



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

**EVALUACIÓN DEL POLIMORFISMO  
G558A DEL GEN *MAD1* EN LA POBLACIÓN  
MEXICANA Y SU RELACIÓN CON LA  
GENERACIÓN DE ANEUPLOIDÍAS**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGO**

P R E S E N T A :

**MIGUEL SANTIBÁÑEZ ANDRADE**

TUTOR: DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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).

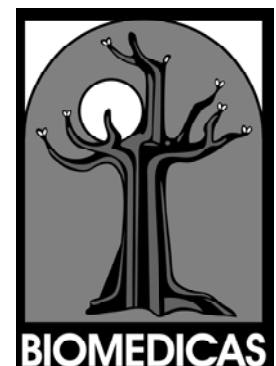
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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



La Tesis que se presenta a continuación fue realizada en el Laboratorio de Carcinogénesis, dentro de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología (INCan), bajo la dirección del Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo y con el apoyo técnico de la M. en I.B.B. Clementina Castro Hernández.

El Laboratorio de Carcinogénesis forma parte del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Este escrito también es resultado de la formación profesional adquirida en la Facultad de Ciencias de la UNAM, particularmente dentro de la asignatura optativa *Carcinogénesis* y del taller *Bases Moleculares del Cáncer* y contó con el apoyo de la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (DGAPA) por medio del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT, IN207105), del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, 45875-M) y del propio INCan.



*A ti, Mariela, por ser la arquitecta de mi destino y haber puesto todo tu empeño y dedicación para que yo alcanzara esta meta, haciendo a un lado las oportunidades que la vida te ponía. Muchas gracias por levantar mi mano al triunfar, mamá, pero sobretodo te agradezco infinitamente por levantarme del suelo al caer. Me llena de felicidad el hecho de que estés conmigo al reír y llorar desde hace más de dos décadas, sé que falta mucho más, lo sé porque ambos lo deseamos, y los deseos, a diferencia de los cuerpos, nunca se extinguen.*

*A ti, Miguel, por darme junto con tu nombre, el mejor ejemplo que tendré en la vida de fuerza y perseverancia. Día tras día me sorprende al ver la pasión con la que te juegas el papel de padre. Soy muy afortunado al tener la oportunidad de compartir contigo momentos en los que nos desprendemos del título familiar y cultivamos una amistad. Gracias por creer en mí. Nunca olvidaré aquel día en el que, de manera clandestina, me llevaste a la cita que definió el rumbo de mi vida, un camino que, con este trabajo llegá a su primera etapa.*

*A Gaby, mi linda hermanita, que a partir de ahora, puedo llamar colega. Quién mejor que tú entiende el significado de este logro. Hemos crecido tan unidos y compartido múltiples inquietudes, que al final nos condujeron a ambos a esta profesión maravillosa. Gracias por brindarme tu apoyo en todo momento, por asesorarme a lo largo de la carrera para que mi paso por ella fuera una experiencia inolvidable, por los enriquecedores debates que sostuvimos, y que seguiremos sosteniendo debido al campo de acción tan amplio que tiene la Biología.*

*A Oscar y Rubén, el dúo dinámico que día a día me hace partícipe de sus aventuras. Ustedes son el motor que me impulsa a seguir adelante. Sepan que haré hasta lo imposible para que ustedes alcancen la felicidad. Los quiero mucho, hermanitos, y recuerden: ¡Sonrían y saluden, sonrían y saluden!*

*A todos los que forman parte de la familia Santibáñez Castañeda, por brindarme todo su cariño y apoyo. Me llena de orgullo pertenecer a este grupo que se distingue por sonreírle a la vida en las buenas y en las malas.*

*A los Andrade Guevara y los Morales Landa por llevarme de la mano hasta el día de hoy. Gracias por esos consejos, por influir en mis decisiones de manera positiva. A mi Irma linda, por todos los relatos y las sonrisas que hemos intercambiado, por el gran amor que existe entre nosotros, ¡mua, mua y más mua!*

*A quienes se encuentran en algún lugar del cosmos, y cuya lejanía he resentido: Aurora, Rafael, Miguel, Antonio y Emir; así como a quienes me hubiera gustado conocer: Julia, Miguel y Álvaro.*

*A Lucía y Rafael: mis padrinos. Gracias por asumir ese cargo y ejercerlo hasta ahora. A Miriel, Pamela y Nadia, por los recuerdos de la infancia y por nuestra complicidad universitaria.*

*A Leoncio Verde, por el cariño y apoyo brindado hacia nuestra familia, su familia. Gracias por mostrarme el estrecho vínculo que existe entre la ciencia y el arte.*

