



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

***EFEECTO DE LA VINBLASTINA EN LA
EXPRESIÓN DE GENES RESPONSABLES DEL
ARRESTO METAFÁSICO EN CÉLULAS
HUMANAS NORMALES***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

MARCO ALONSO ANDONEGUI ELGUERA

TUTOR: DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Carcinogénesis de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto de Investigaciones Biomédicas y el Instituto Nacional de Cancerología bajo la Tutela del Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo, con el apoyo de DGAPA, PAPIIT proyecto IN207105 y CONACYT proyecto 45875-M.

A mi madre y hermanos.

*Después de tanto tiempo postergado,
he llegado por fin a este nuevo inicio.*

AGRADECIMIENTOS

El aprendizaje y logros de estos últimos años en el Instituto Nacional de Cancerología son, en gran parte, resultado del apoyo y confianza de mi tutor el Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo.

Clementina Castro ha sido uno de mis principales apoyos en problemas técnicos y conceptuales, pero de forma más importante ha sido una amiga sincera, gracias Clemen.

Gracias por las enseñanzas, principalmente por exigir siempre una actitud crítica y reflexiva: Dr. Luis Felipe Jiménez y Dr. Emilio Rojas. Al Dr. Fabio Salamanca por sus consejos y a la Dra. María Eugenia Gonsebatt por sus observaciones.

Mi familia es el sostén indispensable para poder continuar en el camino de la ciencia. En especial debo agradecer a mi padrino, en quien tengo el apoyo de un padre.

La escuela “Calmecac” que se ha convertido en una segunda familia, en particular al profesor Roberto Loa un amigo entrañable. A mis amigos, los profesores: Ofelia, Patricia, Mónica y Gerardo.

El trabajo de laboratorio fue muy ameno gracias a la convivencia con mis camaradas Miguel, Lisandro y Diddier, y en general a toda la banda del Laboratorio de Carcinogénesis.

A mis amigos del IEEM, con quienes aprendí a disfrutar la sencillez de la vida. A la banda rocanrolera (Bostik).

Un agradecimiento especial para todos los profesores que han influido en mi desarrollo académico, empezando por mi madre, mi primera maestra. Es un orgullo pertenecer a la UNAM y específicamente a la Facultad de Ciencias, espero poder contribuir a su grandeza y prestigio.

RESÚMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
LOS EUKARIONTES	4
EL CONTROL DEL CICLO CELULAR EN EUKARIONTES	5
LOS PUNTOS DE MONITOREO	7
MITOSIS.....	7
ESTRUCTURA DEL CENTRÓMERO Y CINETOCORO	9
IMPORTANCIA DE LA TRANSICIÓN METAFASE-ANAFASE	12
EL PUNTO DE MONITOREO EN METAFASE	15
GENES Y PROTEÍNAS INVOLUCRADOS EN EL PMM	16
ORGANIZACIÓN JERÁRQUICA	17
FUNCIONAMIENTO Y MODELOS	18
ARRESTO PROLONGADO ¿HASTA CUÁNDO?.....	20
LA VINBLASTINA	23
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS PARTICULARES.....	24
JUSTIFICACIÓN	24
HIPÓTESIS	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
CULTIVOS PRIMARIOS.....	27
CULTIVO PRIMARIO DE FIBROBLASTOS	27
CULTIVO PRIMARIO DE LINFOCITOS	27
SINCRONIZACIÓN CELULAR	28
SINCRONIZACIÓN CELULAR EN FIBROBLASTOS.....	28
SINCRONIZACIÓN CELULAR EN LINFOCITOS.....	28
CURVA DE DOSIS	28
ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR.....	29
EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....	30
EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL.....	30
PCR SEMICUANTITATIVO	30
PCR EN TIEMPO REAL.....	31
RESULTADOS	33
LA SINCRONIZACIÓN DE CULTIVOS DE FIBROBLASTOS	33
ESTIMULACIÓN DE LINFOCITOS.....	35
EXPRESIÓN DE <i>BUB1B</i> A TRAVÉS DEL CICLO CELULAR.....	36

CURVA DE DOSIS DE LINFOCITOS	38
ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR EN LINFOCITOS TRATADOS CON VINBLASTINA (1 NM)	38
EXPRESIÓN GÉNICA (<i>BUB1</i> , <i>BUB1B</i> Y <i>MAD2</i>) EN CULTIVOS DE LINFOCITOS TRATADOS CON VINBLASTINA (1NM)	39
<u>DISCUSIÓN</u>	<u>40</u>
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DEL PMM.....	40
LA EXPRESIÓN DE <i>BUB1B</i>	41
LOS EFECTOS DE LA VINBLASTINA SOBRE LOS CULTIVOS DE LINFOCITOS	41
EL USO DEL MODELO EXPERIMENTAL	42
<u>REFERENCIAS.....</u>	<u>45</u>
<u>GLOSARIO.....</u>	<u>51</u>
<u>ABREVIATURAS:.....</u>	<u>55</u>

RESÚMEN

*La compleja estructura del genoma eucarionte requiere de un mecanismo especial para su segregación durante la división celular, la mitosis es dicho mecanismo y uno de los aspectos más importantes de su regulación está controlado por el punto de monitoreo metafásico (PMM) (46, 54). La función específica del PMM es evitar la progresión de Metafase hacia Anafase en caso de que no exista la unión o tensión adecuada entre algún cinetocoro y los microtúbulos del huso mitótico, permitiendo así una correcta segregación cromosómica. Los principales factores asociados al PMM son proteínas de las familias Mad y Bub, de las cuales Mad2 y BubR1 son los efectores directos de dicho punto al inhibir a APC/C (Complejo Promotor de la Anafase) (46). El PMM también es importante para la respuesta ante agentes quimioterapéuticos como la vinblastina y el taxol, que afectan la polimerización de microtúbulos. Se ha demostrado que el taxol modifica la expresión de genes del PMM y, de esta forma, podría inhibir al mismo permitiendo errores en la segregación cromosómica, sin embargo, no se conoce si la vinblastina puede tener el mismo efecto (12, 66). En este trabajo evaluamos el efecto de la vinblastina sobre la expresión de genes del PMM, utilizando concentraciones de dicho fármaco que no provocan un arresto celular, pero generan errores en la segregación de los cromosomas. Utilizando cultivos primarios asincrónicos de linfocitos humanos, se determinó, mediante un ensayo de micronúcleos, que la vinblastina 1nM provoca defectos en la segregación cromosómica, pero sin afectar la progresión en el ciclo celular. La misma concentración fue utilizada para evaluar la expresión de los genes *bub1*, *bub1b* y *mad2* mediante RT-PCR en tiempo real. Ninguno de los genes presentó cambios significativos en su expresión frente al tratamiento, por lo que las fallas en la segregación pudieron deberse a que la vinblastina 1nM no es capaz de activar al PMM o lo afecta a nivel de proteína y no de RNAm. Por otra parte, se lograron sincronizar cultivos primarios de fibroblastos en los que se evaluó la expresión de *bub1* (sin tratamiento), y se encontró que dicho gen se expresa de forma diferencial en el transcurso del ciclo celular, un aspecto sobre el que hay reportes contradictorios (10, 16, 32). Este es uno de los pocos estudios en los que se evalúa al PMM en cultivos primarios, pues la mayoría de las investigaciones relacionadas se han llevado a cabo en líneas celulares, las cuales pueden poseer defectos intrínsecos en el PMM, por lo anterior, será importante realizar más estudios en células normales, siendo el cultivo de fibroblastos un buen modelo debido a su homogeneidad y fácil sincronización.*

EFFECTO DE LA VINBLASTINA EN LA EXPRESIÓN DE GENES RESPONSABLES DEL ARRESTO METAFÁSICO EN CÉLULAS HUMANAS NORMALES

INTRODUCCIÓN

La continuidad y la diversidad son dos características fundamentales de la vida; ambas están relacionadas con una molécula que posee todo ser vivo: el ADN. El origen de la vida estuvo asociado muy probablemente a la aparición de una molécula que guardara información y a la vez pudiera ser duplicada, esto aseguraría que las características de los primeros sistemas vivos se pudieran heredar; sin embargo, al mismo tiempo pequeñas variaciones en la información heredada serían la materia prima a partir de la cual la selección natural permitiría el desarrollo de diferentes formas de vida (49, 37). Por lo anterior, a través de la evolución, la herencia y la variación han generado la enorme biodiversidad presente en la actualidad.

La información que determina las características de cualquier ser vivo se encuentra codificada en la secuencia de su ADN, un cambio en dicha secuencia (**mutación**) puede tener diferentes consecuencias: si modifica información esencial para la sobrevivencia de ese organismo, una mutación puede provocar su muerte; si por otra parte dicho cambio no afecta de forma importante la viabilidad del organismo, este puede mantenerse a través de las generaciones, alguna de estas mutaciones pueden conferir ventajas al individuo que las posee y entonces fijarse en la población (25). Debido a la importancia de la molécula de ADN, durante la evolución los seres vivos han desarrollado mecanismos complejos que aseguran la fidelidad en la transmisión de la herencia (34, 6).

Los Eucariontes

Existen dos grupos de seres vivos bien diferenciados en cuanto a su estructura celular, estos son los procariontes (**bacterias y arqueobacterias**) y los eucariontes (**protistas, hongos, plantas y animales**). Los primeros se denominan así porque no poseen un núcleo

celular verdadero, los eucariontes tienen un núcleo delimitado por una membrana doble (**envoltura nuclear**) además de poseer diferentes organelos citoplásmicos membranosos (33). Una de las diferencias más importantes entre los procariontes y eucariontes es la forma en que se encuentra organizado su genoma, mientras que en los procariontes el material genético esencial consta de una molécula circular de ADN sin proteínas constitutivas unidas a este, los eucariontes poseen generalmente más de una molécula de ADN en su núcleo, la cual se encuentra asociada a diversas proteínas, principalmente **histonas**, formando una estructura compleja denominada cromatina (33).

Debido a la diferencia en la estructura genómica entre procariontes y eucariontes, la forma de heredar la información genética entre una célula eucarionte y una procarionte es muy distinta. En una bacteria, por ejemplo la molécula circular de ADN es duplicada y después separada y segregada a las células hijas en una división celular normal, en cambio en una célula eucarionte, se debe asegurar que todos los cromosomas sean duplicados y que las células hijas obtengan una copia de cada uno de ellos, esto aumenta la complejidad de la división celular en este grupo.

El control del ciclo celular en eucariontes

Dos procesos son fundamentales para que se lleve a cabo la división celular: la duplicación del material genético (síntesis) y la segregación de este a las células hijas. En los eucariontes estos procesos son coordinados en el llamado ciclo celular, el cual consta de una fase de síntesis del ADN (S) y otra de segregación de cromosomas y división citoplásmica (mitosis y citocinesis, respectivamente), entre cada una de ellas se encuentran fases de intervalo denominadas G1 (entre mitosis y síntesis) y G2 (entre síntesis y mitosis); mediante esta secuencia una célula lleva a cabo la división celular. A las fases G1, S y G2 se les conoce, en conjunto, como interfase (38). Aunque en un ciclo común de división celular las fases mencionadas son consecutivas, en algunos procesos particulares esto no sucede así, por ejemplo en las primeras divisiones mitóticas de diversos embriones la fase de síntesis se continua con la mitosis sin fases G1 ni G2; la meiosis por otro lado se puede considerar como dos mitosis consecutivas en ausencia de una fase de síntesis; finalmente en las células de las glándulas salivales de larvas de ciertos dípteros se efectúan rondas consecutivas de síntesis

del material genético formando **cromosomas politénicos**. En los **megacariocitos** se presenta un fenómeno similar (denominado **endoreplicación**). Lo anterior demuestra que las diversas fases no son completamente dependientes entre sí (59, 15). Por otra parte, algunas células altamente diferenciadas pueden dejar de dividirse y mantenerse en una fase denominada G0, tal es el caso de las neuronas (38).

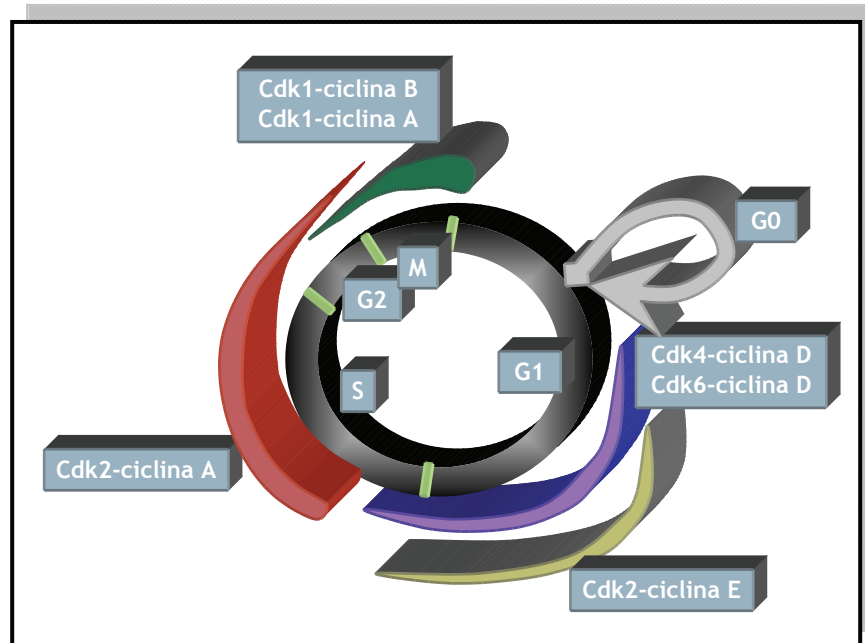


Figura 1: Fases del ciclo celular. La progresión celular está determinada por la activación de diferentes complejos ciclina/cdk, los cuales son específicos de ciertas etapas del ciclo.

La coordinación del ciclo celular en eucariontes depende de proteínas específicas: las **quinasas dependientes de ciclinas (Cdk)** y las ciclinas. Las Cdk fosforilan proteínas clave dentro del ciclo celular permitiendo la progresión de este, sin embargo, su función está supeditada a la unión a una de varias ciclinas, es decir, ciertas Cdk forman dímeros con determinadas ciclinas. Cada fase del ciclo celular está asociada a una pareja de Cdk/ciclina, la progresión hacia la mitosis, por ejemplo, está controlada por la ciclina B unida a la Cdk1 (en levaduras denominada *cdc2/cdc28*). Las diferentes Cdk se activan progresivamente durante el ciclo celular, pero también son inactivadas en etapas posteriores del mismo (Figura 1). La regulación de la función de las Cdk y ciclinas es compleja e incluye procesos de fosforilación, desfosforilación, inhibición por otras proteínas, localización celular, expresión génica y degradación mediada por la adición de moléculas de ubiquitina (15, 45).

Los puntos de monitoreo

De crucial importancia en el ciclo celular es que los diferentes procesos se efectúen de una manera coordinada, es decir que una fase no se inicie hasta que los procesos previos se hayan completado. Para este efecto la célula posee mecanismos de control denominados puntos de monitoreo, los cuales arrestan el ciclo celular en caso de que algún proceso no se lleve a cabo o se haya suscitado de una forma incorrecta, permitiendo tener más tiempo para completarlo (15).

Existen diferentes puntos de monitoreo a través del ciclo celular, los cuales vigilan distintos aspectos del mismo, tales como la síntesis completa del ADN, la presencia de daño en esta molécula, la formación adecuada del huso mitótico, entre otros (15, 45). De especial importancia para este trabajo es el punto de monitoreo de mitosis o metafásico, el cual se encarga de vigilar que la segregación cromosómica hacia las células hijas sea adecuada.

Mitosis

Mitosis proviene de un vocablo griego que significa “hilos” debido a la apariencia de las células en esta fase (33). La mitosis fue uno de los primeros fenómenos observados al microscopio, aunque paradójicamente sus bases moleculares se han comenzado a explicar de forma más bien reciente (44). Durante la mitosis el material genético duplicado durante la fase de síntesis es segregado a las células hijas. Cada cromosoma duplicado en la fase S se mantiene unido a su copia mediante un complejo proteico denominado **cohesina**, durante la mitosis una copia de cada cromosoma debe ser segregada a cada una de las células hijas, heredando estas un juego cromosómico idéntico al de la célula madre (54).

