

Efecto de la proteína Ski sobre la susceptibilidad de células MCF-7 a la muerte inducida por docetaxel

Claudia Hinojosa S.⁽¹⁾, Macarena Jara V.⁽¹⁾, Daniela Diez U.⁽²⁾, Katherine Marcelain C.⁽³⁾

⁽¹⁾*Estudiante de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.*

⁽²⁾*Estudiante de Tecnología Médica, Universidad Mayor.*

⁽³⁾*Programa de Genética Humana, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.*

Financiamiento: Proyecto VIDIO7/11-2, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad de Chile.

SUMMARY

Docetaxel, a drug used in advanced stages of breast cancer, induces stabilization of microtubules, inhibiting the process of cell division and consequently causes a special type of cell death called mitotic catastrophe. Recently it has been shown that the Ski protein, when overexpressed, induces mitotic catastrophe in Mouse Embryo Fibroblasts (MEFs). In this work, we evaluated the effect of Ski over expression on docetaxel-induced cell death in a breast cancer cell line, MCF-7. Cells overexpressing GFP (control) or GFP-Ski were incubated with 0-25-50-100 nM docetaxel for 72 hours. Cell death was evaluated by studying cellular and nuclear morphology by fluorescence microscopy. We found that at 25 nM, 50 nM and 100 nM, docetaxel induced an average of 77.93, 90.04 and 90.39% cell death in control cells; and 86.89, 83.54 and 87.22% in cells overexpressing Ski, respectively. No significant differences were found regarding drug concentrations or Ski over expression. However, under basal conditions (without docetaxel), over expression of Ski significantly induced mitotic catastrophe compared to control cells (22.04% vs. 2.38% cell death). This data support previous findings suggesting that Ski participates in the activation of mitotic catastrophe in cells with mitotic defects, as a mechanism to preserve chromosom stability.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente en la mujer occidental y la principal causa de muerte por cáncer en la mujer en países desarrollados y algunos de América Latina. En Chile se conoce parcialmente la incidencia de cáncer de mama, ya que la notificación obligatoria de los casos nuevos se realiza solo desde hace un par de años y principalmente en los servicios públicos que representan el 72% de la población chilena⁽¹⁾. En 2008, el cáncer de mama en Chile alcanzó una tasa de mortalidad observada de 14,5 por 100.000⁽²⁾.

El cáncer de mama se presenta en diferentes estadios. El pronóstico en general depende del estadio en que éste sea detectado. El conocer el pronóstico de un paciente con cáncer permite, entre otras cosas, elegir la terapéutica más apropiada, evaluar la eficacia del tratamiento, informar al paciente o a sus familiares acerca de la posible evolución y manejar racionalmente las eventuales complicaciones que puedan aparecer en el curso de la enfermedad⁽³⁾.

El cáncer de mama localmente avanzado se caracteriza por un aumento significativo del volumen mamario, con un tumor de tamaño variable, pero que infiltra la piel, ulcerándola o no y con infiltración de los ganglios linfáticos regionales⁽⁴⁾.

Una de las drogas quimioterapéuticas utilizadas en casos de cáncer de mama localmente avanzado es docetaxel (Taxotere[®])⁽³⁾. Esta droga induce muerte celular a través de la estabilización de los microtúbulos, inhibiendo la despolimerización de éstos, lo que provoca en las células una incapacidad para realizar funciones vitales, tales como el transporte de sustancias mediado por el citoesqueleto y la división celular. Así, esta droga afecta preferentemente a las células cancerígenas, las que poseen una alta proliferación y división celular⁽⁵⁾.

Docetaxel induce particularmente dos tipos de muerte celular: apoptosis y catástrofe mitótica. La apoptosis es un proceso activo que implica síntesis proteica, en el cual la célula sufre una condensación nuclear y citoplasmática. Sus características morfológicas revelan condensación de la cromatina nuclear, desintegración del nucléolo, disminución del tamaño nuclear, alteraciones del citoesqueleto y aspecto de burbuja de la membrana, aunque no se rompe. Durante el proceso final ocurre fragmentación del DNA debido a una ruptura internucleosomal del DNA y se forman fragmentos nucleares recubiertos de membrana (cuerpos apoptóticos), que son fagocitados sin evidencia de reacción inflamatoria⁽⁶⁾. Por su parte, la catástrofe mitótica resulta de una mitosis aberrante. Las células que sufren este tipo de muerte celular muestran una morfología característica: son de un mayor tamaño que las células normales y poseen numerosos micronúcleos que corresponden a grupos individuales de cromosomas disgregados⁽⁷⁾.

