

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**



**Inestabilidad Cromosómica Inducida por el Tratamiento *in vitro* con MLN8237, un Inhibidor de la Proteína Quinasa Aurora A, en Linfocitos Proliferantes de Individuos Sanos.**

**Ana Maritza Erazo Milla**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS,  
MENCION GENÉTICA**

**Directora de Tesis: Prof. Dra. Katherine Marcelain**

**2014**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER**

**Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por la candidata**

**ANA MARITZA ERAZO MILLA**

**ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Genética, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 05 de Junio de 2014.**

**Prof. Dra. Katherine Marcelain**

**Directora de Tesis**

**ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Santiago, Chile**

**COMISION INFORMANTE DE TESIS**

\_\_\_\_\_  
**Prof. Dra. Madeleine Lamborot**

\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Patricio Gonzales**

\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Ángel Spotorno**

\_\_\_\_\_  
**Prof. Dra. Lucia Cifuentes  
Presidente Comisión**

## **DEDICATORIA**

Dedico este esfuerzo en primera instancia a la Dra. Juani Pincheira (QEPD), con quien inicié esta jornada y a quien quedo eternamente agradecida por compartir sus conocimientos y amplia experiencia conmigo; valieron la pena los “coscachos” Profe.

Y a quienes se sacrificaron para que este sueño se cumpliera, a mi esposo e hija: Hugo y Ana Karina, a mi madre y hermanos: Clarissa, Karla, Roberto y Jessica y a mi otro hijo: mi sobrino Eduardo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quero agradecer a las personas que durante esta jornada me ayudaron y apoyaron sin condiciones:

- Pablo Baez, gracias por ser un excelente compañero y amigo, y por prestarme tus manos y ayuda con las muestras.
- Jessica Toro y Daniela Diez y, gracias por su ayuda, valiosas asesorías, por su linda amistad y cariño.
- Emmanuel Casanova, Ignacio Maureira y Victor Inostroza, gracias chicos, sin su colaboración no hubiese sido posible terminar y por dejarme ser un poco mamá y maestra.
- Oscar Álvarez, Solange Rivas, Claudio Capelli y Victor Pola, gracias por sus consejos a tiempo, por compartir sus conocimientos conmigo y por su amistad.

De nuevo gracias amigos por su amistad y cariño que traspasa fronteras.

Quiero expresar mi agradecimiento y reconocimiento muy especialmente a mi directora de Tesis, la Prof. Dra Katherine Marcelain, quien me rescato (dos veces) y ayudó a terminar con éxito esta labor. Profe. Kathy, mil gracias por toda su ayuda, apoyo y sacrificio, nunca olvidaré que aun es sus tiempos difíciles siempre estuvo allí para apoyarme sin perder su sonrisa.

Agradezco mucho el tiempo tomado por la comisión de tesis Profesores: Dra. Madeleine Lamborot, Dr. Patricio Gonzales, Dr. Ángel Spotorno, Dra. Lucia Cifuenters y Dra. Patricia Iturra, gracias por su apoyo, observaciones y valiosos aportes.

Agradezco a mi familia por su apoyo, sus sacrificios, ayuda y amor incondicional. Y por sobre todo a Dios, sin cuyas bendiciones nada de esto es posible.

<b>ÍNDICE</b>	<b>Pag.</b>
1. Resumen	7
2. Abstract	9
3. Introducción	11
3.1 Inestabilidad Cromosómica	11
3.2 Mecanismos de Control del Proceso Mitótico	13
3.3 Familia de las Quinasas Aurora	16
3.4 La Quinasa Aurora A	18
3.5 Procesos en los Cuales Participa la Quinasa Aurora A	20
3.6 Sobre Expresión de la Quinasa Aurora A en Cáncer	22
3.7 Inhibidores de la Quinasa Aurora A: Sus Efectos en Células Cancerosas	30
4. Hipótesis	30
5. Objetivos	31
5.1 Objetivo General	31
5.2 Objetivos Específicos	31
6. Materiales y Métodos	32
6.1 Muestras y Material de estudio	32
6.2 Métodos	33
6.2.1 Cultivo de Linfocitos Humanos a partir de Fracción de Plasma Rico en Linfocitos	33
6.2.2 Cultivo de Linfocitos a partir de Sangre Total y obtención de Cromosomas Metafásicos	33
6.2.3 Estimación del Porcentaje de Apoptosis mediante la Determinación y Cuantificación de DNA por Citometría de Flujo	35
6.3 Diseños Experimentales:	36
6.3.1 Concentraciones y Tiempo de Exposición en que el Inhibidor de la Quinasa Aurora A, MLN8237, Induce a Apoptosis en Linfocitos Normales	36
6.3.2 Efecto de la Inhibición de la Quinasa Aurora A en la Frecuencia de Metafases con Anomalías Cromosómicas, mediante el Tratamiento con el Inhibidor MLN8237	37
6.4 Análisis Estadístico	38

7. Resultados	39
7.1 Estimación del Porcentaje de Apoptosis de Linfocitos Proliferantes, Inducida por el Inhibidor de la Aurora Quinasa A, MLN823	39
7.1.1 Índice de Apoptosis Inducida por Concentraciones Crecientes del Inhibidor	39
7.1.2 Efecto del Tiempo de Incubación sobre la Apoptosis de Linfocitos Proliferantes, Tratados con el Inhibidor de la Aurora Quinasa A, MLN8237	42
7.1.3 Tipos de Muerte Celular en Linfocitos Proliferantes, Inducidos por el Inhibidor de la Aurora Quinasa A, MLN8237	44
7.2 Efecto del Inhibidor MLN8237 sobre la frecuencia de Alteraciones Cromosómicas Estructurales	46
7.3 Efecto del Inhibidor MLN8237 sobre la frecuencia de Alteraciones Cromosómicas Numéricas	47
8. Discusión	54
9. Conclusiones	60
10. Referencias Bibliográficas	61
11. Anexos	65
11.1 Consentimiento Informado para Pacientes y Aprobación del Comité de Ética	65
11.2 Esquema de la Metodología Empleada	70
11.3 Histogramas de Índice de Apoptosis, para 72 horas de cultivo, mediante Citometría de Flujo	71
11.4 Análisis de Varianza - Índice de Apoptosis	72
11.5 Declaración de Conflicto de Interés	73

<b>Índice figuras</b>	<b>Pag</b>
1. Predicción de Tumorigénesis causada por la sobre expresión de Quinasa Aurora A	25
2. Esquema del protocolo a utilizar para cultivos de sangre total	38
3. Índice de apoptosis en linfocitos expuestos a distintas concentraciones del MLN8237 durante diferentes tiempos de cultivo	40
4. Variabilidad entre individuos para índice de apoptosis en linfocitos expuestos a distintas concentraciones del MLN8237 durante diferentes tiempos de cultivo	41
5. Análisis de regresión lineal entre porcentaje de apoptosis de cultivos de linfocitos proliferantes a distintas concentraciones del MLN8237	42
6. Índice de apoptosis en linfocitos cultivados durante 72, 96 y 120 horas de cultivo expuestos a distintas concentraciones del MLN8237	43
7. Análisis de regresión lineal entre porcentaje de apoptosis de cultivos de linfocitos proliferantes durante 72, 96 y 120 horas de cultivo, a distintas concentraciones del MLN8237	43
8. Microfotografía de núcleos proliferantes en cultivos sin tratamiento (controles DMSO) durante 96 horas de cultivo	44
9. Microfotografía de núcleos celulares en muerte por catástrofe mitótica, en cultivos tratados con MLN8237 a 0,5 $\mu$ M durante 96 horas de cultivo	45
10. Microfotografía del detalle de núcleos celulares en muerte por catástrofe mitótica y apoptosis	45
11. Microfotografía de aberraciones estructurales (gaps y fracturas), en cultivos tratados con MLN8237 a 0,1 $\mu$ M durante 72 horas de cultivo	46
12. Porcentaje de metafases con alteraciones cromosómicas estructurales expuestos a distintas concentraciones del MLN8237 durante diferentes tiempos de cultivo	47
13. Porcentaje de metafases con 2n=46 cromosomas expuestos a distintas concentraciones del MLN8237 durante 72 horas de cultivo	48
14. Porcentaje de metafases con 2n>46 cromosomas expuestos a distintas concentraciones del MLN8237 durante 72 horas de cultivo	49
15. Porcentaje de metafases con 2n=46 cromosomas expuestos a distintas concentraciones del MLN8237 durante 96 horas de cultivo	50
16. Porcentaje de metafases con 2n>46 cromosomas expuestos a distintas concentraciones del MLN8237 durante 96 horas de cultivo	51
17. Porcentaje de metafases con 2n<46 cromosomas expuestos a distintas concentraciones del MLN8237 durante 72 y 96 horas de cultivo	52
18. Frecuencia de metafases agrupadas según número cromosómico en cultivos de linfocitos expuestos a distintas concentraciones del MLN8237 durante 72 horas de cultivo	53
19. Frecuencia de metafases agrupadas según número cromosómico en cultivos de linfocitos expuestos a distintas concentraciones del MLN8237 durante 72 horas de cultivo	53

## 1. RESUMEN

La mitosis es un paso clave en el ciclo celular y es controlada por múltiples reguladores. Ejemplo de estos es la familia de las proteínas quinasa Aurora, ya que en su conjunto participan en la formación de un eje mitótico bipolar, la segregación de los cromosomas y la finalización de la citocinesis.

Diversos estudios indican que la sobreexpresión o amplificación de la quinasa Aurora A (AURKA) en particular, se ha visto asociada a varios tipos de cánceres. Esto ha convertido a esta proteína en un blanco de interés terapéutico, lo que ha llevado al desarrollo de diversas moléculas inhibitoras de la actividad de esta quinasa. Una de estas moléculas, MLN8237, está siendo evaluada en diversos estudios clínicos, como tratamiento para tumores sólidos y hematológicos. Los estudios *in vitro* y en modelos animales muestran que estos inhibidores inducen aneuploidía y muerte celular. Por su parte, los estudios clínicos iniciales muestran promisorios resultados relativos a la progresión tumoral. Sin embargo, pese al inminente uso de estos inhibidores en un corto o mediano plazo como terapia anti-tumoral, el impacto de la inhibición de AURKA en células no tumorales ha sido pobremente documentado.

En este trabajo se evaluó el efecto de concentraciones crecientes del inhibidor MLN8237 sobre la muerte celular y la frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales y numéricas, en linfocitos de sangre periférica provenientes de 8 individuos sanos y cultivados *in vitro* durante 72, 96 y 120 horas. Para esto se determinó: (i) la muerte celular en linfocitos expuestos durante distintos tiempos a distintas concentraciones del inhibidor MLN8237 (0, 0,1, 0,5 y 1 $\mu$ M); y, (ii) la

presencia de inestabilidad cromosómica numérica y estructural, en las células sometidas a las mismas condiciones de inducción de muerte por el inhibidor.

La muerte celular se evaluó mediante la cuantificación del contenido de DNA por citometría de flujo, mientras que la inestabilidad cromosómica se determinó mediante el recuento de aneuploidías, euploidías y alteraciones cromosómicas estructurales en placas metafásicas.

Los resultados indican que MLN8237 induce muerte celular a concentraciones de 0,5 $\mu$ M y 1 $\mu$ M en los distintos tiempos de exposición. En las distintas condiciones evaluadas, el inhibidor no indujo aberraciones cromosómicas estructurales. Sin embargo, existió un aumento significativo de las poliploidías y aneuploidías con todas las concentraciones evaluadas del inhibidor. Estos resultados sugieren que las células no tumorales que sobreviven al inhibidor pueden adquirir mutaciones cromosómicas numéricas que podría tener un impacto en el desarrollo de neoplasias secundarias al tratamiento.

## 2. ABSTRACT

Mitosis is a key step in the cell cycle, controlled by multiple molecules. Example of these is the Aurora kinase family, participating as a whole in the formation of a bipolar mitotic spindle, the segregation of chromosomes and completion of cytokinesis.

Several studies indicate that overexpression or amplification of Aurora A (AURKA) kinase, has been associated to several types of cancers. This has made this protein a target of therapeutic interest, which has led to the development of various molecule inhibitors of the activity of this kinase. One of these molecules, MLN8237, is being evaluated in clinical studies as a treatment for solid and hematological tumors. Studies performed in cell lines and in animal models, show that these inhibitors induce aneuploidy and cell death. Otherwise, initial clinical studies show promising results for tumor progression. However, despite the imminent use of these inhibitors in the short or medium term as anti-tumor therapy, the impact of AURKA inhibition in non-tumor cells has been poorly documented.

In this work the effect of MLN8237 on cell death and frequency of structural and numerical chromosome aberrations was evaluated in peripheral blood lymphocytes, from 8 healthy individuals, cultured *in vitro* under proliferative conditions, from 72, 86 and 120 hours . In the present theses it was assessed: (i) cell death in lymphocytes exposed to different periods of time under various concentrations of inhibitor MLN8237 (0.1, 0.5 and 1 $\mu$ M) ; and, (ii) the presence of numerical and structural chromosome instability in cells exposed to the same conditions for death induction by the inhibitor.

Cell death was assessed by quantifying DNA content by cytometry flow, meanwhile, chromosomal instability was determined by counting aneuploidy, euploidy and structural chromosomal alterations in metaphasic plates.

The results indicate that MLN8237 induces cell death after 72h of exposure and at 0,5 $\mu$ M and 1 $\mu$ M concentration. Under these conditions, the inhibitor did not induce structural chromosome aberrations. However, there was a significant increase in polyploidy and aneuploidy with all tested concentrations of the inhibitor. These results suggest that normal cells surviving to the inhibitor can acquire numerical chromosomal mutations that could have an impact on the development of secondary tumors to treatment.

### **3. INTRODUCCIÓN**

#### **3.1 *Inestabilidad Genómica:***

La molécula de DNA, que contiene la información genética de cada individuo, es una molécula dinámica, sujeta a cambios constantes que pueden generar alteraciones (mutaciones) que modifiquen tal información. Los cambios en el genoma pueden surgir de manera espontánea, debido a errores en los procesos básicos del ciclo celular (metabolismo oxidativo, replicación, recombinación o reparación), o pueden ser inducidos por agentes exógenos de naturaleza química, física o biológica, presentes en el entorno (Nussbaum *et al*, 2008).

Para mantener la homeostasis celular y garantizar la continuidad genética durante la proliferación celular, es preciso asegurar la estabilidad del genoma. El mantenimiento de la estabilidad genómica depende de una correcta regulación de los sistemas de respuesta celular al daño genómico y de la integridad de sus sistemas de reparación.

En células proliferantes, los mecanismos de regulación que operan durante el ciclo celular, les permiten conservar constante el número cromosómico y mantener contenidos genómicos estables (Cooper, 2000). Así, cuando se pierde el control del ciclo proliferativo, se produce un incremento de las mutaciones génicas y cromosómicas, tanto a nivel espontáneo como inducido, debido a que se reduce la eficiencia de la reparación. Los trastornos en estos mecanismos conllevan a inestabilidad genómica, la cual se refiere a una serie de eventos no programados, que generan una diversidad de cambios genéticos, los cuales pueden conducir a

modificaciones temporales o permanentes, en el número o la estructura normal de los cromosomas (Perera y Bapat, 2008).

La inestabilidad genética puede generarse entonces por mutaciones individuales en un gen concreto, o por pérdida o ganancia de cromosomas o, lo que parece ser más frecuente, por reorganizaciones a gran escala de los cromosomas. La pérdida de la estabilidad genética favorece el desarrollo de tumores por aparición de mutantes que pueden ser seleccionados (Cahill *et al*, 1999)

Una forma de inestabilidad genómica es la inestabilidad cromosómica (del inglés, Chromosomal Instability, CIN). Esta se conceptualiza como la tasa de variación en el número cromosómico de célula a célula. Esta condición es la más frecuente en la mayoría de los cánceres y está dada por reordenamientos cromosómicos, o por ganancias o pérdidas de cromosomas o fracciones de cromosomas (Geigl *et al*, 2007).

Se distinguen dos tipos de inestabilidad cromosómica: (i) La inestabilidad cromosómica numérica: que incluye cambios por ganancia o pérdida de cromosomas enteros (aneuploidías), o de set completos de cromosomas (euploidías); y (ii) La inestabilidad cromosómica estructural: que comprende alteraciones cromosómicas estructurales, tales como deleciones, duplicaciones, inversiones, translocaciones y fracturas entre otros (Holland y Cleveland, 2009).

Otras formas de expresión de CIN incluyen niveles incrementados de roturas cromosómicas espontáneas o de intercambio de cromátidas hermanas, asociaciones teloméricas, acortamiento telomérico y expresión de sitios frágiles. Entre las causas primarias involucradas en CIN se cuenta con defectos en la segregación cromosómica, en la regulación de los puntos de control del ciclo celular y en la reparación de daño en el ADN (Fundia *et al*, 2009)

### **3.2 Mecanismos de Control del Proceso Mitótico:**

Para comprender cómo se mantiene constante el contenido genómico de célula a célula, es necesario conocer en qué consiste el ciclo celular y cómo se llevan a cabo los mecanismos que la regulan.

El ciclo celular es el proceso mediante el cual se producen dos células a partir de una sola. Conceptualmente este ciclo se divide en: (i) ciclo cromosómico, donde ocurren la replicación del genoma en dos juegos completos y la posterior separación de los mismos; y (ii) el ciclo de crecimiento, donde se replican todos los otros componentes celulares y se separan las células hijas (Tyson *et al*, 2002).

En células eucariotas, el ciclo cromosómico consiste de dos procesos básicos: (i) la síntesis de DNA (Fase S), durante el cual la doble hebra del DNA se replica, produciendo dos juegos del genoma; y (ii) la mitosis (Fase M), durante la cual se lleva a cabo la separación de esos dos juegos genómicos (Tyson *et al*, 2002).

Ambas fases están separadas por otras dos fase conocidas como intervalo o “*Gap*”, constituyéndose el ciclo celular general en: G1 – S – G2 – M.

Estos procesos son estrictamente controlados con el objeto de asegurar la integridad del genoma que se transmite a la nueva célula y así perpetuar el tipo celular. Es esencial que los ciclos cromosómico y de crecimiento se coordinen a lo largo del proceso de la generación de nuevas células, así éstas podrán replicar su DNA y dividirse de manera precisa y correcta.

Tomando en consideración la complejidad del ciclo celular, varios procesos y vías metabólicas han sido propuestos como mecanismos de control que operan en las distintas etapas del ciclo, entre los que podemos mencionar las vías involucradas en la estabilidad de telómeros y centrómeros, las vías metabólicas asociadas a las quinasas, modificaciones en los procesos de regulación a nivel post-traducciona de diversas proteínas, mecanismos de división celular y *checkpoints* mitóticos que ordenan la duplicación de centrosomas y la correcta cohesión de cromátidas y segregación de cromosomas. (Bolaños-García, 2005)

De manera particular, el sistema de control del ciclo celular es un mecanismo bioquímico compuesto por un conjunto de proteínas reguladoras que interactúan entre sí. Los principales reguladores del ciclo en células animales son las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas (Cdk). Las ciclinas son proteínas que controlan la actividad de sus proteinquinasas dependientes. La concentración de ciclinas varía en forma cíclica, aumentando o disminuyendo durante el transcurso del ciclo celular.