Para facilitar su estudio, la mitosis ha sido dividida en las siguientes subfases (Figura 2):

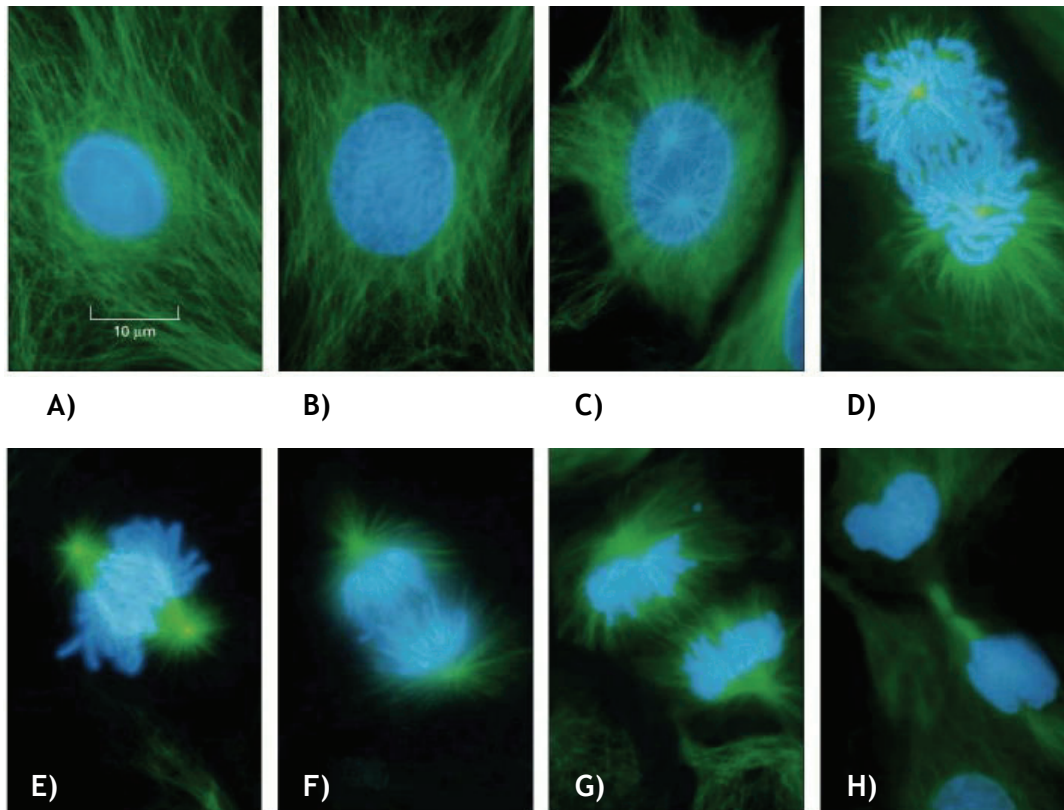


Figura 2: Aspecto de la cromatina (azul) y los microtúbulos (verde) durante las fases de la mitosis. *A/Interfase; B/Profase temprana; C/Profase tardía; D/Prometafase; E/Metafase; F/Anafase temprana; G/Anafase tardía; H/Telofase tardía (2).*

- **Profase:** El material genético que durante la interfase se encuentra disperso en el núcleo, se condensa en cromosomas bien definidos, cada uno formado por dos cromátidas unidas en una región denominada **centrómero**, en las células de vertebrados las cohesinas solo se mantienen en el centrómero gracias a la proteína shugosina (42, 57, 65) y las que se localizan en los “brazos” del cromosoma son degradadas durante esta fase. Al mismo tiempo, en el citoplasma los dos **centrosomas** (organelos duplicados a partir de un solo centrosoma durante la fase S) se separan y comienzan a formar el **huso mitótico**, el cual está estructurado por microtúbulos que se polimerizan a partir de ambos centrosomas, dando origen a un huso bipolar. Los microtúbulos del huso mitótico se originan por la polimerización de las unidades de tubulina que forman parte del **citoesqueleto** celular (2).

- **Prometáfase:** La envoltura nuclear se desintegra debido a la fosforilación de las lamina nucleares por el complejo ciclina/cdk (38). Los **microtúbulos** polimerizados a partir de los centrosomas alcanzan la región en donde se encontraba el núcleo. En la región centromérica se ensambla un complejo proteico denominado **cinetocoro** mediante el cual los cromosomas interactúan con los microtúbulos (2).
- **Metafase:** Durante esta fase los cromosomas se han unido a los microtúbulos del huso mediante sus cinetocoros (ensamblados uno en cada cromátida) y se alinean en el ecuador de la célula. A pesar de que en general esta fase es corta, su duración depende de las interacciones entre los microtúbulos y el cinetocoro, las cuales son azarosas (70). Es en este momento cuando el punto de monitoreo metafásico (PMM) define si la célula progresa a la siguiente fase (anafase) o no (4).
- **Anafase:** Las cromátidas unidas por el centrómero se separan al degradarse los complejos de cohesina en la región centromérica. Debido a la interacción del cinetocoro y los microtúbulos del huso, estos mueven a las cromátidas hacia polos opuestos (**anafase A**) mientras que los polos mismos (centrosomas) se separan uno del otro (**anafase B**) (2).
- **Telofase:** Los cromosomas se descondensan y reaparece la envoltura nuclear rodeando a los dos núcleos de las células hijas (2).

Estructura del centrómero y cinetocoro

Dos estructuras cromosómicas indispensables para llevar a cabo la mitosis son el centrómero y el cinetocoro. El centrómero es una región del cromosoma en donde se ensamblará el cinetocoro, es además, un locus determinado epigenéticamente por la incorporación en sus **nucleosomas** de CENP-A, una variante de la histona H3. Dispersa entre los nucleosomas que contienen a CENP-A, se encuentra también la histona H3 modificada (metilada en la lisina 9) (8). No se conoce exactamente la forma en que CENP-A es reclutada de forma específica en la región centromérica y en vertebrados posiblemente no depende de una secuencia específica en el ADN (8, 14). En los seres humanos la región centromérica está

caracterizada por presentar secuencias repetidas en tandem de aproximadamente 171 pares de bases, denominadas α -satélites, cerca de esta región se encuentra otra con características diferentes llamada región pericentromérica, la cual posee también secuencias α -satélite aunque separadas por secuencias no conservadas, no presenta la incorporación de CENP-A y sus nucleosomas poseen una histona H3 dimetilada en la lisina 4 (Figura 3b) (8).

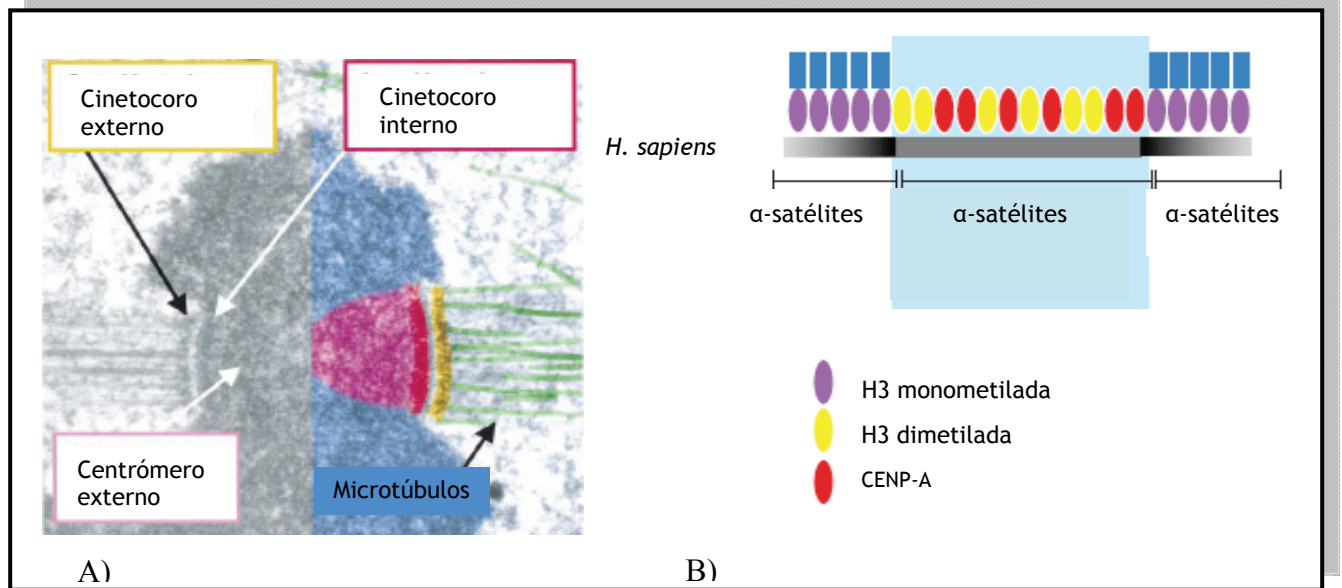


Figura 3: Micrografía de un cinetocoro unido a microtúbulos (A). Estructura de un centrómero humano (B) (8, 2006; 14).

Se cree que la región pericentromérica y la centromérica favorecen la incorporación de CENP-A en los centrómeros aunque ambas regiones no son indispensables para ello (8, 14).

Durante mucho tiempo se observó la estructura del cinetocoro mediante microscopía electrónica como una región trilaminar originada en la superficie de los centrómeros, las zonas diferenciadas se denominaron placa interna, placa externa (y entre ambas una zona intermedia) y corona fibrosa (Figura 3a) (14). Sin embargo, solo se conocían pocas proteínas estructurales del cinetocoro, se sabía que para su formación eran esenciales ciertas proteínas centroméricas (CENP-A, CENP-B, CENP-C, etc.), las cuales se mantienen asociadas al centrómero de forma constitutiva. Las primeras proteínas centroméricas fueron distinguidas por su reactividad ante el suero de pacientes con enfermedades autoinmunes (3). Por otra parte también se pudieron identificar algunas de las proteínas cercanas a la superficie del

cinetocoro; no obstante, lo que menos se conocía era la composición de la región intermedia e interna del cinetocoro (11, 14).

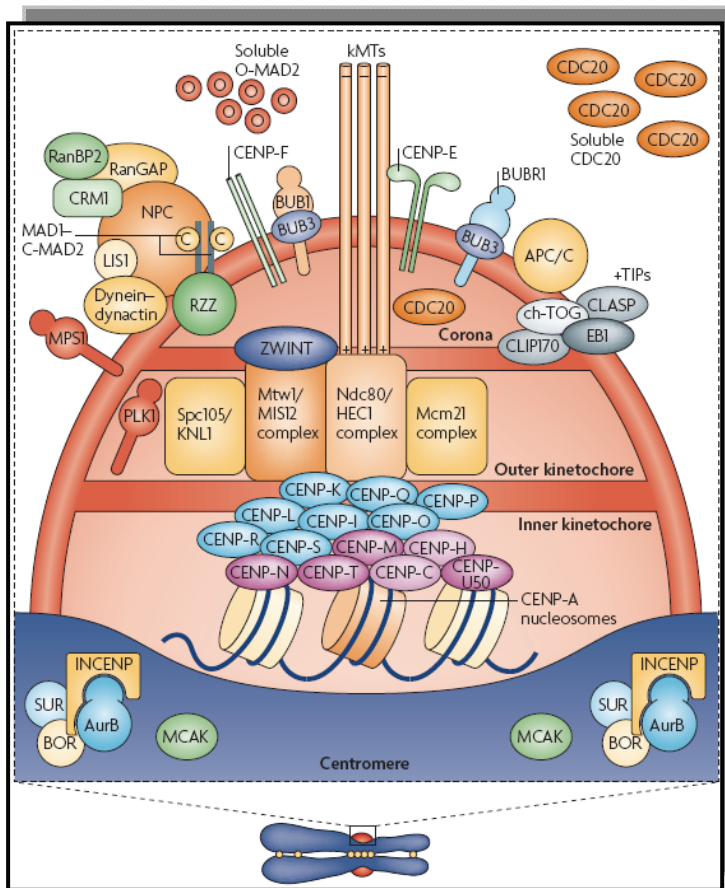


Figura 4: Modelo actual del cinetocoro de vertebrados (46)

En 2006 dos reportes independientes lograron identificar complejos proteicos asociados a CENP-A que eran importantes para el reclutamiento de otras proteínas y que incluían a proteínas centroméricas conocidas y otras descubiertas por primera vez en estas asociaciones, tales como CENP-M, N y T, de tal forma que el modelo actual del cinetocoro es más completo y los nuevos complejos proteicos encontrados son posiblemente el enlace entre las proteínas del centrómero, la placa interna y la placa externa del cinetocoro (Figura 4) (43, 50).

Importancia de la transición Metafase-Anafase

La compleja maquinaria formada durante la mitosis es un reflejo de la importancia de este proceso, complejidad que es compartida por todos los eucariontes aunque con algunas variaciones, por ejemplo, la presencia de **cromosomas holocéntricos** en algunos organismos (18). La función primordial de la mitosis es que durante la división celular las dos células hijas formadas posean un juego completo de cromosomas idéntico al de la célula madre, para este efecto la transición de metafase hacia anafase es crucial. Durante la metafase las cromátidas hermanas se encuentran unidas por el centrómero, mientras que el cinetocoro de cada una de ellas está asociado a microtúbulos de polos opuestos (unión anfitélica). Los microtúbulos de cada polo ejercen fuerzas sobre los cromosomas mediante los cinetocoros, esta tensión es la que permite la alineación de los cromosomas en el ecuador de la célula. Debido a que la unión de los microtúbulos a los cinetocoros es azarosa, se pueden tener diferentes dificultades, por ejemplo que un cinetocoro se una a los dos polos (unión merotélica), que los dos cinetocoros se unan al mismo polo (unión sintélica) o que solo uno de los cinetocoros de cromátidas hermanas se una a un polo del huso (unión monotélica) estos defectos pueden ocasionar que la segregación falle y de como resultado que las células hijas no reciban la misma información genética, alguna puede recibir más de un cromosoma, en tanto que la otra puede tener menos cromosomas que la célula madre, a esta condición se le denomina **aneuploidía** (Figura 5) (13).

Las aneuploidías pueden ocasionar diversas disfunciones en las células, en los seres humanos por ejemplo, si se presentan en células germinales que llegan a formar un cigoto, pueden ocasionar la inviabilidad del producto; algunas aneuploidías pueden permitir el desarrollo embrionario y fetal aunque con la presencia de ciertas malformaciones, como es el caso del síndrome de Down que se debe a la presencia de un cromosoma extra (el **cromosoma 21**) (40, 13); por otra parte muchos de los tumores sólidos son aneuploides, por lo que se ha argüido que la generación de aneuploidías está directamente relacionada con la carcinogénesis al aumentar la tasa de cambios genéticos, permitiendo la transformación de una célula normal en una célula maligna (52, 55, 22).

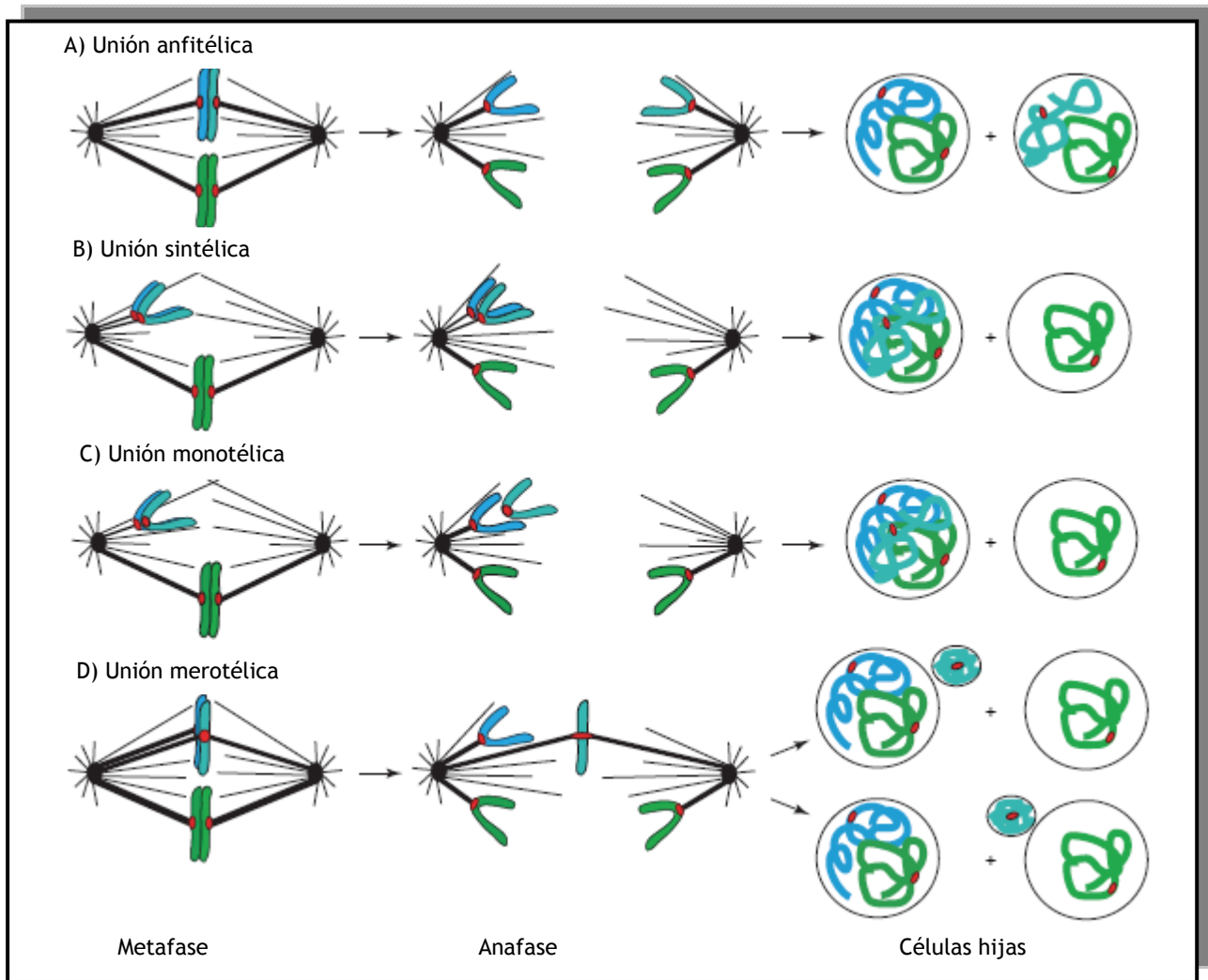


Figura 5: Diferentes posibilidades de interacción entre los cinetocoros y los microtúbulos del huso. Las interacciones inadecuadas pueden ocasionar la pérdida de material genético (13, 2005).