Los componentes moleculares que participan en la activación de la catástrofe mitótica no son del todo conocidos⁽⁷⁾. Recientemente se ha descrito que la sobreexpresión de la proteína Ski induce catástrofe mitótica en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs)⁽⁸⁾.

Ski es un corepresor transcripcional que se expresa prácticamente en todos los tejidos, aunque en bajos niveles. Se ha descrito que Ski participa en la regulación de la proliferación y mielinización de células de Schwann. También se ha demostrado que influye en el crecimiento y la diferenciación de las células hematopoyéticas *in vitro*. Por último, se ha observado que la expresión de Ski se altera en muchas condiciones patológicas, como la cicatrización de heridas, la regeneración del hígado y la nefropatía obstructiva⁽⁹⁾.

Ski se ha descrito como oncogen en células aviares; sin embargo, tras nuevos estudios efectuados en

células de mamíferos, también se ha sugerido que Ski no sólo funciona como oncogen, sino que en ciertas células actuaría como supresor de tumores. Estudios realizados en fibroblastos embrionarios de ratones *knock out* para el gen *SKI* (MEFs Ski (-/-)) mostraron que la ausencia del gen *SKI* induce la generación de aneuploidías. Estas células presentaron un número variable de cromosomas, de 33 a 75, cuando lo normal es $2n=40$. Esta aneuploidía se produce principalmente por defectos en la segregación cromosómica en mitosis⁽⁸⁾.

Interesantemente, una sobreexpresión de Ski en las células MEFs Ski (-/-) indujo la muerte celular por apoptosis y, principalmente, por catástrofe mitótica, sugiriendo que Ski participaría en los mecanismos de muerte celular inducidos por defectos en la mitosis.

Dado que docetaxel es una droga que ataca el aparato mitótico e induce muerte por catástrofe mitótica, en este trabajo se evaluó el efecto que una sobreexpresión de la proteína Ski tendría sobre la muerte celular inducida por docetaxel en una línea celular de cáncer de mama.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo celular. Las células MCF-7 aisladas inicialmente en 1970 a partir de una efusión pleural de una paciente con carcinoma mamario metastásico⁽¹⁰⁾ fueron mantenidas a 37°C con atmósfera de 5% de CO₂, en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), suplementado con 10% de suero fetal bovino, antibióticos y glutamina.

Transfección y tratamiento. Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos tratados con poli-L-Lisina (Sigma) y transfectadas con un plasmidio control (pCMV-EGFP-C1) que codifica para la proteína GFP (*green fluorescent protein*) o un plasmidio codificante para Ski (pCMV-EGFP-SKI), utilizando lipofectamina 2000 y siguiendo las ins-

trucciones del proveedor (Invitrogen). Luego de 24 horas las células fueron tratadas con docetaxel (Selleckchem) a diferentes concentraciones (25-50-100 nM) o con el vehículo (DMSO) durante 72 horas.

Marcación fluorescente de citoplasma y núcleo.

Pasadas las 72 horas de incubación con el tratamiento, las células se lavaron en solución tampón fosfato (PBS) y se fijaron con paraformaldehído al 3,7% por 10 minutos y se permeabilizaron con tritón al 0,1% por 10 minutos a temperatura ambiente. Para la marcación de citoplasma las células fijadas se incubaron con faloidina-Texas Red (1:1000) por 45 minutos. Posteriormente se realizaron tres lavados por 5 minutos cada uno con PBS. Finalmente las muestras se incubaron con DAPI (para la marcación nuclear) y se montaron (Prolong^{MR}, Invitrogen) sobre portaobjetos para su visualización en microscopio de fluorescencia (DSU Confocal Microscope, Olympus).

Cuantificación de la muerte celular. La muerte celular se determinó de acuerdo a la morfología nuclear y celular. Para cada tratamiento (0-25-50-100 nM docetaxel), se evaluaron al menos 100 células de cada tipo (MCF-7/GFP y MCF-7/GFP-Ski) y se compararon los porcentajes de células muertas (apoptosis+catástrofe mitótica). Los experimentos se realizaron 3 veces (N=3). Las diferencias entre los porcentajes se determinaron utilizando la prueba de ANOVA bidireccional (Two-way ANOVA), con corrección de Bonferroni. La diferencia entre la muerte observada en células MCF-7/GFP v/s MCF-7/GFP-Ski en ausencia de droga (muerte basal) se estimó mediante prueba de t de Student.