Las Cdk inducen y coordinan los procesos básicos del ciclo, como la duplicación de DNA y la división celular. Estas enzimas son consideradas las moléculas maestras, ya que, mediante la fosforilación de determinadas proteínas, desencadenan los principales eventos del ciclo celular: replicación de DNA, ruptura de la membrana nuclear, condensación de cromosomas y ensamblaje del huso (Tyson *et al*, 2002).

Como mecanismos de control en células eucariotas, se han desarrollado además puntos de retraso, que pueden frenar el ciclo celular en respuesta al estrés o daño celular. Estos pasos regulatorios se conocen como *checkpoints* o puntos de control del ciclo celular. Durante este ciclo, la célula pasa al menos por tres de ellos (Tyson *et al*, 2002):

- **G1/S:** Controla la entrada a la fase de síntesis de DNA, asegurándose que (i) La célula es lo suficientemente grande para garantizar una nueva ronda de síntesis de DNA; (ii) Cualquier daño sufrido por el DNA haya sido reparado; y (iii) Las condiciones externas o del entorno son favorables para la división celular.
- **G2/M:** Regula la entrada a mitosis, asegurándose que: (i) El DNA está completamente duplicado; (ii) Cualquier nuevo daño en el DNA ha sido reparado; y (iii) La célula es lo suficientemente grande para dividirse.
- **M:** Controla la transición de metafase a anafase, asegurándose que los cromosomas estén alineados correctamente al huso mitótico con las cromátidas hermanas unidas a polos opuestos antes que las cohesinas sea degradadas. Este punto de control asegura la correcta coordinación de cada evento en la división, evitando los errores de segregación y distribución

cromosómica que normalmente conlleva a alteraciones del número o forma de los mismos (Holland y Cleveland, 2009).

La salida de Mitosis es controlada por el Complejo Promotor de la Anafase (del inglés *Anaphase – Promoting Complex, APC*) el cual inicia la degradación de cohesinas y ciclinas mitóticas (Tyson *et al*, 2002).

Como se ha descrito anteriormente, los principales eventos del ciclo celular (síntesis del DNA, mitosis y división celular) son regulados por una compleja red de interacciones proteicas. Tal es el caso de las proteínas quinasas Aurora, que en la actualidad han despertado gran interés ya que juegan un papel clave en múltiples estadios de la mitosis (Moore *et al*, 2010).

### **3.3 Familia de las Quinasas Aurora:**

La familia de quinasas Aurora es fundamental en la ejecución exitosa de la división celular ya que en conjunto, estas proteínas aseguran la formación de un eje mitótico bipolar, la segregación segura de cromosomas y la finalización de citocinesis (Crane, 2004).

Esta familia de quinasas ha conservado su estructura a lo largo de la evolución de los eucariotas. En los mamíferos, la familia comprende 3 miembros: Auroras A, B, y C; otras especies animales muestran ortólogos para Aurora A y/o B (Fu *et al*, 2007).

Estructuralmente las quinasas Aurora poseen 2 dominios conservados: un dominio regulatorio en el NH<sub>2</sub> terminal y un dominio catalítico en el COOH terminal. Para su activación estas quinasas requieren la fosforilación de la treonina 288 (T288), en el dominio catalítico. Aurora A y B presentan además un motivo conocido como D-Box (Caja de Destrucción) que es el responsable de la degradación de la proteína (Fu *et al*, 2007).

Esta familia de quinasas presenta tres cajas Aurora putativas (A-Box I, II y III) en el dominio NH<sub>2</sub> terminal. El significado funcional de estas tres cajas no está claro aún, pero se cree que están relacionadas con la localización subcelular o sitios de reconocimiento de diferentes sustratos (Katayama *et al*, 2003)

Las quinasas Aurora A y B son componentes esenciales de los procesos metabólicos mitóticos. Ambas proteínas presentan un patrón de localización específico durante la mitosis. La quinasa Aurora A se localiza en los centrosomas, asociándose a los polos del huso y regula el ensamblaje del huso en mitosis, mientras que la Aurora B se localiza principalmente en los centrómeros y asegura el acoplamiento de los cromosomas al huso mitótico en metafase (Ducat y Zheng, 2004). La quinasa Aurora B es necesaria para localizar múltiples proteínas en las regiones del centrómero y cinetocoros; esto le permite a la Aurora B participar en la condensación de cromosomas, el alineamiento de los mismo en la placa metafásica, en la separación de las cromátidas hermanas y en la citocinesis a través de un correcto ensamblaje de la zona media de los microtúbulos, regulando la cohesión de las cromátidas, la estabilidad del huso mitótico y en la citocinesis (Carmena *et al*, 2009). Junto con la

Survivina y la INCENP, forman el complejo de proteínas pasajeras del cromosoma (del inglés *Chromosomal Passenger Complex Proteins*, CPC), en el que cada componente del complejo depende del otro para su correcta localización y función (Ducat y Zheng, 2004). Por otro lado se ha reportado la participación de la quinasa Aurora B en la localización y actividad del complejo condensina, el cual es esencial para el mantenimiento de la integridad de los cromosomas mitóticos (Carmena y Earnshaw, 2003).

El rol de la quinasa Aurora C es menos claro pero se ha relacionado directamente con los procesos de espermatogénesis. Recientes investigaciones indican que esta quinasa estaría participando además en el complejo de proteínas pasajeras del cromosoma, superponiéndose y complementando la función de Aurora B en mitosis (Kitzen *et al*, 2010).

### **3.4 La Quinasa Aurora A:**

La proteína Aurora A es una quinasa que juega un importante rol en la organización y ensamblaje del huso mitótico, y consecuentemente en la segregación cromosómica (Asteriti *et al*, 2011).

Esta proteína tiene un tamaño de 403 aminoácidos y es codificada por el gen *AURKA*, el cual, en humanos, se localiza en la región q13 del cromosoma 20. (NCBI, 2014)

Estructuralmente, Aurora presenta un motivo de activación y una caja de destrucción (D-box). También presenta las tres A-Box presentes en la familia quinasa Aurora, sin embargo se ha identificado una nueva señal de reconocimiento en la A-Box II, que es específica para Aurora A (Katayama *et al*, 2003).

La quinasa Aurora A es regulada por múltiples proteínas (Ver Tabla 1), dependiendo de la etapa del ciclo celular (Marumoto *et al*, 2005). La proteína presenta su máxima expresión entre las fases G2 y M del ciclo celular y es inactivada o degradada cuando la célula entra en la fase G1 (Geigl J. *et al*, 2007). Se localiza en los centrosomas y en el huso mitótico (Bolaños-García, 2005)

Tabla 1. Efecto de otras proteínas sobre la quinasa Aurora A

<b>Proteína</b>	<b>Función</b>	<b>Efecto sobre Aurora A durante la interacción</b>
<b>PP1</b>	Fosfatasa	Inactivación, defosforilación
<b>RasGAP</b>	Proteína activante de GTPasa	Inactivación
<b>TPX-2</b>	Factor de reclutamiento de XKLP2-quinasina a los microtúbulos.	Activación; dirige a Aurora hacia el huso mitótico.
<b>Ajuba</b>	Proteína que contiene un dominio LIM.	Activación; regulación del inicio de la mitosis.
<b>p53</b>	Factor transcripcional; supresor de tumor.	Supresión de la actividad oncogénica
<b>Cdh-1</b>	Adaptador del complejo promotor de anafase	Destrucción de Aurora A ubiquitino-dependiente

### **3.5 Procesos en los cuales Participa la Quinasa Aurora A:**

#### 3.5.1.- Ensamblaje del huso mitótico:

Aurora A participa en la maduración del centrosoma y orienta las terminaciones proximales de los microtúbulos hacia los polos celulares, después de la fragmentación de la envoltura nuclear.

Al respecto, se ha descrito que la proteína TPX2 interactúa con la quinasa Aurora A no sólo como un sustrato sino también como un activador de esta proteína. La unión de TPX2 con Aurora A induce un cambio conformacional en esta quinasa fosforilando el dominio de activación, adoptando una posición más compacta, proveyendo una mejor plataforma de unión al sustrato y ocultando de la acción inactivadora de la PP1 al grupo fosforil activador (Bolaños-García, 2005). Si se considera que la reducción o agotamiento de TPX2 causa la formación de husos multipolares en células de mamíferos y que la reducción de la quinasa Aurora A rompe la estabilidad del huso mitótico, la interacción entre TPX2 y Aurora A surge como un importante pre requisito en la formación de un huso mitótico eficiente (Marumoto *et al*, 2005).

En el proceso de maduración del centrosoma, la fosforilación de las proteínas TACC (*Transforming Acidic Coiled-Coil proteins*) por la quinasa Aurora A facilita el reclutamiento de las TACC en los centrosomas durante la mitosis temprana, llevando a la formación de un complejo con proteínas asociadas a microtúbulos (como Msps/XMAP215), lo que promueve el crecimiento de microtúbulos (Marumoto *et al*, 2005).

### 3.5.2.- Separación del centrosoma:

En este sentido, Aurora A participa fosforilando proteínas motoras tipo quinesinas. Para establecer un huso mitótico bipolar se requiere la acción coordinada de dos proteínas motoras que generen contra fuerzas, estas son la Dineína (*minus-end*) y la Eg5 (*plus-end*). En conjunto, estas proteínas establecen una interacción anti paralela entre los microtúbulos, necesaria para mantener el balance de fuerzas que genere un marco rígido para el desplazamiento de los cromosomas (Ducat, y Zheng, 2004). Durante la prometafase, la quinasa Aurora A regula la separación del par de centriolos a través de la fosforilación de la Eg5 (Marumoto *et al*, 2005).

### 3.5.3.- Transición G2-M:

Aurora A, además de regular la maduración del centrosoma, también regula la progresión del ciclo celular, fosforilando otros productos que relocalizan la ciclina B1 en el núcleo y activando la quinasa dependiente de ciclina (Cdk1), lo que permite la entrada a mitosis. Así, la co-activación de la quinasa Aurora A y la Cdk1 en los centrosomas de la etapa G2 tardía del ciclo celular, constituye un evento temprano esencial en la progresión de las células hacia mitosis (Marumoto *et al*, 2005). A su vez, Cdk1 presenta mayor afinidad por ciclina B, a la que se une formando el complejo ciclina B-Cdk1 que posee la capacidad de fosforilar a múltiples proteínas diana durante la transición G2 a M (Wang *et al*, 2009).

Por otra parte la proteína Ajuba, identificada como un substrato y como un activador de la quinasa Aurora A, en su forma fosforilada puede unirse a la proteína Aurora A y esta interacción induce la activación de Aurora A en los

centrosomas en la etapa G2 tardía (Marumoto *et al*, 2005). La interacción entre Ajuba y Aurora es esencial para el reclutamiento del complejo B-Cdk1 en el centrosoma por lo que constituye un paso crucial en el progreso de las células a mitosis (Ikezoe, 2008).

Sin embargo existen evidencias que indican que la quinasa Aurora A trabaja en forma dosis dependiente, donde su sobre expresión acelera la progresión G2/M, mientras que su disminución retrasa, pero no bloquea, el paso a mitosis (Barr y Gergely, 2007).

#### 3.5.4.- Proceso de Citocinesis:

El tiempo correcto de activación y la subsecuente inactivación de la quinasa Aurora A es requerido para una citocinesis adecuada.

Al respecto, se ha propuesto que la desfosforilación de los sustratos específicos de Aurora A sería necesaria para completar la citocinesis. Así, se ha demostrado que tanto la inhibición como la sobre activación de Aurora A generan fallas en la citocinesis, resultando en la formación de células multinucleadas (Marumoto *et al*, 2005).

### **3.6 Sobre Expresión de la Quinasa Aurora A en Cáncer:**

El proceso de división celular debe ocurrir con una alta fidelidad, para mantener el contenido cromosómico diploide en la progenie (Vader *et al*, 2008). La progresión y ejecución de la mitosis está bajo un estricto control de una serie de proteínas, entre ellas las quinasas Aurora, sin embargo, algunas células alteradas pueden superar

estos controles y a su vez transmitir estas alteraciones a las células hijas, acumulándose en el genoma del individuo hasta alcanzar fenotipos que se expresen como patologías tales como el cáncer.

En humanos, la región de localización del gen AURKA (20q13) es considerada un punto caliente (*hot spot*) en el genoma, dado su frecuente amplificación en muchos tipos de cánceres humanos (tumores malignos sólidos como el de mama, pulmón, cabeza y cuello, colon, y tumores hematológicos) (Katayama *et al*, 2003). Debido a la sobre expresión o sobre activación de la proteína Aurora A, se inducen anomalías en el checkpoint mitótico, causando un incremento en el número de centrosomas y aneuploidías. Esto impide la formación del huso mitótico, y produce la fragmentación de los polos, lo que puede conducir a fallas en la segregación cromosómica, promoviendo la inestabilidad cromosómica y genómica (Asteriti *et al*, 2011).

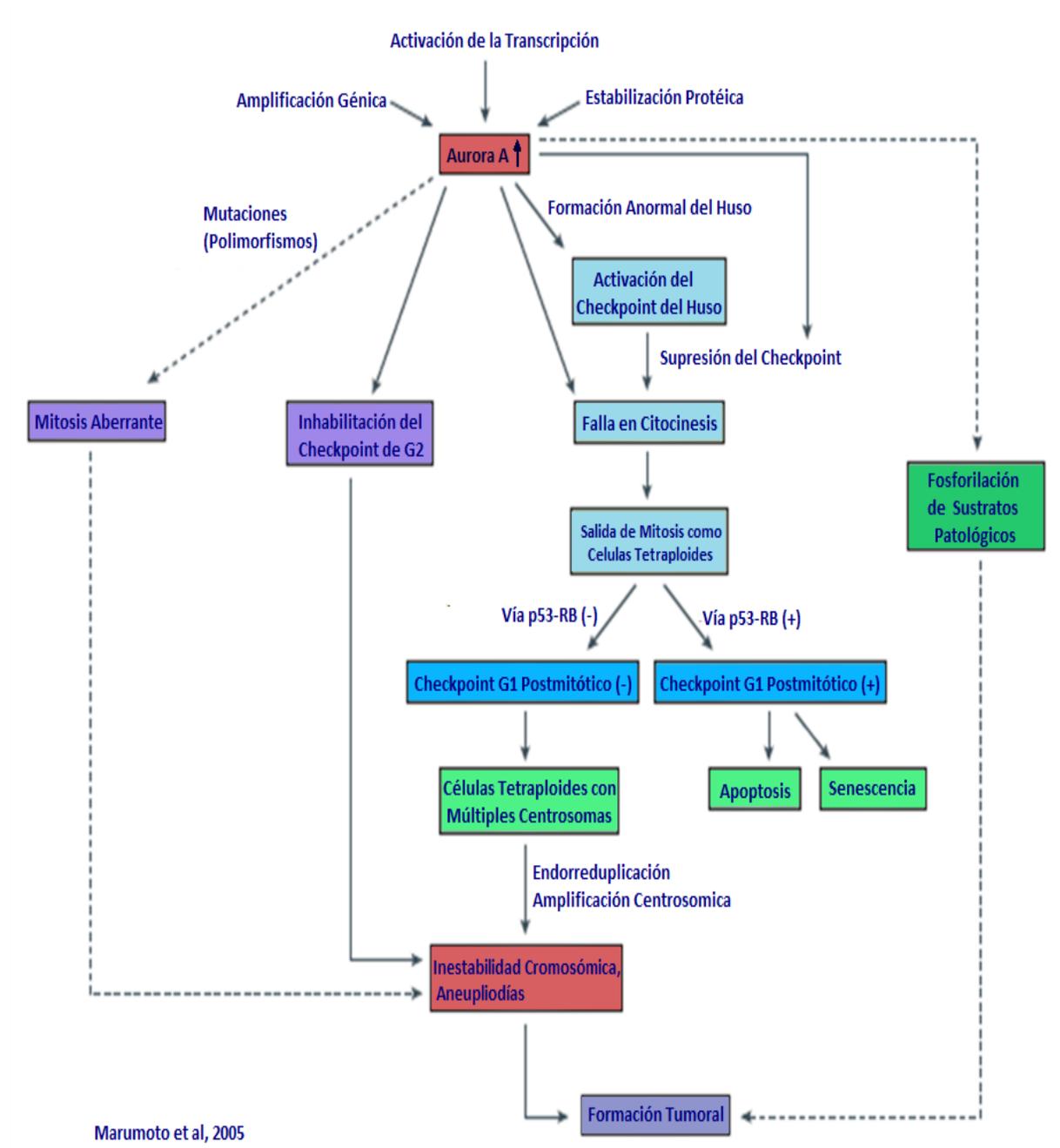
Por otra parte, se ha demostrado a través de una serie de estudios preclínicos que la sobreexpresión ectópica de Aurora A induce la transformación oncogénica de las células en humanos y ratones, tanto *in vitro* como *in vivo* (Mountzios *et al*, 2008). Esta sobre expresión está asociada con tumores poco diferenciados, de pobre pronóstico e inestabilidad genómica. Cabe destacar que la sobreexpresión de Aurora A genera un incremento en la degradación de p53, lo que facilita la transformación oncogénica (Boss *et al*, 2009). En células con la señalización p53-RB (p53-proteína de Retinoblastoma) intacta, la tetraploidía activa el *checkpoint* post mitótico en G1 llevando a la apoptosis o senescencia celular. El aumento de la degradación de p53

genera entonces una falla en esta vía, por lo que las células tetraploides tienden a amplificar los centrosomas lo que conduce a inestabilidad genómica.

Existe un amplio rango de mecanismos mediante los cuales la sobreexpresión de Aurora A podría estar promoviendo la tumorigénesis. De acuerdo con el modelo propuesto por Marumoto y colaboradores (2005), que se resume en la Figura 1, el incremento en los niveles de esta proteína, por amplificación génica, activación transcripcional o estabilización proteica (supresión de su degradación), inducen la formación anormal del huso mitótico y fallas en la citocinesis. En células normales las alteraciones en la formación del huso activan el *checkpoint* de éste, llevando a las células a una detención transiente de su paso a metafase. Sin embargo la sobreexpresión de esta quinasa determina que las células superen dicho *checkpoint*, lo cual implica la inhibición de la citocinesis, y en consecuencia la formación de células tetraploides.

Marumoto y colaboradores (2005) también proponen vías especulativas (Figura 1, líneas punteadas) donde la sobreexpresión de formas mutantes de Aurora A y la fosforilación de otros sustratos (como proteínas citoplasmáticas, o proteínas que se expresan en otras fases del ciclo celular), también pueden inducir tumorigénesis.

