daño del ADN antes de pasar a las siguientes fases del ciclo celular. El ciclo celular se detiene inhibiendo de forma directa e indirecta los complejos ciclina-CDK (10).

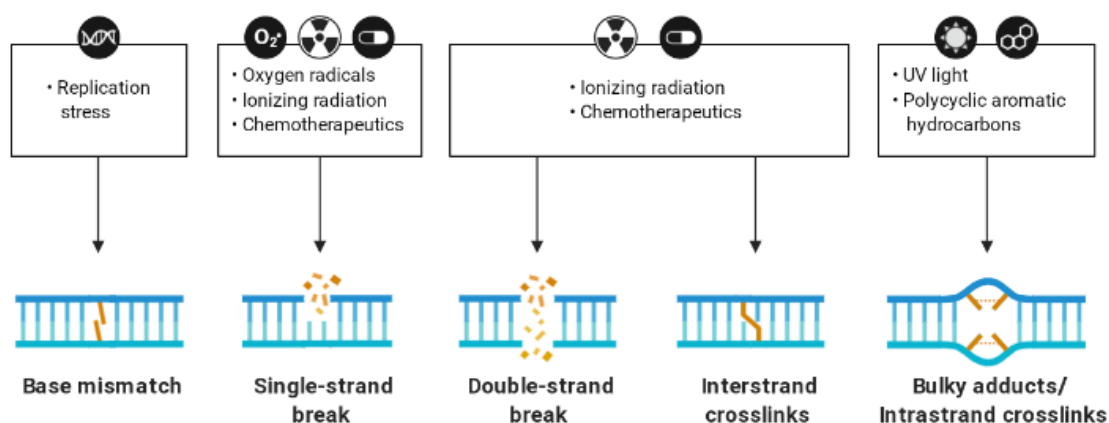


Figura 6. Diferentes factores endógenos y exógenos inducen distintos tipos de daño al ADN (adaptado de la aplicación BioRender).

Las roturas de doble cadena (DSB), principalmente, y las roturas de cadena simple (SSB) son las lesiones genéticas más conocida en el hombre. La aparición de roturas de doble cadena de ADN desencadena una rápida respuesta de señalización que depende de la proteína quinasa ataxia telangiectasia mutada (ATM), mientras que las roturas de cadena simple desencadenan la vía de señalización mediada por la proteína ataxia telangiectasia relacionada con Rad3 (ATR). La activación de ambas, ATM y ATR, induce la fosforilación de la histona H2AX (γ H2AX), la cual se utiliza como marcador de daño en el ADN. La ATM activada fosforila a su vez a la proteína quinasa punto de control 2 (Chk2) y ATR a la proteína quinasa punto de control 1 (Chk1). A su vez, Chk2 activa al factor de transcripción TP53 y Chk1 a la fosfatasa del control de la división celular 25 (CDC25) (7,19). Finalmente, la respuesta al daño en el ADN resulta en la muerte celular (mediada principalmente por TP53) o en la detención transitoria del ciclo celular. Durante esta parada puede repararse el daño en el ADN y la reanudación de la

proliferación, o la senescencia celular causada por la persistencia del daño en el ADN no reparado (6,7,19) (Figura 7).

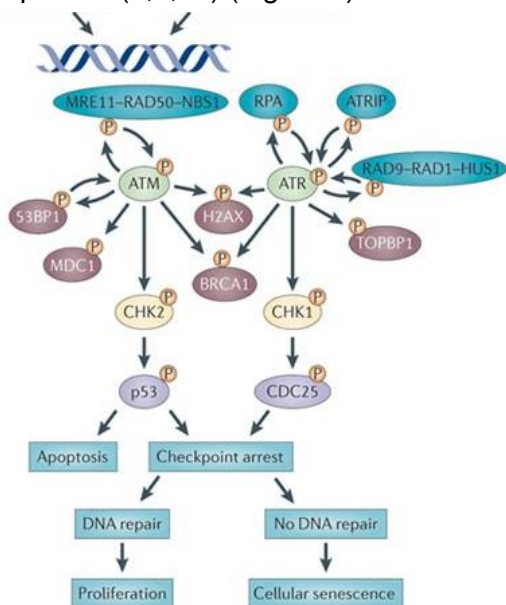


Figura 7. Principales vías de señalización en respuesta al daño del ADN. Adaptado de Sulli et al. Nat Rev Cancer, 2012 (19).

En definitiva, la severidad del daño en el ADN decide el destino de la célula. Las células pueden volver a entrar en el ciclo celular, salir permanentemente del ciclo celular y volverse senescentes, o sufrir apoptosis. En la fase G₁ prerreplicativa si la célula no sufre apoptosis, la detención del ciclo celular es reversible (quiescencia) o irreversible (senescencia). En cambio, en las fases S y G₂, la detención a largo plazo resulta principalmente en una salida irreversible del ciclo celular a través de la senescencia o la apoptosis (7).

SENESCENCIA

La detención del ciclo celular se clasifica, principalmente, como quiescencia o senescencia. La quiescencia es un estado no proliferativo reversible. Las células pueden volver a entrar en el ciclo celular tras la reversión de las señales de daño que han provocado su parada. (20). Las células senescentes se caracterizan por una detención del ciclo celular prolongada y generalmente irreversible. La senescencia implica una salida permanente del ciclo celular en respuesta de estrés celular persistente desencadenado por la activación de oncogenes, daño al ADN, la disfunción mitocondrial, alteraciones de la cromatina, o el deterioro de la biogénesis de los ribosomas. Estas alteraciones van a provocar la activación de distintos CDKI (que ya hemos visto anteriormente), una mayor secreción de factores proinflamatorios y de remodelación tisular, la inducción de genes antiapoptóticos, la alteración de las tasas metabólicas y el estrés del retículo endoplásmico (21). Las células senescentes producen un secretoma complejo conocido como fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP) y experimentan cambios característicos que incluyen alteraciones transcripcionales, epigenéticas, morfológicas y alteraciones metabólicas (20,22). SASP se caracteriza por la secreción de altos niveles de citoquinas inflamatorias, moduladores inmunitarios, factores de crecimiento y proteasas (22). Inicialmente el SASP es inmunosupresor (caracterizado por TGF-β1 y TGF-β3) y profibrótico, pero progresa hasta convertirse en proinflamatorio (caracterizado por IL-1β, IL-6 e IL-8) y fibrolítico (22).

La senescencia tiene muchas funciones fisiológicas en el desarrollo (por ejemplo, la morfogénesis renal), la homeostasis de los tejidos (por ejemplo, la cicatrización de

heridas) y el envejecimiento (20). Además, la senescencia funciona como un importante salvaguarda contra la proliferación celular incontrolada y el cáncer debido a la permanencia de la detención del crecimiento (20).

APOPTOSIS

La apoptosis es la secuencia organizada de fenómenos que conduce a la muerte de la célula. Es un proceso limpio y ordenado caracterizado por la reducción general del volumen de la célula y su núcleo, pérdida de adhesión a las células contiguas, formación de vesículas en la superficie celular, fragmentación de la cromatina y fagocitosis de los restos. La apoptosis puede iniciarse por estímulos externos siguiendo la vía extrínseca o por estímulos internos siguiendo la vía intrínseca (8). La vía extrínseca está mediada por receptores (fundamentalmente receptores de muerte que pertenecen a la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR). Los receptores de muerte mejor caracterizados son Fas y TNFR1 (Tumor Necrosis Factor Receptor-1). A estos receptores se unen sus correspondientes ligandos. A estos se asocian unas moléculas adaptadoras que actúan como cofactores desencadenando la activación de caspasa 8, que es un activador, a su vez, de la cascada de caspasas ejecutoras. La vía intrínseca se desencadena por los estímulos estresantes del interior de la célula, como los oncogenes, el daño al ADN, la hipoxia y la privación de factores de supervivencia. TP53 es un sensor de estrés celular y es un activador crítico de la vía intrínseca. TP53 inicia la apoptosis mediante la activación transcripcional de los miembros proapoptóticos de la familia Bcl2 y la represión de las proteínas antiapoptóticas Bcl2 (8). Se caracteriza por la liberación de citocromo c de la cadena respiratoria de las mitocondrias y la activación de la caspasa 9, que es una caspasa iniciadora de la cascada de las caspasas efectoras, especialmente caspasa 3.

Familia de proteínas Bcl-2

La familia de proteínas Bcl-2 ("*B-cell lymphoma 2*", linfoma de células B2) es conocida por su relevancia en la regulación de la vía intrínseca de la apoptosis. Estas proteínas están definidas, en parte, por la estructura de sus cuatro regiones denominadas dominios de homología Bcl-2 (BH1, BH2, BH3 y BH4). Esta familia se puede clasificar en dos subfamilias, las proteínas proapoptóticas y las proteínas antiapoptóticas, dependiendo de si inducen o inhiben la apoptosis, respectivamente (23,24). La subfamilia antiapoptótica, donde se incluyen las proteínas Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w y Mcl-1, conservan todos los dominios (BH1-4). Las proteínas proapoptóticas se subdividen, a su vez, en dos categorías: las proteínas proapoptóticas multidominio (BH1-3), a la que pertenecen Bax, Bak y Bok; y las proteínas proapoptóticas que sólo tienen el dominio BH3 (por ejemplo, Bim, Bid, Bad, Puma y Noxa) (25,26). Se ha demostrado que estas proteínas tienen, además, funciones importantes en la regulación de otras funciones celulares (27), como en el metabolismo celular (28), afectan a los flujos de Ca^{2+} (especialmente a nivel del retículo endoplásmico) (29,30), influyen en el avance del ciclo celular (31) y son capaces de regular la macroautofagia (32), entre muchas otras.