La función de APC

La transición de metafase hacia anafase está controlada por un grupo de proteínas denominado complejo promotor de la anafase o ciclosoma (APC/C). Este complejo tiene la función de una enzima **E3 ubiquitin ligasa**, que junto con la enzima **E2** une varias moléculas

de **ubiquitina** a proteínas específicas generando una marca que las destina a su destrucción por el **proteosoma** (53). La anafase se inicia una vez que las cromátidas hermanas se separan debido a la degradación de las cohesinas, dicha degradación es responsabilidad de la **separasa**, una enzima que se encuentra inhibida por la unión a otra proteína: la **securina**. Entonces, para que se inicie la anafase se requiere que la separasa deje de ser inhibida por la securina, el complejo APC/C se encarga de ello al ubiquitinar a la securina, liberando a la separasa, la cual rompe la unión física entre cromátidas hermanas (46).

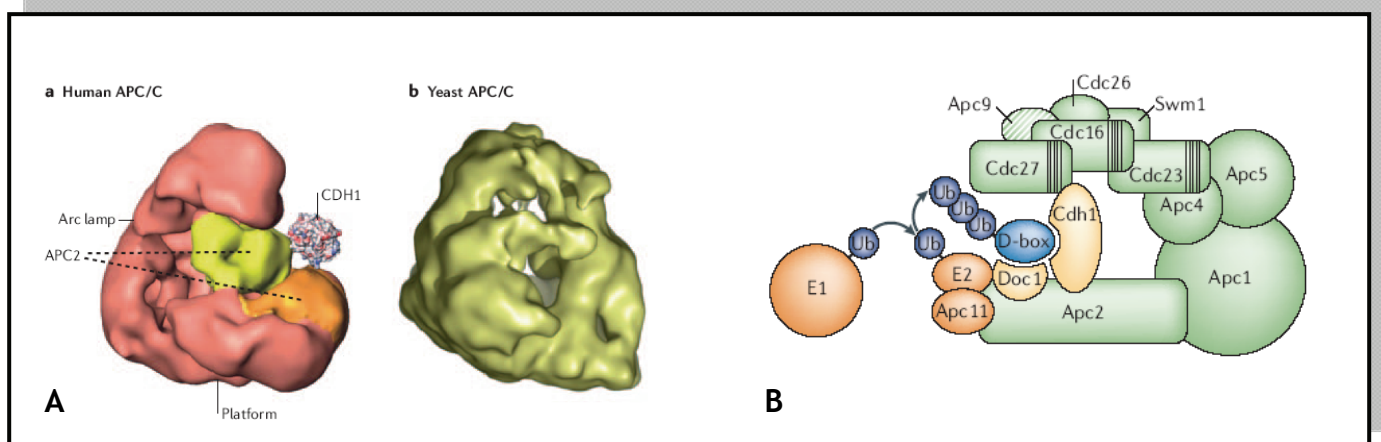


Figura 6: Modelo molecular de APC/C en el que se observa la región en que se une el coactivador CDH1 (A). Subunidades de APC/C necesarias para el reconocimiento y ubiquitinación de proteínas con un dominio D-box (caja de destrucción) (B) (53).

La regulación de APC/C es compleja y no completamente entendida, sin embargo, un factor clave es su unión a proteínas coactivadoras, como Cdc20 o Cdh1. Se cree que estas proteínas facilitan el reconocimiento de sustratos por parte de APC/C. Para que APC/C pueda iniciar la anafase debe estar unida a Cdc20, posiblemente en una región similar a la que requiere para la unión con Cdh1 (Figura 6) (53). Una característica de APC que no

ha sido explicada es su gran complejidad, pues a pesar de estar formada por al menos 12 subunidades y poseer un peso de 1.5 MDa realiza una función similar a otras proteínas E3 que poseen un tamaño mucho menor, tales como SCF (53).

El punto de monitoreo en metafase

Para que la segregación cromosómica se efectúe de manera correcta, se debe asegurar que todos los cromosomas se unan al huso mitótico en una unión anfitélica, aunque debido a la naturaleza estocástica de dicha unión (70), llevarla a cabo puede requerir más tiempo en algunos cinetocoros que en otros. Para que exista el tiempo necesario para llevar a esta unión, es necesario inhibir la función de APC/C para evitar el inicio de la anafase de una manera prematura, esta función la lleva a cabo el PMM, el cual también es conocido como el punto de monitoreo del huso, punto de monitoreo mitótico o el punto de monitoreo del cinetocoro. En este trabajo se utilizará el término punto de monitoreo en metafase, aunque realmente este mecanismo comienza a funcionar desde la prometafase (46).

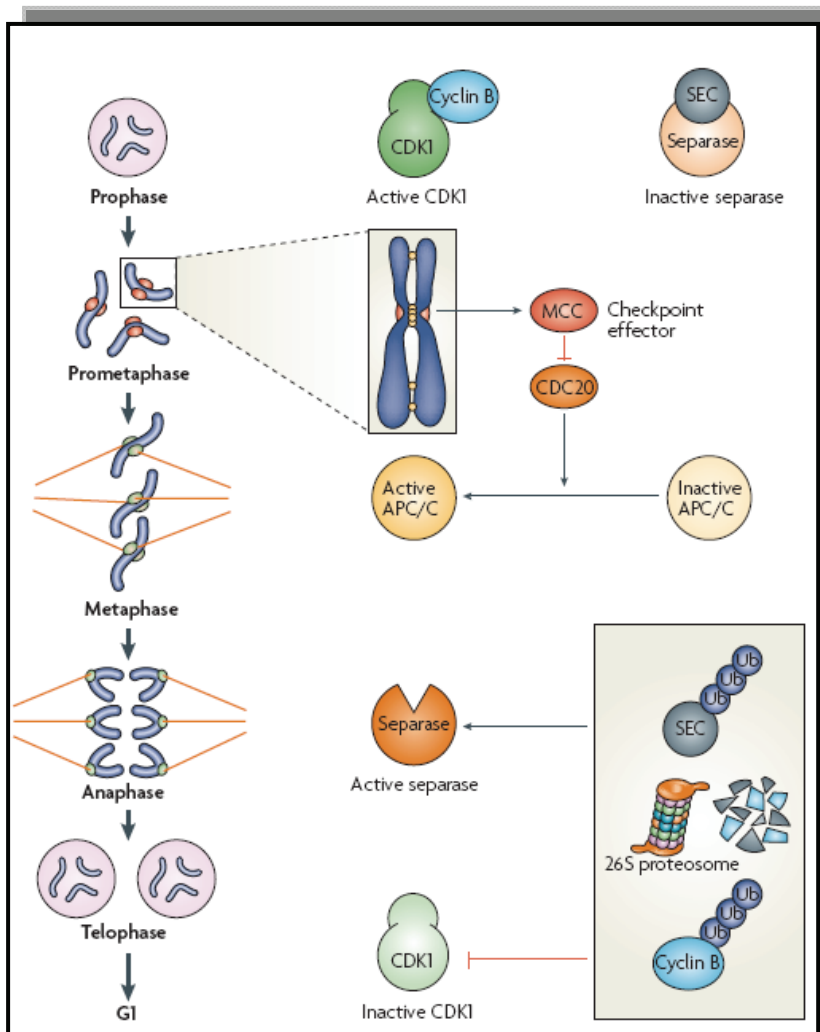


Figura 7: El PMM inhibe a APC/C hasta que los cinetocoros son ocupados por microtúbulos. Cuando APC/C se activa, conduce a la anafase al ubiquitinar a la securina (46).

A pesar de que las primeras observaciones de la mitosis describían a la metafase como un periodo de relativa inactividad en el que los cromosomas se alineaban en el ecuador, actualmente se sabe que es un momento de intensa actividad en el que las proteínas del cinetocoro (en la corona fibrosa) presentan una enorme dinámica vigilando la interacción de este con los microtúbulos. Dos aspectos importantes de esta dinámica son vigilados por el PMM: la unión de los microtúbulos al cinetocoro (a un cinetocoro de vertebrados se unen cerca de 20 microtúbulos) y la tensión ejercida por esta unión. En caso de que exista un defecto en la unión o tensión en los cinetocoros, el PMM evita la progresión hacia anafase extendiendo el tiempo disponible para corregir estos errores (54) (Figura 7).

Genes y proteínas involucrados en el PMM

En estudios de levaduras mutantes, que no podían llevar a cabo el arresto mitótico al ser tratadas con fármacos que inhiben la formación del huso, se descubrieron los primeros genes asociados a este punto de monitoreo. Debido al arresto en respuesta al daño sobre el huso mitótico observado en estas investigaciones, a este punto de monitoreo se le denominó punto de monitoreo del huso (46). Dos grupos independientes descubrieron un par de familias génicas asociadas al PMM, la familia de genes *mad* (*mad1*, *mad2* y *mad3* llamados así por las siglas en inglés de *Mitotic Arrest Deficient*) y la familia de genes *bub* (*bub1* y *bub3* de la abreviación en inglés, *Budding Uninhibited by Benomyl*) posteriormente se encontraron genes homólogos en otros organismos, aunque en vertebrados se encontró un gen denominado *bub1b* (que codifica para la proteína BubR1) que poseía homología tanto a *mad3* como a *bub1* (46, 4).

Mediante aproximaciones con diferentes técnicas, se fueron conociendo más factores asociados a este punto de monitoreo, de los cuales los principales en células de vertebrados son: *Mps1* (*monopolar spindle 1*), Aurora B, Survivina, Borealina, INCEN-P (proteína del centrómero interno), CENP-E (proteína centromérica E), el complejo RZZ (ROD-ZW10-ZWILCH), p31^{comet}, dineína y dinactina. Aunque la función de cada uno de estos componentes no está bien definida, se sabe que su disfunción afecta la respuesta del PMM (46).

Organización jerárquica

Las primeras investigaciones acerca de la estructura física del punto del PMM, demostraron que para su funcionamiento era indispensable la formación del cinetocoro (51), lo que dio indicios de la importancia de esta estructura en la activación y funcionamiento de este punto de vigilancia. Posteriormente se observó que la mayor parte de las proteínas que participan en el PMM, se encuentran unidas desde la prometafase a los cinetocoros de los cromosomas, en una zona denominada corona fibrosa (14).

Uno de los aspectos de debate acerca de la función y estructura del PMM, es la forma en que las diferentes proteínas participantes se unen al cinetocoro. Aunque los resultados de diferentes investigaciones no son del todo coincidentes, una de las conclusiones que se han obtenido es que existe un orden jerárquico en cuanto la unión de las proteínas del PMM al cinetocoro (8). Las proteínas Aurora B, INCEN-P, Survivina y Borealina (Conocidas como *Proteínas Pasajeras del Cromosoma*) forman un complejo que se une a la región centromérica, y cuya unión es un requisito para la incorporación de las demás proteínas del punto de monitoreo. Una vez que este complejo se une a la región correspondiente, las proteínas Bub1, Bub3, CENP-E y Mps1 se incorporan a la estructura del cinetocoro y permiten que las demás proteínas del punto se asocien también, sin embargo, parece no haber una interdependencia entre las uniones de las últimas proteínas de la vía (11, 64).

Un aspecto interesante de la formación del complejo del PMM en los cinetocoros, es que en este también se recluta a Cdc20 y al mismo APC/C, por lo que se cree que la inhibición de la función de APC se da en parte por el control de su localización (1).

Una de las asociaciones más importantes en la formación de este enorme complejo proteico, es la dimerización de Mad1 con Mad2. Para que Mad2 pueda unirse a los cinetocoros se requiere que Mad1 se ancle primero a estos, no obstante, una vez que los microtúbulos del huso mitótico interactúan con los cinetocoros, ambas proteínas desaparecen de estas estructuras, sugiriendo que Mad1 y Mad2 participan en el PMM ante la ausencia de microtúbulos en el cinetocoro. Aunado a lo anterior, se ha observado que la unión de Mad2 a los cinetocoros presenta una elevada dinámica con tasas de intercambio muy rápidas.

Funcionamiento y Modelos

La forma en que el punto de monitoreo en metafase inhibe a APC/C no es del todo clara. Se ha demostrado que tanto Mad2 como BubR1 pueden unirse directamente a Cdc20 en sitios diferentes de la molécula, lo que podría secuestrar a este factor y evitar la activación de APC/C (46, 31). En 2001 se descubrió un complejo inhibidor de APC/C (llamado Complejo del Punto de Monitoreo de Mitosis, MCC por sus siglas en inglés) en células Hela, que poseía una capacidad inhibitoria 3 000 veces mayor que Mad2 *in vitro*, este complejo tiene relaciones casi estequiométricas de Mad2, Bub3, BubR1 y Cdc20 además de unirse a APC/C; sin embargo, se observó que dicho complejo está presente a través de todo el ciclo celular y no solamente durante la mitosis, por lo que se especula que este puede ser “sensibilizado” para inhibir a APC/C sólo durante la actividad del PMM (60). Sin embargo, no se ha podido determinar si el MCC es independiente de los complejos Mad2-Cdc20 y BubR1-Cdc20 o si estos últimos “sensibilizan” o ayudan a formar al mismo MCC (5).

La “ocupación” de los cinetocoros

Una conclusión clara de distintas investigaciones es que el PMM se activa cuando los cinetocoros no están asociados a microtúbulos, una activación que es dependiente del complejo Mad1-Mad2. Se ha observado que estas proteínas colocalizan en cinetocoros sin microtúbulos, en donde Mad1 se encarga de reclutar a Mad2, y desaparecen una vez que los cinetocoros se encuentran “ocupados” por los microtúbulos. Por otra parte se ha descubierto que la dimerización de Mad2 con Mad1, modifica su estructura convirtiéndola de una conformación abierta (Mad2-O) a una cerrada (Mad2-C) siendo la conformación C más adecuada para la unión e inhibición de Cdc20. Debido a que Cdc20 y Mad1 se unen a la misma región de Mad2, se ha propuesto un modelo de acción para estas proteínas llamado de “intercambio” según el cual Mad1 recluta a Mad2 a los cinetocoros “desocupados” y cambia la conformación de Mad2 de O a C, posteriormente la conformación C se libera de los cinetocoros y se une e inhibe a Cdc20 en el citosol (29). Posteriormente se descubrió que Mad2 podía formar homodímeros lo que llevó a la propuesta de otro modelo llamado de

“templado” en el que Mad1 se une a Mad2 de forma estable cambiando su conformación de O a C, posteriormente otra molécula de Mad2-O del citosol se dimeriza con el Mad2-C que se encuentra en el cinetocoro, la dimerización convierte a Mad2-O en Mad2-C el cual es liberado e inhibe a Cdc20 (48, 29). Actualmente las pruebas parecen apoyar más al modelo de “templado” (Figura 8). Sin embargo, ningún modelo predice como Mad2-C, unido a Cdc20, amplifica la señal de tal forma que un solo cinetocoro “desocupado” puede inhibir la acción de APC/C en toda la célula. Este mecanismo podría ser autocatalítico, aunque según modelos matemáticos este sistema no podría explicar la función completa del PMM (20) o mediante la formación del MCC (46).

El papel de la tensión

Otro aspecto que vigila el PMM es la tensión ejercida por el huso mitótico sobre los cinetocoros, la cual permite la congregación cromosómica en el ecuador celular durante la metafase; no obstante, la importancia de este fenómeno en la activación del PMM es controversial pues experimentos en los que se tratan células con **taxol** (una sustancia que estabiliza la polimerización de microtúbulos y por lo tanto no afecta la unión de estos al cinetocoro), provocan la activación del PMM con una disminución de la localización de Mad2 y Mad1 en la corona fibrosa, además micro manipulaciones que generan una tensión artificial en los cinetocoros son suficientes para silenciar al PMM, sin embargo, también se ha observado que la eliminación de uno de los cinetocoros en un cromosoma mitótico, no genera una señal de arresto a pesar de que afecta la tensión en el cinetocoro de la otra cromátida (47). Aunque es difícil evaluar si la tensión ejercida en los cinetocoros es suficiente para activar al PMM, es claro que la tensión y la ocupación de los cinetocoros provocan diferentes efectos con respecto a las proteínas del punto de monitoreo: ante la ausencia de microtúbulos en los cinetocoros, se mantiene la asociación en estos de Mad2 y Mad1; por otra parte si los cinetocoros son “ocupados” por microtúbulos pero la tensión es afectada, Mad2 y Mad1 se desacoplan de los cinetocoros mientras se conservan BubR1 y Bub3, además se conserva también un **epítipo** fosforilado que es reconocido por el **anticuerpo 3F3/2**, el cual pertenece a alguna proteína no identificada pero que se encuentra en el cinetocoro y se desfosforila una vez que la tensión ejercida en este es adecuada. Debido a lo anterior, se ha

propuesto que el PMM posee dos vías diferenciadas, una que se activa frente a cinetocoros desocupados, y otra dependiente de la tensión (39).