Figura 1.- Diagrama que ilustra el modelo de predicción de la tumorigénesis causada por la sobreexpresión de Aurora A



### **3.7 Inhibidores de la Quinasa Aurora A: Sus efectos en Células Cancerosas:**

Las múltiples evidencias que relacionan la sobreexpresión o amplificación de la quinasa Aurora A con la transformación oncogénica, ha llevado al desarrollo de inhibidores de esta proteína, como alternativa terapéutica oncológica. Muchas de estos compuestos son específicos para cada miembro de la familia de las quinasas Aurora (Mountzios *et al*, 2008). Sin embargo, existen evidencias contradictorias acerca de la relación de la sobre expresión de la quinasa Aurora B con el proceso de tumorigénesis, mientras que para Aurora C, no se ha sugerido ningún papel (Boss *et al*, 2009). Muchos de estos compuestos han sido estudiados *in vivo* e *in vitro*, con resultados pre-clínicos promisorios y actualmente están en fase I y II de los estudios clínicos. (Boss *et al*, 2009).

Dadas las funciones descritas de la Aurora A, los inhibidores de esta quinasa alteran la progresión de la mitosis, generan la incorrecta separación de los centriolos, desalinean los cromosomas, forman husos mitóticos anormales y producen detención en G2, lo que conduciría a la muerte de la célula cancerígena por apoptosis (Boss *et al*, 2009).

El primer inhibidor que se desarrolló fue el ZM447439, originalmente se probó *in vitro* que inhibía tanto a Aurora A como a Aurora B, sin embargo estudios posteriores confirmaron que *in vivo* inhibía más a Aurora B que A. Este corresponde a un inhibidor de primera generación (Katayama y Sen, 2010). Hesperadin fue el primer inhibidor probado para Aurora B; utiliza valores de inhibición constantes de > 200  $\mu\text{M}$  *in vitro* (Ikezoe, 2008).

Otro potente inhibidor de primera generación de las quinasas Aurora fue VX-680 (antes conocido como MK-0457). Este compuesto mostró una selectividad más de 100 veces mayor para las proteínas Aurora A, B y C, que otras 55 quinasas probadas *in vitro*. El VX-680 inhibe la fosforilación de la histona H3 en serina 10 (un blanco fisiológico de Aurora B) y causa acumulación de células con contenido cromosómico 4n, lo que refleja la inhibición de Aurora B. (Kitzen *et al*, 2010).

Recientemente han surgido inhibidores de segunda generación, como el MLN8054 y el MLN8237 (producidos por Millenium), con mayor especificidad y selectividad para inhibir la Aurora A. Ambos son ATP-competitivos y reversibles, aproximadamente 40 a 200 veces más efectivos sobre Aurora A que sobre Aurora B (Katayama y Sen, 2010). Su actividad anti cancerígena está acompañada con aneuploidías y muerte celular (Kitzen *et al*, 2010).

El MLN8054 es el primer inhibidor de Aurora A disponible en formulación oral. El tratamiento de células *in vitro* con este compuesto induce a la acumulación de células en G2-M, defectos en el huso mitótico, mal alineamiento de cromosomas en metafase y de la migración de cromosomas en anafase, resultando en aneuploidías y apoptosis (Kitzen *et al*, 2010). Este compuesto se encontraba en fase I de experimentación clínica, sin embargo en la actualidad estos estudios clínicos están descontinuados (Dar *et al*, 2010).

MLN8237 es un inhibidor de desarrollo más reciente. Su función inhibidora está asociada con anomalías del huso mitótico, acumulación de células en mitosis, poliploidía y apoptosis; está disponible en formulación oral y es rápidamente absorbible. Se ha descrito que puede ser más potente que MLN8054 y con menos efectos secundarios (Kitzen *et al*, 2010); su estatus clínico permanece en Fase II (Dar *et al*, 2010).

En estudios recientes se evaluó el efecto antitumoral del inhibidor MLN8237 en un modelo murino de mieloma múltiple, los cuales mostraron una reducción significativa de la carga tumoral y un aumento en la supervivencia de los animales tratados con 30mg/kg de MLN8237 por 21 días; además se confirmó inducción de apoptosis y muerte celular por MLN8237, lo que sugiere que este inhibidor puede ser un nuevo y prometedor agente orientado a la terapia del mieloma múltiple (Gorgun *et al*, 2010).

Considerando que los efectos del inhibidor pueden ser influenciados por múltiples factores, como la variación en la expresión de la proteína misma o de los substratos en los diferentes tumores, aún hay muchos factores esperando ser identificados ya que de estos factores puede depender la efectividad de cada inhibidor (Katayama y Sen, 2010).

Visto lo anterior, las interacciones de los inhibidores con otros compuestos pueden aumentar o disminuir la acción del inhibidor. Tal es el caso descrito por Qi y colaboradores (2011) donde se demuestra que, tanto el inhibidor MLN8237 como el Docetaxel cumplen en forma independiente la característica de presentar una

actividad anti-tumoral modesta, cuando se administran en forma individual; pero los resultados además sugieren que el uso del MLN8237 más el Docetaxel muestran un aumento estadísticamente significativo con respecto a la inhibición del crecimiento tumoral, un aumento en la apoptosis y un incremento en la supervivencia del individuo, con respecto a la terapia con un solo agente.

Dada la numerosa evidencia que muestra un aumento en la expresión del gen *AURKA* en diversos tipos tumorales y los promisorios resultados obtenidos del uso de inhibidores de la proteína quinasa Aurora A solos o como terapia co-adyuvante en diversos estudios clínicos fase II (CT, 2014), es esperable que estos inhibidores se encuentren prontamente disponibles para su uso aprobado en pacientes afectados de distintos tipos de cáncer.

Si bien los estudios fase *in vitro* y en animales muestran un efecto esperado con respecto a la inducción de aneuploidías y muerte celular con el uso de estos inhibidores, a la fecha no existen estudios que muestren el efecto que el uso de estos inhibidores pudiese tener en las células no tumorales del individuo y, en particular, en los linfocitos que sobrevivan a la muerte celular inducida por el inhibidor.

En la presente investigación se evaluó el efecto de MLN8237, inhibidor de la quinasa Aurora A, en linfocitos proliferantes provenientes de individuos sanos. El impacto se verificó evaluando el índice de muerte celular y la presencia de inestabilidad cromosómica (numérica y estructural).

#### **4. HIPOTESIS**

**H<sub>1</sub>** En linfocitos humanos normales proliferantes, la inhibición de la quinasa Aurora A, mediante el tratamiento con MLN8237, produce un incremento en la apoptosis y en la frecuencia de células con alteraciones cromosómicas.

**H<sub>0</sub>** En linfocitos humanos normales proliferantes, la inhibición de la quinasa Aurora A, mediante el tratamiento con MLN8237, no produce incremento en la apoptosis, ni en la frecuencia de células con alteraciones cromosómicas.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto del inhibidor de la quinasa Aurora A, MLN8237, sobre la viabilidad celular y la frecuencia de daño cromosómico estructural y de número, en cultivos de linfocitos de sangre periférica provenientes de individuos sanos.

### **5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Estimar el porcentaje de muerte celular inducida por concentraciones crecientes del inhibidor MLN8237, durante distintos tiempos de exposición, en linfocitos cultivados *in vitro*, provenientes de individuos sanos.

2. Determinar el efecto de la inhibición de la quinasa Aurora A, mediante el tratamiento con MLN8237, sobre la frecuencia de metafases con anomalías cromosómicas numéricas, en linfocitos cultivados *in vitro*, provenientes de individuos sanos.

3. Determinar el efecto de la inhibición de la quinasa Aurora A, mediante el tratamiento con MLN8237, sobre la frecuencia de metafases con anomalías cromosómicas estructurales, en linfocitos cultivados *in vitro*, provenientes de individuos sanos.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Muestras y Material de Estudio:

Se utilizaron muestras de 10 ml de sangre periférica, de 8 individuos voluntarios sanos de entre 20 y 45 años, de ambos sexos, a los cuales se les solicitó completar y firmar el respectivo consentimiento informado (Anexo 1).

El tamaño muestral se calculó considerando como significativa una diferencia de un 25% entre los cuatro grupos experimentales (basado en resultados preliminares), con un  $\alpha=0,05$  y  $\beta=0,2$  para un test de análisis de varianza a un factor (*ANOVA one way*) (ver 6.4, análisis estadístico).

Los voluntarios se pesquisaron entre estudiantes, académicos y funcionarios de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Las muestras fueron tomadas por un profesional de la salud con certificación y experiencia en la toma de muestras sanguíneas. El lugar en que se llevó a cabo el muestreo contaba con los requerimientos necesarios para ofrecer los primeros auxilios y el cuidado de los individuos a muestrear, en caso de ser requerido. Por cada individuo se obtuvo una muestra de sangre, con jeringa estéril y heparinizada.

Esta muestra fue dividida en 2 fracciones: una fracción de 5 ml se utilizó para establecer 12 cultivos de plasma rico en leucocitos, y la fracción restante (5 ml) fue utilizada en el establecimiento de 12 cultivos de sangre total (Anexo 2).

## **6.2 Métodos:**

### *6.2.1 Cultivo de Linfocitos Humanos a partir de la Fracción de Plasma Rico en Leucocitos:*

Para separar la fracción de plasma rico en leucocitos, la jeringa con 5 ml de sangre venosa de cada dador se dejó reposando en posición vertical en la cámara de cultivo a temperatura ambiente por dos horas, a manera de decantar la muestra. Una vez separada la capa de plasma con leucocitos, ésta se traspasó desde la jeringa a un tubo estéril, con la punta de la jeringa incurvada y sin cambiar drásticamente la posición de la jeringa. Para cada cultivo se sembraron 0,3 ml de la suspensión de plasma, en 5ml de medio de cultivo completo RPMI-1640, suplementado con suero fetal bovino 20%, fitohemaglutinina (GIBCO) 2% y antibiótico Penicilina/Estreptomicina (GIBCO) 0,5%. La muestra de cada dador se distribuyó en 12 cultivos y fueron incubados a 37°C; 4 cultivos se incubaron durante 72 horas, 4 cultivos durante 96 horas y los 4 cultivos restantes durante 120 horas. Esta técnica se desarrolló de acuerdo al protocolo estandarizado, propuesto por Moorhead y colaboradores (1960).

### *6.2.2 Cultivo de Linfocitos a Partir de Sangre Total y Obtención de Cromosomas Metafásicos:*

Para la obtención de cromosomas metafásicos se establecieron 12 tubos de cultivos de sangre total, por cada individuo de la muestra. En cada tubo se sembraron 0,4 ml de sangre total periférica, en 5ml de medio de cultivo completo RPMI-1640, suplementado con suero fetal bovino 20%, fitohemaglutinina (GIBCO) 2% y antibiótico Penicilina/Estreptomicina (GIBCO) 0,5%. Estos cultivos se dividieron en 3

grupos de 4 tubos, los cuales serán procesados a las 72, 96 y 120 horas. Tres horas antes de finalizar los ciclos de incubación, a cada tubo de cultivo se le agregó Colcemide 0,2 µg/ml (Karyomax), con la finalidad de detener la división celular en mitosis y acumular una mayor cantidad de células en metafase para el análisis.

Al término de cada ciclo de incubación, los tubos de cultivo se centrifugaron a 800 rpm por 6 minutos, y se eliminó el sobrenadante, dejando 0,3 a 0,5 ml. Después se agregaron 5 ml de KCl 0,075M directamente, agitando con el *vórtex* y se dejaron por 6 minutos a 37°C. Se centrifugó nuevamente a 800 rpm por 12 minutos, se eliminó el sobrenadante dejando aproximadamente 0,3 ml. A continuación se soltó el sedimento con el *vórtex* y se fijó agregando 5 ml de Metanol - Ácido acético (3:1), el que se agregó de 1 ml por vez, agitando brevemente con el *vórtex*. Se dejó reposar a 4°C hasta el día siguiente. Posteriormente se centrifugó a 800 rpm por 6 minutos y se lavó con el fijador dos veces más.

Una vez listas las muestras, se controló la cantidad y calidad de la muestra, verificando la densidad y fijación de la misma con microscopio de contraste de fase.

Completado el proceso anterior, se preparó el material dejando caer una o dos gotas de la suspensión de células en portaobjetos limpios y se dejaron secar al aire por 2 – 3 días. Una vez secos, cada preparado se tiñó con Giemsa al 4% de tampón fosfato pH 6,8 (buffer Sörensen), durante 18 – 20 minutos, dejando secar por 3 días y cubriendo definitivamente con cubre objetos, utilizando Entellan (Merck) como adhesivo. Se elaboraron 4 preparados de cada cultivo.

Para cada muestra se observaron y analizaron 50 - 100 metafases bien esparcidas bajo microscopio de luz, con objetivo de 100X y en presencia de aceite de inmersión, cuantificando el número de cromosomas y las aberraciones cromosómicas estructurales presentes en cada metafase.

### *6.2.3 Estimación del Porcentaje de Apoptosis mediante la Determinación y Cuantificación de DNA por Citometría de Flujo:*

Para cada una de las determinaciones, una fracción de los cultivos de plasma rico en linfocitos se sometió a centrifugación y lavado con PBS en frío, para luego ser fijadas con etanol al 80% y almacenadas a -20°C durante toda la noche. Después de 1 a 4 días, las células fijadas se centrifugaron en frío a 3.000 rpm por 10 minutos y se lavaron con PBS mediante centrifugación. Posteriormente, el precipitado se resuspendió en 700 µl de solución de tinción de ioduro de propidio (PI) 50 µg/ml, en presencia de RNasa 10 µg/ml (DNase-free RNase), Citrato de Sodio 0,1 % y NP- 40 0,1 %. Las muestras se incubaron a 37°C por 30 minutos y finalmente se traspasaron a tubos para citometría, para su respectiva lectura.

Los perfiles de contenido de DNA de cada cultivo se determinaron en un citómetro de flujo FACScanto (BD Bioscience, CA). Se analizaron entre 10.000 y 30.000 células linfocíticas por cultivo. Los resultados se analizaron utilizando el programa Flowing Software, versión 2.5 (Perttu Terho, Turku Centre for Biotechnology, University of Turku y la Åbo Akademi University, Finlandia) (Flowing Software, 2013)

### 6.3 Diseños Experimentales:

#### 6.3.1 Concentraciones y Tiempo de Exposición en que el Inhibidor de la Quinasa Aurora A, MLN8237, Induce a Apoptosis en Linfocitos Normales:

Con este diseño experimental se alcanzó el Objetivo 1, determinando las concentraciones del inhibidor MLN8237 y los tiempos de exposición al inhibidor, que inducen a apoptosis en linfocitos de sangre periférica de individuos sanos. Para esto se cultivaron los linfocitos de cada dador a diferentes tiempos (72, 96 y 120 horas), agregando el MLN8237 al inicio de cada cultivo, a concentraciones de 0,1, 0,5 y 1  $\mu\text{M}$  (Ver Protocolo 1). Para establecer estas concentraciones, fueron considerados los datos encontrados en la literatura (Qi *et al*, 2011) y aquellos utilizados en ensayos preliminares en el laboratorio.

#### **Protocolo 1.- Tratamiento *in vitro* de linfocitos, con MLN8237, para el análisis de apoptosis y aberraciones cromosómicas**

Tubo	Tratamiento	Concentración de MLN8237	Tiempo de Incubación
1	DMSO (Control)	0,0 $\mu\text{M}$	72 horas
2	MLN8237	0,1 $\mu\text{M}$	72 horas
3	MLN8237	0,5 $\mu\text{M}$	72 horas
4	MLN8237	1,0 $\mu\text{M}$	72 horas
5	DMSO (Control)	0,0 $\mu\text{M}$	96 horas
6	MLN8237	0,1 $\mu\text{M}$	96 horas
7	MLN8237	0,5 $\mu\text{M}$	96 horas
8	MLN8237	1,0 $\mu\text{M}$	96 horas
9	DMSO (Control)	0,0 $\mu\text{M}$	120 horas
10	MLN8237	0,1 $\mu\text{M}$	120 horas
11	MLN8237	0,5 $\mu\text{M}$	120 horas
12	MLN8237	1,0 $\mu\text{M}$	120 horas

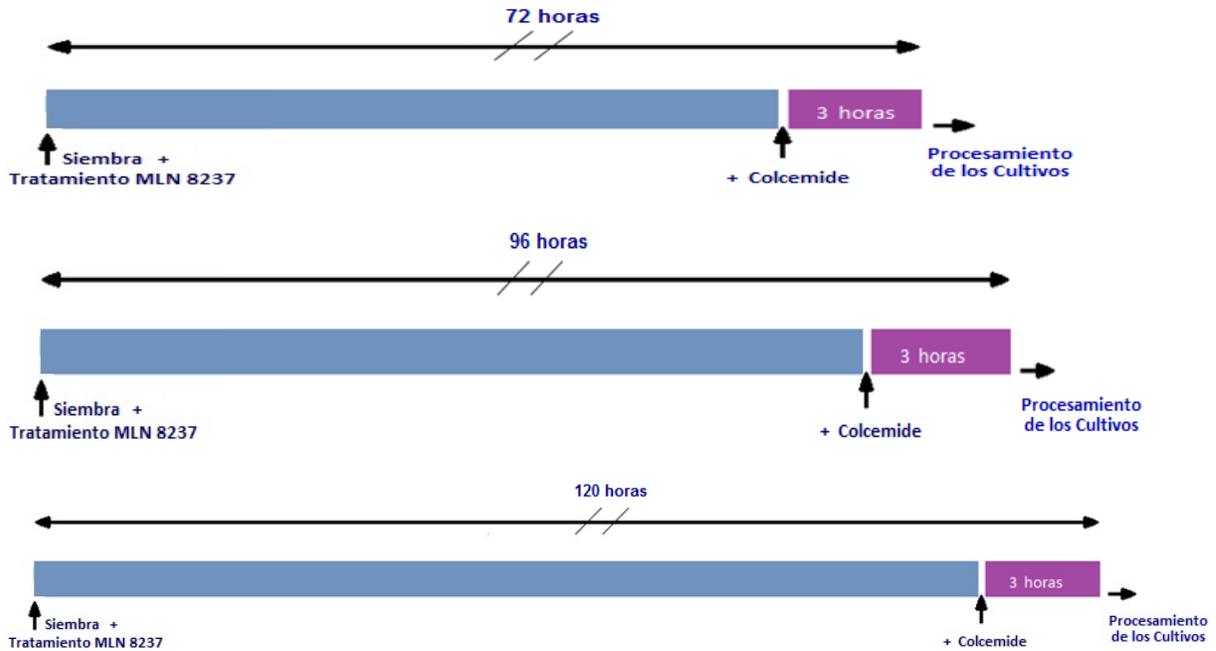
Luego de transcurrido el tiempo de incubación de cada cultivo, se evaluó la apoptosis celular mediante la cuantificación de DNA por citometría de flujo. El porcentaje de células con contenido de DNA  $<2n$  (hipodiploide o sub-G1) fue considerado como células apoptóticas, según técnica descrita en 6.2.3.