Las proteínas Bax y Bak, son conocidas por su importante papel en la inducción de la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP), que es el paso limitante de la vía intrínseca de la apoptosis (25,26). Bax y Bak se encuentran en la membrana mitocondrial externa unidas fuertemente a Bcl-2. Cuando se liberan, forman oligómeros que generan poros en la membrana mitocondrial externa permitiendo la liberación al citosol proteínas mitocondriales como el citocromo c (8). Bax y Bak también se localizan en el retículo endoplásmico (RE) para regular la vía intrínseca de la apoptosis. La transferencia de Ca^{2+} desde el RE a las mitocondrias es un factor crítico que contribuye a la apoptosis. En este sentido, Bax y Bak son necesarias para mantener las

concentraciones homeostáticas de Ca^{2+} en el RE (33) . La inhibición de Bax y Bak confiere a las células la capacidad de resistir la muerte por apoptosis (25,26). Por su lado, Bok fue descubierta hace 25 años y es la más desconocida de las proteínas proapoptóticas multidominio. En los últimos 5 años han aumentado los indicios sobre el papel de Bok en la proliferación celular, la autofagia, la fisiología mitocondrial, la homeostasis del RE y la modulación de la respuesta a estrés del RE ("*unfolded protein response*" o UPR) (34). En cuanto a su importancia en la apoptosis, se sabe que Bok se localiza en el RE donde se une al receptor de inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3R) y que es necesario para los niveles basales de Ca^{2+} mitocondrial y la transferencia de Ca^{2+} desde el RE a la mitocondria (35). De hecho, las células humanas o de ratón que carecen tanto de Bax como de Bak (debido a un doble knockout, DKO) son resistentes a la MOMP y a la inducción de la muerte celular (23,24).

La apoptosis desempeña un papel fundamental en la regulación del desarrollo y la homeostasis de los tejidos. La ausencia de Bax y Bak provoca una profunda resistencia a la apoptosis, pero Bax y Bak también son esenciales para el desarrollo normal de múltiples tejidos. En los ratones $\text{Bax}^{-/-}\text{Bak}^{-/-}$ (DKO) se ha observado una elevada mortalidad perinatal y sólo el 10% de los ratones llegan a la edad adulta. Los ratones DKO presentan espermatogénesis defectuosa, vagina imperforada y tejido interdigital, así como anomalías neurológicas y exceso de células en los sistemas nervioso y hematopoyético, lo que se traduce en un mayor tamaño del cerebro y un aumento de los órganos linfoides (36). No se ha descrito una eliminación similar de dos copias de Bax y Bak en humanos, aunque se han descrito cambios en los niveles de expresión de la proteína y mutaciones. Se han observado mutaciones en Bax y Bak en varios tipos de cáncer humano, en particular en el 40% de los cánceres gastrointestinales (37,38), y en varios tipos de linfoma no Hodgkin de células B indolente (39). Se ha comprobado una disminución de la expresión de Bax y Bak en enfermedades autoinmunes como la enfermedad de Graves o la Ataxia telangiectasia (40). Algunos estudios muestran un papel crítico de Bak y un papel auxiliar de Bax en la tolerancia inmunológica y por lo tanto en la prevención de enfermedades autoinmunes (41).

CARACTERÍSTICAS DEL CÁNCER

En el año 2000 Hanahan y Weinberg definieron las características del cáncer como las capacidades funcionales adquiridas que permiten a las células cancerígenas sobrevivir, proliferar y diseminarse. Las características incluían la capacidad de mantener la señalización proliferativa, resistir la muerte celular, inducir la angiogénesis, permitir la inmortalidad replicativa, activar la capacidad invasiva y metastásica y evitar los supresores del crecimiento (42). En el año 2011 propusieron que esta adquisición es posible gracias a dos nuevas características: la **inestabilidad genómica** y el estado inflamatorio. El desarrollo de inestabilidad genómica en células cancerosas es lo que genera las mutaciones aleatorias que permite la adquisición de estas mismas características. Las anomalías genéticas pueden estar relacionadas con la estructura cromosómica, incluyendo duplicaciones, deleciones o translocaciones de fragmentos cromosómicos, o también pueden estar relacionadas con el número de cromosomas, dando lugar a cariotipos subdiploides ($<2n$) o hiperploides ($>4n$). Por su lado, el estado proinflamatorio hace que se promueva la progresión tumoral (43) (*Figura 8*).

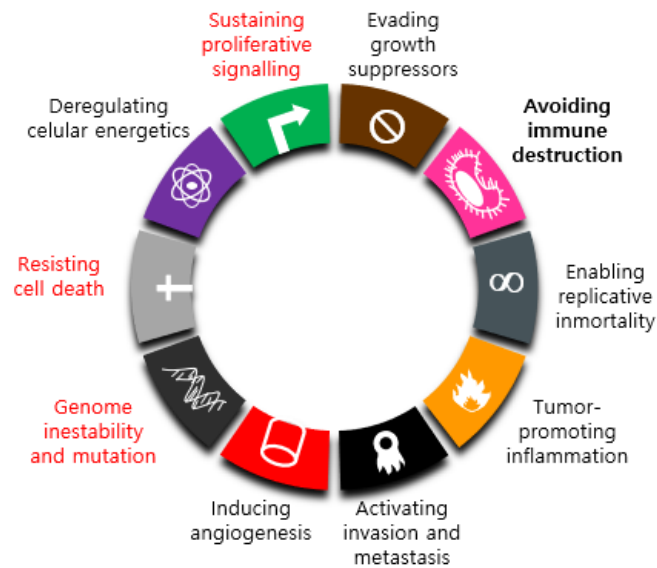


Figura 8. Características del cáncer. Modificado de Hanahan y Weinberg, Cell, 2011 (43)

Inestabilidad genómica y tetraploidía

La poliploidización se ha asociado a enfermedades humanas como el cáncer (44). Las células cancerosas permiten numerosas alteraciones genéticas y epigenéticas. Esta condición de inestabilidad genómica favorece la adquisición de un fenotipo cada vez más agresivo. Uno de los mecanismos subyacentes a la inestabilidad genómica implica una fase transitoria de poliploidización, que en la mayoría de los casos es una fase de tetraploidización (45). La tetraploidía actúa como un generador de inestabilidad genómica ya que las células tetraploides son propensas a ganar o perder cromosomas progresivamente durante los sucesivos ciclos de mitosis (46) dando lugar a las células aneuploides características de cáncer agresivo. Es decir, las células poliploides contribuyen a la tumorigénesis o a la progresión del cáncer, al promover la aneuploidía y la inestabilidad cromosómica (44).

En la mayoría de los tipos de células, no se toleran variaciones significativas en el estado diploide y las células tetraploides, así como las de orden superior, mueren al generarse (45). Sin embargo, se ha observado tetraploidía en cánceres bronquiales, esofágicos, gástricos, de mama, colorrectales, de ovario, de cuello de útero y de próstata, correlacionándose con la inactivación de los supresores tumorales TP53 y la proteína del retinoblastoma pRb (14). Aproximadamente una quinta parte de los cánceres humanos se caracterizan por la aneuploidía con un número de cromosomas superior al normal (47). La aneuploidía, que es una característica casi constante de los cánceres, puede ser el resultado de un evento de duplicación del genoma, seguido de la pérdida progresiva de cromosomas debido a una mala segregación de estos durante la anafase (46). Hay múltiples datos que apuntan en esta dirección. En primer lugar, un amplio estudio de caracterización del genoma de múltiples tumores sólidos reveló que aproximadamente el 40% de estos cánceres, incluidos los tumores con contenido de ADN casi diploide, experimentaron al menos un evento de duplicación del genoma durante su evolución (58–60). En segundo lugar, las células tetraploides se encuentran en las primeras etapas de los cánceres, así como en lesiones premalignas como el esófago de Barret (47). Esta cascada de "poliploidización-depoliploidización" se evita normalmente mediante mecanismos de control de oncosupresores autónomos de las células (46,48–50). La inactivación de TP53 (51) así como la pérdida de p21^{CIP1} (52), y Bax (18), entre otros, hacen posible la tetraploidización (Figura 9).

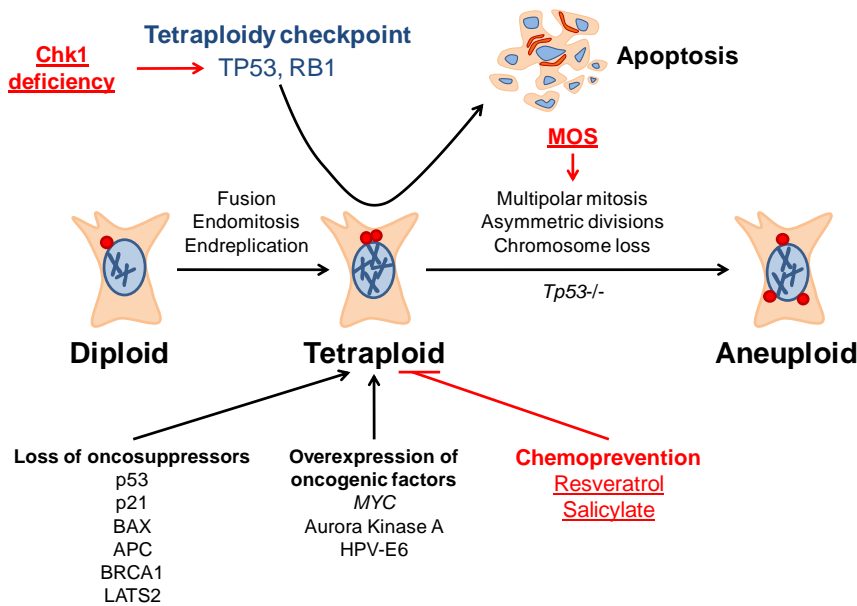


Figura 9. Progresión de la ploidía en la oncogénesis. Las células diploides sanas pueden convertirse en tetraploides como resultado de la endorreplicación, los errores mitóticos y la fusión célula-célula. La ausencia de TP53 no sólo es permisiva para la supervivencia, sino también para las divisiones asimétricas multipolares de las células tetraploides.

Se ha sugerido la existencia de un "punto de control de la tetraploidía" que impida la producción o propagación de células (53). El "estrés oncogénico" puede desencadenar una serie de programas intrínsecos de supresión de tumores, algunos de los cuales están relacionados con la respuesta al daño del ADN. Por ejemplo, el estrés oncogénico y el daño en el ADN pueden inducir la **senescencia celular** o la **apoptosis** (54,55), ambos mecanismos que impiden la proliferación de las células (pre)malignas y aumentan la susceptibilidad de las células cancerosas a la actividad citotóxica del sistema inmunitario innato y/o adaptativo (56,57)

Proliferación y senescencia en el cáncer

El rasgo principal de las células cancerosas es su proliferación crónica. Los tejidos sanos controlan la liberación de señales que permiten la progresión a través del ciclo celular asegurándose del mantenimiento de la arquitectura y funcionamiento correcto del tejido. Las células cancerosas desregulan estas señales de crecimiento. Las células cancerosas pueden producir ligandos del factor de crecimiento y expresar receptores afines (58,59); así mismo, pueden enviar señales para estimular a las células sanas del estroma del tumor para que estas suministren a las células cancerosas factores de crecimiento (60), y elevar la cantidad de receptores en superficie, aumentando así su respuesta a los factores de crecimiento. Por otro lado, puede existir una activación constitutiva de las vías de señalización de manera que esta activación sea independiente de los factores de crecimiento.