Finalmente, la función de otras proteínas del PMM no está del todo definida; Bub1 es una cinasa necesaria para la unión de las demás proteínas del punto de monitoreo, pero además realiza otras funciones importantes como el reclutamiento de la proteína shugosina que evita la degradación de las cohesinas en la prometafase (35); la cinasa Aurora B desestabiliza uniones de microtúbulos que no generan una tensión adecuada y se cree que funciona como un “sensor” de la misma, por otra parte, Aurora B tiene un papel estructural en el reclutamiento de otras proteínas al cinetocoro (21); CENP-C (una proteína con un dominio de cinesina) interactúa con BubR1 y activa la función de cinasa de esta proteína en ausencia de microtúbulos en el cinetocoro, mientras que la inactiva durante la “ocupación” del mismo (Figura 8); se cree que el complejo RZZ participa en el reclutamiento de Mad1 y Mad2 a los cinetocoros; finalmente la proteína p31^{comet} se une a Mad2 y podría evitar la formación del dímero Mad2-Cdc20 de forma espontánea en el citosol, además de participar en el silenciamiento del PMM (46).

El fin del arresto

Una vez que la “ocupación” del cinetocoro y la tensión ejercida sobre este son logradas, el PMM debe “apagarse” para permitir la transición hacia la anafase, algunos de los mecanismos propuestos para este fin son: la separación de los cinetocoros de proteínas del PMM mediada por la dineína; la activación de p31^{comet} que inhibe la formación del complejo Mad2-Cdc20; finalmente la degradación mediada por ubiquitinación de Mps1 y la ciclina B (Figura 8) (56).

Arresto prolongado ¿Hasta cuándo?

Un aspecto interesante del PMM es su función ante un arresto prolongado. En la quimioterapia contra algunos tipos de cáncer se utilizan fármacos que afectan la formación

del huso mitótico, tales como la vinblastina, vincristina y paclitaxel (Tabla 1) y que pueden provocar un arresto metafásico.

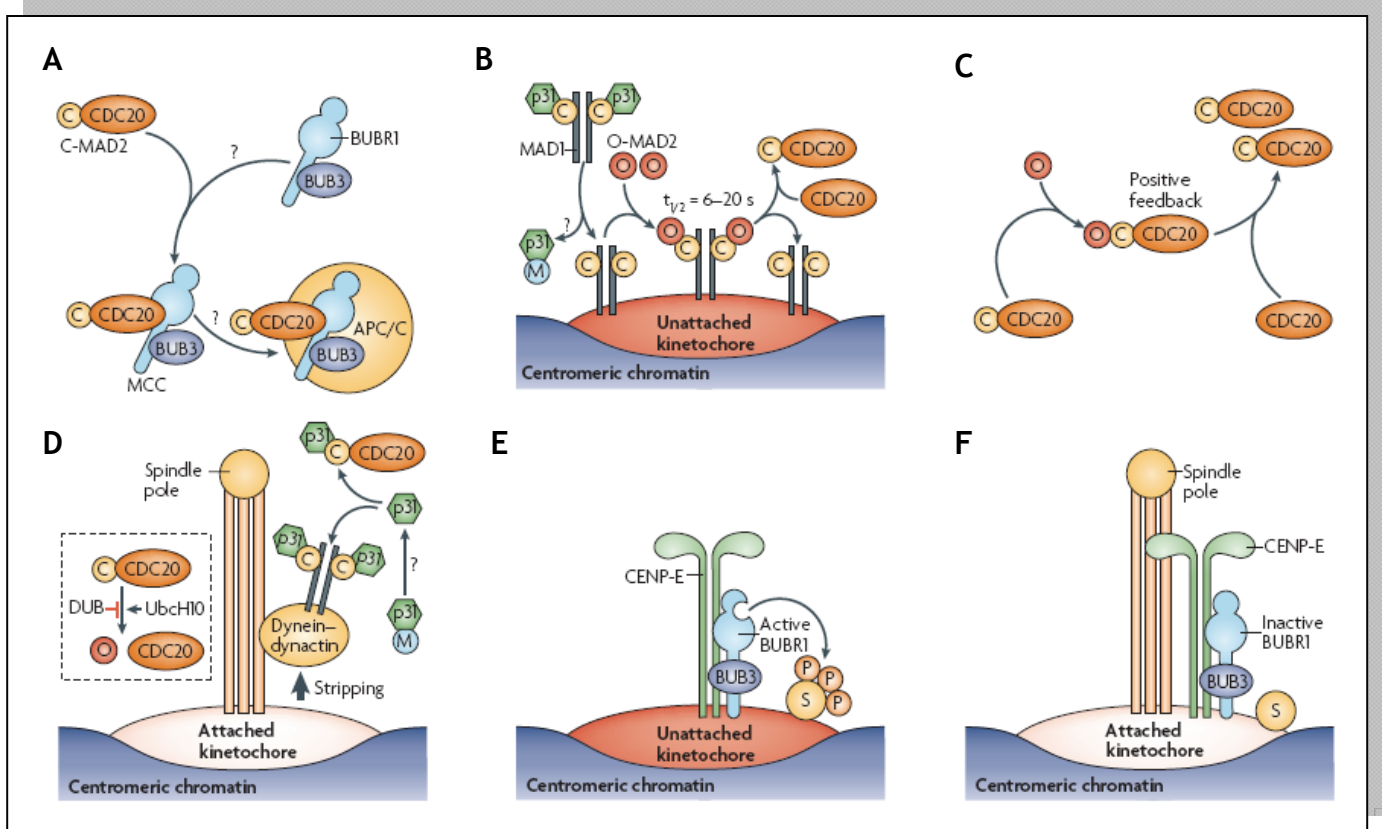


Figura 8: La formación del complejo MCC puede estar regulada por la formación del complejo Mad2-Cdc20 y BubR1-Cdc20 A. Modelo de “templado” para la formación de Mad2-C B. Para lograr la amplificación de la señal, el complejo Mad2-Cdc20 podría provocar la formación de nuevos complejos Mad2-Cdc20 en un sistema autocatalítico C. El silenciamiento del PMM puede deberse a la inhibición de Mad2 por p31 y a la eliminación de Mad1 y Mad2 de los cinetocoros por medio de la dineína D. Bub3, BubR1 y CENP-E pueden ser una rama de la señalización del PMM ante la falta de unión de los cinetocoros a los microtúbulos, cuando los cinetocoros son “ocupados” CENP-E inhibe a BubR1 y podría silenciar al PMM de esta manera (46).

Existen diferentes consecuencias del arresto prolongado provocado por estas sustancias, una de ellas podría ser la muerte inmediata de la célula por defectos en la consecución de la mitosis (**catástrofe mitótica**); por otra parte el fármaco podría ser eliminado de la célula y esta retornaría al ciclo celular de una forma normal; otra consecuencia importante sería que las células evadieran el arresto (fenómeno denominado adaptación) sin llevar a cabo la citocinesis y manteniendo un genoma **tetraploide**, estas

células podrían continuar su ciclo celular con este contenido de ADN, sufrir procesos de **senescencia** o bien podrían morir por **apoptosis** (66). Esta última opción ha sido comprobada experimentalmente y un requisito importante para llevarla a cabo es que las células posean un PMM eficiente (62).

Tabla 1: Fármacos que afectan el huso mitótico, utilizados en quimioterapia. El tratamiento de primera línea se refiere a la opción terapéutica estándar de preferencia para un determinado tipo de cáncer, en caso de falta de respuesta, recaída o toxicidad, se utilizan fármacos de segunda línea y eventualmente de tercera línea (17).

Fármaco	Tipo Cáncer	1a línea	2a línea	3era línea
Vincristina	Linfoma Hodgkin	x		
	Linfoma No Hodgkin	x		
	Tumor Neuroectodérmico Primitivo	x		
Vinblastina	Tumor de células germinales de testículo		x	
Vinorelbina	Cáncer de mama metastásico		x	
	Cáncer de ovario recurrente		x	x
Paclitaxel	Cáncer de pulmón tratamiento adyuvante	x		
	Cáncer de mama tratamiento neoadyuvante y adyuvante	x		
	Cáncer de mama metastásico	x		
	Cáncer gástrico enfermedad avanzada		x	
	Cáncer de cabeza y cuello tratamiento neoadyuvante	x		
	Cáncer de pulmón enfermedad metastásica	x		
	Cáncer de pulmón tratamiento adyuvante	x		
	Cáncer de testículo platino resistente			x
	Cáncer de cérvix metastásico	x		
	Angiosarcoma	x		
Docetaxel	Cáncer de mama tratamiento neoadyuvante y adyuvante	x		
	Cáncer de mama enfermedad metastásica	x		
	Cáncer de próstata hormonorefractario	x		
	Cáncer de cabeza y cuello tratamiento neoadyuvante	x		
	Cáncer gástrico enfermedad avanzada	x		
	Cáncer de ovario recurrente			x

Aunque no se conoce el mecanismo que une la vía de señalización del PMM con la apoptosis, se ha descubierto que las proteínas Bax, PAK1 y la vía de JNK, participan

activamente en la muerte celular mediada por fármacos cuyo blanco es el huso mitótico (26, 61, 63, 41).

A pesar de la utilización común de estos fármacos en quimioterapia, su forma de acción y los efectos celulares que generan son solo parcialmente conocidos, por lo que la resistencia ante estos compuestos tampoco está claramente definida.

La vinblastina

En la década de 1950, los laboratorios Eli Lilly demostraron que la vinblastina (un **vinca alcaloide**) poseía una capacidad antiproliferativa importante. El descubrimiento de la vinblastina fue el resultado de un estudio sobre la efectividad del uso de una planta llamada *Vinca rosea* (actualmente clasificada como *Catharanthus roseus*) en el tratamiento de la diabetes (9). Aunque no se le encontró utilidad en el tratamiento de la diabetes, se observó que algunas sustancias de la planta eran capaces de disminuir la población de glóbulos rojos en sangre, las sustancias se identificaron posteriormente como vinblastina y vincristina (9).

Actualmente se sabe que la vinblastina actúa sobre los microtúbulos al inhibir la polimerización de subunidades de α - y β - tubulina (los **monómeros** que forman a los microtúbulos). La acción de la vinblastina depende de su concentración: a bajas concentraciones se cree que estabiliza la polimerización de la tubulina, mientras que en concentraciones altas la inhibe. El sitio de unión de la vinblastina a la tubulina fue descrito recientemente (27) y en parte explica los fenómenos observado en los microtúbulos ante la presencia de a este fármaco. A pesar de los estudios realizados con la vinblastina, no se conoce exactamente cuál es su mecanismo de acción, se sabe que podría originar aneuploidías sin embargo el papel que juega el PMM frente a estos efectos no ha sido descrito completamente.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la vinblastina puede afectar la expresión de genes que monitorean la adecuada segregación cromosómica, en concentraciones que provocan una mala segregación cromosómica, pero no generan un arresto en metafase.

Objetivos Particulares

- Determinar la concentración de vinblastina que genera errores en la segregación cromosómica sin arrestar a las células en mitosis
- Evaluar la expresión de los genes de interés a través del ciclo celular en células normales para definir si estos se expresan de acuerdo al ciclo celular
- Definir si existe un cambio en la expresión de los genes antes mencionados durante la exposición a vinblastina
- Analizar los posibles cambios en el ciclo celular generados por la vinblastina, es decir si esta modifica los tiempos de progresión de las células a través del ciclo.

JUSTIFICACIÓN

El PMM es un mecanismo indispensable en los procesos hereditarios de los eucariontes. La mayor parte de las proteínas que participan en este punto se han conservado durante la evolución en todos los grupos eucariontes, lo que refleja su importancia (69). Por otra parte, los genes del PMM son esenciales para la viabilidad celular y para el desarrollo normal de organismos multicelulares, posiblemente porque este mecanismo es la principal protección contra la generación de aneuploidías, es decir, evita la pérdida o ganancia de cromosomas completos durante los procesos de división celular (36).

Una célula aneuploide modifica su genoma de una forma radical, cada cromosoma posee miles de genes, y la ganancia o pérdida de uno o más de ellos significa un aumento o disminución enorme en la cantidad de genes presentes en el núcleo celular. La generación de aneuploidías es una característica común en muchos tumores sólidos, lo que permite predecir que este tipo de inestabilidad cromosómica está relacionada directamente con la carcinogénesis, una hipótesis propuesta hace cerca de un siglo por Theodor Boveri (22). Además, la segregación cromosómica inadecuada durante la meiosis puede ocasionar la formación de cigotos aneuploides, la mayoría de los cuales no son viables o presentan malformaciones durante el desarrollo. En los seres humanos la ganancia de un cromosoma en las células germinales puede generar padecimientos como el síndrome de Down (40, 13).

Desde el descubrimiento de los primeros factores que participan en el PMM, se ha intentado encontrar una asociación entre la generación de aneuploidías y fallas en la activación y consecución de este mecanismo. Algunos de los primeros reportes acerca de esta asociación fueron la presencia de mutaciones en genes del PMM en tumores malignos (7). A partir de estos descubrimientos se buscaron más mutaciones que explicaran la inestabilidad cromosómica en diferentes tipos de cáncer, sin embargo, se observó que dichas mutaciones eran más bien raras, por lo que se dedujo que la inestabilidad cromosómica en los tumores se debía principalmente a otros factores. Posteriormente, varias investigaciones demostraron que algunos tipos de cáncer presentaban tasas de expresión anormales en genes del PMM. Aunque en un inicio solo se reportó la subexpresión, descubrimientos subsecuentes encontraron que también la sobreexpresión de estos genes se asocia a la inestabilidad cromosómica (73, 19, 72, 68).

Así mismo, se ha observado que durante el envejecimiento, la expresión de algunos genes del PMM disminuye en ovocitos humanos (40, 58), lo que concuerda con el hecho de que mujeres en edad avanzada poseen una mayor probabilidad de procrear hijos con padecimientos relacionados a las aneuploidías, como el síndrome de Down. En base a lo mencionado, es posible que la disfunción del PMM se relacione principalmente a la expresión de los genes que participan en él y no a mutaciones.

Los primeros genes del PMM se descubrieron al tratar a células de levaduras con agentes que afectan al huso mitótico. Estos mismos tipos de agentes son utilizados actualmente en la terapia contra diferentes tipos de cáncer, sin embargo, la forma en que actúan en la célula no está bien entendida.

Se ha descubierto que el taxol puede afectar la expresión génica (12), no obstante, no se ha determinado si la vinblastina puede tener un efecto similar, ya que ambos poseen diferentes mecanismos de acción sobre los microtúbulos. Por otra parte, la respuesta del PMM ante concentraciones bajas de agentes que interfieren con los microtúbulos no es muy clara, debido a que generalmente dicha respuesta se ha evaluado ante concentraciones altas, que generalmente ocasionan un arresto. Es posible que ante daños menores en el huso mitótico, pequeños cambios en la expresión o el funcionamiento de factores del PMM puedan tener consecuencias importantes. Finalmente, el modelo utilizado para estudiar al PMM puede ser fundamental, pues la mayor parte de las investigaciones en células humanas se realizan con líneas celulares, las cuales pueden poseer defectos intrínsecos en el PMM, mientras que pocos estudios evalúan la eficiencia de este punto de monitoreo en células normales.

HIPÓTESIS

La vinblastina modifica la expresión de genes del punto de monitoreo metafásico en concentraciones que no producen un arresto mitótico, pero que provocan errores en la segregación cromosómica; dicha modificación promueve la disfunción del PMM permitiendo la generación de aneuploidías.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos primarios

Cultivo primario de fibroblastos

Se utilizaron cultivos primarios de fibroblastos humanos a partir de viales de células congeladas del segundo pasaje. El cultivo primario se inició a partir de tejido de prepucio de infantes, establecido usando métodos descritos previamente (24). El contenido de los viales fue descongelado y agregado a 10 mL de medio de cultivo, posteriormente esta mezcla fue centrifugada durante 10 minutos a 1 200 rpm, el sobrenadante fue desechado y el pellet resuspendido en medio de cultivo, las células resuspendidas fueron cultivadas en cajas de cultivo de 125 cm². Las células fueron crecidas en medio DEMEM High Glucose (GIBCO-Invitrogen) suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB; HyClone) al 10% y Antibiótico-Antimicótico (GIBCO-Invitrogen) al 1%. La división de los cultivos se realizó utilizando 2 mL de tripsina TrypLe Express (GIBCO-Invitrogen) durante 2 minutos, posteriormente las células podían ser sembradas o congeladas en viales de 2 mL con 5 a 7 millones de células por vial resuspendidas en 900 µL de Suero Fetal Bovino (SFB) y 100 µL de DMSO (SIGMA) y almacenadas a -80°C. Los cultivos fueron mantenidos a una temperatura de 37°C con una concentración de CO₂ del 5%.