*6.3.2.- Efecto de la Inhibición de la Quinasa Aurora A en la Frecuencia de Metafases con Anomalías Cromosómicas, mediante el tratamiento con el Inhibidor MLN8237 :*

Para el logro de los Objetivos 2 y 3, se determinó el efecto de la inhibición de la quinasa Aurora A, mediante el tratamiento con MLN8237, sobre la estabilidad cromosómica en linfocitos de sangre periférica cultivados *in vitro*, provenientes de individuos sanos. Para esto se cultivaron linfocitos de sangre periférica en ciclos de 72, 96 y 120 horas. Como tratamiento para las células se agregó el inhibidor al inicio de cada ciclo de incubación, a las diferentes concentraciones incluidas en el rango que el inhibidor produce apoptosis, datos que se obtuvieron al completar el Objetivo 1 (Ver Protocolo 1 y Figura 2).

Como control negativo, se incluyó en cada tiempo, un tubo con el vehículo del inhibidor, DMSO 0,05%. Posterior al tiempo de incubación y procesamiento de los cultivos se cuantificaron las alteraciones cromosómicas observadas en un mínimo de 50 - 100 metafases por cultivo celular. Para esto se estimó la frecuencia de: (i) alteraciones cromosómicas numéricas (aneuploidías y euploidías), y (ii) alteraciones cromosómicas estructurales (fracturas cromosómicas, fracturas cromatídicas, gaps y anillos).

**Figura 2.- Esquema del protocolo a utilizar para el cultivo de sangre total**



#### 6.4 Análisis Estadístico:

Para cada tiempo de incubación, se comparó el promedio de apoptosis y de aberraciones cromosómicas obtenidos con las diferentes concentraciones del inhibidor, en relación al control sin tratamiento, y entre las diferentes concentraciones entre sí, utilizando el test de análisis de varianza a un factor, (*ANOVA one way*), y *post test* de Tukey. Se realizó un análisis de regresión lineal para evaluar la relación lineal entre el índice de apoptosis y las distintas concentraciones y tiempos de incubación con el inhibidor.

Se utilizó el Software GraphPAD Prism, versión 5.4 para Windows (*GraphPad Software Inc, La Jolla, CA.*); y se consideraron valores significativos aquellos con  $p < 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Estimación del Porcentaje de Apoptosis de Linfocitos Proliferantes, Inducida por el Inhibidor de la Aurora Quinasa A, MLN8237:

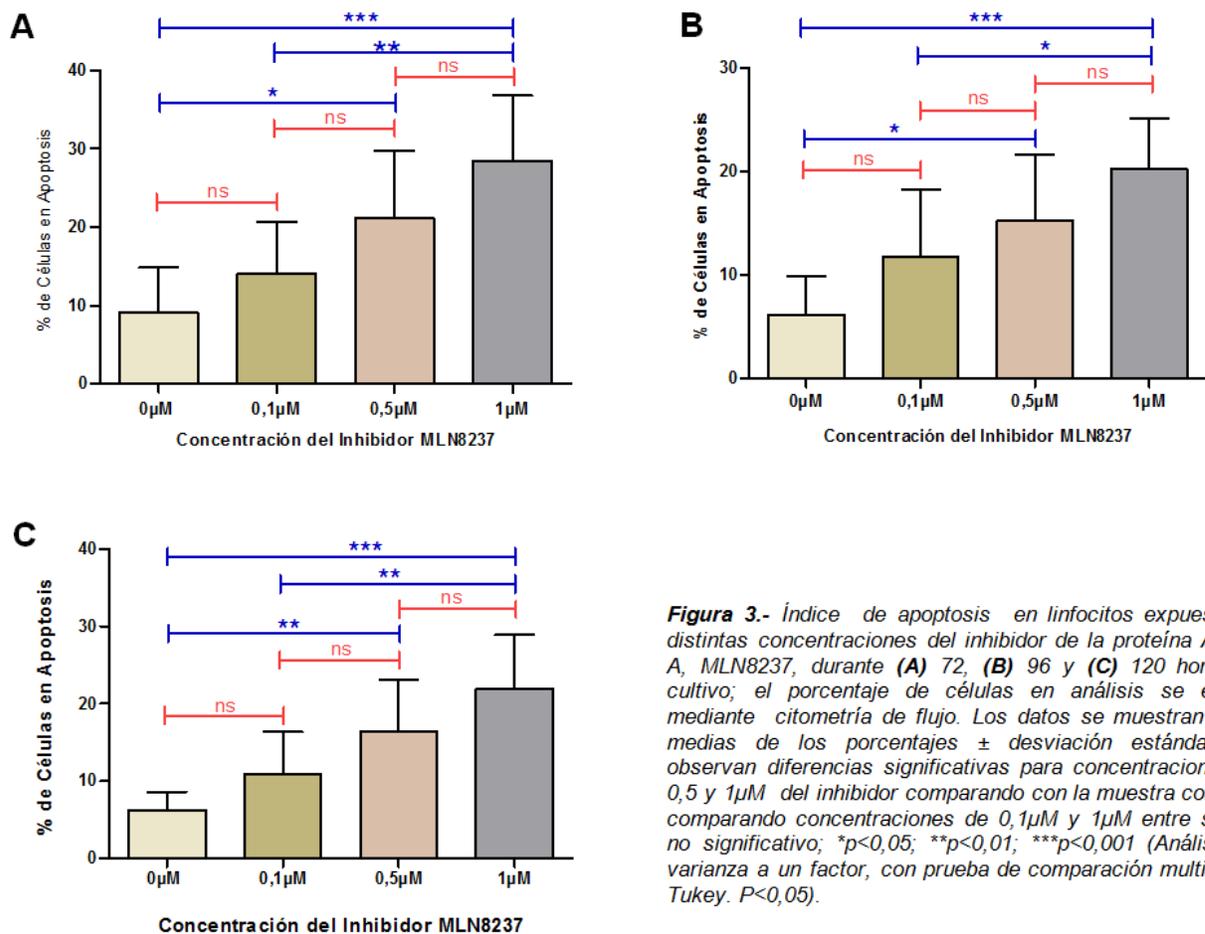
Para determinar el efecto de MLN8237 sobre la viabilidad celular, los linfocitos de sangre periférica proveniente de 8 individuos sanos, fueron cultivados *in vitro* en presencia del inhibidor a diferentes concentraciones. El índice de muerte celular se estimó mediante la cuantificación del contenido de DNA de la población sub G1 (hipodiploide) del ciclo celular, a través de citometría de flujo (Figuras 1a-c, Anexo 3).

Inicialmente se propuso realizar el estudio a las 48, 72 y 96 horas de incubación con el inhibidor. Sin embargo, al evaluar la muerte celular a las 48 horas de incubación, se encontró que en ese periodo de tiempo aún no era evidente el efecto del inhibidor. Por esta razón, los tiempos de incubación fueron modificados a 72, 96 y 120h. A las 120 horas, los cultivos sin tratamiento aún fueron viables y presentaron altos índices mitóticos.

#### 7.1.1 Índice de Apoptosis Inducida por Concentraciones Crecientes del Inhibidor:

Los resultados obtenidos de la cuantificación del contenido de DNA de la población sub G1, indican que las células cultivadas por 72 horas en presencia de MLN8237 0,1 $\mu$ M, presentaron un porcentaje promedio de muerte celular de un 14%. A concentraciones de 0,5 $\mu$ M y 1 $\mu$ M, la muerte celular fue de 21 y 29%, respectivamente (Figura 3a).

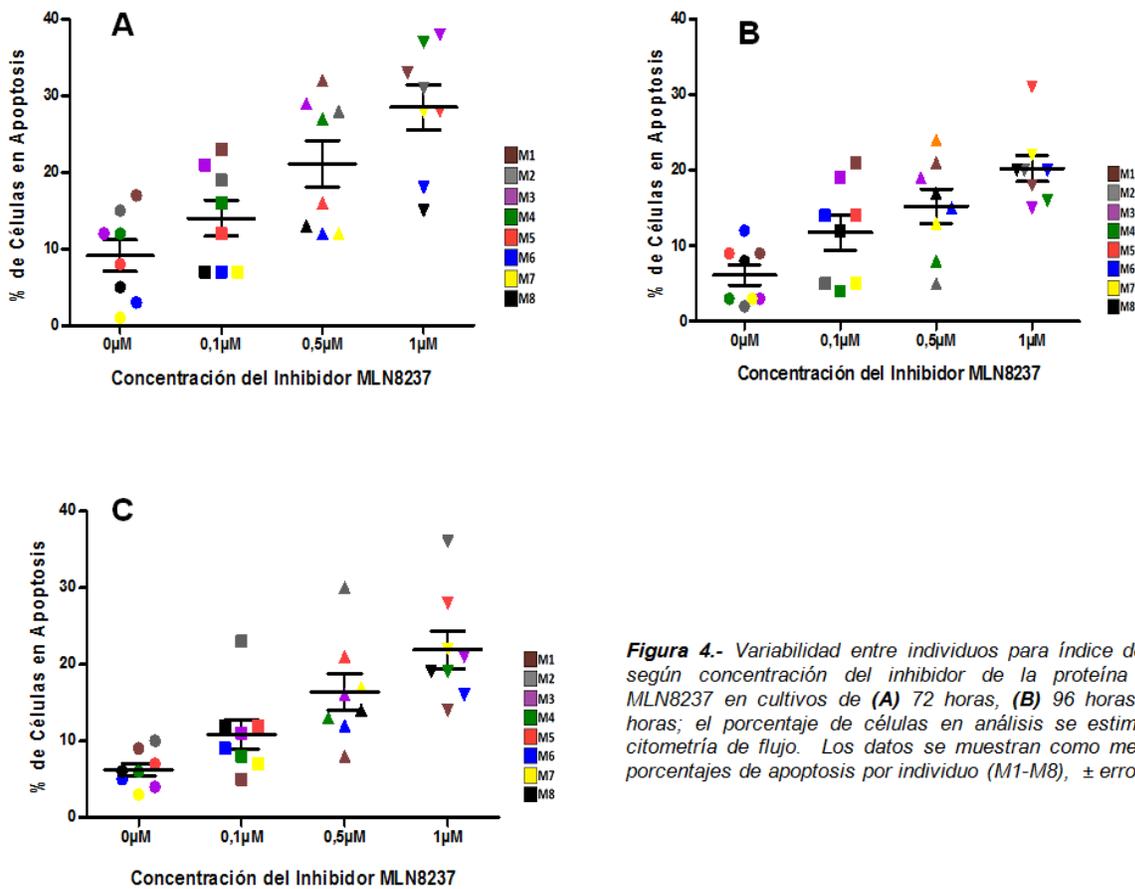
La misma tendencia se presenta en células cultivadas por 96 y 120 horas. Para cultivos de 96 horas, a concentraciones de 0,1 y 0,5 $\mu$ M, el porcentaje promedio de muerte celular fue de 12% y 15% respectivamente, mientras que para 1 $\mu$ M este valor fue de un 20% (Figura 3b). Para cultivos de 120 horas, a concentraciones de 0,1 y 0,5 $\mu$ M, el porcentaje promedio de muerte celular fue de 11% y 16% respectivamente. En tanto, para 1 $\mu$ M este valor fue de un 22% (Figura 3c).



Lo anterior muestra que la muerte celular tiende a incrementar, a medida que se incrementan las concentraciones del inhibidor en los tres tiempos de cultivo, sin embargo este aumento fue estadísticamente significativo sólo para concentraciones

de 0,5 y 1 $\mu$ M con respecto a las muestras control; también aparece significativo el aumento en el porcentaje de muerte celular entre concentraciones de 0,1 a 1 $\mu$ M, comparadas entre sí (Ver análisis estadístico en Anexo 4, Tablas 1-3)

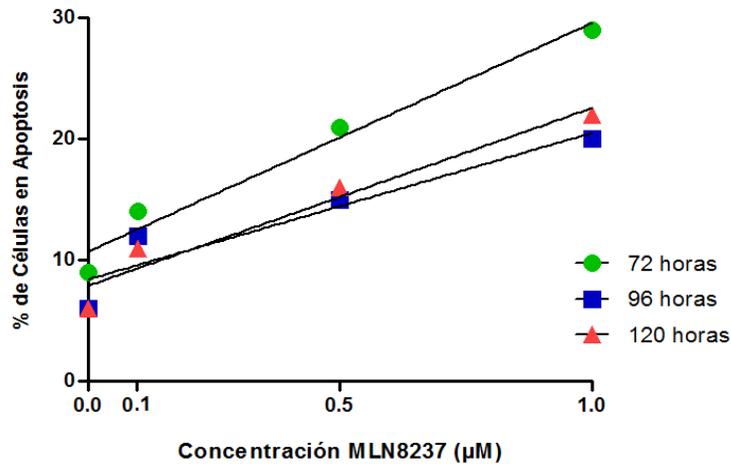
La ausencia de diferencias estadísticamente significativas puede obedecer a la variabilidad entre individuos. Esta variabilidad entre individuos, para muerte celular, se muestra en la Figura 4, en las cuales se observa la dispersión de los datos individuales según concentración del inhibidor a las distintas horas de cultivo.



**Figura 4.-** Variabilidad entre individuos para índice de apoptosis según concentración del inhibidor de la proteína Aurora A, MLN8237 en cultivos de (A) 72 horas, (B) 96 horas y (C) 120 horas; el porcentaje de células en análisis se estimó mediante citometría de flujo. Los datos se muestran como medias de los porcentajes de apoptosis por individuo (M1-M8),  $\pm$  error estándar.

Además, se realizó una análisis de regresión lineal comparando las medias del porcentaje de muerte celular en las distintas concentraciones del inhibidor MLN8237 (Figura 5), lo que mostró una relación lineal entre las concentraciones del inhibidor y

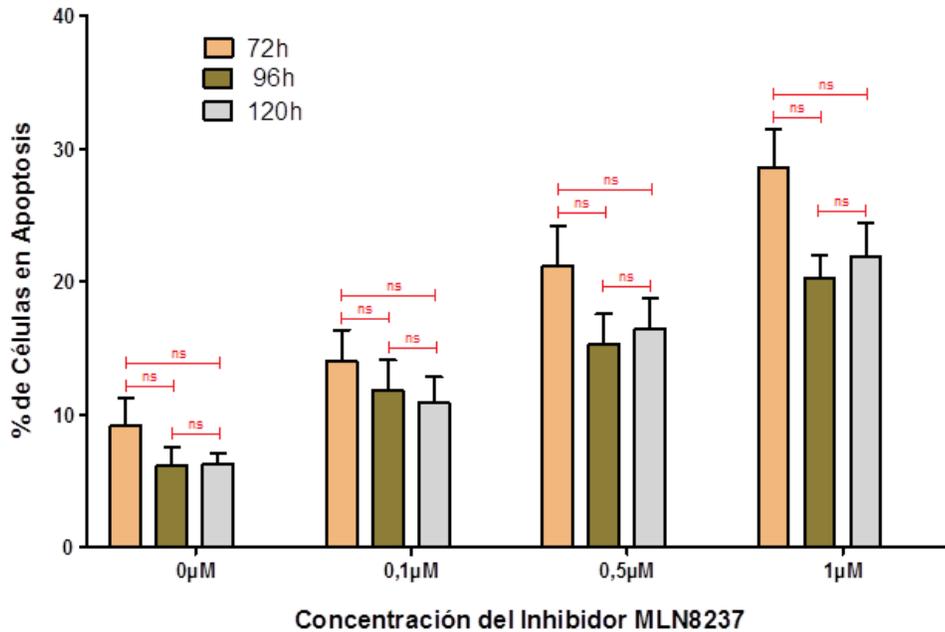
el porcentaje de apoptosis (72 horas:  $r^2=1$  y  $p=0,0132$ ; 96 horas:  $r^2=0,9$  y  $p=0,0603$ ; 120 horas:  $r^2=0,9$  y  $p=0,0259$ )



**Figura 5.-** Análisis de regresión lineal entre porcentaje de células en apoptosis de linfocitos proliferantes tratados y distintas concentraciones del inhibidor MLN8237; el porcentaje de células en análisis se estimó mediante citometría de flujo. Se observa relación lineal entre muerte celular y concentración del inhibidor. (72 horas:  $r^2=1$  y  $p=0,0132$ ; 96 horas:  $r^2=0,9$  y  $p=0,0603$ ; 120 horas:  $r^2=0,9$  y  $p=0,0259$ )

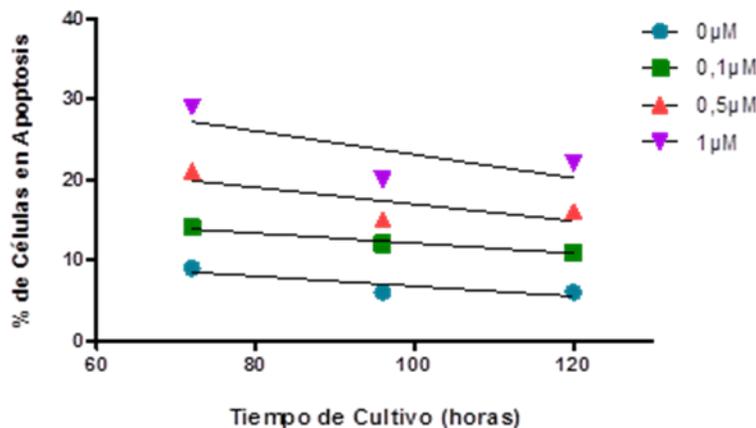
### 7.1.2 Efecto del Tiempo de Incubación sobre la Apoptosis de Linfocitos Proliferantes, Tratados con el Inhibidor de la Aurora Quinasa A, MLN8237:

Al hacer una comparación de los datos de porcentaje de muerte celular entre los diferentes tiempos de cultivo (72, 96 y 120 horas), se puede observar que, hay variación entre los porcentajes de apoptosis, según concentración del inhibidor, y los diferentes tiempos de cultivo, sin embargo estas diferencias no son estadísticamente significativas (Figura 6).



**Figura 6.-** Apoptosis en linfocitos expuestos a diferentes concentraciones del inhibidor de la proteína Aurora A, MLN8237, por distintos períodos de tiempo; el porcentaje de células en análisis se estimó mediante citometría de flujo. Los datos se muestran como medias  $\pm$  error estándar. No se observaron diferencias significativas. ns, no significativo; (Análisis de varianza con prueba de comparación múltiple de Tukey.  $P > 0,05$ ).