Los primeros estudios sobre los oncogenes determinaron que el aumento de la expresión de estos y de sus proteínas correspondiente aumentaban la proliferación de las células cancerosas y, por tanto, el crecimiento del tumor. Sin embargo, las últimas investigaciones han concluido que esto no es siempre así, ya que un aumento de las oncoproteínas RAS, MYC y RAF puede inducir a la apoptosis o a la senescencia celular (54,61,62). Las células con características senescentes (citoplasma agrandado, expresión de β -galactosidasa, ausencia de proliferación) son abundantes en tejidos que

sobreexpresan oncogenes (61,62). Esta respuesta es el reflejo de los mecanismos de defensa celular para eliminar las células cancerosas con niveles excesivos de señalización oncogénica. Alternativamente, ciertas células cancerosas son capaces de adaptarse a estos altos niveles de señalización oncogénica y desactivar la inducción a la apoptosis o senescencia (43).

Resistencia a la apoptosis en el cáncer

En las dos últimas décadas se ha establecido que la muerte celular programada por apoptosis sirve como una barrera natural para el desarrollo del cáncer (54,63,64). La apoptosis en las células cancerosas se desencadena en respuesta a diferentes tensiones fisiológicas dadas durante la tumorigénesis o como debido a la terapia anticancerígena. Actualmente, la vía intrínseca de la apoptosis es la más ampliamente implicada como una barrera para la patogénesis del cáncer. En las células cancerosas el daño al ADN asociado a la hiperproliferación y los desequilibrios de señalización provocados por niveles elevados de señalización oncogénica son eventos estresantes que inducen apoptosis. Sin embargo, otras investigaciones han revelado que, en aquellos tumores que progresan a estados de alto nivel de malignidad y que resisten a la terapia, la apoptosis está atenuada (54,63). Las células tumorales desarrollan una serie de estrategias para limitar o eludir la apoptosis. La estrategia más común que desarrollan las células tumorales para limitar la apoptosis es la pérdida de TP53. También, las células cancerosas pueden ver aumentada la expresión de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL), disminuir la expresión de factores proapoptóticos (Bim, Puma, Bax) o evitar la vía extrínseca de la apoptosis.

La deficiencia de Bax, así como una sobreexpresión de Bcl-2, favorecen la supervivencia de las células tetraploides, con una eficacia similar en ausencia de TP53 o p21^{CIP1}. Las células tetraploides muestran un incremento en los niveles de apoptosis espontánea, debido al punto de control de la tetraploidia mediado por TP53. La inhibición de TP53 disminuye la apoptosis espontánea de las células tetraploides. Además, las células tetraploides son más resistentes a los inductores del daño en el ADN que las células diploides. Esta resistencia desaparece, igualmente, cuando TP53 ha sido inhibido (65). Recientemente, nuestro laboratorio ha demostrado que las células tetraploides deficientes en Bax y Bak (células DKO) no son capaces de proliferar (66)

HIPÓTESIS

Bax y Bak son bien conocidos por su importante papel en la vía intrínseca de la apoptosis. Así, las células deficientes en Bax y Bak muestran resistencia a la apoptosis inducida por tratamientos anticancerígenos. Sin embargo, la apoptosis es también un mecanismo presente en el desarrollo embrionario. Los ratones knock-out de Bax y Bak se caracterizan por un exceso de células en el sistema inmune y en el sistema nervioso central. Además, se ha observado, en los pocos ratones que consiguen alcanzar la edad adulta, que no desarrollan cáncer. Por primera vez, se ha descrito recientemente, el hallazgo inesperado de que Bax y Bak son necesarias para la expansión de las células tetraploides generadas a causa de una mitosis fallida, lo que apoya la idea de que Bax y Bak no son sólo proteínas pro-apoptóticas, sino que paradójicamente pueden ser necesarias para la aparición de células tetraploides.

Se sabe que en las células DKO (Bax^{-/-}Bak^{-/-}) se inhibe la vía intrínseca de la apoptosis. Sin embargo, las células DKO no muestran resistencia cuando se usan inhibidores de microtúbulos que inducen tetraploidía. Además, Bax y Bak son necesarios para la expansión de las células tetraploides. De hecho, la presencia de Bax/Bak es necesaria para que las células tetraploides supriman la senescencia. Tras la exposición de las

células a un inhibidor de microtúbulos, las células deficientes en Bax/Bak suelen activar un programa de senescencia, en el que está implicado p21^{CIP1}. Esto explicaría por qué las células DKO no pueden reanudar la proliferación, mientras que las WT sí pueden hacerlo (66). Es tentador especular que la deficiencia de Bax/Bak no es un factor importante de la oncogénesis, porque compromete el potencial proliferativo de las células tetraploides eliminando así una de las principales vías de carcinogénesis, lo cual explicaría la rareza de la pérdida completa de Bax y Bak en las células cancerosas (66).

Sin embargo, la relevancia funcional de la proteína proapoptótica Bok en la proliferación de las células tetraploides es, hasta ahora, totalmente desconocida. El conocimiento adquirido en los últimos cinco años sobre Bok parece indicar que tiene una actividad similar a los otros dos componentes del grupo, Bax y Bak. Nuestro interés es estudiar la relevancia de Bok en la aparición y progresión de las células tetraploides precursoras del cáncer, ya que no hay ningún estudio publicado con respecto a ello.

OBJETIVOS

1. Estudiar la resistencia a la apoptosis inducida por agentes tetraploidizantes en células deficientes en Bax, Bak y Bok, simultáneamente.
2. Evaluar los niveles de senescencia inducidos por agentes tetraploidizantes en células deficientes en Bax, Bak y Bok, simultáneamente.
3. Analizar la capacidad proliferativa de las células Bax^{-/-}Bak^{-/-}Bok^{-/-} tetraploides.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIALES

El material de plástico utilizado para los cultivos ha sido adquirido en Corning (Nueva York, Estados Unidos). Salvo que se indique lo contrario, los medios de cultivo y los suplementos se compraron a Gibco-ThermoFisher Scientific (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) y los agentes químicos a Sigma Aldrich (San Luis, Misuri, Estados Unidos).

ANTICUERPOS

El anticuerpo (Ac) monoclonal de conejo contra Bax (#2772) y el Ac policlonal de conejo contra Bak (#3814) y el Ac monoclonal de conejo P-histona H2A.X (Ser139) (γH2AX) (#9718) proceden de Cell Signaling Technology (Danver, Massachusetts, Estados Unidos); el Ac monoclonal de conejo contra Bok (ab 233072), el Ac monoclonal de conejo contra p21^{CIP1} (ab109199) y el Ac contra β-actina acoplado a la peroxidasa de rábano (HRP) (ab49900) proceden de Abcam (Cambridge, Reino Unido). Todos ellos se utilizaron a una dilución 1:1000.

LÍNEAS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVOS

Las líneas celulares utilizadas son fibroblastos inmortalizados (MEFs) procedentes de cultivos primarios de ratones wild type (WT), ratones doble knock out (DKO) para las proteínas Bax y Bak (Bax^{-/-}Bak^{-/-}) o triple knock out (TKO) para las proteínas Bax, Bak y Bok (Bax^{-/-}Bak^{-/-}Bok^{-/-}). Estas líneas celulares nos fueron proporcionadas por el Prof. Andreas Strasser del Walter and Eliza Hall Institute, Melbourne, Australia (67). Todas las líneas celulares se cultivaron en Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con contenido bajo de glucosa (1000 mg/L) y piruvato sódico (1mM), y suplementado con suero fetal bovino (SFB, 10%), 2-mercaptoetanol (50 mM), L-asparagina (100 mM)

(Sigma Aldrich), y penicilina sódica/sulfato de estreptomicina (100 U/mL / 100 µg/mL, respectivamente). Las células se mantuvieron a 37°C en una atmosfera con 5% de CO₂.

CITOMETRÍA DE FLUJO

Ensayo de muerte celular

Las células se sembraron en placas de 12 pocillos (3x10⁴ células/mL, 1 mL/pocillo). A las 24 h, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones del agente quimioterapéutico derivado del platino oxaliplatino (10, 25, 50 y 100 nM) o del inhibidor de microtúbulos nocodazol (25, 50, 100 y 200 nM). Tras 48 h de tratamiento, el sobrenadante se recuperó en tubos para citómetro de flujo y se añadió tripsina (TrypLE™ Express) (500 µL/pocillo) por 2 min a 37°C y 5% de CO₂ para despegar las células restantes. La tripsina que contenía las células despegadas se incorporó al tubo correspondiente. Las células se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min e incubaron en medio de cultivo (300 µL/tubo) que contenía yoduro de 3,3'-Dihexiloxacarbocyanina (DiOC₆(3)) (40 nM) para cuantificar el potencial mitocondrial transmembrana ($\Delta\Psi_m$), yoduro de propidio (PI) (1 µg/mL) para observar la fragmentación de la membrana plasmática y Hoechst 33342 (10µM) para medir el contenido en ADN nuclear (las tres sondas fueron adquiridas en Life Technologies (Carlsbad, California, Estados Unidos)) durante 45 minutos a 37°C en 5% de CO₂. Una vez transcurrido el tiempo, se analizó el porcentaje de células apoptóticas utilizando el citómetro analizador Gallios (Beckman Coulter. Brea, California, Estados Unidos).