Cultivo primario de linfocitos

Se aislaron linfocitos de sangre periférica de donadores sanos. El aislamiento de linfocitos se realizó con Medio para Separación de Linfocitos (Bio*Whittaker). Se colocaron 20 mL del Medio de Separación en un tubo cónico de 50 mL y se agregaron lentamente por las paredes del tubo 20 mL de sangre total, después se centrifugó a 1200 rpm durante 30 minutos usando una aceleración media y sin freno, los leucocitos eran observados como una capa blanquecina intermedia en el gradiente a partir de la cual se obtuvieron las células para el cultivo. Para cada experimento se sembraron aproximadamente 4 millones de células en 10 mL de medio de cultivo RPMI 1640 (GIBCO-Invitrogen) suplementado con SFB (HyClone) al 10%, aminoácidos no esenciales (Sigma) al 1%, L-glutamina (GIBCO-Invitrogen) al 1% y 30 µL

de fitohemaglutinina (GIBCO-Invitrogen) 2mg/mL para estimular la proliferación de linfocitos T. Los cultivos fueron mantenidos a una temperatura de 37°C con una concentración de CO₂ del 5%.

Sincronización celular

Sincronización Celular en fibroblastos

Se utilizó el método de eliminación del SFB del medio de cultivo, mediante el cual las células del cultivo son arrestadas en la fase G1 del ciclo celular debido a la falta de factores de crecimiento. Para eliminar este arresto las células son cultivadas con medio suplementado con SFB (10%). Para evaluar la mejor sincronización celular mediante la técnica anterior se realizaron diversos ensayos: se eliminó completamente el SFB durante 12 y 24 horas y se observó el grado de sincronización; también se eliminó el SFB de forma gradual cultivando a las células con medio adicionado con SFB al 5% durante 12 y 24 horas, antes de eliminar el suero completamente durante otras 24 horas. Para evaluar la eficiencia de la sincronización, los diferentes tratamientos para la eliminación del SFB fueron acompañados de la tinción de las células cultivadas con yoduro de propidio para su análisis bajo citometría de flujo.

Sincronización celular en linfocitos

Se evaluó la sincronía de los cultivos de linfocitos a partir de su cultivo con fitohemaglutinina, la cual estimula prácticamente solo a los linfocitos T. A partir de la adición de fitohemaglutinina, se tomaron muestras de cultivos a intervalos de 6 h. hasta las 72 h. para definir en qué tiempo los linfocitos comenzaban a proliferar y si avanzaban a través del ciclo celular de una manera sincrónica.

Curva de dosis

Para determinar la dosis de vinblastina a utilizar, se realizaron ensayos de micronúcleos con citocinesis bloqueada, utilizando cultivos de linfocitos. Se cultivaron las

células durante 48 h con las condiciones de cultivo antes mencionadas, a partir de las cuales se adicionó vinblastina [0.0001 μM], [0.001 μM], [0.01 μM], [0.1 μM] y [1.0 μM] y 30 μL de citocalasina (Sigma) a una concentración de 2 mg/mL para inhibir la citocinesis, 24 h. después se fijaron las células con una solución 3:1 de metanol/ácido acético 24 h, antes de su tinción con azul de metileno y eosina. El conteo de micronúcleos se realizó siguiendo los criterios definidos previamente (23) contando un total de 1 000 células binucleadas por cada condición, entre las que se determinó el número que presentaban micronúcleos. La dosis elegida para los demás experimentos fue aquella en la que se originaban una mayor cantidad de micronúcleos. Las laminillas que no presentaban células binucleadas fueron omitidas del conteo.

Análisis del ciclo celular

Se determinó la posición de los diferentes cultivos en el ciclo celular con respecto al contenido total de ADN de las células de cada uno de ellos, lo anterior fue evaluado mediante la tinción del material genético con yoduro de propidio y su lectura en un citómetro de flujo. Las células a evaluar fueron centrifugadas (10 min a 1200 rpm) y el pellet obtenido se resuspendió en PBS y se volvió a centrifugar (10 min a 1200 rpm) para eliminar el medio restante. El pellet final se resuspendió en 4.5 mL de etanol al 70% (frío) y se almacenó a -20°C por lo menos 24 h antes de su procesamiento para la lectura en el citómetro, posteriormente las células fueron centrifugadas y lavadas una vez con PBS (en las mismas condiciones ya mencionadas), el sobrenadante fue desechado y las células se resuspendieron en 0.5 mL del amortiguador de yoduro de propidio, esta mezcla fue incubada durante 20 min a una temperatura de 37°C en la oscuridad antes de su evaluación en el citómetro. El amortiguador de yoduro de propidio se preparó de la siguiente manera: se agregaron 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de yoduro de propidio (Sigma) en un amortiguador de citratos al 1.1% con 1 mg/mL de RNasa A (USB). Se utilizó un citómetro FACsort (Becton Dickinson), la captura de los datos se realizó con el programa Cell Quest y el análisis con ModFit LT. Para el modelado de las distintas fases del ciclo celular se utilizaron como controles linfocitos fijados inmediatamente después de su aislamiento (sin cultivo), los cuales se encuentran en general en la fase G1.

Evaluación de la expresión génica

Extracción de ARN total

Para determinar la expresión génica, las células de los cultivos fueron lavadas con PBS y centrifugadas eliminando el sobrenadante. Para la extracción del ARN total se utilizó el kit RNAeasy Mini (QIAGEN) siguiendo los pasos indicados, el número de células utilizado para la extracción de ARN fue entre 2 y 4 millones, al ARN extraído y disuelto en aproximadamente 50 µL de agua libre de RNAsas se le adicionó 1 µL de RNasa Out (Invitrogen).

Síntesis del ADN complementario (cDNA): Se utilizó el kit SuperScript™ III Platinum® Two-Step qRT-PCR Kit with SYBR® Green. Para la síntesis del cDNA se utilizaron 500 ng de ARN total.

Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados para la amplificación en el PCR.

Gen	Oligos	Exones abarcados	Producto (pb)
<i>bub1</i>	For. 5'-AACTT GCGTCTACAC CATTG-3' Rev. 5'-CTG TTT TGG GCT TTT CTC TTG-3'	Del 16 al 18	191
<i>bub1b</i> (<i>bubR1</i>)	For. 5'-AGCCAGAACAGAGGACTCCA-3' * ¹ Rev. 5'-CAGGCTTTCTGGTGCTTAGG-3' * ¹ For. 5'-CTCAAACCTCAGAAAGCATCAC-3' * ² Rev. 5'-AAAGGAGTGGATACAAAACGAG-3' * ²	Del 7 al 9 Del 14 al 15	358 197
<i>mad2</i>	For. 5'-GCAGTTTGATATTGAGTGTGACAAG-3' Rev. 5'-ACTCTTCCCATTTTTTCAGGTACAAC-3'	Del 3 al 5	209
<i>gapdh</i>	For. 5'- ACCCACTCCTCCACCTTTG-3' Rev. 5'- CTCTTGTGCTCTTGCTGGG-3'	Del 8 al 9	117

*¹ Utilizados en PCR semicuantitativo.

*² Utilizados para PCR en tiempo real.

PCR semicuantitativo

Como un acercamiento al análisis de la expresión de *bub1b* durante el ciclo celular en fibroblastos, se realizó un PCR semicuantitativo (Tabla 2) para determinar si existían cambios notables en la expresión de este gen después de la sincronización celular a través del tiempo. Las condiciones del PCR fueron: 95°C 5 min, posteriormente 20 ciclos a 95°C 1 min, 61°C 1 min y 72°C 1 min. El producto obtenido fue analizado en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

PCR en tiempo real

El análisis cuantitativo de la expresión se realizó en el Smart Cycler® (Cepheid) utilizando SuperScript™ III Platinum® Two-Step qRT-PCR Kit with SYBR® Green. Los genes analizados fueron: *bub1*, *bub1b*, *mad2* y se utilizó a *gapdh* como control interno (Tabla 3 y 4).

El diseño de los oligonucleótidos se realizó con el programa Gene Fisher (bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher/old.html) y su análisis con el programa Oligo Analyzer 3.0 (www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer) tomando en consideración aquellos que abarcaran por lo menos dos exones, que la región a amplificar tuviera cerca de 200pb y que la formación de homodímeros y heterodímeros entre ellos tuviera una ΔG lo mayor posible y no menor a -5.

La reacción de PCR en tiempo real fue optimizada utilizando el siguiente protocolo:

Tabla 3: Estandarización PCR en tiempo real.

	Volumen (µL) para una reacción
SuperMix* ¹	13.5
Forward (10µM)	0.5
Reverse (10µM)	0.5
DMSO* ²	1
cDNA	8.8
H2O	2.7

*¹ Kit SuperScript™ III Platinum® Two-Step qRT-PCR Kit with SYBR® Green.

*² Se utilizó para disminuir la formación de dímeros entre los oligos.

Tabla 4: Temperaturas y tiempos utilizados en el PCR en tiempo real

Gen	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3 (45 ciclos)	Etapa 4 (Curva de de fusión)
<i>bub1</i>	50 °C - 2 min.	95 °C - 2 min.	95 °C 15 s. 60 °C 30 s.	60 - 95 °C
<i>bub1b</i> (BubR1)	50 °C - 2 min.	95 °C - 2 min.	95 °C 15 s. 59 °C 30 s.	60 - 95 °C
<i>mad2</i>	50 °C - 2 min.	95 °C - 2 min.	95 °C 15 s. 57 °C 30 s.	60 - 95 °C
<i>gapdh</i>	50 °C - 2 min.	95 °C - 2 min.	95 °C 15 s. 59 °C 30 s.	60 - 95 °C

Todas las reacciones se realizaron por triplicado y el C_T utilizado fue el promedio de las tres lecturas para cada muestra. Para el análisis cuantitativo se eligió arbitrariamente un umbral de 10 para determinar el C_T en la reacción. Se realizaron curvas estándar para cada región amplificada hasta obtener coeficientes de correlación mayores o iguales a 0.99, las curvas se efectuaron con diluciones del producto purificado a partir de geles de agarosa usando el DNA Gel Extraction Kit (Millipore), las diluciones correspondían a 10^9 , 10^8 , 10^7 y 10^6 moléculas. Se utilizó el método $2^{-\Delta(\Delta CT)}$ para evaluar el cambio en la expresión como se ha descrito previamente (71; 19, 2004). Para determinar la formación del producto, se analizó la curva de fusión obtenida en el PCR en tiempo real y las muestras se corrieron en geles de agarosa al 2% para asegurar la presencia de los productos deseados.

RESULTADOS

La sincronización de cultivos de fibroblastos

Debido a la posibilidad de que los genes a estudiar se expresaran de forma diferencial durante el ciclo celular, fue necesario sincronizar los cultivos para evitar variaciones debidas a la heterogeneidad del cultivo con respecto a la progresión celular. Uno de los métodos más utilizados para sincronizar cultivos celulares es la eliminación del suero del medio de cultivo, destituyendo a este de los factores de crecimiento que promueven la proliferación celular. Se realizaron diversos ensayos experimentales para adecuar el método de sincronización por eliminación de suero en los cultivos. En primer lugar se determinó el tiempo en el que un cultivo sin suero arresta una mayor cantidad de células en la fase G1, para lo cual se eliminó el SFB en cultivos con una confluencia cercana al 60% y se tomaron muestras durante 12, 24 y 48 h. Se encontró que después de 24 h de cultivo sin SFB, existía un mayor número de células en fase G1 (Figura 9).

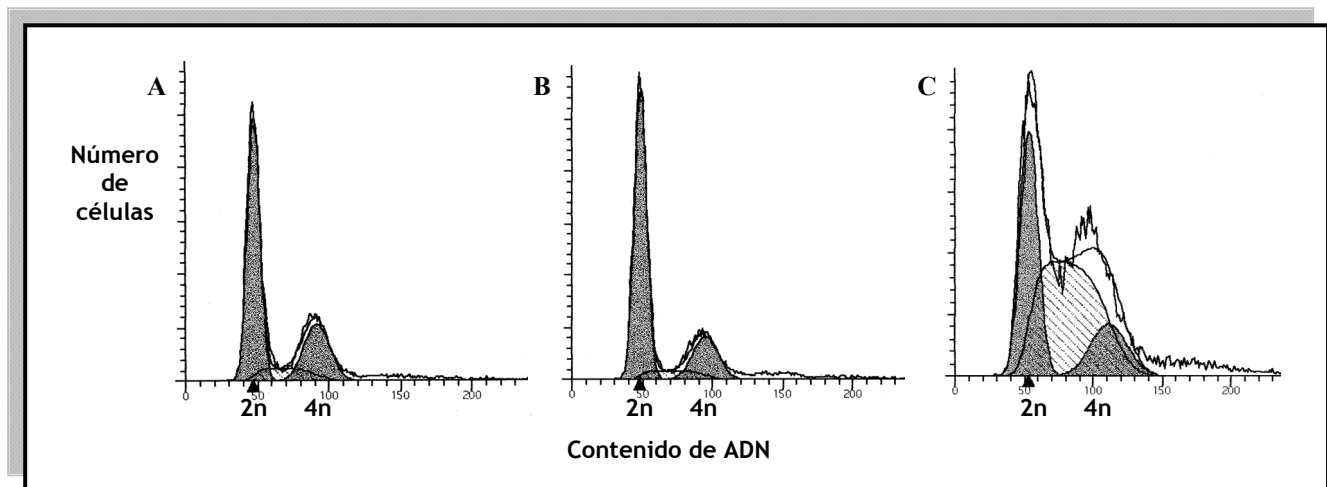


Figura 9: A) Cultivo sin SFB durante 12 h; se encontró un porcentaje celular de 61.43% en G0-G1; 11.53% en S y 24.01% en G2-M; B) Cultivo sin SFB durante 24 hrs. 69.98% de las células se encontraban en G0-G1; 9.05% en S y 20.97% en G2-M; C) Control, 32.61% en G0-G1; 53.51% en S y 18.88% en G2-M.

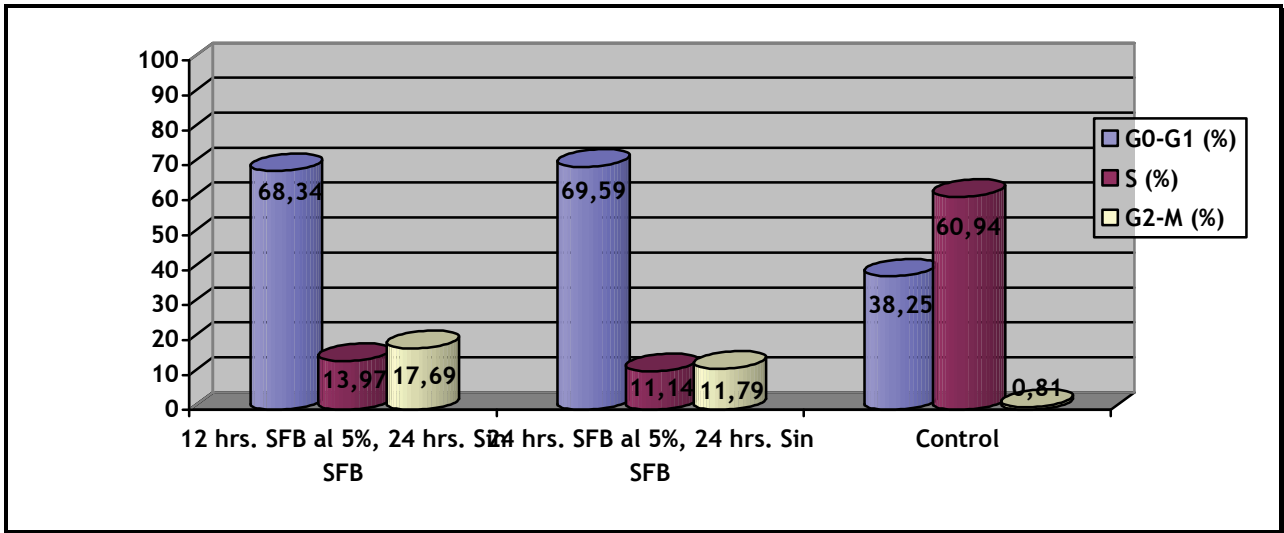


Figura 10: Porcentaje de fibroblastos en las diferentes fases del ciclo celular mediante el arresto por eliminación del SFB. Las 24 h sin SFB presentan el mayor número de células en G0-G1.