RESULTADOS

Para evaluar el porcentaje de muerte celular en células MCF-7 se consideró como criterio la morfología celular y nuclear. Para esto, el citoplasma

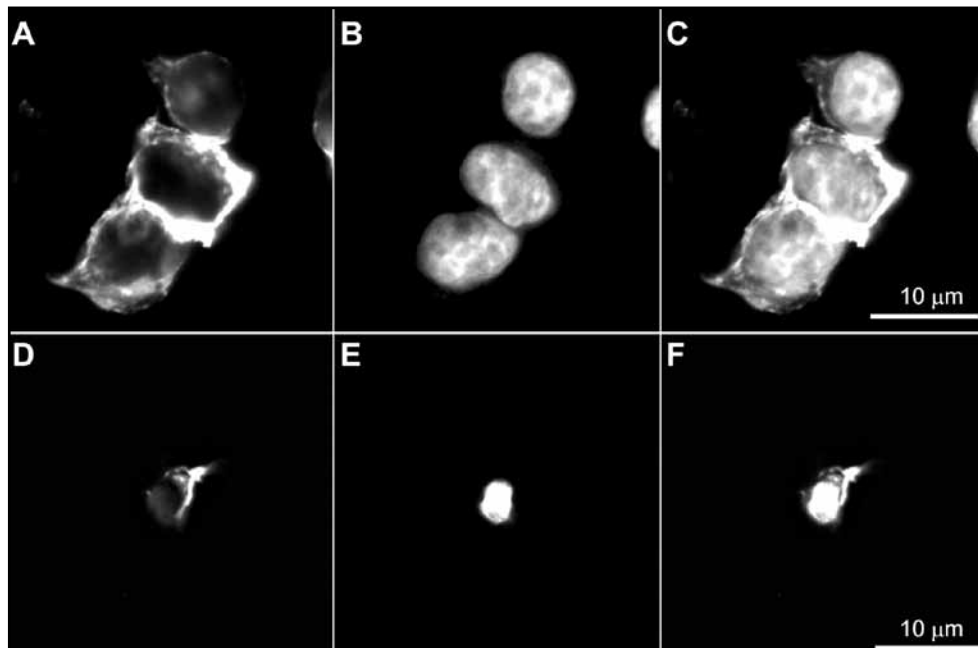


Figura 1. Morfología celular y nuclear evaluadas por microscopía de fluorescencia. El citoplasma celular fue identificado con la tinción de faloidina (A y D) y el núcleo, con DAPI (B y E). C y F muestran imágenes superpuestas. A-C muestra ejemplos de células vivas. D-F muestra una célula apoptótica. Barra de escala: 10 µm, objetivo 40x.

celular fue detectado mediante la tinción fluorescente de faloidina (molécula que une filamentos de actina). A su vez el núcleo fue identificado mediante la tinción con DAPI (molécula fluorescente que une DNA). De esta forma se discriminó claramente entre células normales (vivas), células apoptóticas y células con catástrofe mitótica. La Figura 1 muestra un ejemplo de células normales y una apoptótica. Se puede evidenciar la disminución de tamaño y la condensación nuclear típicos de una célula apoptótica. Por su parte, las células que sufren catástrofe mitótica aumentan sustancialmente su tamaño y muestran un núcleo fragmentado en mininúcleos (Figura 2). Nótese la diferencia de tamaño comparado con las células normales y apoptótica (ver barras de escala).

Utilizando este criterio, se obtuvo que la sobreexpresión de la proteína Ski produjo un aumento significativo de la muerte celular en células en condiciones basales (sin docetaxel), en comparación con las células controles que sobreexpresan GFP (22.04% *vs.* 2.38%, respectivamente) (Figura 3). Esta muerte correspondió aproximadamente en un 90% a catástrofe mitótica.

Al incubar durante 72 horas las células MCF-7/GFP y MCF-7/GFP-Ski con docetaxel 25nM, 50nM y 100nM, se produjo un aumento significativo de mortalidad de ambos tipos celulares con todas las concentraciones de docetaxel utilizadas ($p < 0.0001$, Figura 4). Sin embargo, no hubo diferencias significativas de la mortalidad inducida por las distintas concentraciones de la droga ($p > 0.05$). Si bien en las células MCF-7/GFP se observa un aumento en la mortalidad a 50 y 100nM comparado con 25nM docetaxel (90.04 y 90.39% *vs.* 77.93%), estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Tampoco existieron diferencias significativas entre las células MCF-7/GFP y MCF-7/GFP-Ski tratadas con docetaxel (Figura 4).