Ensayo de senescencia

Las células se sembraron en placas de 12 pocillos (3x10⁴ células/mL, 1 mL/pocillo). Tras 24 h, las células fueron tratadas con nocodazol (100nM). Después de 48 h, se quitó el tratamiento y las células fueron cultivadas por cuatro días más en medio de cultivo sin tratamiento. A los 7 días de haber sembrado las células, el sobrenadante se recuperó en tubos para citómetro de flujo y se añadió tripsina (TrypLE™ Express) (500 µL/pocillo) por 2 min a 37°C y 5% de CO₂ para despegar las células restantes. La tripsina que contenía las células despegadas se incorporó al tubo correspondiente. Las células se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min e incubaron en medio de cultivo (300 µL/tubo) que contenía un sustrato de la enzima β-galactosidasa (marcador de senescencia) 5-dodecanoilaminofluoresceína Di-β-galactopiranososa (C12FDG) (33 µM), yoduro de propidio (PI) (1 µg/mL) y Hoechst 33342 (10µM) durante 45 minutos a 37°C en 5% de CO₂. Una vez transcurrido el tiempo, se analizó el porcentaje de células apoptóticas utilizando el citómetro analizador Gallios (Beckman Coulter. Brea, California, Estados Unidos).

Los datos obtenidos del citómetro de flujo se analizaron con el software FlowJo (Ashland, Oregon, Estados Unidos), caracterizando los eventos con valores normales de la dispersión frontal (FSC) y la dispersión lateral (SSC).

ENSAYO DE CAPACIDAD CLONOGÉNICA

La capacidad clonogénica es la capacidad que tienen las células en formar colonias a partir de 1 – 100 células iniciales. Las células a las que se les indujo la tetraploidía fueron sembradas ($1,5 \times 10^6$) en botellas de plástico de 175 cm². Después de 48 h sometidas al tratamiento con nocodazol (100 nM), se retiró el medio con tratamiento y se mantuvieron en medio de cultivo durante 4 días más. Las células control fueron sembradas ($0,5 \times 10^6$) en botellas de plástico de 75 cm². A los 7 (células tratadas) o 3 (células control) días de haber sembradas, las células (1×10^6 /mL) se incubaron con Hoechst 10 µM durante 45 minutos a 37°C en 5% de CO₂. A continuación, las células fueron separadas según su contenido en ADN (2n o >4n) en el citómetro de flujo separador celular FACS ARIA (BD Biosciences, Franklin Lakes, Nueva Jersey, Estados Unidos). Los perfiles del contenido de ADN se definieron usando las células control. Las células 2n fueron separadas a partir de las células control, mientras que las células con un contenido >4n fueron separadas a partir de las células tratadas con nocodazol, a razón de 100 células/pocillo en placas de 96 pocillos. Las células se mantuvieron a 37°C y 5% de CO₂ durante 14 días. Transcurrido este tiempo, se cuantificaron el número de pocillos en los que se apreciaban colonias (*Figura 10*).

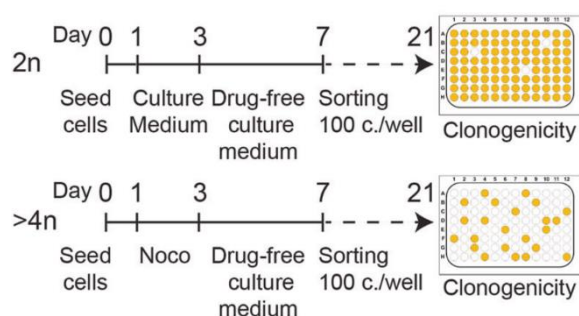


Figura 10. Esquema del ensayo de capacidad clonogénica. Adaptado de J.Deng, Cell death and disease, 2021 (66)

WESTERN BLOT

Las células a las que se les indujo la tetraploidía fueron sembradas ($1,5 \times 10^6$) en botellas de plástico de 175 cm². Después de 48 h sometidas al tratamiento con nocodazol (100 nM), se retiró el medio con tratamiento y se mantuvieron en medio de cultivo durante 4 días más. Las células control fueron sembradas (5×10^5) en botellas de plástico de 75 cm². Una vez descartado el sobrenadante, las células pegadas fueron recuperadas mediante tripsina. Tras un lavado con tampón fosfato salino (PBS), se lisaron sus pellets y se cuantificaron las proteínas siguiendo el procedimiento estándar del ensayo colorimétrico del ácido bicinconínico (BCA). Se ajustó la concentración de proteínas de todas las muestras a 0,75 – 1,5 µg/µL. Utilizando geles preencastados de poliacrilamida Bis-Tris 4-12% (ThermoFisher Scientific), cargamos 20 µl de proteínas de cada muestra. Los geles son transferidos mediante pilas de transferencia a membranas de nitrocelulosa (sistema seco de transferencia iBlot™2, ThermoFisher Scientific). A continuación, las membranas se incubaron durante 1 hora en solución salina tamponada con Tris (TBS)-Tween 20 (0,05%) y complementada con un 5% de leche en polvo desgrasada para bloquear los sitios de unión no específicos de las proteínas. Los Ac primarios se incubaron durante la noche a 4°C en TBS o TBS-BSA (5%). Al día siguiente, se retiró el Ac primario y se incubó con el Ac secundarios correspondiente en TBS durante 1 h a temperatura ambiente. La expresión de las proteínas de interés se reveló utilizando el sistema de imagen VersaDoc (Bio-Rad, Hercules, California, Estados Unidos). Como control de carga se utilizó la proteína β-actina-HRP.

ENSAYO DE SENESCENCIA β -GALACTOSIDASA

Las células se sembraron en placas de 12 pocillos (2×10^4). Al día siguiente, las células fueron sometidas a tratamiento con nocodazol a concentración 100nM. Después de 48 h de tratamiento las células fueron sometidas a un ensayo para detectar la actividad β -galactosidasa siguiendo las recomendaciones del kit comercial (Sigma-Aldrich). En definitiva, se descarta el sobrenadante y las células que se encuentran pegadas son fijadas para marcarlas, a continuación, con una solución de X-Gal durante 24 h a 37°C sin CO₂. Para poder mantener el marcaje estable, las células se dejaron en glicerol (70%). Las imágenes fueron adquiridas con el lector de imágenes Cytation 5 (Biotek. Winooski, Vermont, Estados Unidos). Las imágenes fueron analizadas con el software ImageJ (National Institutes of Health).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para realizar el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, California, Estados Unidos). Utilizamos el análisis de varianza ANOVA y T-Student.

RESULTADOS

La ausencia de proteínas proapoptóticas multidominio causa resistencia a la apoptosis inducida por oxaliplatino

Comparadas con las células MEF WT, las células deficientes para Bax^{-/-}Bak^{-/-} (DKO) y Bax^{-/-}Bak^{-/-}Bok^{-/-} (TKO) muestran una gran resistencia a quimioterapéuticos clásicos inductores del daño en el ADN derivados del platino como el Oxaliplatino (OXAL). Así lo demuestran los resultados obtenidos por citometría de flujo en el que las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de OXAL (10, 25, 50 y 100 nM) durante 48 h y marcadas con la sonda de potencial mitocondrial transmembrana (yoduro de 3,3'-Dihexiloxacarbocyanina (DiOC₆(3)) ($\Delta\Psi_m$) y yoduro de propidio (PI) para determinar la fragmentación de la membrana plasmática. Las células que están muriendo presentan una bajada en el $\Delta\Psi_m$ aunque aún no presentan fragmentación de la membrana plasmática (células DiOC₆(3)^{bajo}PI^{bajo}), mientras que las células que ya están muertas muestran fragmentación de la membrana plasmática (PI^{alto}) (Figura 11A). Observamos que las células WT muestran un aumento significativo de la mortalidad cuando son expuestas a concentraciones altas de OXAL, con una mortalidad cercana al 100% de células tratadas con OXAL 100 nM, mientras que las células DKO (Bax^{-/-}Bak^{-/-}) y TKO (Bax^{-/-}Bak^{-/-}Bok^{-/-}) muestran una gran resistencia ($\leq 5\%$ de células muertas OXAL 100 nM) (Figura 11B).

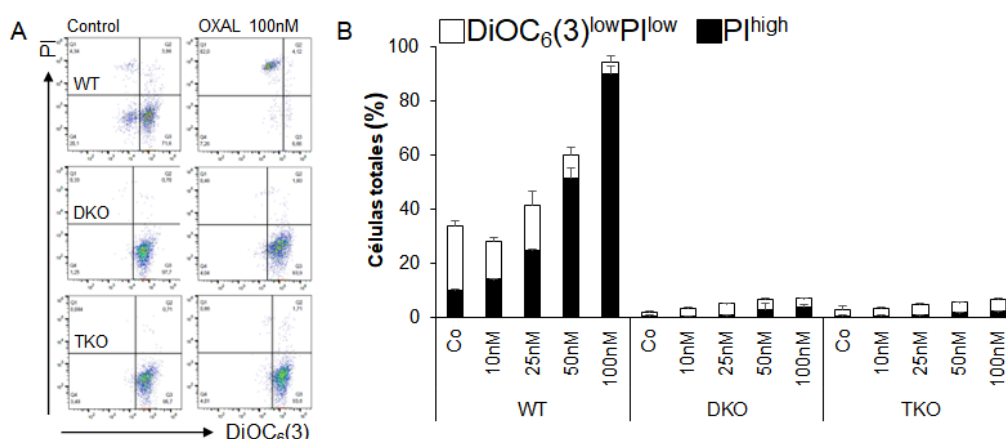


Figura 11. Los fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) Bax/Bak DKO y Bax/Bak/Bok TKO no son susceptibles de ser eliminados por inductores del daño en el ADN como el Oxaliplatino. Las células WT, DKO y TKO se cultivaron durante 48 horas en ausencia (control, Co), 10, 25, 50 y 100 μ M de oxaliplatino (OXAL). A continuación, las células se tiñeron con el colorante vital yoduro de propidio (PI) y el colorante sensible al potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) DiOC₆(3) para medir la muerte celular apoptótica. Se ilustran los gráficos de puntos representativos de las MEF WT y DKO en ausencia de cualquier tratamiento (Co) o tras la incubación con 100 nM de OXAL (A). Los números indican el porcentaje de células en cada cuadrante. En B, las columnas negras representan el porcentaje de células muertas (PI alto) y las columnas blancas representan el porcentaje de células moribundas (DiOC₆(3)^{low}PI^{low}). Las barras de error indican la desviación estándar. N=2

La inducción de la tetraploidía se correlaciona con un incremento en la mortalidad en células WT, DKO y TKO

Comparadas con las células WT, las células deficientes en Bax^{-/-}Bak^{-/-} (DKO) y Bax^{-/-}Bak^{-/-}Bok^{-/-} (TKO) presentan mayor nivel de resistencia a la apoptosis inducida por el agente inhibidor de microtúbulos Nocodazol (Noco), pero menos importante que al OXAL. Esta sustancia induce la tetraploidía ya que afecta a la polimerización de microtúbulos y, por lo tanto, a la formación del huso mitótico y la citocinesis. Los datos

se obtuvieron por citometría de flujo. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de Noco (25, 50, 100 y 200 nM) durante 48 h y marcadas con DiOC₆(3), PI, y el marcador de ADN Hoechst 33342. Las células WT, DKO y TKO respondieron de manera similar a la acumulación de células tetraploides tras la exposición transitoria a Noco (*Figura 12*).