*Y a ti, Erika, por el giro que dio mi vida desde que te conocí, porque estando tan cerca durante toda la vida, apareciste en el momento exacto. No me equivoco al decir que mi amor hacia ti es irreductible, y por lo tanto, perpetuo. Gracias por tolerar largas ausencias y cambios de planes. Me has apoyado infinitamente en la realización de este trabajo, porque aunque el camino en ocasiones es oscuro, tu sonrisa me da la luz necesaria para seguir adelante, porque haces tuyos mis triunfos y mis derrotas, porque nuestras discusiones son por ver quién ama más, porque me lo das todo cuando me regalas un beso.*

## **AGRADECIMIENTOS:**

A mi tutor, el Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo, por abrirme las puertas de su laboratorio y promover el desarrollo de esta tesis, pero sobre todo, por brindarme su amistad y apoyo incondicional durante todo este tiempo. Sé que pocos alumnos tienen ese privilegio, por lo tanto, espero cumplir con las expectativas que tan buena relación ha generado.

A la M. en I.B.B. Clementina Castro Hernández por ser, además de quien me motivó y apoyo durante la realización de este trabajo, una de las mejores personas que he conocido. Mil gracias Clemen, este trabajo también es tuyo, y espero que la amistad dure toda la vida.

A los miembros del jurado, que con sus acertados comentarios, producto de la experiencia en sus áreas de investigación, han enriquecido esta tesis: el Dr. Fabio Salamanca Gómez, la Dra. Regina Montero Montoya y la Dra. Patricia Ramos Morales.

A todos los integrantes del laboratorio de carcinogénesis, especialmente al H. Congreso de la Amistad, ese foro libertario que, en horario extraordinario ha sido testigo de excelentes ponencias coordinadas por el Sr. Torres. A mis entrañables amigos Marco y Lisandro, que entre la extracción de RNA de la nada, los “pasones” de metilación y las electroforesis inversas, han hecho del laboratorio, mi segundo hogar. A Diddier y Alejandro, que con su ayuda en el laboratorio, así como con su amistad, han sido un gran apoyo. A Roxana (Bocha) por la linda amistad que hemos cultivado, así como por endulzarnos la vida cada seminario, y a Rodrigo, por ser un buen camarada durante todo este tiempo.

A David, Francisco, Erika, Itzel, Luis y Lizbeth por llenar desde la preparatoria un baúl con un sinfín de anécdotas agradables. Sé que su amistad es para toda la vida, pues aunque no físicamente, los llevo a todos lados.

A Silvana, por la adolescencia vivida dentro de un cuento de hadas, aquella que transcurrió entre castillos y fuentes (bien sabes a qué me refiero).

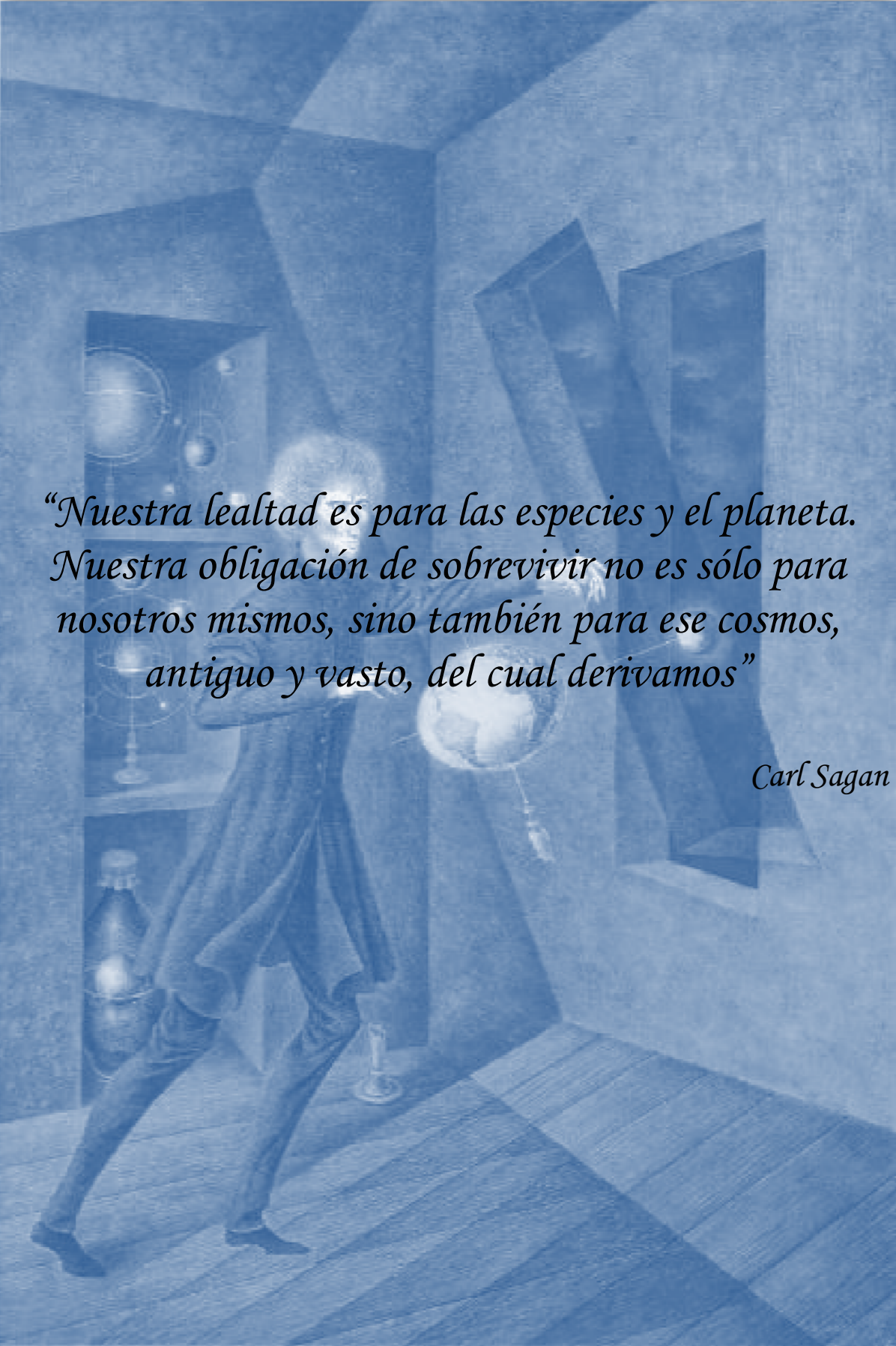
A mi querida Samantha, a Christina y a Gloria, una terna de ases que admiro y que quiero muchísimo. Agradezco infinitamente su amistad y su apoyo en momentos difíciles, y también añoro las sesiones nocturnas de pláticas en espiral.