DISCUSIÓN

Ski se ha descrito como oncogen en células aviares; sin embargo, tras nuevos estudios efectuados en células de ratones y en algunas células tumorales humanas, también se ha sugerido que Ski no sólo funciona como oncogen, sino que en estas células actuaría como supresor de tumores^(8,9).

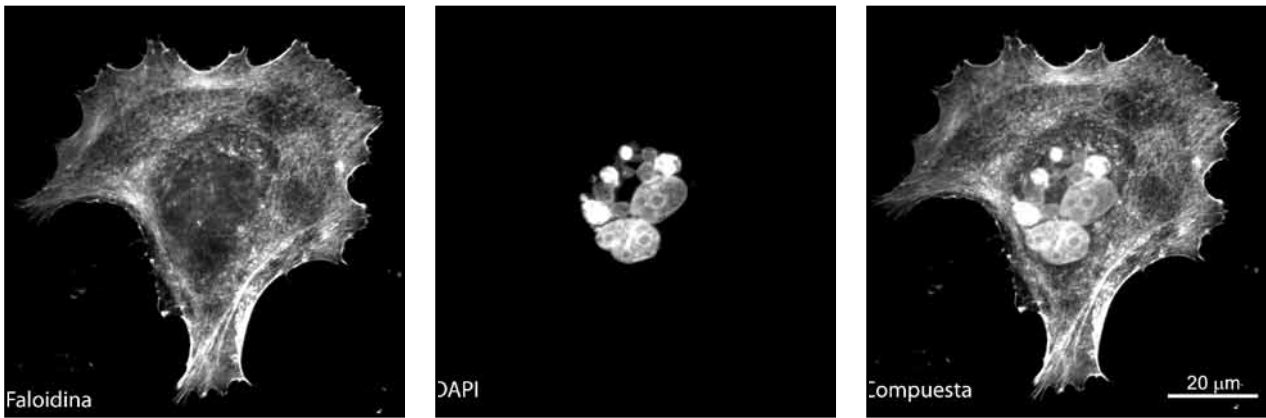


Figura 2. Morfología celular y nuclear de una célula con catástrofe mitótica. El citoplasma celular fue identificado con la tinción de faloidina y el núcleo, con DAPI. Barra de escala: 20 μm , objetivo 40x.

Resultados recientes muestran que la sobreexpresión de Ski en células altamente aneuploides induce muerte celular principalmente por un mecanismo denominado catástrofe mitótica^(7,8). Considerando que este tipo de muerte celular es el mecanismo de acción de drogas quimioterapéuticas citotóxicas como docetaxel, utilizada en el tratamiento de cáncer de mama^(5,11), en este trabajo se evaluó si la sobreexpresión de la proteína Ski potenciaría la muerte en células de cáncer de mama tratadas *in vitro* con esta droga.

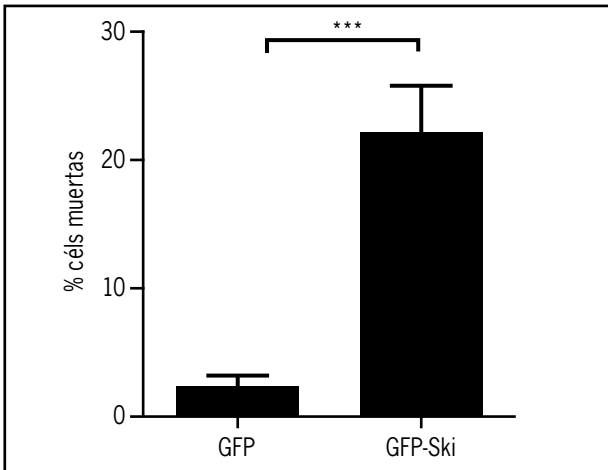


Figura 3. Efecto de la sobreexpresión de Ski en células MCF-7 en condiciones basales. El porcentaje de muerte en células MCF-7 que sobreexpresan GFP (control) y células que sobreexpresan GFP-Ski, se determinó observando la morfología celular y nuclear. *** $p < 0.001$, test t de Student.