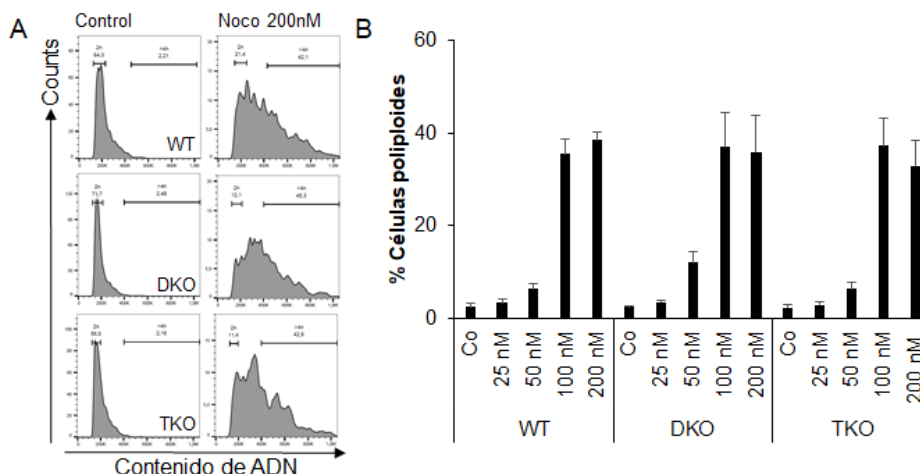


Figura 12. Inducción de la tetraploidía en MEFs WT, DKO y TKO con un agente inhibidor de microtúbulos (Nocodazol). Las células WT, DKO y TKO se cultivaron durante 48 horas en ausencia (control, Co), 25, 50, 100 y 200 nM de nodazol (Noco). A continuación, las células se tiñeron con el colorante vital yoduro de propidio (PI), el colorante sensible al potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) DiOC₆(3) para medir la muerte celular apoptótica y el marcador de ADN Hoechst 33342. Se ilustra el gráfico representativo con el contenido de ADN de las MEF WT, DKO y TKO en ausencia de cualquier tratamiento (Co) o tras la incubación con 200 nM de Noco (A). Los números indican el porcentaje de células en cada cuadrante. En B, las columnas negras representan el porcentaje de células poliploides. Las barras de error indican el error estándar. N=5

A concentraciones iguales o superiores a 100 nM de Noco, las cuales presentan un incremento en el porcentaje de células tetraploides, tanto las células WT como las DKO y TKO presentan un incremento significativo de la mortalidad, siendo más importante en las células WT. Las células WT presentan un 70% y un 80% de mortalidad celular cuando son tratadas con 100 nM y 200 nM de Noco; mientras que solo llega a haber hasta un 30% de mortalidad en las células DKO y TKO (*Figura 13*).

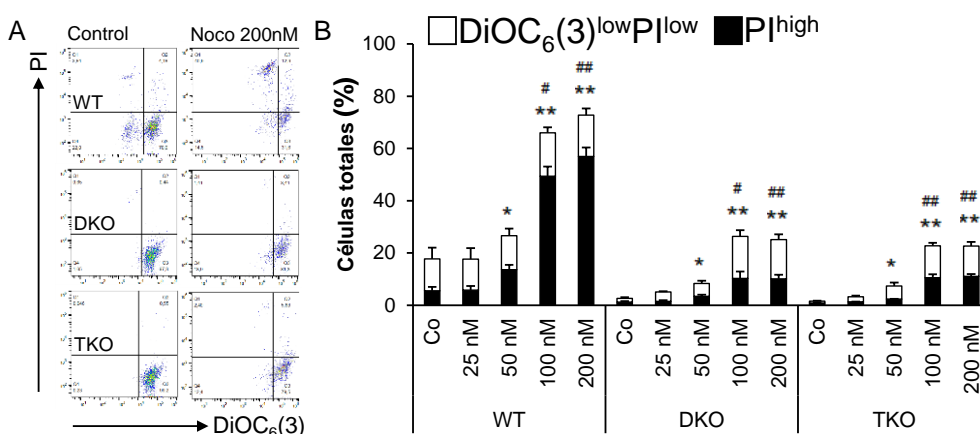


Figura 13. La inducción de la tetraploidía en MEFs WT, DKO y TKO con un agente inhibidor de microtúbulos (Nocodazol) se correlaciona con un incremento en la mortalidad. Los fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) WT, Bax/Bak DKO, Bax/Bak/Bok TKO son susceptibles de ser eliminados por inducción de la tetraploidía con el agente nocodazol. Las células WT, DKO y TKO se cultivaron durante 48 horas en ausencia (control, Co), 25, 50, 100 y 200 nM de nodazol (Noco). A continuación, las células se tiñeron con

el colorante vital yoduro de propidio (PI), el colorante sensible al potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) DiOC6(3) para medir la muerte celular apoptótica y el marcador de ADN Hoechst 33342. Se ilustran los gráficos de puntos representativos de las MEF WT, DKO y TKO en ausencia de cualquier tratamiento (Co) o tras la incubación con 200 nM de Noco (A). Los números indican el porcentaje de células en cada cuadrante. En B, las columnas negras representan el porcentaje de células muertas (PI alto) y las columnas blancas representan el porcentaje de células moribundas (DiOC6(3) lowPI). Las barras de error indican el error estándar. Las columnas totales (DiOC6(3)lowPIlow + PIhigh) se compararon mediante el software GraphPad Prisma 8 utilizando el test estadístico ANOVA. #p < 0,05, ##p < 0,01 tratamiento vs. control. *p < 0,05, **p < 0,01 efecto del tratamiento, DKO y TKO frente a WT. N=5

La ausencia de Bok reestablece la capacidad clonogénica de las células DKO

Teniendo en cuenta los resultados de mortalidad, y dado que está ampliamente asumido que las tres proteínas poseen funciones similares y/o compensatorias, nos planteamos si la ausencia de BOK, añadida a la ausencia de BAX y BAK, provocaba un efecto sinérgico en la capacidad clonogénica de las células tetraploides. Las células son tratadas durante 48 h con Noco 100nM y, posteriormente, mantenidas en medio de cultivo sin tratamiento por 4 días más. A los 7 días, las células diploides y las células con un contenido en ADN >4n (Figura 10) fueron separadas y sembradas para estudiar su capacidad clonogénica. Una vez transcurridos 15 días desde que se sembraron, se cuantificaron el número de pocillos con proliferación celular. Observamos que, tal y como esperábamos, las células >4n pierden su capacidad proliferativa con respecto a las células diploides, pero en distinta medida según el genotipo. Sorprendentemente, mientras que las células tetraploides DKO mostraban una capacidad proliferativa del 20%, las células WT y las células TKO superaban el 40% (Figura 14).

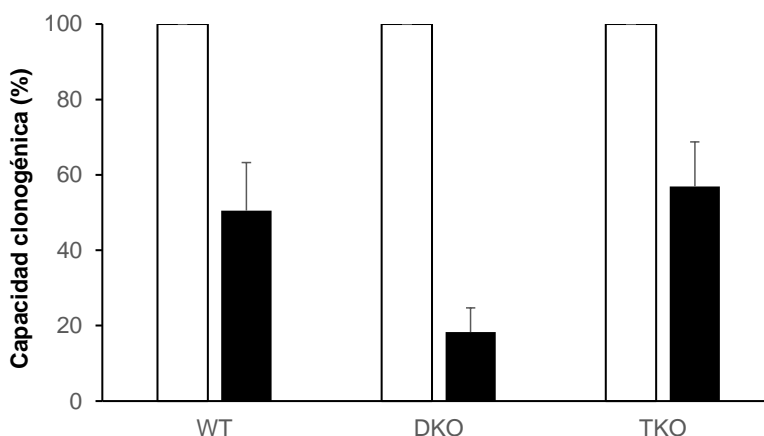


Figura 14. La eliminación de Bax y Bak compromete el potencial clonogénico de las células tetraploides, mientras que la eliminación combinada de Bax, Bak y Bok restablece este potencial clonogénico. Las células MEF fueron cultivadas 48 h en medio libre de fármacos o tratados con 100 nM de Nocodazol (Noco) lavadas y mantenidas en un medio libre de fármacos durante 4 días más, y finalmente clasificadas el día 7 (100 células por pocillo). Las células diploides (2n) se derivaron de células cultivadas en un medio libre de fármacos mientras que las células poliploides (>4n) se derivaron de células tratadas con Noco. El ciclo celular y las puertas de contenido de ADN se establecieron mediante la tinción de las células con 10 μ M de Hoechst 33342 durante 1 h (B). La clonogenicidad de las células MEF deficientes para dos o tres proteínas proapoptóticas se cuantificó en el día 21 como porcentaje de pozos en los que había proliferación celular. Las columnas blancas representan la clonogenicidad de 2n células y las columnas negras representan clonogenicidad de las células >4n. Las barras de error indican el error estándar. Los datos fueron comparados por el software GraphPad Prisma 8 utilizando el test estadístico ANOVA. Las muestras >4n se compararon con las muestras 2n para cada línea celular (##p < 0,01, ###p < 0,001 vs. 2n). La clonogenicidad de las células >4n se comparó entre las células DKO ("D") y WT ("W") (E, F) (*p < 0,05, **p < 0,01). N=6

La ausencia de BOK restaura los niveles de senescencia de las células DKO tras la tetraploidización

Para intentar comprender la razón por la cual la ausencia de BOK restaura la capacidad clonogénica de las células tetraploides DKO, quisimos analizar los niveles de senescencia de los distintos genotipos celulares tras la tetraploidización. Para ello, utilizamos diversas técnicas.