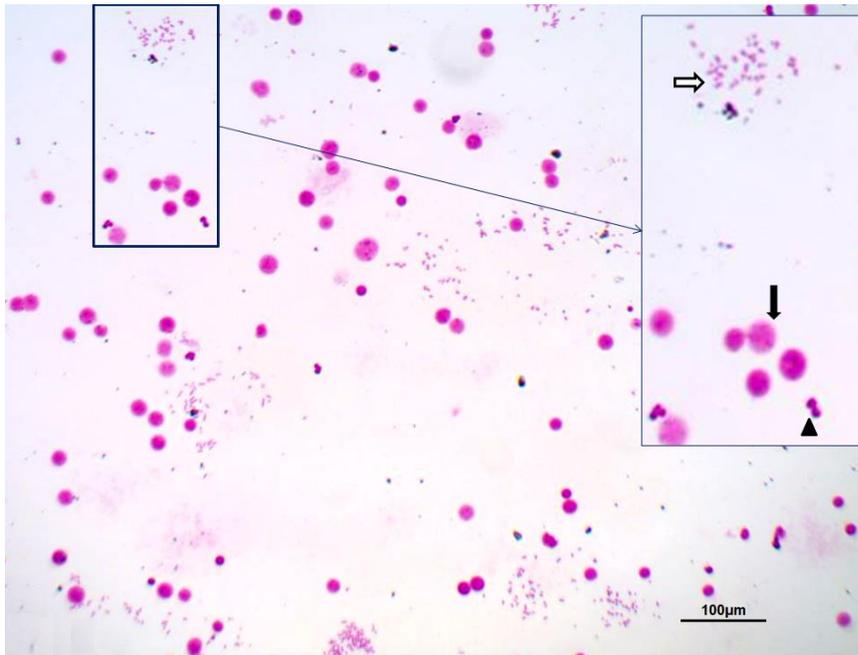
Así mismo, no se encontró una relación lineal entre el porcentaje promedio de muerte celular y los tiempos de cultivo (Figura 7) ( $0\mu\text{M}$ :  $r^2=0,8$  y  $p=0,3333$ ;  $0,1\mu\text{M}$ :  $r^2=1$  y  $p=0,1210$ ;  $0,5\mu\text{M}$ :  $r^2=0,6$  y  $p=0,4328$ ;  $1\mu\text{M}$ :  $r^2=0,5$  y  $p=0,4691$ )



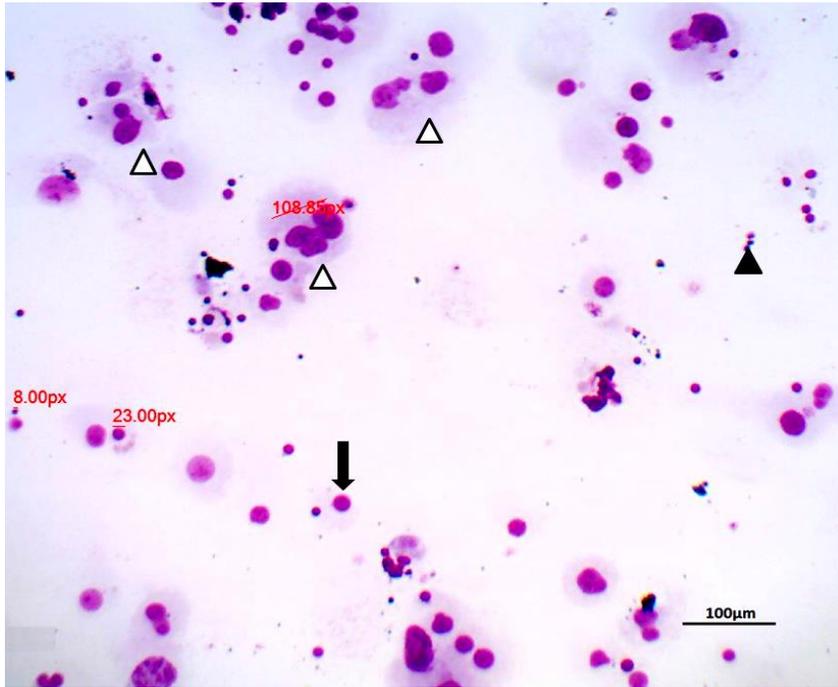
**Figura 7.-** Análisis de regresión lineal entre porcentaje de células en apoptosis de linfocitos proliferantes tratados con el inhibidor MLN8237, y los diferentes tiempos de cultivo; el porcentaje de células en análisis se estimó mediante citometría de flujo. No se observa relación lineal entre las dos variables. ( $0\mu\text{M}$ :  $r^2=0,8$  y  $p=0,3333$ ;  $0,1\mu\text{M}$ :  $r^2=1$  y  $p=0,1210$ ;  $0,5\mu\text{M}$ :  $r^2=0,6$  y  $p=0,4328$ ;  $1\mu\text{M}$ :  $r^2=0,5$  y  $p=0,4691$ )

### 7.1.3 Tipos de Muerte Celular en Linfocitos Proliferantes, Inducidos por el Inhibidor de la Aurora Quinasa A, MLN8237:

La observación al microscopio de los cultivos tratados con MLN8237, mostró evidencias de que este inhibidor genera diferentes tipos de muerte celular. La evaluación microscópica de las células tratadas con el inhibidor, sobre todo a concentraciones más altas, reveló que un alto porcentaje de estas células se encuentran en catástrofe mitótica. Como se puede observar en microfotografías de cultivos celulares sin tratamiento (Figura 8), se muestra un alto índice de linfocitos proliferantes, además de algunos núcleos celulares que muestran características de las células en apoptosis; en tanto que en cultivos de linfocitos tratados con el inhibidor, las células proliferantes son escasas y la frecuencia de núcleos celulares en catástrofe mitótica muy alta (Figura 9).

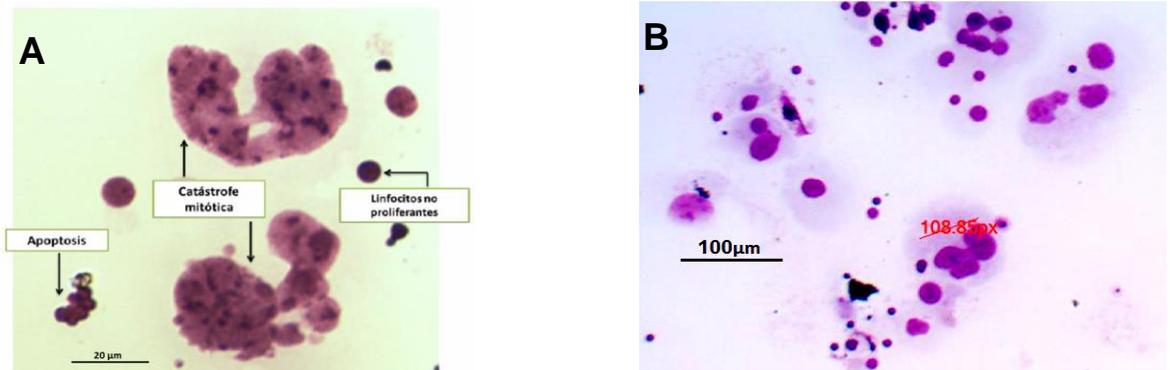


**Figura 8.-** Microfotografía que muestra núcleos celulares proliferantes, presentes en cultivos de linfocitos de individuos sanos, sin tratamiento (Controles con DMSO) por 96 horas de cultivo, a un aumento de 100X. La flecha blanca señala un núcleo en metafase, la flecha negra señala linfocitos proliferantes normales y la cabeza de flecha negra señala núcleos en apoptosis. (Microscopio óptico Nikon Optiphot, tinción de Giemsa)



**Figura 9.-** Microfotografía que muestra núcleos celulares en muerte por Catástrofe Mitótica, presentes en cultivos de linfocitos de individuos sanos, tratados con el inhibidor de Aurora A, MLN8237, a  $0,5\mu\text{M}$  por 96 horas de cultivo a un aumento de 100X. La cabeza de flecha blanca señala núcleos en catástrofe mitótica, la flecha negra señala linfocitos proliferantes normales y la cabeza de flecha negra señala núcleos en apoptosis. (Microscopio óptico Nikon Optiphot, tinción de Giemsa)

En la Figura 10 se pueden reconocer en detalle los dos tipos de muerte celular inducidos por el inhibidor MLN8237, tanto células apoptóticas como células en catástrofe mitótica; nótese que en la Figura 10-B aún se observa citoplasma rodeando el núcleo de las células en catástrofe mitótica.

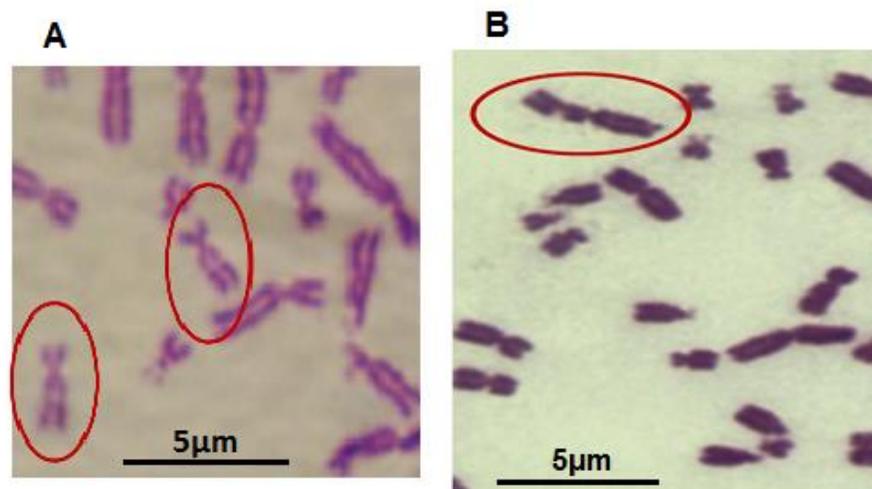


**Figura 10.-** Microfotografías en la que se señala (A) Núcleos celulares en apoptosis, núcleos en catástrofe mitótica, y linfocitos no proliferantes – Aumento de 1000X – y (B) Núcleos en catástrofe mitótica con citoplasma aún visible, – Aumento de 100X – presentes en cultivos de linfocitos de individuos sanos, tratados con el inhibidor de Aurora A, MLN8237, a  $0,5\mu\text{M}$  por 96 horas de cultivo (Microscopio óptico Nikon Optiphot, tinción de Giemsa)

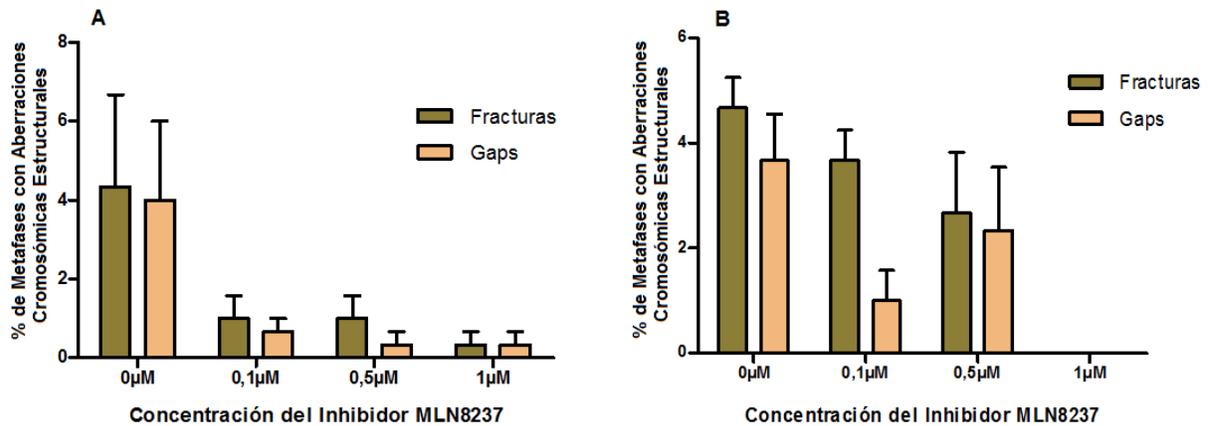
## 7.2 Efecto de la Inhibición de la Quinasa Aurora A, Mediante el Tratamiento con MLN8237, sobre la Frecuencia de Metafases con Anomalías Cromosómicas Estructurales

El efecto del MLN8237 sobre la frecuencia de metafases con anomalías cromosómicas estructurales se evaluó a través del análisis de cromosomas en placas metafásicas. Para esto, los linfocitos de 8 individuos fueron cultivados *in vitro* por 72 y 96 horas en presencia del inhibidor a concentraciones de 0, 0.1, 0.5 y 1  $\mu\text{M}$ .

El recuento de aberraciones cromosómicas estructurales observadas en cultivos de linfocitos de individuos sanos tratados con el inhibidor MLN8237, para 72 y 96 horas de cultivo, mostró una frecuencia muy baja de este tipo de aberraciones. Se pudo observar la presencia de gaps (brechas) y fracturas tanto cromosómicas como cromatídicas (Figura 11), sin embargo, la frecuencia de aberraciones estructurales, no es significativa a distintas concentraciones usadas del inhibidor (Figura 12).



**Figura 11.-** Microfotografías en las que se observan (A) Gaps (brechas o lagunas) cromosómicos, y (B) Fractura cromatídica, en cultivos de linfocitos de individuos sanos, tratados con el inhibidor de Aurora A, MLN8237, a 0.1  $\mu\text{M}$  por 72 horas de cultivo (Aumento 1000X, microscopio óptico NikonOptiphot, tinción de Giemsa)



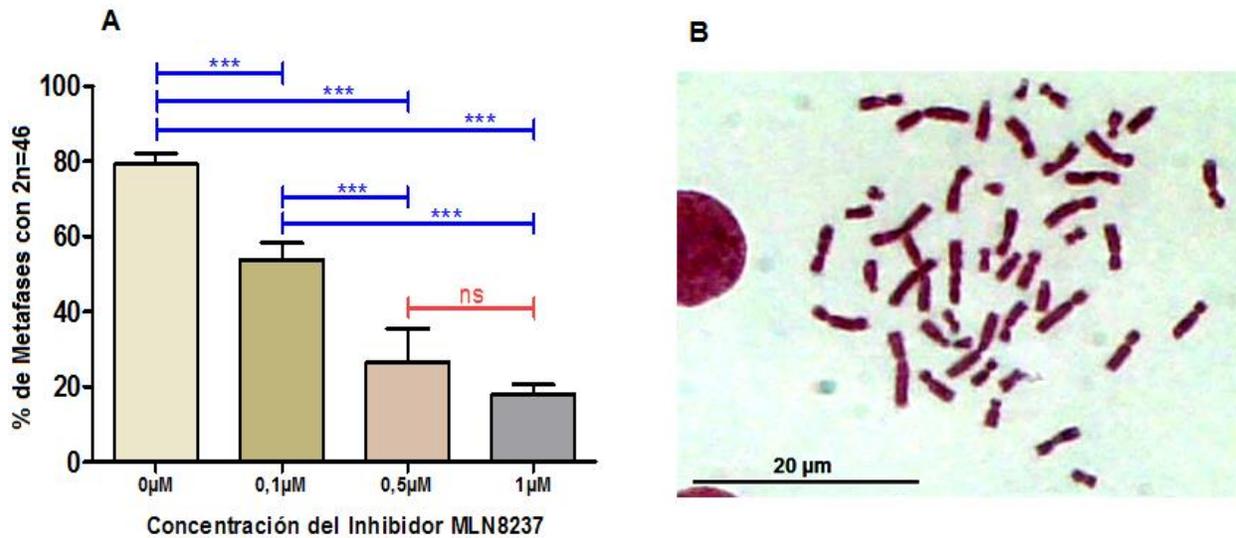
**Figura 12.-** Porcentaje de metafases con aberraciones estructurales (Fracturas y Gaps), tratadas con diferentes concentraciones del inhibidor de la proteína Aurora A, MLN8237, para (A) 72 horas de cultivo y (B) 96 horas de cultivo. Los datos se muestran como medias de los porcentajes  $\pm$  error estándar.

### 7.3 Efecto de la Inhibición de la Quinasa Aurora A, Mediante el Tratamiento con MLN8237, sobre la Frecuencia de Metafases con Anomalías Cromosómicas Numéricas

De la misma forma en que se procedió para evaluar aberraciones cromosómicas estructurales, el efecto del inhibidor de la proteína quinasa Aurora A, MLN8237, sobre la frecuencia de metafases con anomalías cromosómicas numéricas se evaluó a través del análisis de cromosomas en placas metafásicas. Para esto, los linfocitos de 8 individuos fueron cultivados *in vitro* por 72 y 96 horas en presencia del inhibidor a concentraciones de 0, 0.1, 0.5 y 1  $\mu$ M.

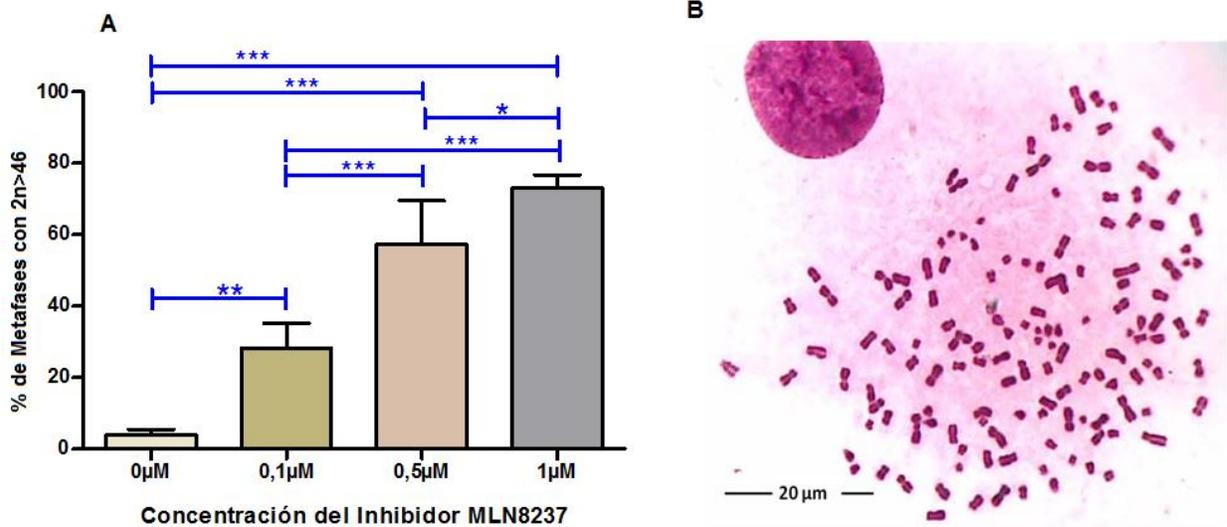
En recuentos del número cromosómico de células cultivadas por 72 horas se observó una disminución en la frecuencia de células con número cromosómico normal ( $2n=46$  cromosomas) comparando con la muestra control. En células tratadas con el inhibidor a 0,1 $\mu$ M se presentó un índice del 54% de células con  $2n=46$

cromosomas. Así, la frecuencia de metafases con  $2n=46$  cromosomas disminuyó a 26% en células incubadas con  $0,5\mu\text{M}$  de MLN8237 y a 18% en células incubadas con  $1\mu\text{M}$  del inhibidor. (Figura 13).