Docetaxel fue altamente eficiente en inducir muerte en células MCF-7. Aún en bajas concentraciones (25nM) se alcanzó porcentajes de muerte de aproximadamente 80%. Los resultados confirman que la

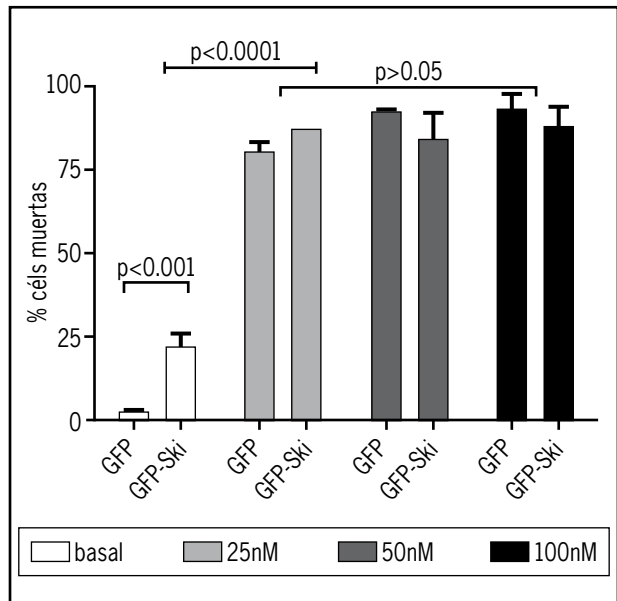


Figura 4. Efecto de la sobreexpresión de Ski en células MCF-7 expuestas a distintas concentraciones de docetaxel. El porcentaje de muerte en células MCF-7 que sobreexpresan GFP (control) y células que sobreexpresan GFP-Ski, se determinó observando la morfología celular y nuclear luego de 72 horas de exposición a docetaxel 0, 25, 50 y 100 nM. GFP vs. GFP-Ski en condición basal: $p < 0.001$ (test t de Student). GFP y GFP-Ski basal vs. 25-50-100 nM docetaxel: $p < 0.0001$ (Two Way ANOVA). GFP y GFP-Ski docetaxel 25 vs. 50 nM; 25 vs. 100 nM y 50 vs. 100 nM: $p > 0.05$ (Two Way ANOVA).

principal forma de muerte inducida por docetaxel en células de cáncer de mama es la catástrofe mitótica. Sin embargo, tanto en células MCF-7/GFP como en MCF-7/GFP-Ski, no se obtuvo una respuesta dependiente de la concentración de droga utilizada. Esto puede explicarse porque se trabajó con un rango de dosis que se encuentra en el límite superior de inducción de muerte y, por lo tanto, las diferencias en tal rango no son significativas. Más aún, la metodología utilizada en este trabajo para determinar porcentaje de muerte celular tiene ventajas y desventajas. Su principal ventaja es que posee una sensibilidad muy superior a otras metodologías que evalúan viabilidad celular, como lo es el ensayo de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-y 1)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) el cual en estas mismas células expuestas a las mismas condiciones presentadas en este trabajo, arroja porcentajes de muerte que van desde 30 a 50% (datos no publicados). Por otro lado, docetaxel induce muerte celular por apoptosis, catástrofe mitótica, y también necrosis⁽⁵⁾. Este último tipo de muerte sería causado por concentraciones elevadas de la droga y es probable que produzca desprendimiento de las células desde el cubreobjetos en el que están adheridas, ya que la célula sufre un procesos de desintegración y disolución (necrosis)⁽¹²⁾, por lo que estas células serían excluidas en el proceso de cuantificación de muerte celular. Es posible entonces que mediante la utilización de concentraciones más bajas y tiempos de incubación menores con la droga, se observen diferencias dependientes de la dosis.

En este rango de muerte inducida por docetaxel (78-90%), la sobreexpresión de Ski no tuvo el efecto potenciador esperado. Es probable que las diferencias esperadas no hayan sido evidenciadas por las mismas razones técnicas aludidas anteriormente, ya que resultados no publicados de nuestro gru-

po indican que utilizando otras metodologías de cuantificación de muerte celular menos sensibles, es posible evidenciar un efecto potenciador de la sobreexpresión de Ski en la muerte inducida por docetaxel en estas células. Más aún, en ausencia de droga, la sobreexpresión de Ski *per se* indujo muerte celular por catástrofe mitótica en células MCF-7.

Estudios previos han demostrado que los niveles de la proteína Ski se incrementan durante la mitosis. En esta fase del ciclo celular, Ski es fosforilada por la quinasa cdk1/ciclinaB⁽¹³⁾ y la quinasa Aurora-A⁽¹⁴⁾. Estas observaciones sugieren la participación de Ski en el proceso mitótico⁽¹³⁾. En efecto, recientemente se demostró que la presencia de Ski es necesaria para que exista una correcta segregación de los cromosomas y para la activación del *checkpoint* de anafase⁽⁸⁾. Se ha demostrado que para que exista muerte por catástrofe mitótica debe existir previamente la activación del *checkpoint* de anafase^(15,16).