A Miriam, que desde que la ví en un paso zebra, me brindó su cariño y apoyo durante gran parte de la carrera, cenca tlazohcamati. A la familia Martínez Chávez (junto con cuñados y sobrinos), por darme innumerables lecciones de vida que nunca olvidaré.

A Universum, por brindarme la oportunidad de utilizar los conocimientos de mi carrera para comunicarme con la gente. A Manuel, por todos los buenos momentos y las enseñanzas que espero sigan acumulándose. A los fabulosos becarios con quienes compartí experiencias inolvidables: Siyuli, Karlita, Vanessa, Roxanna, Alma, Raquel, Lola, Varenka, Nadia, Salvador, Vero y Jose Luis (compañero). Gracias por supuesto al escuadrón de la muerte (Chava, Serafín, Arturo y el George) así como a toda la excelente flota de monitores del Curso de Verano.

A mis amigos de la Facultad, con quienes disfruté las maravillas de la Biología: Bere, Dorit, Ileana, Yadira, Silvia, Karla, Tania, Jimena, Anell, Alberto, Adrián, Pablo, Yireh, Sol, Hugo, Alejandra, Quetzalli, Fabiola, Diana, Tulio y Julio y José de Jesús (J.J).

A mis alumnetos del Taller “Bases moleculares del cáncer”, con quienes el aprendizaje durante las clases se promueve en ambas direcciones.



*“Nuestra lealtad es para las especies y el planeta. Nuestra obligación de sobrevivir no es sólo para nosotros mismos, sino también para ese cosmos, antiguo y vasto, del cual derivamos”*