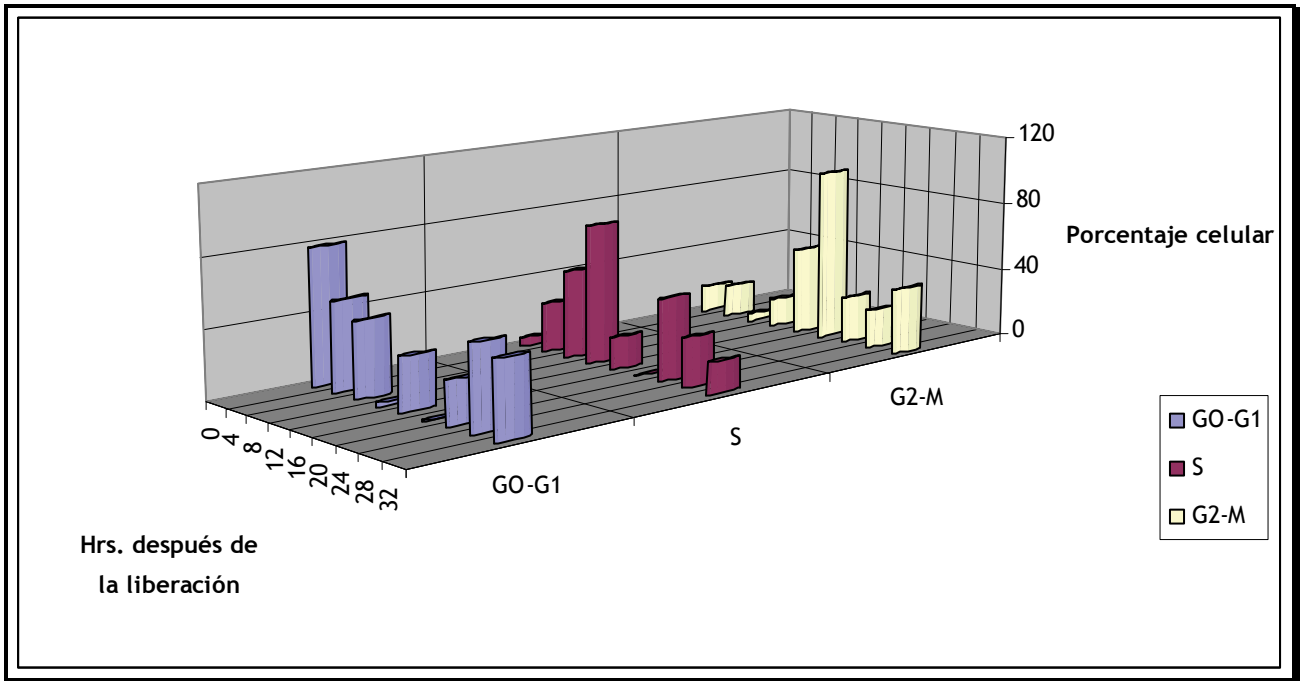


Figura 11: Progresión celular de cultivos de fibroblastos, una vez liberados del arresto por eliminación de SFB. El porcentaje de G0-G1 disminuye conforme pasa el tiempo mientras que el de S y G2-M aumenta, la fase S presenta un pico del 80% a las 12 h mientras que el 99% de las células a las 20 h se encontraban en G2-M lo que demuestra una adecuada sincronización celular.

Para evitar el estrés celular debido a la eliminación abrupta del SFB del medio de cultivo, se realizó otro experimento en el que antes de la destitución del SFB se disminuía el porcentaje utilizado en el medio del 10% al 5% durante diferentes tiempos (Figura 10). El método que se utilizó en adelante fue el cultivo con medio al 5% de SFB (24 h) antes de la eliminación completa del SFB (24 h)

Una vez sincronizados los cultivos, estos eran liberados al cultivarse en condiciones normales (con SFB al 10%). Para determinar si una vez liberados, los cultivos se comportaban de una manera sincrónica, se tomaron muestras de cultivos a diferentes intervalos a partir de la liberación del arresto y se procesaron para su análisis por citometría de flujo (Figura 11).

Estimulación de linfocitos

Los linfocitos que se encuentran en la sangre periférica están generalmente en un estado **quiescente** es decir, en la fase G0 del ciclo celular. En cultivo, la fitohemaglutinina estimula prácticamente solo a los linfocitos T para que comiencen la división celular, por ello decidimos iniciar el cultivo de linfocitos y observar si estos proliferaban de una manera sincrónica para utilizarlos de forma análoga a los cultivos sincronizados de fibroblastos. Para analizar si los cultivos de linfocitos se comportaban de una manera sincrónica, estos fueron cultivados con fitohemaglutinina y después fueron fijados para su análisis por citometría de flujo a diferentes intervalos. Cerca de las 14 h se comienza a observar un aumento en las células que entran en mitosis, sin embargo, hasta las 72 h las células en fase G1 no disminuyen de manera importante (Figura 12). De lo anterior se desprende que los cultivos de linfocitos no representan una población homogénea durante la progresión en el ciclo celular, y no se comportan como cultivos sincrónicos.

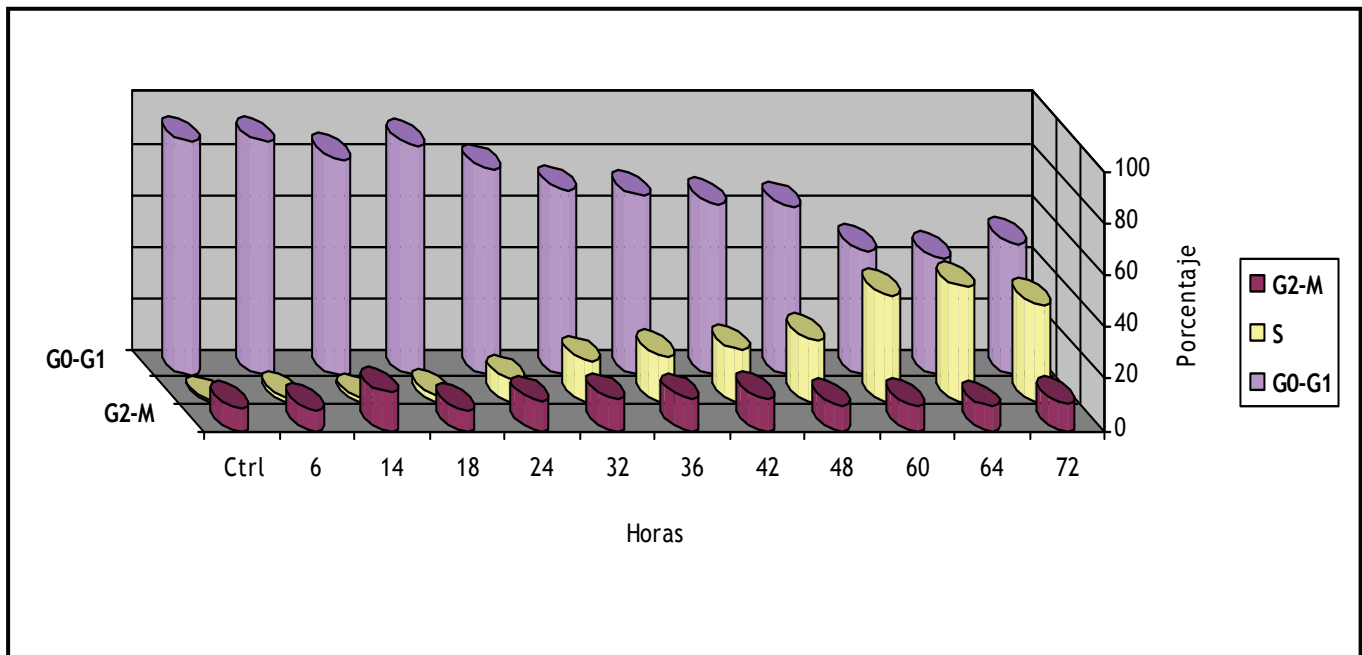


Figura 12: Progresión celular de cultivos de linfocitos después de la estimulación con fitohemaglutinina. A través del tiempo las poblaciones celulares en G2-M y S aumentan aunque no superan el 50%, por otra parte, hasta las 72 h no existe una disminución notable en la población celular en G0-G1.

Expresión de *bub1b* a través del ciclo celular

Uno de los aspectos debatidos con respecto a la expresión de los genes del PMM, es si esta es diferencial a través del ciclo celular. Existen reportes contradictorios acerca de este aspecto por lo que decidimos hacer un experimento en el que se evaluó la expresión de *bub1b* después de la liberación de fibroblastos. En primer lugar se realizó un ensayo semicuantitativo en el que se observaba la aparición gradual de *bub1b* después de la liberación (Figura 13 A). Este ensayo se repitió utilizando un análisis cuantitativo mediante PCR en tiempo real y se confirmó un aumento notable y progresivo en la expresión de *bub1b* (Figura 13 B y C, y Tabla 5).

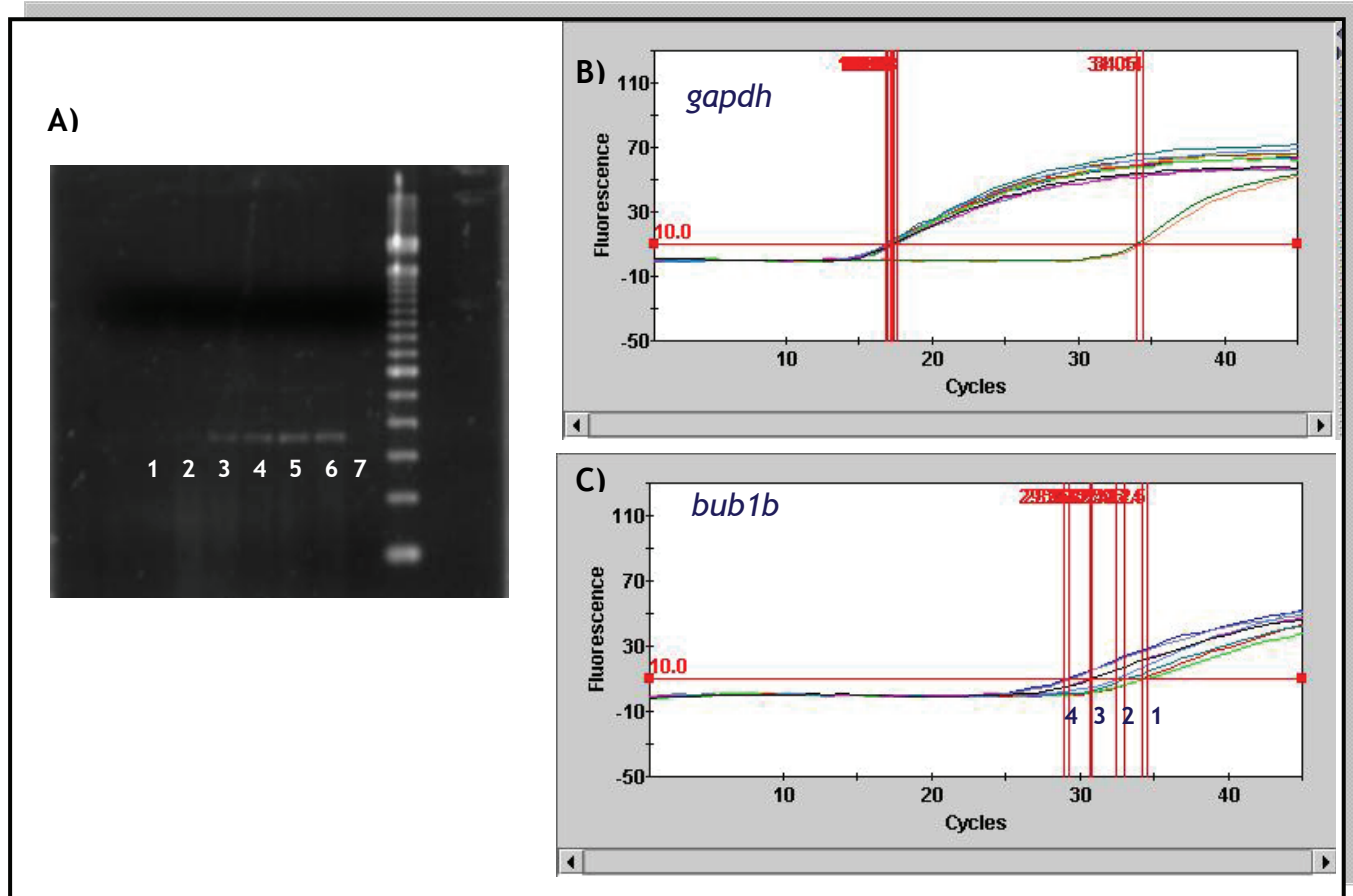


Figura 13: Expresión de *bub1b* después de la sincronización de fibroblastos a diferentes intervalos (1/0 h, 2/4 h, 3/8 h, 4/12 h, 5/24 h, 6/45 h, 7 control negativo). La expresión de *bub1b* es observable en el análisis semicuantitativo a las 8 h y aumenta con el tiempo (A). Expresión de *gapdh* (control interno) de las muestras 1, 2, 3 y 4, todas cruzan el umbral en el mismo punto reflejando una expresión similar (C). Expresión de *bub1b* analizada por PCR en tiempo real, la muestra 4 amplifica primero y de forma consecutiva las muestras 3, 2 y 1 de forma concordante con los resultados del PCR semicuantitativo. La expresión se normalizó utilizando a GAPDH como gen de referencia (B).

Tabla 5: Cambios en la expresión de *bub1b* después de la sincronización

	1 (0 h)	2 (4 h)	3 (8 h)	4 (12 h)
<i>gapdh</i> (C _T)	17.05	16.88	17.32	17.41
<i>bub1b</i> (C _T)	34.37	32.7	30.75	29.08
Cambio en la expresión *	1	2.84	14.83	50.21

*El número indica el cambio en la expresión con respecto al tiempo 1 (2 significaría el doble de la expresión con respecto al tiempo 1, mientras 0.5 sería la mitad de la expresión de la muestra 1)

Curva de dosis de linfocitos

Mediante los ensayos de micronúcleos, se definió la dosis de vinblastina que generaba el índice más alto de daño cromosómico. La dosis encontrada fue de 1nM (Figura 14). Cuando se utilizaron dosis más elevadas (≥ 10 nM) no se pudieron encontrar células binucleadas debido que a esas dosis las células se arrestaban y no lograban dividirse o morían.

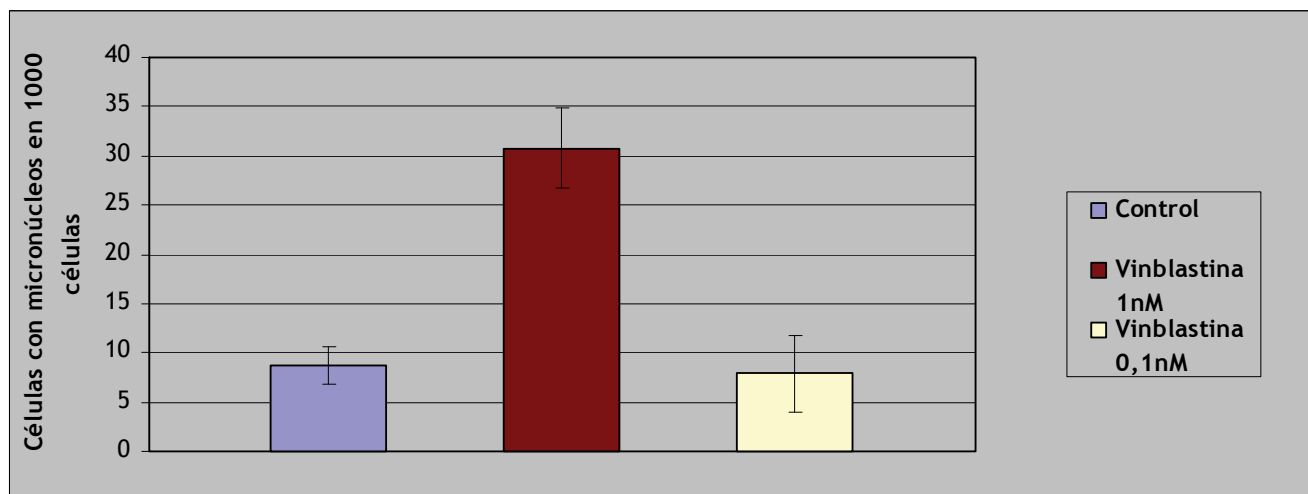


Figura 14: Curva de dosis de vinblastina. Solo se muestran las dosis de 1nM y 0.1nM debido a que dosis más altas (10nM, 100nM y 1 μ M) no se encontraron suficientes células binucleadas para el conteo. Se realizaron al menos tres experimentos con células de individuos diferentes, realizando tres repeticiones de cada conteo.

Análisis del ciclo celular en linfocitos tratados con vinblastina (1 nM)

Una vez obtenida la dosis a utilizar, se trataron cultivos de linfocitos con vinblastina 1nM. Se obtuvieron muestras a 12, 16 y 24 h. En el análisis del ciclo celular no se encontró diferencia entre los cultivos tratados (en los diferentes tiempos) y el control. La mayor parte de los cultivos presentaron el mismo patrón de porcentaje celular en las diferentes fases del ciclo (Figura 15).