En ausencia de un estímulo externo de activación del *checkpoint* de anafase, como lo es el uso de drogas como docetaxel, este *checkpoint* se activa normalmente en las células cuando existe uno o un par de cromosomas que no se han unido correctamente a los microtúbulos que forman el huso mitótico⁽¹⁵⁾. Defectos en la activación del *checkpoint* de anafase resultan, por lo tanto, en la generación de aneuploidía, una de las manifestaciones más frecuentes de inestabilidad cromosómica en los tumores y la cual está estrechamente relacionada con la progresión del cáncer y su mal pronóstico⁽¹⁶⁾.

Las células MCF-7 fueron establecidas en el año 1970 y poseen un alto grado de aneuploidías⁽¹⁷⁾ y en consecuencia, defectos en la segregación cromosómica. Es altamente probable entonces que

en condiciones basales la sobreexpresión de Ski induzca un *checkpoint* de anafase en aquellas células en que se produzcan defectos en la segregación de los cromosomas y consecuentemente se induzca la muerte de estas células por catástrofe mitótica. La sobreexpresión de Ski entonces, al igual como

se describió previamente en un modelo de células murinas (MEFs)⁽⁸⁾, contribuiría a la mantención de la estabilidad cromosómica en células derivadas de adenocarcinoma mamario humano, MCF-7, apoyando el rol de esta proteína como supresor tumoral.

REFERENCIAS

1. Peralta O. Cáncer de Mama en Chile: Datos epidemiológicos. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología* 2002;67:439-45.
2. Ministerio de salud. Guía clínica cáncer de mama. Santiago: Minsal, 2011.
3. Ministerio de Salud. Guía clínica de cáncer de mama en personas de 15 años y más. Santiago: Minsal, 2005.
4. Fernández A. Cáncer de mama localmente avanzado, inflamatorio y diseminado. Factores pronósticos de respuesta al tratamiento. Tomado de: <http://www.uninet.edu>
5. Morse D, Gray H, Payne C, Gillies R. Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 2005;4:1495-504.
6. Arango M, Llanes L, Díaz T, Faxas M. La apoptosis: sus características y su papel en la transformación maligna de la célula. *Revista Cubana de Oncología* 1997;13:126-34.
7. Castedo M, Perfettini J, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* 2004;23:2825-37.
8. Marcelain K, Armisen R, Aguirre A, Ueki N, Toro J, Colmenares C *et al.* Chromosomal instability in mouse embryonic fibroblasts null for the transcriptional co-repressor Ski. *Journal Cell Physiology* 2012;227:278-87.
9. Deheuninck J, Luo K. Ski and SnoN, potent negative regulators of TGF- β signaling. *Cell Research* 2009;19:47-57.
10. Tomado desde <http://www.laboratoriomicrovet.com/medios/dmem.html>
11. Singh R, George J, Shukla Y. Role of senescence and mitotic catastrophe in cancer therapy. *Cell Division* 2010;21:4.
12. Patología celular. En: Pontificia Universidad Católica de Chile. Manual de patología general. 2ª edición. Tomado desde: http://escuela.med.puc.cl/publ/patologiageneral/patol_031.html

13. Marcelain K, Hayman MJ. The Ski oncoprotein is upregulated and localized at the centrosomes and mitotic spindle during mitosis. *Oncogene* 2005;24:4321-9.
14. Mosquera J, Armisen R, Zhao H, Rojas DA, Maldonado E, Tapia JC *et al.* Identification of Ski as a target for Aurora A kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;409:539-43.
15. Weaver BA, Bonday ZQ, Putkey FR, Kops GJ, Silk AD, Cleveland DW. Centromere-associated protein-E is essential for the mammalian mitotic checkpoint to prevent aneuploidy due to single chromosome loss. *J Cell Biol* 2003;162:551-63.
16. Weaver BA, Cleveland DW. Decoding the links between mitosis, cancer and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation and cell death. *Cancer Cell* 2005;8:7-12.
17. Consultado en www.ATCC.org

CORRESPONDENCIA

Dra. Katherine Marcelain Cubillos
Programa de Genética Humana, ICBM
Facultad de Medicina, Universidad de Chile
Av. Independencia 1027, Santiago
Fono: 2978 6741
E-mail: kmarcelain@med.uchile.cl