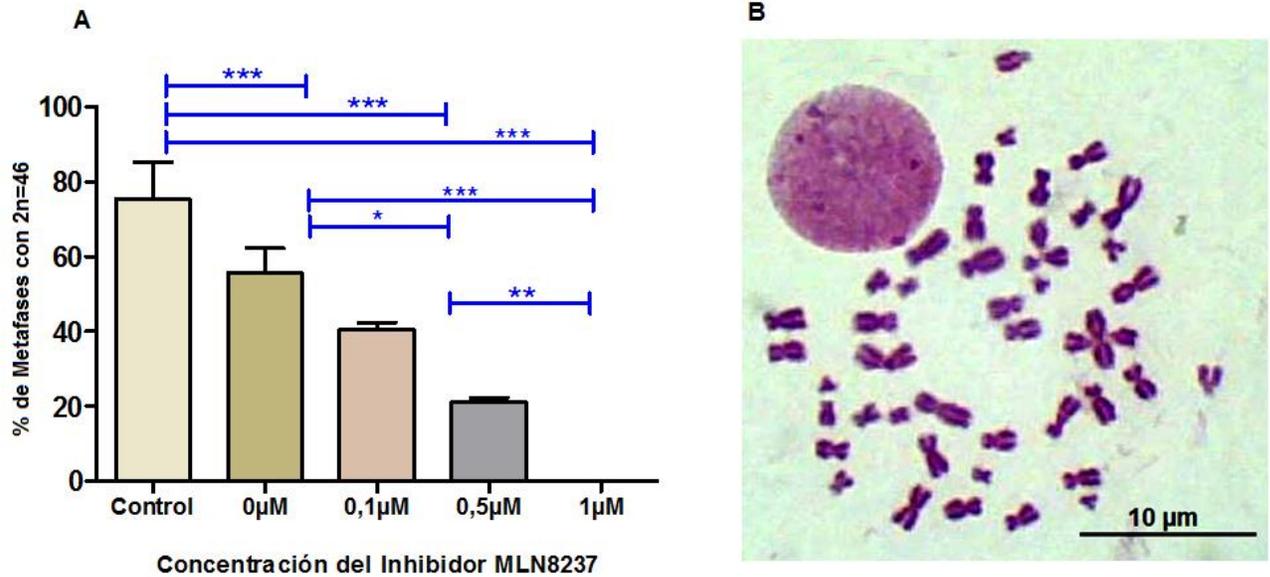
**Figura 13.- (A)** Porcentaje de metafases con  $2n=46$  cromosomas, tratadas con diferentes concentraciones del inhibidor de la proteína Aurora A, MLN8237, durante 72 horas de cultivo. Los datos se muestran como medias de los porcentajes  $\pm$  desviación estándar. Se observan diferencias significativas para todas las concentraciones utilizadas del inhibidor comparando con la muestra control y con  $0,1\mu\text{M}$  de concentración, exceptuando al comparar concentraciones de  $0,5$  y  $1\mu\text{M}$  entre sí. *ns*, no significativo; \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$  (Análisis de varianza con prueba de comparación múltiple de Tukey.  $P<0,05$ ). **(B)** Microfotografía de metafase con  $2n=46$  cromosomas (normal); células en cultivos control (DMSO) de linfocitos provenientes de individuos sanos, durante 72 horas (Aumento  $1000\times$ , microscopio óptico Nikon Optiphot, tinción de Giemsa).

La disminución de células con 46 cromosomas, inducida por el inhibidor, se debe a un aumento en la frecuencia de células con  $2n>46$  cromosomas (aneuploides y poliploides), con respecto a la muestra control. A una concentración de  $0,1\mu\text{M}$  del inhibidor se observa un 28% en la frecuencia de células  $2n>46$  cromosomas; a concentraciones más altas del inhibidor -  $0,5$  y  $1\mu\text{M}$  - el porcentaje de la frecuencia de estas células aumentó significativamente a 57% y 73%, respectivamente (Figura 14).



**Figura 14.- (A)** Porcentaje de metafases con  $2n > 46$  cromosomas, tratadas con diferentes concentraciones del inhibidor de la proteína Aurora A, MLN8237, durante 72 horas de cultivo. Los datos se muestran como medias de los porcentajes  $\pm$  desviación estándar. Se observan diferencias significativas para todas las concentraciones utilizadas del inhibidor comparando con la muestra control y con 0,1  $\mu$ M de concentración, exceptuando al comparar concentraciones de 0,5 y 1  $\mu$ M entre sí. ns, no significativo; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (Análisis de varianza con prueba de comparación múltiple de Tukey.  $P < 0,05$ ). **(B)** Microfotografía de metafase con  $2n > 46$  cromosomas (hiperdiploide); células en cultivos de linfocitos provenientes de individuos sanos, tratados con el inhibidor MLN8237 a 0,5  $\mu$ M, durante 72 horas (Aumento 1000x, microscopio óptico Nikon Optiphot, tinción de Giemsa).

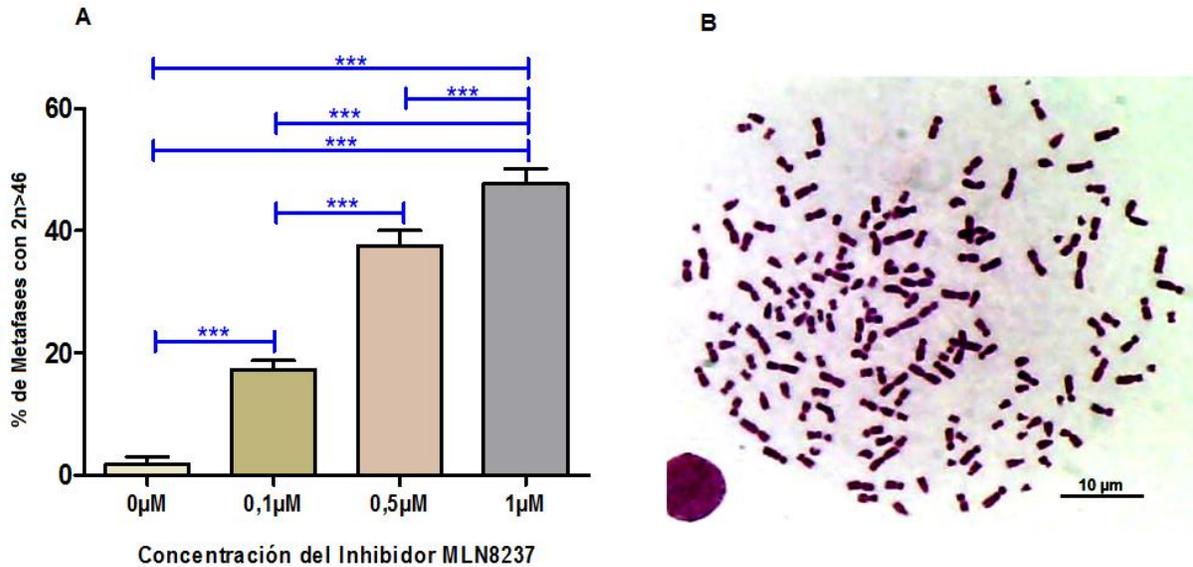
La misma tendencia observada en cultivos incubados durante 72 horas con el inhibidor MLN8237, se presenta en cultivos que estuvieron en presencia del mismo durante 96 horas. Así, en recuentos del número cromosómico de estas células también se observó una disminución en la frecuencia de células con número cromosómico normal, comparando con la muestra control. Un 56% de células tratadas con el inhibidor a 0,1  $\mu$ M presentó un  $2n = 46$  cromosomas; este porcentaje disminuyó a 41% para concentraciones de 0,5  $\mu$ M y a 21% para concentraciones de 1  $\mu$ M (Figura 15).



**Figura 15.- (A)** Porcentaje de metafases con 2n=46 cromosomas, tratadas con diferentes concentraciones del inhibidor de la proteína Aurora A, MLN8237, durante 96 horas de cultivo. Los datos se muestran como medias de los porcentajes  $\pm$  desviación estándar. Se observan diferencias significativas para todas las concentraciones utilizadas del inhibidor comparando todas las concentraciones entre sí. ns, no significativo; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (Análisis de varianza con prueba de comparación múltiple de Tukey.  $P < 0,05$ ). **(B)** Microfotografía de metafase con 2n=46 cromosomas (normal); células en cultivos control (DMSO) de linfocitos provenientes de individuos sanos, durante 96 horas (Aumento 1000x, microscopio óptico Nikon Optiphot, tinción de Giemsa).

De la misma manera que para cultivos de 72 horas, la disminución de células con 2n=46 cromosomas se relaciona con el aumento en la frecuencia de células con 2n>46 cromosomas. A concentraciones del inhibidor de 0,1µM se observa un 17% en la frecuencia de células con más de 46 cromosomas; a concentraciones más altas del inhibidor - 0,5 y 1µM - el porcentaje de la frecuencia de estas células aumentó a 38% y 48%, respectivamente (Figura 16).

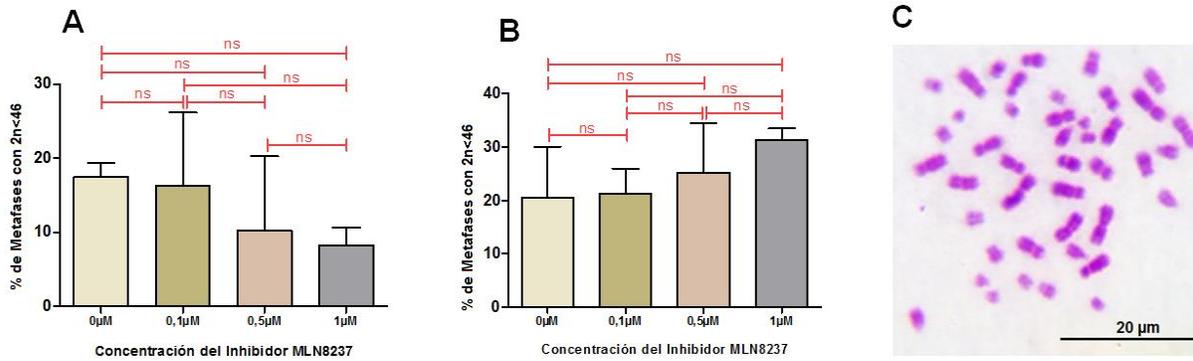
Tanto para cultivos celulares de 72 como de 96 horas, la frecuencia de células con número cromosómico normal disminuye significativamente, a medida que la concentración del inhibidor MLN8237 aumenta. Mientras que, la frecuencia de células con 2n>46 cromosomas, aumenta en forma significativa a concentraciones crecientes del inhibidor.



**Figura 16.- (A)** Porcentaje de metafases con  $2n > 46$  cromosomas, tratadas con diferentes concentraciones del inhibidor de la proteína Aurora A, MLN8237, durante 96 horas de cultivo. Los datos se muestran como medias de los porcentajes  $\pm$  desviación estándar. Se observan diferencias significativas para todas las concentraciones utilizadas del inhibidor, comparando todas las concentraciones entre sí. ns, no significativo; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (Análisis de varianza con prueba de comparación múltiple de Tukey.  $P < 0,05$ ). **(B)** Microfotografía de metafase con  $2n > 46$  cromosomas (hiperdiploide); células en cultivos de linfocitos provenientes de individuos sanos, tratados con el inhibidor MLN8237 a  $1 \mu\text{M}$ , durante 96 horas (Aumento 1000x, microscopio óptico Nikon Optiphot, tinción de Giemsa).

Contrario a lo anterior, las diferencias observadas en la frecuencia de células con  $2n < 46$  cromosomas (hipodiploides), con respecto a la muestra control tanto para 72 como para 96 horas de cultivo, no fueron estadísticamente significativas (Figura 17).

Al observar que el inhibidor MLN8237 induce aberraciones cromosómicas numéricas hiperploides de manera significativa, se realizó una comparación entre la frecuencia de células con aneuploidías o poliploidías que se presentaron en los recuentos.

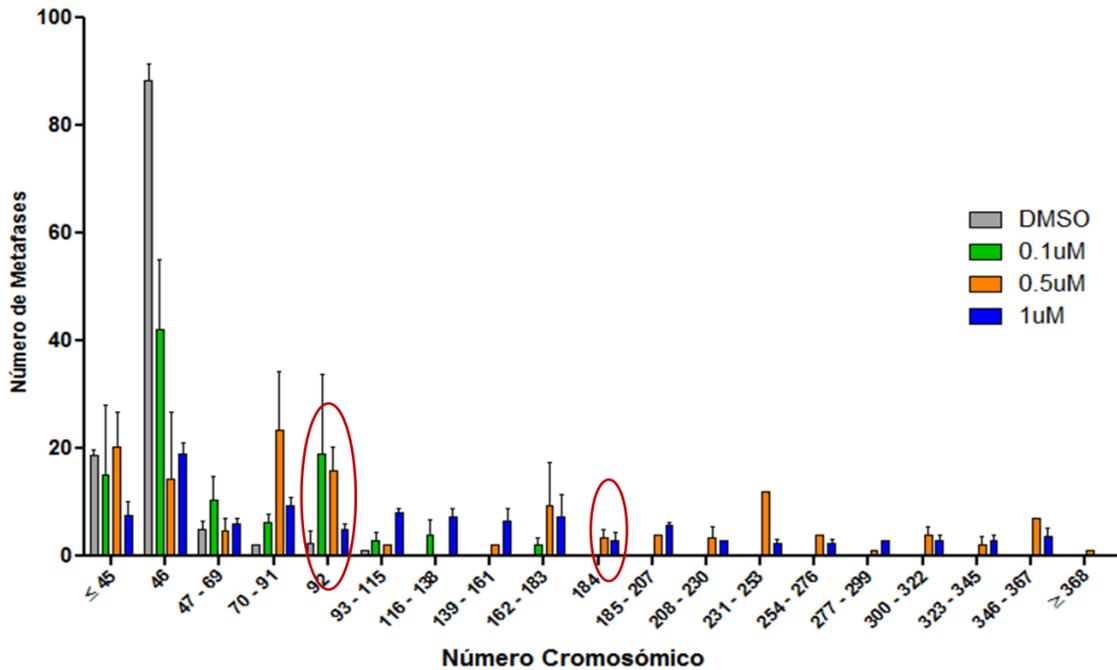


**Figura 17.-** Porcentaje de metafases con  $2n < 46$  cromosomas, tratadas con diferentes concentraciones del inhibidor de la proteína Aurora A, MLN8237, durante (A) 72 horas de cultivo, (B) 96 horas de cultivo. Los datos se muestran como medias de los porcentajes  $\pm$  desviación estándar. En ninguno de los dos casos se observan diferencias significativas entre las concentraciones utilizadas del inhibidor comparando con la muestra control y entre sí. ns, no significativo; (Análisis de varianza con prueba de comparación múltiple de Tukey.  $P > 0,05$ ). (C) Microfotografía de metafase con  $2n < 46$  cromosomas (hipodiploide); células en cultivos de linfocitos de individuos sanos, tratados con el inhibidor de Aurora A, MLN8237, a  $0,5 \mu\text{M}$  durante 96 horas (Aumento 1000X, microscopio óptico Nikon Optiphot, tinción de Giemsa).

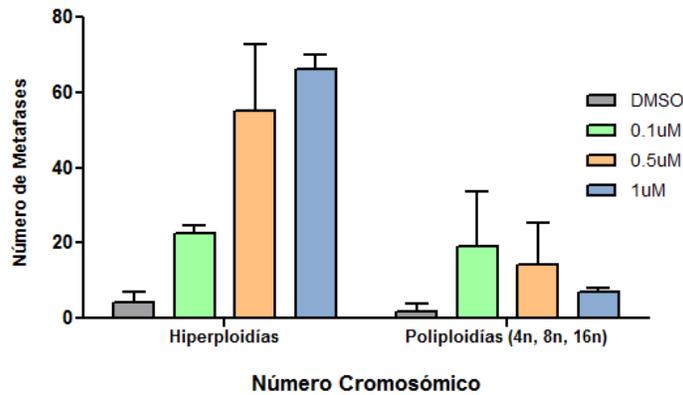
Este análisis se realizó con los cultivos de linfocitos que fueron tratados a las diferentes concentraciones durante un período de incubación de 72, debido a que es durante este tiempo de incubación que se observó la mayor cantidad de metafases por placa de cultivo.

El análisis mostró que el mayor porcentaje de las metafases hiperploides presentaron un número cromosómico entre 70 y 92 cromosomas -cerca o igual a un número cromosómico de  $4n-$ , también es evidente el número cromosómico alterado que pueden alcanzar estas células tratadas con el inhibidor - 360 cromosomas y más- (Figura 18). Es interesante notar que las aneuploidías se generan incluso a dosis que no producen una muerte celular significativa sin embargo es a mayor concentración del inhibidor, que se presentan metafases con números cromosómicos mayores a 184 (8n).

Sin embargo al comparar las frecuencias totales entre las células hiperploides presentes, se observó que las poliploidías se presentaron en menor porcentaje con respecto a las aneuploidías (Figura 19).



**Figura 18.-** Frecuencia de metafases agrupadas según número cromosómico. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones del inhibidor de la proteína Aurora A, MLN8237, durante 72 horas de cultivo. Los círculos rojos destacan las tetraploidías (92) y octoploidías (184). Los datos se muestran como medias de los porcentajes  $\pm$  desviación estándar.



**Figura 19.-** Frecuencia de metafases Aneuploides y Euploides (poliploidías), en células tratadas con diferentes concentraciones del inhibidor de la proteína Aurora A, MLN8237, durante 72 horas de cultivo. A concentraciones de 0,5 y 1 $\mu$ M se observa el incremento de aneuploidías con respecto a las poliploidías. Los datos se muestran como medias de los porcentajes  $\pm$  desviación estándar.

## DISCUSIÓN

Aurora quinasa A es una oncoproteína que por estar sobre expresada en varios tipos de tumores, se ha convertido en un blanco terapéutico de importancia, por lo que se han desarrollado varias moléculas capaces de inhibir su actividad. Una de estas moléculas es el MLN8237 (conocido en el mercado como Alisertib). Su uso como agente anti carcinógeno se encuentra en evaluación en estudios clínicos fase I, II y III en pacientes con diversos tipos tumorales.

En la presente tesis se evaluó el efecto de este inhibidor en linfocitos proliferantes de individuos sanos con el propósito de conocer si este compuesto genera inestabilidad cromosómica en células normales. Esto se logró mediante la evaluación del efecto de MLN8237 sobre la viabilidad celular y la frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales y numéricas.

