

Índice de capítulos

1. Resumen	6
2. Introducción	7
3. Revisión bibliográfica	9
3.1 Ciclina D1 y la regulación del ciclo celular	9
3.2 Ciclina D1 y cáncer	10
3.3 Senescencia celular	11
3.4 Autofagia.....	13
3.5 Autofagia en cáncer.....	16
3.6 Autofagia y senescencia.....	17
3.7 Rol de ciclina D1 en la regulación de autofagia y senescencia.....	17
4. Objetivos	19
4.1 Objetivo general	19
4.2 Objetivos específicos	19
5. Materiales y métodos	20
5.1 Cultivo celular.....	20
5.2 Congelación de las células	20
5.3 Descongelación celular	21
5.4 Tripsinización.....	21
5.5 Ensayo de proliferación.....	22
5.6 Conteo celular	22
5.7 Actividad beta galactosidasa asociada a senescencia.....	23
5.8 Silenciamiento genético de P53 mediante shRNA.....	24
5.8.1 Transfección.....	24
5.8.2 Infección.....	25

5.8.3 Selección	25
5.9 Extracción de proteínas	26
5.9.1 Cuantificación de proteínas.....	26
5.9.2 Análisis proteico mediante técnica de western blotting.....	27
5.9.3 Preparación de geles de poliacrilamida.....	27
5.9.4 Preparación de las muestras	28
5.9.5 Electroforesis	28
5.9.6 Transferencia.....	29
5.9.7 Inmunoblotting.....	29
5.9.8 Revelado fotográfico.....	30
5.9.9 Tratamiento de los datos.....	30
6. Resultados	31
6.1 Análisis de expresión proteica	31
6.2 Efecto de la inhibición de CDK4/6 en la proliferación celular.....	32
6.3 Efecto de la inhibición de CDK4/CDK6 en senescencia celular	33
6.4 Estado de p53 y LC3 B en células AGS tratadas con palbociclib	34
6.5 Efecto anti-proliferativo de la inhibición farmacológica de CDK4/6 y autofagia	35
6.6 Efecto de la inhibición combinada de autofagia y CDK4/6 en senescencia.....	36
6.7 Efectos cualitativos de la inhibición de autofagia en células senescentes	38
6.8 Efecto del <i>Knock Down</i> de p53 en senescencia celular	39
6.9 Efecto del <i>Knock Down</i> de p53 en autofagia.....	41
7. Discusión.....	42
8. Conclusión	45
9. Bibliografía	46

Índice de figuras

Figura 1 Vías de p53 y pRB en senescencia.....	12
Figura 2 Etapas de autofagia.....	14
Figura 3 Regulación de autofagia.....	15
Figura 4 Estado de expresión de Ciclina D1, p53 y pRB en líneas celulares de cáncer gástrico.....	31
Figura 5 Efecto proliferativo de la inhibición de CDK4/CDK6 en líneas celulares de cáncer gástrico.....	32
Figura 6 Inducción de senescencia secundaria a la inhibición farmacológica de CDK4/CDK6 en líneas celulares de cáncer gástrico.....	34
Figura 7 Estado de p53 y LC3 Ben células AGS tratadas con palbociclib.....	34
Figura 8 Efecto de la inhibición farmacológica de CDK4/6 en combinación con inhibición de autofagia.....	35
Figura 9 Efecto en senescencia de la inhibición farmacológica CDK4/6 en combinación con inhibición de autofagia.....	37
Figura 10 Efectos cualitativos de la inhibición de autofagia en células AGS tratadas con palbociclib.....	38
Figura 11 <i>Knock Down</i> de p53 conduce a una disminución de la senescencia inducida por inhibición de CDK4/6 en células AGS.....	30
Figura 12 <i>Knock Down</i> de p53 conduce a un aumento en el flujo autofágico.....	41