Expresión génica (*bub1*, *bub1b* y *mad2*) en cultivos de linfocitos tratados con vinblastina (1nM)

Los cultivos tratados y controles para el análisis del ciclo celular tenían duplicados que fueron utilizados para medir la expresión de los genes: *bub1*, *bub1b* y *mad2*. En los resultados de la expresión, no se encontró diferencia entre los cultivos tratados y controles en ninguno de los tiempos analizados (Tabla 6). Se considera una sobreexpresión un valor mayor o igual a 2, mientras que una subexpresión debe poseer un valor menor o igual a 0.5 (19, 2004)

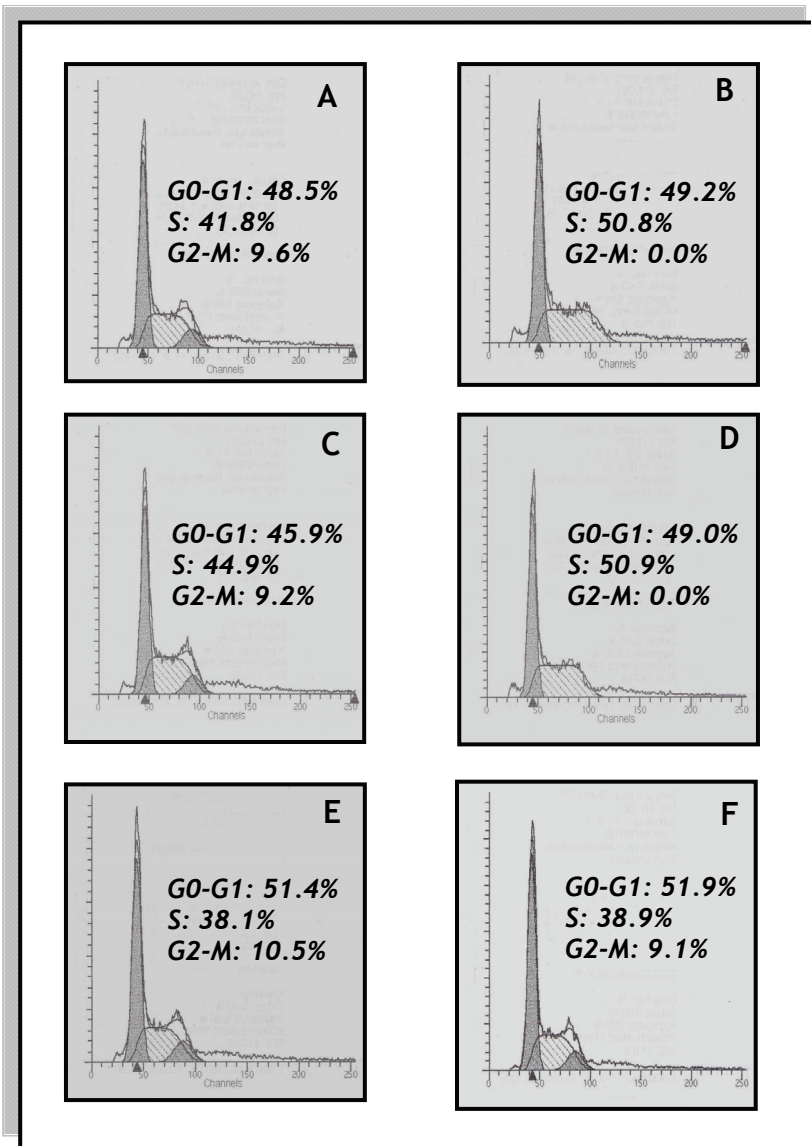


Figura 15: Análisis del ciclo celular en linfocitos tratados con vinblastina (1nM). Control 12 h. (A) Cultivo tratado 12h. (B). Control 16 h. (C) Cultivo tratado 16 h. (D). Control 24 h. (E) Cultivo tratado 24 h. (F). No existe una diferencia clara entre los cultivos tratados y controles.

Tabla 6: Expresión de genes del PMM en cultivos tratados con vinblastina. La expresión está comparada con respecto a los controles y normalizada con *gapdh* como control interno. Los valores cercanos a 1 muestran que no hubo cambios importantes en la expresión de estos genes entre las condiciones del tratamiento y el control.

	12 h		16 h		24 h	
	T	C	T	C	T	C
<i>bub1</i>	1.22	1	0.98	1	1.36	1
<i>bub1b</i>	1	1	1.1	1	1.07	1
<i>mad2</i>	1.04	1	1.22	1	1.06	1

DISCUSIÓN

Regulación de la expresión de los genes del PMM

No existe un acuerdo en cuanto a la forma en que se regula la expresión de los genes del punto de monitoreo metafásico. Existen reportes que demuestran que la expresión de la mayoría de estos genes es “constitutiva” durante el ciclo celular (32), sin embargo, otras investigaciones han encontrado que estos genes se expresan de forma diferencial en el ciclo con un pico máximo en la transición de G2-M (16). Una de las posibles causas de estas contradicciones es el modelo celular utilizado y las técnicas para evaluar la expresión, debido a que en algunas investigaciones el análisis de la expresión se realiza utilizando proteínas (**Western blot**), mientras que en otras se lleva a cabo mediante RT-PCR. Sin embargo, el tipo celular utilizado puede ser el factor principal causante de las variaciones en los estudios. En la mayor parte de las investigaciones se utilizan líneas celulares derivadas de diferentes tipos de cáncer, las cuales pueden poseer defectos en el PMM además de ser muy heterogéneas entre sí. Independientemente de estas diferencias existen diversas pruebas que apoyan la postura de que estos genes se expresan de forma diferente en el ciclo celular, por ejemplo, se ha observado que *mad2* es un gen regulado por E2F, un factor de transcripción que se requiere para la transición de G1-S (30), aunque también se ha asociado la expresión de Mad2 con un factor denominado OCT-1 el cual favorece su transcripción en asociación con la proteína BRCA1 (67)

La expresión de *bub1b*

BubR1 es una proteína codificada por el gen *bub1b*. Esta proteína solo se encuentra en vertebrados y presenta homología con Mad3 y Bub1, es una de las proteínas más importantes en el PMM debido a que es una efectora directa de este al inhibir a APC/C mediante la unión a Cdc20, además *bub1b* puede ser considerado un gen supresor de tumores pues se sabe que su mutación en células germinales se relaciona con un aumento en la incidencia de algunos cánceres, aunque debe resaltarse que dichas mutaciones son muy raras (28). En el reporte de su descubrimiento, se describió a *bub1b* como un gen que se expresaba de acuerdo al ciclo celular (16), sin embargo otras investigaciones han encontrado que su expresión es constitutiva en células proliferantes (32, 10). En este estudio se pudo observar un aumento en la expresión de *bub1b* que concordaba con la progresión celular hacia mitosis, un comportamiento que apoya las primeras observaciones en este sentido. No obstante, se ha propuesto que la sincronización por eliminación del SFB puede afectar de forma importante el comportamiento celular, por lo que será necesario validar los resultados obtenidos con otra técnica de sincronización.

Un aspecto relevante evaluado en este estudio es la comparación entre el tipo de información que se obtuvo a partir de las dos pruebas de análisis de la expresión. A pesar de que el PCR semicuantitativo mostraba una tendencia de aumento en la expresión de *bub1b* después de la liberación de cultivos de fibroblastos, entre algunos tiempos esta diferencia no era notable; por otra parte, con la utilización del PCR en tiempo real fue posible hacer una relación cuantitativa que demostró un gran cambio en la expresión de *bub1b* principalmente entre el tiempo 0 y las 24 h (la expresión aumentó 50 veces) y que era además gradual, demostrando la importancia de esta herramienta en el estudio de la expresión génica.

Los efectos de la vinblastina sobre los cultivos de linfocitos

Estudios previos han demostrado que el taxol (un agente que interfiere con la dinámica de los microtúbulos) puede modificar la expresión génica y provocar una disminución en la expresión de *bub1* (12), sin embargo no se tiene conocimiento de que la vinblastina pueda afectar a las células de la misma forma. Nosotros observamos que la

vinblastina a una concentración 1nM en cultivos de linfocitos provocaba cierta inestabilidad cromosómica (observada mediante la técnica de micronúcleos) pero no afectó la expresión génica ni modificó la progresión del ciclo celular, esto puede significar que la vinblastina genera errores en la segregación de los cromosomas sin afectar el PMM. Dichos errores pueden deberse a la concentración de vinblastina utilizada, la cual al ser muy baja, tal vez no fue suficiente para generar una respuesta robusta durante la mitosis. Por otra parte, la vinblastina podría estar afectando la estabilidad o disponibilidad de las proteínas mismas y no la transcripción de los genes, por lo que se deberá evaluar si las primeras se expresan y localizan de forma normal ante concentraciones bajas de vinblastina.

El uso del modelo experimental

Uno de los factores importantes en el estudio del PMM, es el modelo experimental. Comúnmente se utilizan líneas celulares debido a que poseen una tasa de proliferación elevada e ilimitada, además de poder sufrir manipulaciones genéticas o de otro tipo sin que pierdan la viabilidad, estas ventajas no se encuentran en los cultivos primarios, los cuales son muy sensibles a cambios en las condiciones de cultivo o manipulaciones experimentales, sin embargo, para conocer el mecanismo normal del PMM es importante realizar estudios en células normales, pues poseen una mejor integridad en los mecanismos de protección del genoma.

En el caso particular de los cultivo de fibroblastos y linfocitos, se observó que a pesar de las dificultades en el cultivo de los primeros, son un mejor modelo para el estudio del ciclo celular, ello debido a ciertas cualidades: en primer lugar comprenden una población más homogénea, en contraparte, a pesar de que el uso de la fitohemaglutinina permite la estimulación preferencial de los linocitos T, otras células pueden mantenerse en el cultivo de linfocitos y afectar los resultados experimentales; por otra parte la sincronización de los cultivos, necesaria para estudiar genes de la progresión del ciclo, pudo efectuarse en los fibroblastos, mientras que los linfocitos fueron cultivos asincrónicos en los que existía una población constante en G1.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El punto de monitoreo de metafase es un mecanismo que se originó en las células eucariontes para asegurar la fidelidad en la transmisión de la herencia, es la primer “defensa” frente a la inducción de aneuploidías por lo que su desregulación puede tener efectos catastróficos. En este punto de monitoreo están involucradas muchas proteínas, cuyas funciones específicas no están bien determinadas y de algunas de las cuales no se conoce aun su identidad.

La presencia común de las aneuploidías en diferentes tumores refleja posiblemente la importancia de su aparición durante el proceso carcinogénico. La forma en que una célula llega a ser aneuploide a pesar del PMM es todavía una materia de debate, sin embargo, la disfunción en este punto de monitoreo seguramente juega un papel importante en el proceso. La formación de aneuploidías tiene también importancia en otros padecimientos como las trisomías. Por otra parte la generación de aneuploidías ha influido en la evolución de ciertos taxa de una forma análoga a como lo han hecho las mutaciones.

Por lo anterior es clara la importancia del estudio de los mecanismos de segregación cromosómica. En este trabajo, utilizamos cultivos primarios de células humanas para intentar determinar si la vinblastina (un fármaco que puede generar aneuploidías) afecta la expresión de genes del PMM en concentraciones que causan daño al cromosoma pero no arrestan el ciclo celular. En el caso de los linfocitos, no encontramos una asociación entre la expresión de genes del PMM y la presencia de la vinblastina, por lo que el daño cromosómico observado puede deberse a efectos de la vinblastina en otras estructuras como el centrosoma. No obstante, debido a las características de los linfocitos, estos resultados deberán ser validados en un modelo más adecuado para el estudio del ciclo celular, siendo una opción los cultivos de fibroblastos.

Mediante la sincronización celular se pudo observar que el gen *bub1b* se expresa de forma diferencial a través del ciclo celular en fibroblastos, como se había reportado en otras investigaciones, la diferencia entre estas observaciones y las investigaciones que reportan una expresión independiente del ciclo celular pueden deberse a las diferencias en los

modelos experimentales. Por otra parte, el análisis de la expresión mediante el PCR en tiempo real demostró las ventajas de realizar este tipo de estudios con un método cuantitativo.

Finalmente, existen aun muchos aspectos del PMM y sus relaciones con otras actividades celulares que no han sido dilucidados, pero cuya explicación seguramente será importante en diversas áreas del conocimiento biológico y tendrá un impacto fundamental en el estudio y tratamiento de enfermedades como el cáncer.

REFERENCIAS

1. Acquaviva, C., F. Herzog, C. Kraft, & J. Pines. 2004. The anaphase promoting complex/cyclosome is recruited to centromeres by the spindle assembly checkpoint. *Nat. Cell. Biol.* 6: 892-898.
2. Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, & P. Walters. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science. Cuarta Edición.
3. Bernat, R., G. Borisy, N. Rothfield, & W. Earnshaw. 1990. Injection of Anticentromere Antibodies in Interphase Disrupts Events Required for Chromosome Movement at Mitosis. *J. Cell Biol.* 111: 1519-1533.
4. Bharadwaj, R., H. Yu. 2004. The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. *Oncogene* 23: 2016-2027.
5. Braunstein, I., S. Miniowitz, Y. Moshe & A. Hershko. 2007. Inhibitory factors associated with anaphase-promoting complex/cylosome in mitotic checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104: 4870-4875.
6. Brown, T. 2002. *Genomes*. John Wiley & Sons. Segunda Edición.
7. Cahill, D., C. Lengauer, J. Yu, G. Riggins, J. Willson, S. Markowitz, K. Kinzler & B. Vogelstein. 1998. *Nature* 392: 300-303.
8. Carroll, C., & A. Straight. 2006. Centromere formation: from epigenetics to self-assembly. *Trends Cell Biol.* 16: 70-78.
9. Chabner, B., & T. Roberts. 2005. Chemotherapy and the war on cancer. *Nat. Rev. Cancer* 5: 65-72.
10. Chan, G., S. Jablonski, V. Sudakin, J. Hittle & T. Yen. 1999. Human BubR1 is a Mitotic Checkpoint Kinase that Monitors CENP-E Functions at Kinetochores and Binds the Cyclosome/APC. *J. Cell Biol.* 146: 941-954
11. Chan, G., S. Liu & T. Yen. 2005. Kinetochore Structure and Function. *Trends Cell Biol.* 15: 589-598.
12. Chen, J., C. Yang, M. Cammer, & S. Horwitz. 2003. Gene Expression and Mitotic Exit Induced by Microtubule-Stabilizing Drugs. *Cancer Res.* 63: 7891-7899.
13. Cimini, D., & F. Degraffi. 2005. Aneuploidy: A matter of bad connections. *Trends Cell Biol.* 15: 442-451.

14. Cleveland, D., Y. Mao & K. Sullivan. 2003. Centromeres and Kinetochores: From Epigenetics to Mitotic Checkpoint Signaling. *Cell* 112: 407-421
15. Clurman, B., & J. Roberts. Cell Cycle Control: An Overview. En *The Genetic Basis of Human Cancer*, Vogelstein & Kinzler (eds.) 2002. MacGraw-Hill. Nueva York.
16. Davenport, J., E. Fernandes, L. Harris, G. Neale, R. Goorha. 1999. The Mouse Mitotic Checkpoint gene *Bub1b*, a Novel *Bub1* Family Member Is Expressed In a Cell Cycle-Dependent Manner. *Genomics* 55: 113-117.
17. De Vita, 2005. *Principles and Practice of Oncology*. Séptima Ed. Lippincott Williams & Wilkins.
18. Dernburg, A. 2001. Here, There, and Everywhere: Kinetochores on Holocentric Chromosomes. *J. Cell Biol.* 153: F33-F38.
19. Doak, S., G. Jenkins, E. Parry, P. Griffiths, J. Baxter & J. Paarry. 2004. Differential expression of the *MAD2*, *BUB1* and *HSP27* genes in Barrett's oesophagus—their association with aneuploidy and neoplastic progression. *Mutat. Res.* 547: 133-144.
20. Doncic, A., E. Jacob & N. Barkal. 2005. Evaluating putative mechanisms of the mitotic spindle checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102: 6332-6337.
21. Ducat, D., & Y. Zheng. 2004. Aurora kinases in spindle assembly and chromosome segregation. *Exp. Cell Res.* 301: 60-67.
22. Duesberg, P., D. Rasnick. 2000. Aneuploidy, the somatic mutation that makes Cancer a species of its own. *Cell Motil. Cytoskeleton* 47: 81-107.
23. Fenech, M., & C. Chang. 2000. HUMN Project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* 534: 65-75.
24. Freshney, I. 2000. *Culture of Animal Cells*. Fourth Edition. Wiley-Liss.
25. Futyma, D. 1998. *Evolutionary Biology*. Sinauer.
26. Gabrielli, B. Y. Chau, N. Giles, A. Harding, F. Stevens, & H. Beamish. 2007. Caffeine Promotes Apoptosis in Mitotic Spindle Checkpoint-arrested Cells. *J. Biol. Chem.* 252: 5954-5964.
27. Gigant, B., C. Wang, R. Ravekki, F. Roussi, M. Steinmetz, P. Curmi, A. Sobel, & M. Knossow. 2005. Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. *Nature* 435: 519-522.

28. Hanks, S., K. Coleman, S. Reid, A. Plaja, H. Firth, D. FitzPatrick, A. Kidd, K. Méhes, R. Nash, N. Robin, N. Shannon, J. Tolmie, J. Swansbury, A. Irrthum, J. Douglas & N. Rahman. 2004. Constitutional aneuploidy and cancer predisposition caused by biallelic mutations in BUB1B. *Nat. Genet.* 35 (11): 1159-1161.
29. Hardwick, K. 2005. Checkpoint signalling: Mad2 Conformers and Signal Propagation. *Curr. Biol.* 15: R122-R124.
30. Hernando, E. Z. Nahlé, G. Juan, E. Díaz-Rodríguez, M. Alaminos, M. Hemann, L. Michel, V. Mittal, W. Gerald, R. Benezra, S. Lowe, & C. Cordon-Cardo. 2004. Rb inactivation promotes genomic stability by uncoupling cell cycle progression from mitotic control. *Nature* 430: 797-802.
31. Hwang, L., L. Lau, D. Smith, C. Mistrot, K. Hardwick, E. Hwang, A. Amon & A. Murray. 1998. Budding Yeast Cdc20: A Target of the Spindle Checkpoint. *Science* 279: 1041-1044.
32. Ikui, A., C. Huang, T. Matsumoto & S. Horwitz. 2005. Low Concentrations of Taxol Cause Mitotic Delay Followed by Premature Dissociation of p53 from Mad2 and BubR1 and Abrogation of the Spindle Checkpoint, Leading to Aneuploidy. *Cell Cycle* 4: 1385-1388.
33. Karp, G. 1998. *Biología Celular y Molecular*. McGraw-Hill Interamericana.
34. Kastan, M., & J. Bartek. 2004. Cell-Cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432: 316-323.
35. Kitajima, T., S. Hauf, M. Ohsugi, T. Yamamoto, & Y. Watanabe. 2005. Human Bub1 Defines the Persistent Cohesion Site along the Mitotic Chromosome by Affecting Shugoshin Localization. *Curr. Biol.* 15: 353-359.
36. Kops, G., B. Weaver, & D. Cleveland. 2005. On the Road to Cancer: Aneuploidy and the Mitotic Checkpoint. *Nat. Rev. Cancer* 5: 773-785.
37. Lazcano, A., y A. Becerra. 2003. La Biología Molecular y la Evolución Celular Temprana Cap 26 En *Biología Celular y Molecular* (Editores Jiménez, LF y Merchant H.) Pearson: 795- 781.
38. Lodish, H., A. Berk, P. Matsudaira, C. Kaiser, M. Krieger, M. Scott, L. Zipursky, & J. Darnell. 2004. *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman and Company. Quinta Edición.