Los resultados del análisis para apoptosis indican que el porcentaje de muerte tiende a incrementar, a medida que se incrementan las concentraciones del inhibidor en los tres tiempos de cultivo, datos que confirman los hallazgos encontrados en los estudios clínicos fase I, en los que se demuestra que la efectividad del MLN8237 está relacionado con las dosis suministradas al paciente, estableciéndose una curva de mayor efectividad en concentraciones plasmáticas entre 1 y 10 $\mu$ mol/L (Mossé *et al*, 2012)

Al hacer una comparación de los datos de muerte celular entre los diferentes tiempos de cultivo (72, 96 y 120 horas), se puede observar que, si bien hay diferencias en el porcentaje de muerte celular a medida que aumenta el tiempo de cultivo, éstas no son estadísticamente significativas con ninguna de las concentraciones del inhibidor evaluadas en este estudio. El análisis de regresión lineal mostró que el aumento del porcentaje de apoptosis es directamente proporcional al incremento de la concentración del inhibidor, sin embargo no hay relación lineal entre el porcentaje de apoptosis y los distintos tiempos de cultivo.

Una posible explicación para la falta de efecto del tiempo de exposición al inhibidor MLN8237 es que la vida media del inhibidor en el medio de cultivo sea acotado y no se extienda más allá de las 72 horas, es decir más allá de los primeros ciclos de división celular. Otra explicación tiene relación con el método utilizado para evaluar la muerte celular. En este estudio, la muerte celular se evaluó mediante la cuantificación de la población hipodiploide (sub-G1). El aumento en esta población es una característica de las células en apoptosis y ocurre debido a que en el proceso de muerte por apoptosis existe fragmentación del DNA (Castedo, *et al*, 2004), lo que se interpreta mediante citometría de flujo como células con  $2n < 46$  cromosomas (hipodiploides).

Sin embargo, la observación al microscopio refleja que en los cultivos tratados con el inhibidor MLN8237 más que apoptosis, el tipo de muerte celular más frecuente es catástrofe mitótica. Este tipo de muerte celular ocurre durante o inmediatamente después de mitosis y se caracteriza por la presencia de células gigantes con grandes núcleos fragmentados (Vakifahmetoglu, *et al*, 2008). Es probable que mediante

citometría de flujo, las células en catástrofe mitótica estén siendo consideradas no como células muertas sino como poliploidías, ya que dentro de las particularidades de la catástrofe mitótica es que esta puede activar una vía metabólica para muerte celular que no se ejecuta hasta que la célula regresa a interfase en el siguiente ciclo celular (Vitale *et al*, 2011); por tanto al realizarse la lectura a través del citómetro de flujo estas no se contabilizan como células muertas en ese ciclo celular.

Cabe observar que este tipo de muerte celular no ha sido asociada al MLN8237, en ninguno de los trabajos de investigación revisados. Esto podría deberse a que en esos estudios sólo se esté tomando en cuenta el índice de muerte total, incluidas todas como muerte apoptótica. Por otra parte, puede ser que la catástrofe mitótica no esté siendo considerado por los investigadores como un tipo de muerte celular diferente, sino como un mecanismo precursor de apoptosis, que es el tipo de muerte celular asociada al uso de MLN8237 (Vitale *et al*, 2011).

Por otro lado, sí se observó una correlación lineal entre la muerte celular y las concentraciones utilizadas del inhibidor, a pesar de existir una alta variabilidad de los resultados entre los individuos analizados. Esta variabilidad en la respuesta entre individuos puede deberse a la presencia de polimorfismos del gen *AURKA* en los individuos participando en el estudio. Al respecto, se han descrito dos polimorfismos de *AURKA* en humanos que podrían tener una implicancia en la aparición más temprana de ciertos tipos de cáncer, estos son polimorfismos de una base nitrogenada. El primero corresponde a **c.91T>A**, un cambio en el nucleótido 91 Timina (T), por Adenina (A) lo que resulta en el cambio aminoacídico **p.F31L** y el

segundo que corresponde a **c.169G>A**, un cambio en el nucleótido 169 Guanina (G), por Adenina (A) lo que resulta en el cambio aminoacídico **p.V57I**, (Qin, *et al*, 2013).

Chen y colaboradores (2007) habían establecido la relación de la presencia del polimorfismo c.91T>A con aparición temprana de cáncer de esófago, mama y ovario, por sobreexpresión de Aurora A, sin embargo para cáncer colo-rectal no poliposo era un factor protector. Estudios recientes han relacionado nuevamente al polimorfismo c.91T>A como un fuerte factor de riesgo por su predisposición al cáncer de mama (Qin, *et al*, 2013). Cabe destacar que ninguno de los estudios mencionados encontró una relación significativa con el polimorfismo c.169G>A y la predisposición a cáncer. Lo anterior nos hace suponer que la variabilidad individual en los índices de muerte celular podría estar respondiendo a la presencia de un determinado polimorfismo para el gen *AURKA*, y que este provoque menor sensibilidad al tratamiento.

Con respecto al impacto del uso del inhibidor MLN8237, y tal como se ha reportado para células tumorales, la inhibición de *AURKA* produce alteraciones numéricas de los cromosomas, principalmente de tipo hiperdiploidía (Kitzen *et al*, 2010). Las poliploidías se presentaron en menor porcentaje. Esto debido a las funciones de *AURKA* en el proceso de división celular, ya que la actividad de esta quinasa se relaciona con varios procesos mitóticos como: (a) el ensamblaje del huso mitótico participando en la maduración del centrosoma y orientando las terminaciones proximales de los microtúbulos hacia los polos celulares; (b) en la separación del centrosoma, participa fosforilando proteínas motoras tipo quinesinas; (c) en la transición G2-M, fosforilando otros productos que relocalizan la ciclina B1 en el núcleo y activando la quinasa dependiente de ciclina (Cdk1); y (d) en el proceso de

Citocinesis, en el que el tiempo correcto de activación y la subsecuente inactivación de la quinasa Aurora A es requerido para una citocinesis adecuada (Marumoto *et al*, 2005). Es necesario recalcar que las aneuploidías se generan incluso a dosis que no producen una muerte celular significativa.

Por otra parte, no se observó diferencia significativa en la frecuencia de placas metafásicas hipodiploides; probablemente, la presencia de este tipo de placas metafásicas obedece a artefactos de la técnica usada en la preparación de las mismas, en las que se pudieron perder cromosomas de distintas metafases, lo que es independiente al tratamiento con el inhibidor.

Con respecto al efecto del MLN8237 en la generación de células con aberraciones estructurales, los resultados muestran que la frecuencia de células con este tipo de alteración, no es significativa; esto sugiere que este inhibidor no produce efecto a nivel de la organización estructural del cromosoma y que el tipo de alteraciones estructurales que se presentan, corresponden a la tasa normal de alteraciones estructurales que se podrían generar en los procesos de daño y reparación endógena del DNA.

De los resultados observados cabe destacar que el aumento del porcentaje de apoptosis es directamente proporcional al incremento de la concentración del inhibidor, pero la efectividad del uso del inhibidor también puede verse afectada por la respuesta individual del paciente, debido a la posible presencia de polimorfismos del gen *AURKA* que estén generando diferente sensibilidad al tratamiento.

Estos resultados indican que el determinar las concentraciones adecuadas para cada paciente, se vuelve indispensable para asegurar un tratamiento anti cancerígeno efectivo, pues las células no tumorales que sobreviven al inhibidor pueden adquirir mutaciones cromosómicas numéricas que podría tener un impacto en el desarrollo de neoplasias secundarias al tratamiento

## CONCLUSIONES

1. El inhibidor de Aurora quinasa A, MLN8237, induce la apoptosis de linfocitos proliferantes a concentraciones de 0,5 $\mu$ M y 1 $\mu$ M. El aumento del porcentaje de apoptosis es directamente proporcional al incremento de la concentración del inhibidor.
2. No existen diferencias en el porcentaje de apoptosis inducida por el inhibidor MLN8237 a distintos tiempos de incubación (72, 96 y 120h).
3. El inhibidor MLN8237 induce dos tipos de muerte celular en linfocitos proliferantes: apoptosis y catástrofe mitótica, hecho que se evidenció mediante la observación al microscopio de los preparados metafásicos.
4. El análisis y conteo de cromosomas en placas metafásicas de los cultivos investigados indicó que el inhibidor MLN8237 induce aberraciones cromosómicas numéricas (hiperploidías) a las 72 y 96 horas de cultivo, con todas las concentraciones estudiadas.
5. Contrario a lo anterior, el inhibidor no induce aberraciones cromosómicas estructurales, por lo menos en los periodos de incubación de 72 y 96 horas de cultivo.
6. Estos resultados sugieren que las células no tumorales que sobreviven al inhibidor pueden adquirir mutaciones cromosómicas numéricas que podría tener un impacto en el desarrollo de neoplasias secundarias al tratamiento.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agnese V, Bazan V, Fiorentino FP, Fanale D, Badalamenti G, Colucci G, Adamo V, Santini D, Russo A. *The Role of Aurora-A Inhibitors in Cancer Therapy*. *Oncol*, 18(6):47-52 (2007)
- Asteriti I.A., Giubettini M., Lavia P, Guarguaglini G. *Aurora- A Inactivation Causes Mitotic Spindle Pole Fragmentation by Unbalancing Microtubule - Generated Forces*. *Molecular Cancer*, 10(1):131. (2011)
- Barr A.R. and Gergely F. *Aurora-A: The Maker and Breaker of Spindle Poles*. *Journal of Cell Science*, 120:2987-2996. (2007)
- Bolaños-Garcia, V.M. *Molecules in Focus: Aurora Kinases*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37:1572–1577 (2005)
- Boss D.S., Beijnen J.H, and Schellens J.H.M. *Clinical Experience with Aurora Kinase Inhibitors: A Review*. *The Oncologist*, 14:780–793 (2009)
- Cahill DP, Kinzle KW, Vogelstein B and Lengauer C., *Genetic Inestability and Darwinian Selection in Tumors*. *Trend Cell Biol*, 9(12): M57-60 (1999)
- Carmena M, and Earnshaw WC. *The Cellular Geography of Aurora Kinases*. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4(11):842-54. (2003)
- Carmena M, Ruchaud S, Earnshaw WC. *Making the Auroras Glow: Regulation of Aurora A and B Kinase Function by Interacting Proteins*. *Curr Opin Cell Biol*. 21(6):796-805. (2009)
- Castedo M., Perfettini J.L., Roumier T., Valent A., Raslova H., Yakushijin K., Horne D., Feunteun J., Lenoir G., Medema R., Vainchenker, W. and Kroemer G. *Mitotic Catastrophe Constitutes a Special case of Apoptosis whose Suppression Entails Aneuploidy*. *Oncogene* 23:4362–4370. (2004)
- Cooper G.M. *The Cell: A Molecular Aproach*. 2dn Edition. Sinaver Associates. Suderland (MA), USA. Pags. 591-627. (2000)
- Crane R., Gadea B., Littlepage L., Wu H. and Rudermnan JV. *Aurora A, Meiosis and Mitosis*. *Biol Cell*, 96(3):215-29. (2004)

- CT Site: ClinicalTrials.gov Alisertib  
<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=Alisertib&Search=Search>  
[www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) Actualizado al 29-May-2014; Última consulta 30-May-2014
  
- Chen J., Li D., Wei Ch., Sen S., Killary A.M., I. Amos Ch., Evans D.B., Abbruzzese J.L., and Frazier M.L. *Aurora-A and p16 Polymorphisms Contribute to an Earlier Age at Diagnosis of Pancreatic Cancer in Caucasians.* Clin Cancer Res, 13(10): 3100-3104 (2007).
  
- Dar A.A., Goff L.W., Majid S., Berlin J. and El-Rifai W. *Aurora Kinase Inhibitors - Rising Stars in Cancer Therapeutics?* Mol. Cancer Ther, 9(2): 268-278. (2010)
  
- Ducat D. and Zheng Y. *Aurora Kinases in Spindle Assembly and Chromosome Segregation.* Experimental Cell Research, 301:60-67. (2004)
  
- Flowing Software. <http://www.flowingsoftware.com/index.php?page=33>  
 Revisado para descarga: 2-oct-2013; Última consulta: 2-Feb-2014
  
- Fu J., Bian M., Jiang Q., and Zhang Ch. *Roles of Aurora Kinases in Mitosis and Tumorigenesis.* Cancer Res, 5:1-10. (2007)
  
- Fundia, A. F., Larripa, I., Slavutsky, I. *Alteraciones Genéticas, Inestabilidad Genómica y Cáncer en Enfermedad Celíaca.* Acta Gastroenterológica Latinoamericana, 39(1):55-62 (2009)
  
- Geigl J.B., Obenauf A.C., Schwarzbraun T. and Speicher M.R. *Defining Chromosomal Instability.* Trends in Genetics, 24(2):64-68 (2007)
  
- Giet R., Petretti C. and Prigent C. *Aurora Kinases, Aneuploidy and Cancer, a Coincidence or Real Link?* TRENDS in Cell Biology, 15(5):241-250 (2005)
  
- Görgün G., Calabrese E., Hideshima T., Excedí J., Perrone G., et al. *A Novel Aurora-A Kinase Inhibitor MLN8237 Induces Cytotoxicity and Cell-cycle Arrest in Multiple Myeloma.* Blood, 115(25):5202–5213. (2010)
  
- Holland A.J. and Cleveland D.W. *Boveri revisited: Chromosomal Instability, Aneuploidy and Tumorigenesis.* Nature, reviews; 10(7):478-487 (2009)
  
- Ikezoe T. *Aurora Kinases as an Anti-Cancer Target.* Cancer Lett. 262(1):1-9. (2008)

- Katayama H., Brinkley W.R., Sen S. *The Aurora Kinases: Role in Cell Transformation and Tumorigenesis*. *Cancer and Metastasis Reviews*, 22:451–464 (2003)
- Katayama H., Sen S. *Aurora Kinase Inhibitors as Anticancer Molecules*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1799:829–839. (2010)
- Kitzen J.J.E.M., Jonge M.J.A. and Verweij J. *Aurora Kinase Inhibitors*. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 73:99–110. (2010)
- Marumoto T., Zhang D. and Saya H. *Aurora-A — A Guardian of Poles*. *Nature Reviews, Cancer*, 5:42-50 (2005)
- Moore AS, Blagg J, Linardopoulos S, Pearson A.D. *Aurora Kinase Inhibitors: Novel Small Molecules with Promising Activity in Acute Myeloid and Philadelphia- Positive Leukemias*. *Leukemia*, 24(4):671-8. (2010)
- Moorhead P.S., Nowell P.C., Melman W.j., Battips D.M., and Hunger D.A. *Chromosomes Preparations of Leukocytes Cultured from Human Peripheral Blood*. *Exp. Cell Res.* 20: 613-616. (1960)
- Mountzios G, Terpos E, Dimopoulos MA. *Aurora Kinases as Targets for Cancer Therapy*. *Cancer Treat Rev*, 34(2):175-82. (2008)
- NCBI Site: National Center for Biotechnology Information. Gene. AURKA aurora kinase A [Homo sapiens (human)] [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=search&term=6790&RID=C0SR1AK801N&log\\$=geneexplicitnucl&blast\\_rank=1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=search&term=6790&RID=C0SR1AK801N&log$=geneexplicitnucl&blast_rank=1) Actualizado al 23-May-2014, Última consulta 23-May-2014
- Nussbaum R.L, R.M. Roderick, F.W. Huntington F. Willard. *Thompson & Thompson. Genética en Medicina*. 7a ed. Pag. 175-177. Elsevier, España. (2008)
- Qi W, Cooke LS, Liu X, Rimsza L, Roe DJ, Manziolli A, Persky DO, Miller TP, Mahadevan D. *Aurora Inhibitor MLN8237 in Combination with Docetaxel enhances Apoptosis and Anti-Tumor Activity in Mantle Cell Lymphoma*. *Biochem Pharmacol.* 81(7):881-90. (2011)
- Qin K., Wu Ch. and Wu W. *Two Nonsynonymous Polymorphisms (F31I and V57I) of the STK15 Gene and Breast Cancer risk: A meta-analysis based on 5966 cases and 7609 controls*. *Journal of International Medical Research*, 41(4): 956-963 (2013)

- Tyson JJ, Csikasz-Nagy A, Novak B. *The Dynamics of Cell Cycle Regulation*. Bioessays. 24(12):1095-109 (2002)
- Vader G, Lens SM. *The Aurora Kinase Family in Cell Division and Cancer*. Biochim Biophys Acta. 1786(1):60-72. (2008)
- Vakifahmetoglu H., Olsson M. and Zhivotovsky B. *Death through a tragedy: Mitotic Catastrophe*. Cell Death and Differentiation 15:1153–1162 (2008)
- Vitale I., Galluzzi L., Castedo M., and Kroemer G. *Mitotic Catastrophe: A Mechanism for Avoiding Genomic Instability*. Natures Reviews, Molecular Cell Biology 12: 1-3 (2011)
- Wang Y, Ji P, Liu J, Broaddus RR, Xue F, Zhang W. *Centrosome-Associated Regulators of the G(2)/M Checkpoint as Targets for Cancer Therapy*. Mol Cancer. 8:8. (2009)

# ANEXO 1



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA

28 JUN. 2013



INSTITUTO DE CIENCIAS  
BIOMÉDICAS

---

## CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONANTES

### TÍTULO DE LA INVESTIGACIÓN

**“Inestabilidad Cromosómica Inducida por el Tratamiento *in Vitro* con MLN 8237, un Inhibidor de la Proteína Quinasa Aurora A, en Linfocitos Proliferantes de Individuos Sanos”.**

### Nombre de la Investigadora Principal:

Prof. Katherine Marcelain PhD (RUT: 12903456-4)

Institución: Laboratorio de Citogenética Humana, Programa de Genética Humana, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

### Invitación a participar:

Le estamos invitando, junto a otras 7 personas, a participar en el proyecto de investigación: “Inestabilidad Cromosómica Inducida por el Tratamiento *in Vitro* con MLN 8237, un Inhibidor de la Proteína Quinasa Aurora A, en Linfocitos Proliferantes de Individuos Sanos”.

### Objetivos:

El MLN8237 es un compuesto que está siendo evaluado para su uso en el tratamiento de diversos cánceres y que parece tener una buena efectividad. El objetivo de esta investigación es determinar si este compuesto podría producir daño en las células sanguíneas normales de los pacientes sometidos a este tratamiento. Para esto, se estudiará el efecto que tiene MLN8237 en los cromosomas de células sanguíneas (linfocitos) de personas sanas (sin cáncer). De esta forma se contribuirá a mejorar los protocolos de uso del antineoplásico en pacientes afectados de cáncer, de manera tal de evitar al máximo los efectos secundarios producidos por este tratamiento.



28 JUN. 2013

**Procedimiento:** Si usted está de acuerdo en participar en este estudio, se le solicitará donar diez mililitros (10 ml) (2 cucharadas) de sangre. Esta cantidad de sangre es relativamente pequeña y puede ser extraída de usted de manera segura. La sangre se extraerá mediante una jeringa esterilizada y nueva. También se le solicitará responder algunas preguntas personales y de salud que pudieran ser relevantes en el presente proyecto. De la muestra que usted done se obtendrán cultivos de linfocitos; este procedimiento se realizará en nuestros laboratorios.

Su muestra será almacenada en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, por lo que los investigadores le solicitan (a través de este documento) su autorización para almacenar los cultivos celulares de su muestra de forma indefinida o hasta que sea utilizada en su totalidad.