En primer lugar, llevamos a cabo una tinción clásica β -Galactosidasa (X-Gal). Las células fueron sembradas y tratadas con Noco 100 nM por 48 h. A continuación, las células fueron fijadas y marcadas con X-Gal. Las imágenes fueron adquiridas mediante un lector de placas. Observando las imágenes, diferenciamos entre células con alta y baja intensidad de marcaje X-Gal, así como células negativas (*Figura 15*).

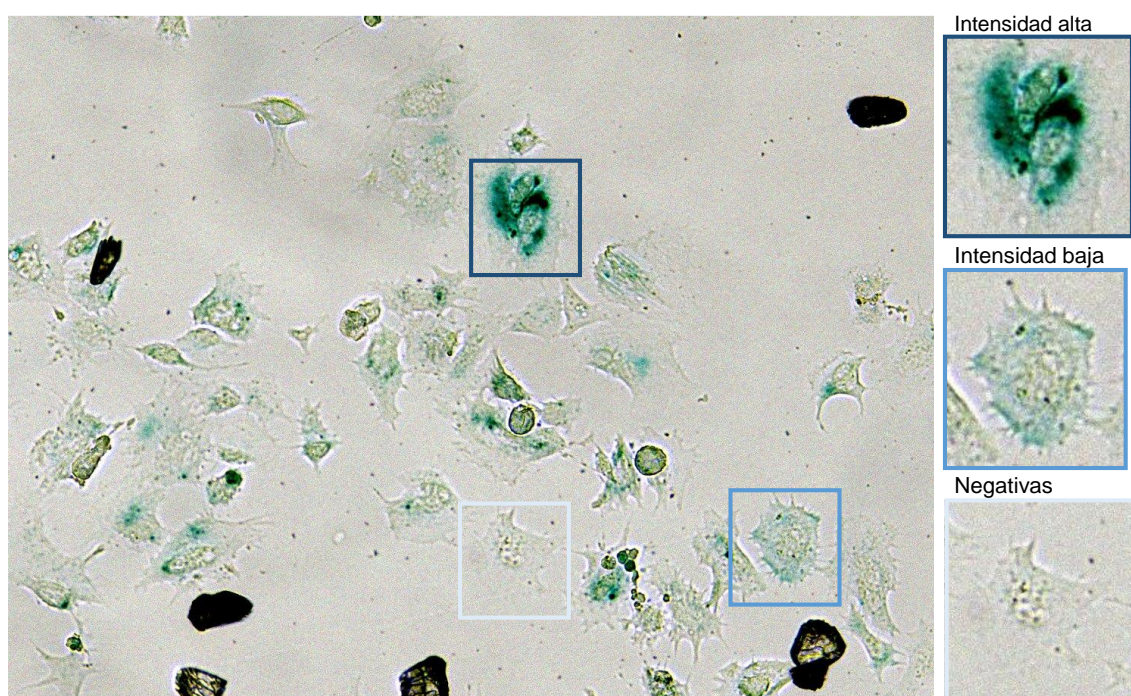


Figura 15. Criterio de clasificación según la intensidad de marcaje X-Gal de las células MEF. Imagen representativa correspondiente a células DKO tratadas con Noco 100 nM. Imagen tomada con el lector de imágenes Cytation 5.

Teniendo en cuenta este criterio, se cuantificaron 3 imágenes de cada condición y 100 células/campo. Con un N=2 observamos que a las 48 horas las células que han sido tratadas con Noco 100 nM tienen mayor nivel de senescencia que las células sin tratar (Co). Las células con genotipo TKO es donde se detecta mayor nivel de senescencia, de hecho, en las células TKO tratadas es donde se consigue llegar a tener más del 50% de células en senescencia, aunque se detecte a baja intensidad (*Figura 16*). El hecho de que la señal de senescencia sea baja puede deberse a que solo hayan estado 48 horas en tratamiento.

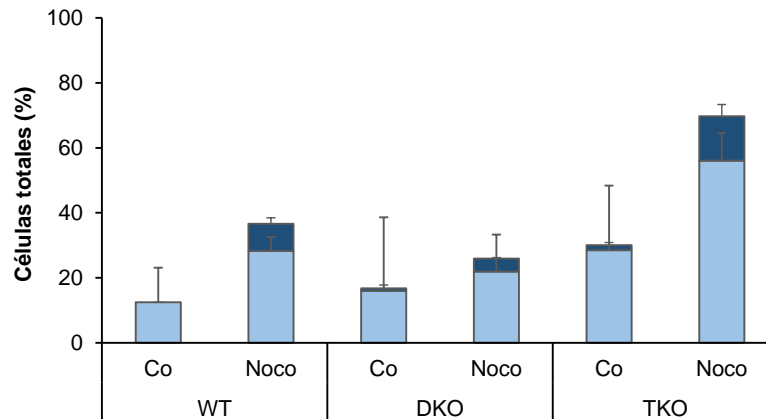


Figura 16. La inducción de la tetraploidía en las células MEF con el agente inhibidor de microtúbulos Noco provoca la entrada en senescencia. Se sembraron células MEF, se trataron o no con 100 nM de Nocodazol (Noco) durante 48 h. A continuación, las células fueron fijadas y se tiñeron con X-Gal. Se tomaron imágenes con el lector de imágenes Cytation y se cuantificó el número de células teñidas con baja intensidad (columnas de color azul claro) y con alta intensidad (columnas de color azul oscuro). Las barras de error indican la desviación estándar. N=2

Por otro lado, las células fueron sembradas, tratadas con Noco 100 nM por 48 h y mantenidas en cultivo por 4 días más en medio sin tratamiento. Transcurrido este tiempo, realizamos un triple marcaje para PI, Hoechst 33342 y C12FDG, que es sustrato de la β -Galactosidasa y, por lo tanto, un marcador de senescencia. Los resultados fueron analizados mediante citometría de flujo. Los datos preliminares muestran una diferencia significativa en el incremento del porcentaje de células DKO senescentes ($C12FDG^{alto}PI^{bajo}$) comparadas con las células WT y TKO. El 15% de las células DKO tratadas con Noco son senescentes mientras que en las WT y TKO no llega al 5% (Figura 17).

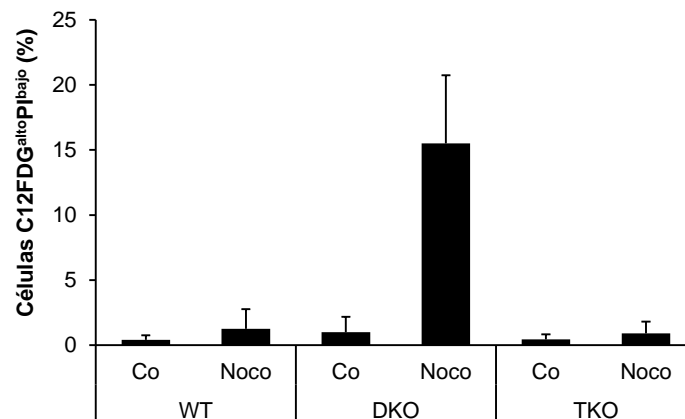


Figura 17. Las células Bax/Bak DKO sufren senescencia tras la inducción de la tetraploidía, esta senescencia es revertida con la pérdida combinada de Bok (células TKO). Se sembraron fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), se trataron o no con 100 nM de Nocodazol (Noco) durante 48 h, después fueron lavadas y mantenidas en un medio libre de fármacos durante 4 días. A continuación, las células se tiñeron con el colorante vital yoduro de propidio (PI), el sustrato de β -galactosidasa C12FDG, y la tinción fluorescente del ADN, Hoechst 33342. El nivel de C12FDG fue analizado en la población total. Las barras de error indican el error estándar. N=2

Para confirmar el resultado anterior utilizamos la técnica de Western Blot para analizar el nivel de expresión de la proteína $p21^{CIP1}$, que es un marcador de senescencia. Tras seguir el mismo protocolo de tetraploidización, las células fueron recuperadas mediante tripsina, se lisaron sus pellets y se cargaron las proteínas de cada muestra en geles

preencastados de poliacrilamida. Los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa y sobre estas membranas se incubó el anticuerpo correspondiente a p21^{CIP1}. Utilizamos la proteína β -actina-HRP como control de carga y para la normalización de los datos. Tal y como esperábamos, los mayores niveles de expresión de la proteína p21^{CIP1} se encuentran en la línea celular DKO (*Figura 18*), mientras que la pérdida de la proteína Bok (células TKO) revierte los niveles de senescencia, coincidiendo con los resultados del ensayo del experimento de C12FDG (*Figura 17*).

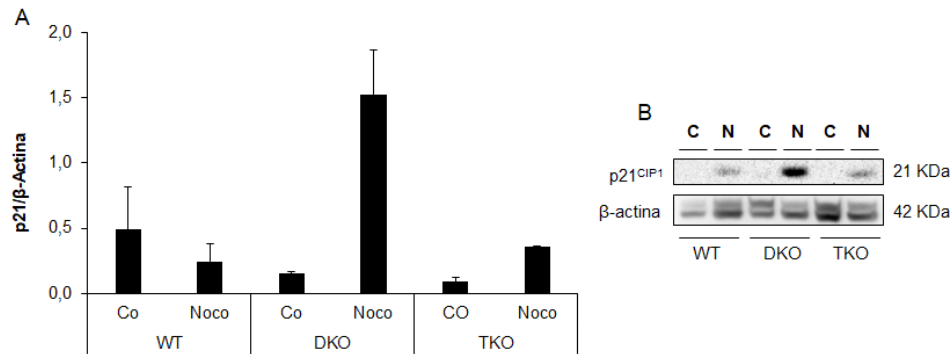


Figura 18. Determinación de la expresión de p21^{CIP1} por la técnica de Western Blot. Las células Bax/Bak DKO expresan p21^{CIP1} (marcador de senescencia) tras la inducción de la tetraploidía, la expresión de esta proteína es revertida con la pérdida combinada de Bok (células TKO). Se sembraron fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), se trataron o no con 100 nM de Nocodazol (Noco) durante 48 h, después fueron lavadas y mantenidas en un medio libre de fármacos durante 4 días. Se recogieron sus pellets, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con los anticuerpos correspondientes. N=2

DISCUSIÓN

Las proteínas proapoptóticas multidominio de la familia Bcl2 (Bax, Bak y Bok) son conocidas, principalmente por su implicación en la apoptosis. Sin embargo, estas proteínas regulan otras funciones celulares como los flujos de Ca^{2+} , principalmente los que implican al Ca^{2+} del RE; en la progresión del ciclo celular; y en el proceso de autofagia. Desde hace dos décadas, se sabe que la pérdida combinada de las proteínas Bax y Bak (células DKO) y de Bax, Bak y Bok (células TKO) hace que se inhiba la vía intrínseca de la apoptosis (68,69); o, lo que es igual, se vuelven resistentes a las señales apoptóticas. Recientemente, nuestro laboratorio ha demostrado que las células DKO muestran resistencia a quimioterapéuticos basados en el platino, pero esta resistencia desaparece cuando las células son tratadas con inhibidores de microtúbulos que inducen tetraploidía. Además, las células DKO tetraploides generadas a partir del uso con los agentes tetraploidizantes, no eran capaces de proliferar. Aunque, no se describió el mecanismo completo, sí que se demostró la implicación de los flujos de Ca^{2+} (liberación de Ca^{2+} de los depósitos y entrada capacitativa) y la entrada en senescencia (66). En este trabajo valoramos el efecto de la ausencia adicional de Bok (células TKO) en este proceso.