39. Logarinho, E., H. Bousbaa, J. Dias, C. Lopes, I. Amorim, A. Antunes-martins, & E. Sunkel. 2003. Different spindle checkpoint proteins monitor microtubule attachment and tension at kinetochores in *Drosophila* cells. *J. Cell Sci.* 117: 1757-1771.
40. Malmanche, N., A. Maia, & C. Sunkel. 2006. The spindle assembly checkpoint: Preventing chromosome mis-segregation during mitosis and meiosis. *FEBS Lett.* 580: 2888-2895
41. Masuda, A., K. Maeno, T. Nakagawa, H. Saito, & T. Takahashi. 2003. Association Between Mitotic Spindle Checkpoint Impairment and Susceptibility to the Induction of Apoptosis by Anti-Microtubule Agents in Human Lung Cancers. *Am. J. Pathol.* 163: 1109-1116.
42. McGuinness, B., T. Hirota, N. Kudo, J. Peters & K. Nasmyth. 2005. Shugoshin Prevents Dissociation of Cohesin from Centromeres During Mitosis in Vertebrate Cells. *PLOS Biol.* 3: 433-449
43. Mellone, B., S. Erhardt & G. Karpen. 2006. The ABCs of centromeres. *Nat. Cell Biol.* 8: 427-429.
44. Mitchison, T., & E. Salmon. 2001. Mitosis: a history of division. *Nat. Cell Biol.* 3: E17-E21.
45. Molinari, M. 2000. Cell Cycle Checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell Prolif.* 33: 261-274.
46. Musacchio, A., & E. Salmon. 2007. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 379-393.
47. Musacchio, A., & K. Hardwick. 2002. The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 731-741.
48. Nasmyth, K. 2005. How Do so Few Control so Many? *Cell* 120: 739-746.
49. Nelson, D., & M. Cox. 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Cuarta Edición. W. H. Freeman. Nueva York.
50. Okada, M., I. Cheeseman, T. Hori, K. Okawa, I. McLeod, J. Yates, A. Desai & T. Fukugawa. 2006. The CENP-H-I complex is required for the efficient incorporation of newly synthesized CENP-A into centromeres. *Nat. Cell Biol.* 8: 446-457.
51. Pangilinan, F., & F. Spencer. 1996. Abnormal kinetochore Structure Activates the Spindle Assembly Checkpoint in Budding Yeast. *Mol. Biol. Cell* 7: 1195-1208.

52. Pellman, D. 2007. Aneuploidy and Cancer. *Nature* 446: 38-39.
53. Peters, J., 2006. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 644-656.
54. Pines, J. 2006. Mitosis: a matter of getting rid of the right protein at the right time. *Trends Cell Biol.* 16: 55-63
55. Rajagopalan, H., & C. Lengauer. 2004. Aneuploidy and cancer. *Nature* 432: 338-341.
56. Reddy, S., M. Raoer, W. Margansky & M Kirschner. 2007. Ubiquitination by the anaphase-promoting complex drives spindle checkpoint inactivation. *Nature* 446: 921-925.
57. Stemmann, O., D. Boss, & I. Gorr. 2005. Rephrasing anaphase: separase FEARs shugoshin. *Chromosoma* 109: 409-417.
58. Steuerwald, N., J. Cohen, R. Herrera, M. Sandalinas, & C. Brenner. 2001. Association between spindle assembly checkpoint expression and maternal age in human oocytes. *Mol. Hum. Rep.* 7: 49-55
59. Storchova, Z., & D. Pellman. 2004. From Polyploidy to Aneuploidy, Genome Instability and Cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 45-54.
60. Sudakin, V., G. Chan, & T. Yen. 2001. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20 and MAD2. *J. Cell Biol.* 154: 925-936.
61. Tao, W., V. South, R. Diehl, J. Davide, L. Sepp-Lorenzino, M. Fraley, K. Arrington & R. Lobelli. 2007. An Inhibitor of the Kinesin Spindle Protein Activates the Intrinsic Apoptotic Pathway Independently of p53 and de Novo Protein Synthesis. 2007. *Mol. Cell Biol.* 27: 689-698.
62. Tao, W., V. South, Y. Zhang, J. Davide, L. Farrel, N. Khol, L. Sepp-Lorenzino & R. Lobell. 2005. Induction of apoptosis by an inhibitor of the mitotic kinesin KSP requires both activation of the spindle assembly checkpoint and mitotic slippage. *Cancer Cell* 8: 49-59.
63. Upreti, M., C. Lyle, B. Skaug, L. Du & T. Chambers. 2006. Vinblastine-induced Apoptosis Is Mediated by Discrete Alterations in Subcellular Location, oligomeric Structure, and Activation Status of Specific Bcl-2 Family Members. *J. Biol. Chem.* 281: 15941-15950.

64. Vigneron, S., S. Prieto, C. Bernis, J. Labbé, A. Castro, & T. Lorca. 2004. Kinetochores: Localization of Spindle Checkpoint Proteins: Who Controls Whom? *Mol. Biol. Cell* 15: 4584-4596.
65. Watanabe, Y. 2005. Shugosin: guardian spirit at the centromere. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17: 1-6.
66. Weaver, B., D. Cleveland. 2005. Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. *Cancer Cell* 8: 7-12.
67. Wang, R., H. Yu, & C. Deng. 2004. A Requirement for breast-cancer-associated gene 1 (BRCA1) in the Spindle Checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 17108-17113.
68. Wang, X., D. Jin, R. Ng, H. Feng, Y. Wong, A. Cheung & S. Tsao. 2002. Significance of MAD2 Expression to Mitotic Checkpoint Control in Ovarian Cancer Cells. *Cancer Res.* 62: 1662-1668.
69. Wassmann, K., & R. Benezra. 2001. Mitotic checkpoints: from yeast to cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11: 83-90.
70. Wollman, R., E. Cytrynbaum, J. Jones, T. Meyes, J. Scholey & A. Mogilner. 2005. Efficient Chromosome Capture Requires a Bias in the 'Search-and-Capture' Process during Mitotic-Spindle Assembly. *Curr. Biol.* 15: 828-832.
71. Wong, M., & J. Medrano. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39: 1-11.
72. Wu, C., C. Chi, & T. Huang. 2004. Elevated level of spindle checkpoint protein MAD2 correlates with cellular mitotic arrest, but not with aneuploidy and clinicopathological characteristics in gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* 10 (22): 3240-3244.
73. Yuan, B. J. Woo, Y. Wang, Y. Bae, D. Yoon, R. Wersto, E. Tully, K. Wilsbach, & E. Gabrielson. 2006. Increased Expression of Mitotic Checkpoint Genes in Breast Cancer Cells with Chromosomal Instability. *Clin. Cancer Res.* 12 (2): 405-410.

GLOSARIO

α -satélites. Secuencias de cerca de 171 pb repetidas en tandem que se encuentran en los centrómeros de los cromosomas y en las regiones pericentroméricas.

Anafase A. Separación de las cromátidas hermanas debido a la fuerza que generan los microtúbulos sobre sus cinetocoros.

Anafase B. Separación de los polos del huso mitótico con sus cromosomas anclados mediante microtúbulos.

Aneuploidía. Fenómeno en el que una célula posee un número cromosómico diferente al de una célula normal ya sea por pérdida o ganancia de uno o más cromosomas.

Animales. Reino que comprende a los seres eucariontes, multicelulares y heterotróficos que forman tejidos y órganos verdaderos.

Anticuerpo 3F3/2. Anticuerpo que reconoce a cierta proteína fosforilada durante la mitosis. No se conoce la identidad de la proteína que reconoce.

Apoptosis. Tipo de muerte celular programada que puede iniciarse por factores externos o internos en una célula. La apoptosis se lleva a cabo por la acción de proteasas específicas llamadas caspasas.

Arqueobacterias. Grupo de procariontes que se diferencia de las Eubacterias por características moleculares. La mayor parte de las arqueobacterias viven en ambientes extremos de altas temperaturas, concentraciones de sales y bajos niveles de pH.

Bacterias. Grupo compuesto por organismos procariontes.

Catástrofe Mitótica. Tipo de muerte celular originada por defectos en la mitosis que no pueden ser reparados. No existe un acuerdo sobre las características morfológicas de la catástrofe mitótica.

Células Hela. Línea celular obtenida a partir de un tumor de cérvix.

Centrómero. Región del cromosoma donde se ensambla el cinetocoro. El centrómero se caracteriza por poseer secuencias α -satélite y proteínas específicas como CENP-A.

Centrosomas. Organelos formados por un par de centriolos perpendiculares. Los centrosomas son los centros organizadores de microtúbulos en vertebrados, su función es dirigir la polimerización de estos dentro de la célula.

Cinasa. Enzima que agrega grupos fosfato a ciertas proteínas.

Cinesina. Proteína motora que moviliza moléculas mediante los microtúbulos hacia su extremo “mas”.

Cinetocoro. Estructura proteica que se forma sobre los centrómeros de los cromosomas durante la mitosis, y cuya función es hacer contacto con los microtúbulos del huso mitótico para llevar a cabo la segregación cromosómica.

Citoesqueleto. Estructura de sostén que le da forma a la célula y que es también utilizada para otros fines como la movilización de estructuras dentro de la célula, apoyo para el movimiento y división celular. El citoesqueleto está compuesto por tres diferentes estructuras: los microtúbulos, los microfilamentos y los filamentos intermedios.

Cohesina. Complejo proteico que mantienen unidas a las cromátidas hermanas hasta su separación en anafase.

Cromosomas holocéntricos. Cromosomas cuyo centrómero no está delimitado a una zona específica y la función de este se asocia a todo el cromosoma. En este tipo de cromosoma los microtúbulos interactúan con estructuras que se localizan en toda la longitud del cromosoma.

Cromosomas politénicos. Cromosomas formados por múltiples copias de ADN que se mantienen unidas en una sola estructura. Su presencia es característica de algunas células glandulares de dípteros en etapas larvarias.

Cromosoma 21. Uno de los 23 pares de cromosomas que posee la especie humana. Existen 22 pares de autosomas y 1 de cromosomas sexuales.

C_T. (Cycle threshold) Término utilizado en el PCR en tiempo real, que es igual al número del ciclo al que cruza el umbral una muestra dada, y es un índice de la cantidad de material inicial en dicha reacción.

Cultivos primarios. Cultivos de células normales obtenidos a partir de tejido sano.

Dinactina. Proteína que permite la unión de la dineína con las moléculas que esta transporta.

Dineína. Proteína motora que mueve moléculas a través de microtúbulos hacia su extremo “menos”.

Endoreplicación. Fenómeno en el que una célula duplica su material genético sin efectuar la división celular.

Enzima E2. Proteína que une moléculas de ubiquitina a proteínas blanco. La enzima E2 recibe una ubiquitina “activada” de la enzima E1, y después con ayuda de E3 la asocia a una proteína específica.

Epítotope. Región de un antígeno que es reconocida por un anticuerpo.

Envoltura Nuclear. Estructura que delimita al núcleo en eucariontes y que esta formada por una doble membrana, posee poros nucleares que median el intercambio de moléculas con el citosol.

E3 Ubiquitin ligasa. Enzima que permite la adición de moléculas de ubiquitina a proteínas blanco, La enzima E3 no lleva a cabo directamente la ubiquitinación sino que permite la unión de la enzima E2 con el substrato específico para que esta lo ubiquitine.

Genoma. Material genético total de un organismo.

Histonas. Proteínas básicas que se unen al ADN formando estructuras llamadas nucleosomas.

ΔG . Cambio en la energía libre en un sistema. En química, es un índice de la espontaneidad de una reacción. Mientras mas negativo se el ΔG para una reacción dada, más probable es que dicha reacción se efectúe de manera espontánea.

Hongos. Organismos eucariontes del reino Fungi caracterizados por su alimentación saprófita. Los hongos pueden llegar a formar tejidos pero no órganos.

Huso mitótico. Estructura ahusada que se forma durante la mitosis a partir de microtúbulos polimerizados desde los cromosomas (o de otros centros organizadores de microtúbulos) que se unen a los cromosomas mitóticos. En una división celular normal, el huso mitótico es bipolar (cada centrosoma corresponde a un polo).

Leucocitos. Células sanguíneas que participan en la respuesta inmune. Los leucocitos o glóbulos blancos se dividen en granulares (neutrófilos, basófilo y eosinófilos) y agranulares (linfocitos y monocitos)

Levaduras. Hongos unicelulares.

Megacariocitos. Células de la médula ósea que dan origen a las plaquetas.

Microtúbulos. Túbulos microscópicos cuyas paredes están formadas por protofilamentos unidos lateralmente. Cada protofilamento se origina a partir de la polimerización de la tubulina, los dímeros de tubulina α y tubulina β se ensamblan de forma secuencial para formar a los protofilamentos.

Monómero. Subunidad de una macromolécula. La unión de monómero genera estructuras denominadas polímeros.

Mutación. Cambio heredable en la secuencia del ADN. La secuencia de esta molécula está codificada en 4 bases nitrogenadas diferentes: Adenina, Citosina, Guanina y Timina.

Nucleosoma. Estructura formada por un segmento de ADN (146 pares de bases) enrollado en un complejo formado por ocho moléculas de histonas.

Plantas. Grupo de organismos eucariontes, autótrofos, multicelulares que llevan a cabo la fotosíntesis y poseen tejidos y órganos verdaderos.

Proteínas Pasajeras del Cromosoma. Complejo proteico formado por Aurora B, Survivina, INCENP y Borealina. Su nombre fue asignado porque este complejo se localiza en el centrómero durante la profase y prometafase, después se localizan en el huso (durante la anafase) y finalmente en la zona donde se formará el surco citoplásmico que divide a las células hijas.

Proteosoma. Estructura proteica con un coeficiente de sedimentación 26S formado por diversas enzimas que degradan proteínas marcadas por su ubiquitinación.

Protistas. Seres eucariontes unicelulares. Este grupo comprende a los protozoarios y a las algas.

Quiescente. La quiescencia se refiere a un estado celular en el que no hay división, sin embargo se puede reiniciar el ciclo celular mediante los estímulos y condiciones apropiadas.

SCF. Complejo ubiquitin ligasa formado por cuatro subunidades, que participa en la progresión celular.

Separasa. Enzima que degrada a ciertas subunidades de la cohesina, separando a las cromátidas hermanas.

Securina. Proteína que al unirse a la separasa inhibe su funcionamiento.

Senescencia. Es el proceso en el que una célula se arresta permanentemente durante la fase G1 y no progresa en el ciclo celular, para después

Tetraploide. Célula que posee cuatro veces un juego haploide de cromosomas. En humanos el complemento normal es el diploide (dos juegos haploides, uno heredado de cada padre). Las células tetraploides se pueden originar por fallas durante la mitosis o por fusión celular.

Vinca alcaloide. Alcaloide obtenido de la planta *Catharanthus roseus*. Los principales alcaloides obtenidos de dicha planta son la vinblastina y la vincristina.

Western blot. Técnica utilizada para observar la presencia de una proteína específica a partir de un cultivo celular o tejido. Puede usarse para generar una medida semicuantitativa de dicha proteína.

Abreviaturas:

ADN	Ácido desoxirribonucleico
APC/C	Complejo Promotor de la Anafase o Ciclosoma
BRCA1	Gen Asociado a Cáncer de Mama 1
Bub	(Bud Unhinibited by Benomyl)
Cdk	Cinasa dependiente de ciclina
cDNA	ADN complementario
CENP	Proteínas centroméricas
CO ₂	Dióxido de Carbono
DEMEM	Medio Dulbecco Modificado
DMSO	Dimetil sulfóxido
G1	(Gap1) Fase del ciclo celular entre M y S
G2	(Gap 2) Fase del ciclo celular entre S y M
Mad	(Mitotic Arrest Deficient)
Mps1	(Monopolar Spindle 1)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PMM	Punto de Monitoreo en Metafase
RZZ	(ROD-ZW10-ZWILCH)
S	Fase de Síntesis de ADN
SFB	Suero Fetal Bovino
cm ²	Centrímetros cuadrados
h	Horas
mg/mL	Miligramos por mililitro
mL	Militros
µL	Microlitros
µM	Micromolar

min	Minutos
mL	Militros
nM	Nanomolar
rpm	Revoluciones por minuto