**Riesgos y complicaciones:** Los riesgos asociados con la extracción de sangre son leves, pero la aplicación de la técnica puede acompañarse de los siguientes efectos indeseados: mareo, moretón, dolor, hinchazón, y/o desmayo.

**Costos:** La técnica de extracción de sangre y los implementos necesarios, serán costeados por el laboratorio de citogenética humana, sin costo alguno para usted durante el desarrollo de este proyecto.

**Compensación:** Usted no recibirá ninguna compensación económica por su participación en el estudio.

**Beneficios:** Este estudio no le proporcionará ningún beneficio personal, pero podrá ser útil para avanzar en el tratamiento del cáncer.

**Confidencialidad:** Toda la información derivada de su participación en este estudio será conservada en forma de estricta confidencialidad, lo que incluye el acceso de los investigadores o agencias supervisoras de la investigación. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima.

**Voluntariedad:** Su participación en esta investigación es totalmente VOLUNTARIA y se puede retirar en cualquier momento, comunicándole su decisión al investigador responsable.

**Derechos del Participante:** Como participante de este estudio, usted tiene derecho a conocer los detalles del proyecto de investigación y sus resultados globales.

**Contacto:**

Si usted requiere cualquiera otra información o tiene cualquier consulta sobre su participación en este estudio, puede contactar a:

- Investigadora responsable: Dra. Katherine Marcelain (Teléfono: 02-29786741, 02-29786467, 02-29786463).

28 JUN. 2013



- Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Departamento de Bioética y Humanidades, Facultad de Medicina, Universidad de Chile (Teléfono: 02 – 9786923).

**Consentimiento del Paciente:**

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para participar en el proyecto "Inestabilidad Cromosómica Inducida por el Tratamiento in Vitro con MLN8237, un Inhibidor de la Proteína Quinasa Aurora A, en Linfocitos Proliferantes de Individuos Sanos".

Entiendo que mi participación es completamente voluntaria. Puedo elegir no donar muestras o revocar mi permiso para que ésta sea empleada. Si retiro mi autorización, la muestra será destruida. Como participante del estudio, puedo hacer preguntas sobre el tipo de investigación que se está realizando. También dejo constancia que recibo una copia firmada de este consentimiento.

Nombre del Sujeto	RUT	Firma	Fecha
Nombre del Informante	RUT	Firma	Fecha
Nombre del Investigador*	RUT	Firma	Fecha

*\* Mi firma significa que el estudio ha sido revisado en conjunto con el participante voluntario, ya sea por mí o por una persona de mi staff. Mi firma puede haber sido agregada después de haber obtenido este consentimiento, ya que puedo no haber estado presente al momento en que la firma del participante fue obtenida.*

# Aprobación del Proyecto, Comité de Ética.



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE MEDICINA  
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS

1/2



## ACTA DE APROBACIÓN DE PROYECTO

FECHA: 28 JUN 2013

28 JUN. 2013

**PROYECTO: INESTABILIDAD CROMOSÓMICA INDUCIDA POR EL TRATAMIENTO IN VITRO CON MLN 8237, UN INHIBIDOR DE LA PROTEINA QUINASA AURORA A, EN LINFOCITOS PROLIFERANTES DE INDIVIDUOS SANOS**

**INVESTIGADOR RESPONSABLE: SRTA. ANA ERAZO MILLA.**

**INSTITUCIÓN: FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE CHILE.**

Con fecha 25 de Junio de 2013, el proyecto ha sido analizado a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de la Guía Internacional de Ética para la Investigación Biomédica que involucra sujetos humanos CIOMS 1992, y de las Guías de Buena Práctica Clínica de ICH 1996.

Sobre la base de la información proporcionada en el texto del proyecto el Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, estima que el estudio propuesto está bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores que mínimos.

Este comité también analizó y aprobó el correspondiente documento de Consentimiento Informado en su versión modificada con fecha 26 de junio de 2013. Se adjunta aprobación de los siguientes documentos: Consentimiento Informado.

En virtud de las consideraciones anteriores el Comité otorga la aprobación ética para la realización del estudio propuesto, dentro de las especificaciones del protocolo.

Teléfono: 9786923 Fax: 9786189 Email: ceiha@med.uchile.cl



**INTEGRANTES DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN  
EN SERES HUMANOS**

28 JUN. 2013

<b>NOMBRE</b>	<b>CARGO</b>	<b>RELACIÓN CON LA INSTITUCIÓN</b>
Dr. Manuel Oyarzún	Presidente	Sí
Prof. Gina Raineri	Secretaria Ejecutiva	Sí
Dr. Hugo Amigo	Miembro	Sí
Dr. Leandro Biagini	Miembro	Sí
Dra. Lucia Cifuentes	Miembro	Sí
Sra. Nina Horwitz	Miembro	Sí
Dra. María Eugenia Pinto	Miembro	Sí
Sra. Claudia Marshall	Miembro	No
Dra. Gricel Orellana	Miembro	Sí
Prof. M. Julieta González	Miembro	Sí

Santiago, 28 de junio de 2013.

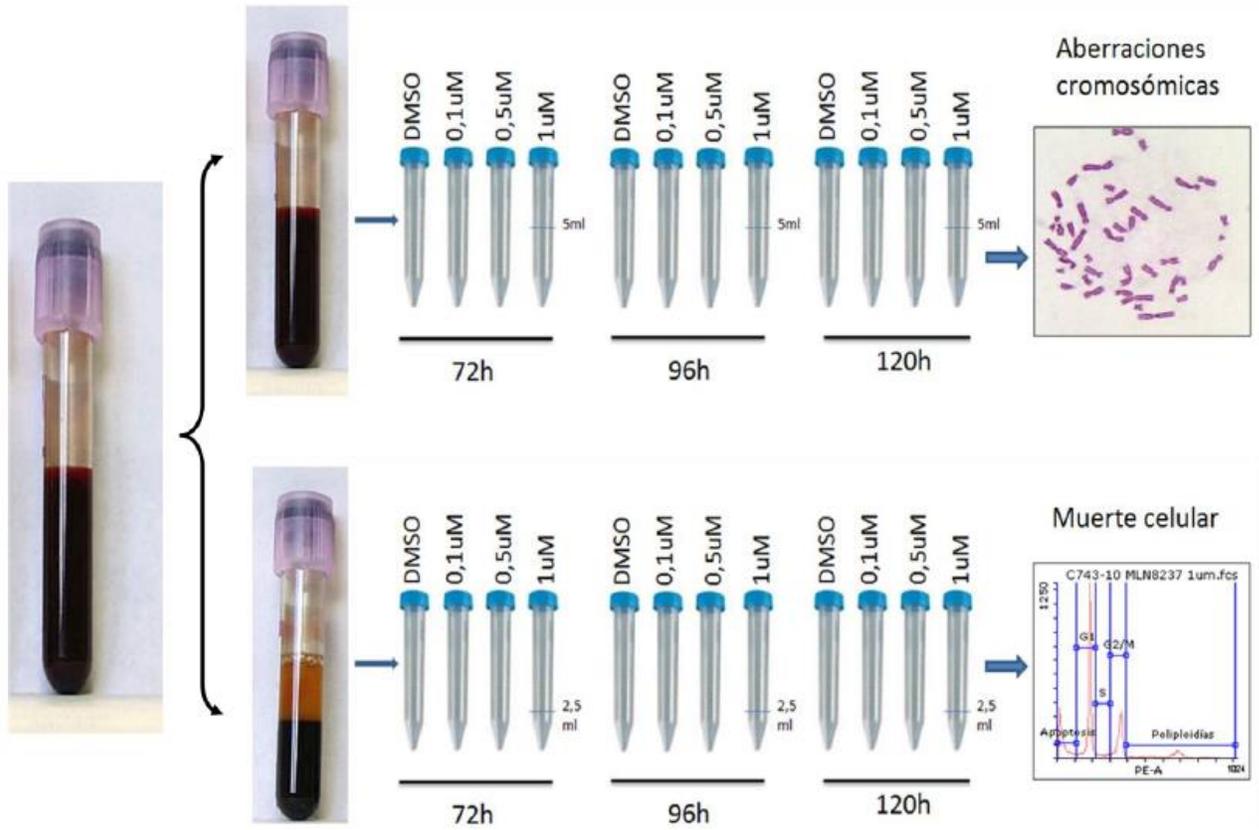
  
**Prof. Gina Raineri B.**  
**Secretaria Ejecutiva CEISH**

GRB/mva.  
Proy. N° 039-2013

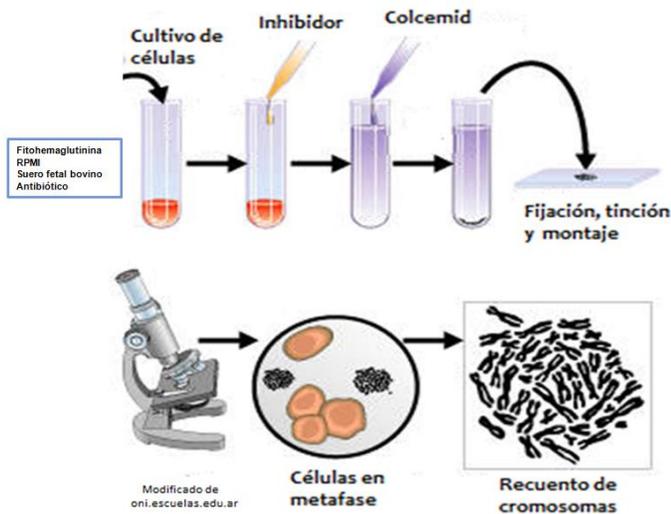
Teléfono: 9786923 Fax: 9786189 Email: ceiha@med.uchile.cl

# ANEXO 2

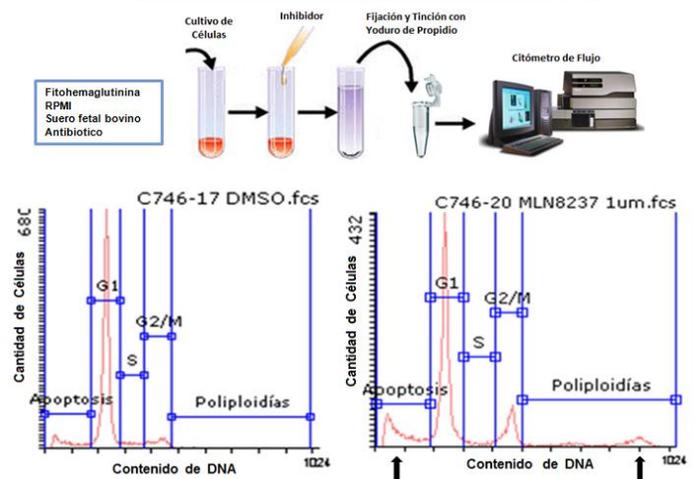
## Esquema de la Metodología Empleada



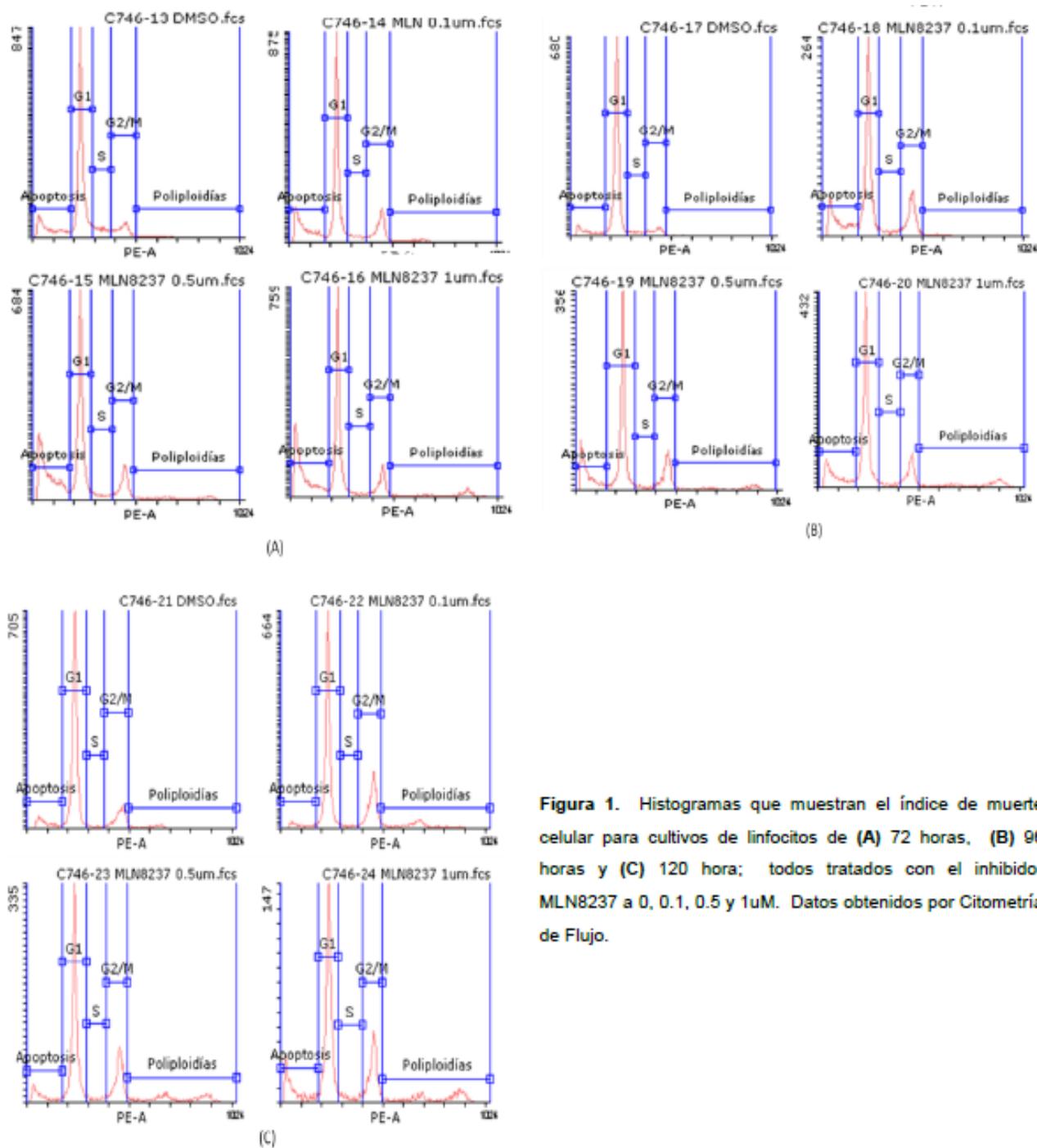
### Obtención de Metafases: Análisis Cromosómico



### Índice de Muerte Celular: Lectura mediante Citometría de Flujo



## ANEXO 3



**Figura 1.** Histogramas que muestran el índice de muerte celular para cultivos de linfocitos de (A) 72 horas, (B) 96 horas y (C) 120 hora; todos tratados con el inhibidor MLN8237 a 0, 0.1, 0.5 y 1uM. Datos obtenidos por Citometría de Flujo.

## ANEXO 4: Análisis de Varianza - Índice de Apoptosis

Tabla 1. Análisis de Varianza. Índice de Apoptosis utilizando diferentes Concentraciones del MLN8237 durante 72 horas de Cultivo

Table Analyzed	Muerte 72h				
One-way analysis of variance					
P value	P<0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	4				
F	10				
R squared	0.53				
Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	1.3				
P value	0.7179				
P value summary	ns				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	1700	3	570		
Residual (within columns)	1500	28	55		
Total	3300	31			
<b>Tukey's Multiple Comparison Test</b>	<b>Mean Diff.</b>	<b>q</b>	<b>Significant? P &lt; 0.05?</b>	<b>Summary</b>	<b>95% CI of diff</b>
0 uM vs 0.1uM	-4.9	1.9	No	ns	-15 to 5.3
0 uM vs 0.5uM	-12	4.6	Yes	*	-22 to -1.8
0 uM vs 1uM	-19	7.4	Yes	***	-30 to -9.2
0.1uM vs 0.5uM	-7.1	2.7	No	ns	-17 to 3.0
0.1uM vs 1uM	-15	5.5	Yes	**	-25 to -4.3
0.5uM vs 1uM	-7.4	2.8	No	ns	-18 to 2.8

Tabla 2. Análisis de Varianza. Índice de Apoptosis utilizando diferentes Concentraciones del MLN8237 durante 96 horas de Cultivo

Table Analyzed	Muerte 96h				
One-way analysis of variance					
P value	0.0002				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	4				
F	9.2				
R squared	0.50				
Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	2.4				
P value	0.4944				
P value summary	ns				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	850	3	280		
Residual (within columns)	860	28	31		
Total	1700	31			
<b>Tukey's Multiple Comparison Test</b>	<b>Mean Diff.</b>	<b>q</b>	<b>Significant? P &lt; 0.05?</b>	<b>Summary</b>	<b>95% CI of diff</b>
0 uM vs 0.1uM	-5.6	2.9	No	ns	-13 to 1.9
0 uM vs 0.5uM	-9.1	4.7	Yes	*	-17 to -1.6
0 uM vs 1uM	-14	7.2	Yes	***	-22 to -6.6
0.1uM vs 0.5uM	-3.5	1.8	No	ns	-11 to 4.1
0.1uM vs 1uM	-8.5	4.3	Yes	*	-16 to -0.93
0.5uM vs 1uM	-5.0	2.6	No	ns	-13 to 2.6

Table Analyzed	Muerte 120h				
One-way analysis of variance					
P value	P<0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	4				
F	11				
R squared	0.55				
Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	7.2				
P value	0.0650				
P value summary	ns				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	1100	3	370		
Residual (within columns)	920	28	33		
Total	2000	31			
<b>Tukey's Multiple Comparison Test</b>	<b>Mean Diff.</b>	<b>q</b>	<b>Significant? P &lt; 0.05?</b>	<b>Summary</b>	<b>95% CI of diff</b>
0 uM vs 0.1uM	-4.6	2.3	No	ns	-12 to 3.2
0 uM vs 0.5uM	-10	5.0	Yes	**	-18 to -2.3
0 uM vs 1uM	-16	7.7	Yes	***	-23 to -7.8
0.1uM vs 0.5uM	-5.5	2.7	No	ns	-13 to 2.3
0.1uM vs 1uM	-11	5.4	Yes	**	-19 to -3.2
0.5uM vs 1uM	-5.5	2.7	No	ns	-13 to 2.3

Tabla 3. Análisis de Varianza. Índice de Apoptosis utilizando diferentes Concentraciones del MLN8237 durante 120 horas de Cultivo

## ANEXO 5

### DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS

La autora de este trabajo, Ana Maritza Erazo Milla, y su directora de Tesis, Katherine J. Marcelain C., declaran **no tener conflictos de interés** en relación a este estudio y el uso de MLN8237.

Junio, 2014.

---

Ana Maritza Erazo Milla

---

Katherine J. Marcelain C.