Los resultados de los ensayos de mortalidad obtenidos en este trabajo muestran que las células WT son sensibles a los tratamientos de oxaliplatino (quimioterapéutico basado en el platino) y de nocodazol (inhibidor de microtúbulos). Por su lado, las células DKO son completamente resistentes al oxaliplatino y, en menor medida, al nocodazol, ya que se observa un incremento significativo de la mortalidad a concentraciones elevadas de nocodazol. Las células TKO han mostrado resultados similares a las células DKO, por lo que parece que la ausencia de Bok no supone un efecto sinérgico en los ensayos de mortalidad. Estos datos eran predecibles teniendo en cuenta los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio. Sin embargo, las células DKO utilizadas en este trabajo parecen más resistentes que las células usadas en trabajos previos. Esto puede deberse a que poseen diferente origen. Las células usadas anteriormente habían sido manipuladas genéticamente a partir de células WT, mientras que las células utilizadas en este trabajo proceden de cultivos primarios de animales genéticamente modificados. Como se ha mencionado antes, las células tetraploides normalmente mueren por apoptosis a través del punto de control de la tetraploidía (65). Podría ocurrir que las células DKO y TKO fueran capaces de generar menor porcentaje de células tetraploides. Sin embargo, los datos muestran que el nocodazol induce tetraploidía en las tres líneas celulares (WT, DKO y TKO) en la misma medida. El punto de control de la tetraploidía está regulado principalmente por TP53 y pRb (53), sería necesario analizar los niveles de estas dos proteínas en nuestras células para poder explicar la sensibilidad parcial al tratamiento con nocodazol.

Como era de esperar, las células DKO tetraploides muestran una capacidad clonogénica reducida, confirmando los resultados publicados recientemente por nuestro grupo (66). Sin embargo, sorprendentemente, la ausencia adicional de Bok en las células TKO revierte este efecto aumentando la capacidad proliferativa de las células tetraploides a niveles similares a los de las células WT. Por lo tanto, la capacidad clonogénica de las células tetraploides DKO ($\text{Bax}^{-/-}\text{Bak}^{-/-}\text{Bok}^{+/+}$) está reducida con respecto a las células WT ($\text{Bax}^{+/+}\text{Bak}^{+/+}\text{Bok}^{+/+}$) y a las células TKO ($\text{Bax}^{-/-}\text{Bak}^{-/-}\text{Bok}^{-/-}$), que muestran, paradójicamente, valores similares a las células WT. El trabajo realizado por *Castedo et al.* (18) describe que la ausencia de Bax favorece la generación de células tetraploides. Hecho que fue confirmado por *Deng et al.* posteriormente (66). En este último trabajo, también se muestra cómo la ausencia de Bak limita la proliferación de células tetraploides. Nuestros datos sugieren que Bok debe tener, por lo tanto, un efecto similar a Bax y su ausencia favorecer la proliferación de células tetraploides.

Para poder encontrar una explicación, hemos estudiado los niveles de senescencia de estas células tras la tetraploidización. Los datos previos a este trabajo han reportado que la presencia de Bax y Bak es necesaria para que las células tetraploides salgan de senescencia y vuelvan a entrar en el ciclo celular (66). Nuestros datos del ensayo de senescencia realizado durante la tetraploidización en agudo (tras 48 h de tratamiento con nocodazol) muestran el mismo nivel de senescencia en todas las líneas celulares. Sin embargo, cuando hemos realizado los ensayos de senescencia tras 48 horas con nocodazol y 4 días en medio sin tratamiento, hemos comprobado que las células DKO muestran unos niveles elevados de senescencia, mientras que las células WT no. Estos datos confirman los datos previos. Sin embargo, sorprendentemente, las células TKO revierten el efecto de senescencia encontrados en las células DKO a niveles de las células WT. Las diferencias encontradas entre los dos ensayos de senescencia podrían explicarse por el tiempo en el que están realizados cada uno de ellos. Los resultados realizados a 48 h corresponden a la tetraploidía en agudo. En este momento, es probable que esté activando el punto de control de la tetraploidía, y que todas las células hayan parado su ciclo celular, unas células podrían ser quiescentes y otras senescentes. Al dejar las células 4 días más en medio de cultivo sin tratamiento, las células que están destinadas a morir, habrán muerto; otras habrán sido capaces de reentrar en el ciclo celular y de volver a proliferar, por lo tanto, eran quiescentes; y otras no serán capaces de volver a entrar en el ciclo celular y se volverán senescentes. Por lo tanto, a 48 h todas las células serían quiescentes; mientras que a 48 h + 4 días, las células WT y TKO vuelven a entrar en el ciclo celular y las DKO entran en senescencia. Se observa que no existe diferencia entre el fenotipo WT y el TKO por lo que se concluye que la pérdida de la proteína Bok hace que se revierta el fenotipo DKO a WT con respecto a la senescencia. Actualmente no contamos con datos que nos permitan explicar cómo las células WT y las células deficientes para las proteínas proapoptóticas multidominio (TKO) poseen fenotipos similares en cuanto a la persistencia de las células tetraploides y la senescencia inducida por los agentes tetraploidizantes. Para ello, se deberá seguir investigando en esta línea, prestando atención a dos puntos principalmente: 1) Por un lado los cambios de expresión en otras proteínas de la familia Bcl2, que se vean afectados por la ausencia de Bax, Bak y Bok. En datos previos (66), las células DKO expresaron niveles casi normales (con variaciones de hasta el 40%) de otros genes de la familia Bcl2. 2) Por otro lado, sería interesante estudiar diferentes vías de estrés. De los datos previos (66), sabemos que la tetraploidía induce estrés oxidativo y estrés del retículo endoplásmico indistintamente en las células WT y las células DKO, por lo que estas vías estarían descartadas. Se podría estudiar el daño al ADN ya que se sabe que las lesiones asociadas al estrés de la replicación del ADN son capaces de “esquivar” los puntos de control del ciclo celular y las células en fase M dañadas siguen progresando en los pasos mitóticos. Por ello, estas células dan lugar a una mala segregación cromosómica, a fallos en la citoquinesis y a la consiguiente tetraploidía (70).

La relevancia de este proyecto está relacionada con la tetraploidía. Al menos 40% de los cánceres sólidos son el resultado de una tetraploidización transitoria seguida de la pérdida de un exceso de cromosomas para restablecer un cariotipo casi diploide (aneuploide) (46). Además, los pacientes que sufren tumores con subclones poliploides tienen peor pronóstico (71,72). Dado que la ausencia de Bax y Bak limita la proliferación de células tetraploides, es muy probable que la deficiencia de Bax/Bak no sea un factor importante de la oncogénesis. Sin embargo, la deficiencia de Bax, Bak y Bok sí podría facilitar la proliferación de las células tetraploides cancerosas, aunque parece poco probable. Si tenemos en cuenta los datos previos, junto con estos datos, parece que Bak posee un papel crucial en la aparición de las células tetraploides y que Bax y Bok poseen un papel secundario. Por esto, creemos que debemos centrar nuestro estudio en Bak.

CONCLUSIONES

En resumen, la ausencia de proteínas proapoptóticas multidominio tiene diferente relevancia en función de la combinación que haya.

- 1.- Tanto la doble ausencia de Bax y Bak (DKO), como la triple ausencia de Bax, Bak y Bok (TKO) causa resistencia a la apoptosis inducida por el quimioterapéutico oxaliplatino, inductor de daño en el ADN.
- 2.- La inducción de la tetraploidía con el inhibidor de microtúbulos nocodazol se correlaciona con un incremento en la mortalidad en las tres líneas celulares WT, DKO y TKO.
- 3.- La ausencia simultánea de Bax y Bak provoca una disminución de la capacidad clonogénica, confirmando datos previos.
- 4.- Sorprendentemente, la ausencia añadida de Bok (células TKO) revierte este efecto y la capacidad clonogénica alcanza valores similares a las células WT.
- 5.- Comprobamos que los niveles de senescencia aumentan en las células DKO tras la tetraploidización.
- 6.- La ausencia añadida de Bok (TKO) restaura los niveles de senescencia de las células DKO a los niveles de las células WT.
- 7.- La disminución de la capacidad clonogénica de las células DKO tetraploides parece estar relacionada por la entrada en senescencia tras la tetraploidización.
- 8.- Dado que, en datos previos, la ausencia de Bax favorece la proliferación de células tetraploides, mientras que la ausencia de Bak limita la proliferación de estas células, es posible que la ausencia de Bok tenga un efecto similar a Bax y que la ausencia de ambas Bax y Bok tenga un efecto más importante que el efecto de Bak.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hunt T, Nasmyth K, Novák B. The cell cycle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 27 de diciembre de 2011;366(1584):3494-7.
2. Schafer KA. The cell cycle: a review. *Vet Pathol*. noviembre de 1998;35(6):461-78.
3. Norbury C, Nurse P. Animal cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem*. 1992;61:441-70.
4. Heuvel S van den. Cell-cycle regulation [Internet]. WormBook: The Online Review of *C. elegans* Biology [Internet]. WormBook; 2005 [citado 3 de agosto de 2022].
5. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, et al. *Molecular Biology of the Cell*. New York, NY; 2014.
6. Barnum KJ, O'Connell MJ. Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2014;1170:29-40.
7. Matthews HK, Bertoli C, de Bruin RAM. Cell cycle control in cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. enero de 2022;23(1):74-88.
8. KARP G. BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR. CONCEPTOS Y EXPERIMENTOS. 2007;
9. Amani J, Gorjizadeh N, Younesi S, Najafi M, Ashrafi AM, Irian S, et al. Cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKIs) and the DNA damage response: The link between signaling pathways and cancer. *DNA Repair*. junio de 2021;102:103103.
10. Lodish H. *Biología celular y molecular*. Ed. Médica Panamericana; 2005. 1096 p.
11. Hieter P, Griffiths T. Polyploidy--more is more or less. *Science*. 9 de julio de 1999;285(5425):210-1.
12. Ogle BM, Cascalho M, Platt JL. Biological implications of cell fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. julio de 2005;6(7):567-75.
13. Lee HO, Davidson JM, Duronio RJ. Endoreplication: polyploidy with purpose. *Genes Dev*. 1 de noviembre de 2009;23(21):2461-77.
14. Davoli T, de Lange T. The causes and consequences of polyploidy in normal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011;27:585-610.
15. Zybina TG, Zybina EV. Cell reproduction and genome multiplication in the proliferative and invasive trophoblast cell populations of mammalian placenta. *Cell Biol Int*. diciembre de 2005;29(12):1071-83.
16. Parmacek MS, Epstein JA. Cardiomyocyte renewal. *N Engl J Med*. 2 de julio de 2009;361(1):86-8.
17. Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature*. 24 de abril de 2003;422(6934):897-901.
18. Castedo M, Coquelle A, Vitale I, Vivet S, Mouhamad S, Viaud S, et al. Selective resistance of tetraploid cancer cells against DNA damage-induced apoptosis. *Ann N Y Acad Sci*. diciembre de 2006;1090:35-49.
19. Sulli G, Di Micco R, d'Adda di Fagagna F. Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. *Nat Rev Cancer*. octubre de 2012;12(10):709-20.
20. Pack LR, Daigh LH, Meyer T. Putting the brakes on the cell cycle: mechanisms of cellular growth arrest. *Curr Opin Cell Biol*. octubre de 2019;60:106-13.
21. Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol*. junio de 2018;28(6):436-53.
22. Birch J, Gil J. Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. *Genes Dev*. 1 de diciembre de 2020;34(23-24):1565-76.
23. Levine B, Sinha S, Kroemer G. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy*. julio de 2008;4(5):600-6.
24. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. enero de 2008;9(1):47-59.

25. Biswas S, Shi Q, Matise L, Cleveland S, Dave U, Zinkel S. A role for proapoptotic Bax and Bak in T-cell differentiation and transformation. *Blood*. 9 de diciembre de 2010;116(24):5237-46.
26. Ruiz-Vela A, Opferman JT, Cheng EHY, Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK control multiple initiator caspases. *EMBO Rep*. abril de 2005;6(4):379-85.
27. Gross A, Katz SG. Non-apoptotic functions of BCL-2 family proteins. *Cell Death Differ*. agosto de 2017;24(8):1348-58.
28. Giménez-Cassina A, Danial NN. Regulation of mitochondrial nutrient and energy metabolism by BCL-2 family proteins. *Trends Endocrinol Metab*. abril de 2015;26(4):165-75.
29. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. octubre de 2000;1(1):11-21.
30. Rong Y, Distelhorst CW. Bcl-2 protein family members: versatile regulators of calcium signaling in cell survival and apoptosis. *Annu Rev Physiol*. 2008;70:73-91.
31. Zinkel S, Gross A, Yang E. BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ*. agosto de 2006;13(8):1351-9.
32. Marquez RT, Xu L. Bcl-2:Beclin 1 complex: multiple, mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch. *Am J Cancer Res*. 2012;2(2):214-21.
33. Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, et al. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science*. 4 de abril de 2003;300(5616):135-9.
34. Naim S, Kaufmann T. The Multifaceted Roles of the BCL-2 Family Member BOK. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:574338.
35. Carpio MA, Means RE, Brill AL, Sainz A, Ehrlich BE, Katz SG. BOK controls apoptosis by Ca²⁺ transfer through ER-mitochondrial contact sites. *Cell Rep*. 9 de marzo de 2021;34(10):108827.
36. Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong WX, Rathmell JC, Shiels HA, et al. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell*. diciembre de 2000;6(6):1389-99.
37. Kondo S, Shinomura Y, Miyazaki Y, Kiyohara T, Tsutsui S, Kitamura S, et al. Mutations of the bak gene in human gastric and colorectal cancers. *Cancer Res*. 15 de agosto de 2000;60(16):4328-30.
38. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, et al. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science*. 14 de febrero de 1997;275(5302):967-9.
39. Agarwal B, Naresh KN. Bcl-2 family of proteins in indolent B-cell non-Hodgkin's lymphoma: study of 116 cases. *Am J Hematol*. agosto de 2002;70(4):278-82.
40. Hiromatsu Y, Kaku H, Mukai T, Miyake I, Fukutani T, Koga M, et al. Immunohistochemical analysis of bcl-2, Bax and Bak expression in thyroid glands from patients with Graves' disease. *Endocr J*. agosto de 2004;51(4):399-405.
41. Mason KD, Lin A, Robb L, Josefsson EC, Henley KJ, Gray DHD, et al. Proapoptotic Bak and Bax guard against fatal systemic and organ-specific autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 12 de febrero de 2013;110(7):2599-604.
42. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 7 de enero de 2000;100(1):57-70.
43. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 4 de marzo de 2011;144(5):646-74.
44. Andreassen PR, Martineau SN, Margolis RL. Chemical induction of mitotic checkpoint override in mammalian cells results in aneuploidy following a transient tetraploid state. *Mutat Res*. diciembre de 1996;372(2):181-94.
45. Fujiwara T, Bandi M, Nitta M, Ivanova EV, Bronson RT, Pellman D. Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature*. 13 de octubre de 2005;437(7061):1043-7.

46. Vitale I, Galluzzi L, Senovilla L, Criollo A, Jemaà M, Castedo M, et al. Illicit survival of cancer cells during polyploidization and depolyploidization. *Cell Death Differ.* septiembre de 2011;18(9):1403-13.
47. Gordon DJ, Resio B, Pellman D. Causes and consequences of aneuploidy in cancer. *Nat Rev Genet.* 24 de enero de 2012;13(3):189-203.
48. Duelli D, Lazebnik Y. Cell-to-cell fusion as a link between viruses and cancer. *Nat Rev Cancer.* diciembre de 2007;7(12):968-76.
49. Vitale I, Galluzzi L, Castedo M, Kroemer G. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol.* junio de 2011;12(6):385-92.
50. Ganem NJ, Pellman D. Limiting the proliferation of polyploid cells. *Cell.* 2 de noviembre de 2007;131(3):437-40.
51. Margolis RL. Tetraploidy and tumor development. *Cancer Cell.* noviembre de 2005;8(5):353-4.
52. Waldman T, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21. *Nature.* 20 de junio de 1996;381(6584):713-6.
53. Andreassen PR, Lohez OD, Lacroix FB, Margolis RL. Tetraploid state induces p53-dependent arrest of nontransformed mammalian cells in G1. *Mol Biol Cell.* mayo de 2001;12(5):1315-28.
54. Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature.* 18 de noviembre de 2004;432(7015):307-15.
55. Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science.* 7 de marzo de 2008;319(5868):1352-5.
56. Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, Krizhanovsky V, et al. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature.* 8 de febrero de 2007;445(7128):656-60.
57. Zitvogel L, Galluzzi L, Smyth MJ, Kroemer G. Mechanism of action of conventional and targeted anticancer therapies: reinstating immunosurveillance. *Immunity.* 25 de julio de 2013;39(1):74-88.
58. Hynes NE, MacDonald G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol.* abril de 2009;21(2):177-84.
59. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 25 de junio de 2010;141(7):1117-34.
60. Cheng N, Chytil A, Shyr Y, Joly A, Moses HL. Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol Cancer Res MCR.* octubre de 2008;6(10):1521-33.
61. Collado M, Serrano M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer.* enero de 2010;10(1):51-7.
62. Evan GI, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: hot or what? *Curr Opin Genet Dev.* febrero de 2009;19(1):25-31.
63. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene.* 26 de febrero de 2007;26(9):1324-37.
64. Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science.* 28 de agosto de 1998;281(5381):1317-22.
65. Castedo M, Coquelle A, Vivet S, Vitale I, Kauffmann A, Dessen P, et al. Apoptosis regulation in tetraploid cancer cells. *EMBO J.* 7 de junio de 2006;25(11):2584-95.
66. Deng J, Gutiérrez LG, Stoll G, Motiño O, Martins I, Núñez L, et al. Paradoxical implication of BAX/BAK in the persistence of tetraploid cells. *Cell Death Dis.* 1 de noviembre de 2021;12(11):1039.
67. Ke F, Bouillet P, Kaufmann T, Strasser A, Kerr J, Voss AK. Consequences of the combined loss of BOK and BAK or BOK and BAX. *Cell Death Dis.* 6 de junio de 2013;4:e650.

68. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*. 30 de julio de 2004;305(5684):626-9.
69. Tait SWG, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. septiembre de 2010;11(9):621-32.
70. Ichijima Y, Yoshioka K ichi, Yoshioka Y, Shinohe K, Fujimori H, Unno J, et al. DNA lesions induced by replication stress trigger mitotic aberration and tetraploidy development. *PLoS One*. 21 de enero de 2010;5(1):e8821.
71. Li P, Zhou L, Liu X, Jin X, Zhao T, Ye F, et al. Mitotic DNA damages induced by carbon-ion radiation incur additional chromosomal breaks in polyploidy. *Toxicol Lett*. 1 de octubre de 2014;230(1):36-47.
72. Nano M, Gemble S, Simon A, Penner C, Fraiser V, Marthiens V, et al. Cell-Cycle Asynchrony Generates DNA Damage at Mitotic Entry in Polyploid Cells. *Curr Biol CB*. 18 de noviembre de 2019;29(22):3937-3945.e7.