*Carl Sagan*



## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	- 9 -
<b>1. INTRODUCCIÓN.</b> .....	- 10 -
1.1 El ciclo celular. ....	- 10 -
1.2 Mitosis. ....	- 12 -
1.3 Segregación cromosómica. La transición metafase-anafase.....	- 15 -
1.4 Estructura del cinetocoro y función. ....	- 19 -
1.5 El punto de monitoreo del huso mitótico. Componentes y dinámica de su funcionamiento. ....	- 21 -
1.6 Aneuploidías e inestabilidad cromosómica. La presencia de errores en la maquinaria de división. ....	- 26 -
1.7 Alteraciones en el punto de monitoreo del huso mitótico y desarrollo de inestabilidad cromosómica... -	29 -
1.8 Aneuploidías y cáncer.....	- 30 -
1.9 Polimorfismos de DNA. Definición e importancia. ....	- 32 -
1.10 <i>Mad1</i> . Estructura, función e importancia dentro del punto de monitoreo del huso mitótico. ....	- 34 -
1.11 El polimorfismo G558A del gen <i>Mad1</i> . Antecedentes.....	- 37 -
1.12 Importancia del estudio. ....	- 38 -
<b>2. OBJETIVOS.</b> .....	- 40 -
2.1 Objetivo general.....	- 40 -
2.2 Objetivos particulares. ....	- 40 -
<b>3. DISEÑO EXPERIMENTAL.</b> .....	- 40 -
3.1 Genotipificación del polimorfismo <i>Mad1</i> G558A a partir de DNA de sangre periférica. ....	- 40 -
3.1.1 Aislamiento de DNA mediante extracción doble con fenol-cloroformo. ....	- 41 -
3.1.2 Amplificación del exón 17 del gen <i>Mad1</i> . Condiciones. ....	- 42 -
3.1.3 Determinación del genotipo mediante RFLP.....	- 44 -
3.1.4 Determinación del genotipo por medio de secuenciación.....	- 44 -
3.2 Estimación del índice mitótico en función del polimorfismo <i>Mad1</i> G558A. ....	- 46 -
3.2.1 Condiciones de cultivo y tiempos de exposición. ....	- 48 -
3.2.2 Fijación celular y preparación de laminillas. ....	- 48 -
3.2.3 Condiciones del conteo y análisis de resultados. ....	- 48 -
3.3 Evaluación de la cinética de proliferación en función del polimorfismo <i>Mad1</i> G558A.....	- 49 -
3.3.1 Aislamiento de linfocitos.....	- 49 -
3.3.2 Condiciones de cultivo y tiempos de exposición.....	- 50 -
3.3.3 Fijación y tinción celular.....	- 50 -
3.3.4 Lectura de experimentos, obtención y análisis de datos. ....	- 51 -
3.4 Ensayo de micronúcleos por citocinesis bloqueada en función del polimorfismo <i>Mad1</i> G558A. ....	- 52 -
3.4.1 Condiciones de cultivo y tiempos de exposición. ....	- 53 -
3.4.2 Fijación celular y preparación de laminillas. ....	- 54 -



3.4.3 Condiciones del conteo y análisis de resultados. ....	- 54 -
3.5 Evaluación de eventos de no disyunción en función del polimorfismo <i>Mad1</i> G558A. ....	- 55 -
3.5.1 Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia. ....	- 56 -
3.5.2 Conteo de eventos de no disyunción. ....	- 57 -
3.6 Genotipificación del polimorfismo <i>Mad1</i> G558A a partir de biopsias de adenocarcinoma gástrico. ....	- 57 -
3.6.1 Colecta y manejo de las biopsias. ....	- 58 -
3.6.2 Aislamiento de DNA mediante extracción doble con fenol-cloroformo (modificado). ....	- 59 -
3.6.3 Determinación del genotipo mediante PCR y RFLP. ....	- 59 -
<b>4. RESULTADOS. ....</b>	<b>- 59 -</b>
4.1 Genotipificación del polimorfismo <i>Mad1</i> G558A a partir de DNA de sangre periférica. ....	- 59 -
4.2 Estimación del índice mitótico. ....	- 62 -
4.3 Evaluación de la cinética de proliferación. ....	- 63 -
4.4 Ensayo de micronúcleos por citocinesis bloqueada. ....	- 65 -
4.5 Evaluación de eventos de no disyunción. ....	- 67 -
4.6 Genotipificación del polimorfismo <i>Mad1</i> G558A a partir de biopsias de adenocarcinoma gástrico. ....	- 69 -
<b>5. DISCUSIÓN. ....</b>	<b>- 69 -</b>
<b>6. CONCLUSIONES. ....</b>	<b>- 76 -</b>
<b>7. LITERATURA CITADA. ....</b>	<b>- 77 -</b>
<b>ANEXOS ....</b>	<b>- 86 -</b>
Abreviaturas utilizadas en el texto. ....	- 87 -
Abreviaturas de medidas y reactivos ....	- 88 -
Glosario. ....	- 89 -





## RESUMEN

**Antecedentes:** La segregación cromosómica en células eucariontes es controlada por una serie de proteínas que en conjunto forman el punto de monitoreo del huso mitótico. Cualquier alteración en este punto de monitoreo ocasiona inestabilidad cromosómica, principalmente aneuploidías. MAD<sub>1</sub> es una de las proteínas más relevantes ya que tiene funciones estructurales y reguladoras que controlan el ciclo celular. MAD<sub>1</sub> moviliza a MAD<sub>2</sub> al cinetocoro, promueve su interacción con CDC<sub>20</sub> e inhibe el progreso hacia la anafase. En un estudio con líneas celulares de cáncer, se reportó un polimorfismo en el codón 558 del gen *Mad1*, que sustituye una guanina (G) por una adenina (A), provocando el cambio de arginina (R) por histidina (H). La frecuencia alélica fue A558: 67% y G558: 33%. Se propuso que el fenotipo H/H afectaba la unión de MAD<sub>1</sub> a MAD<sub>2</sub>, desactivando el punto de monitoreo. Se analizó la frecuencia de este polimorfismo en individuos sanos, sin encontrar homocigotos para la variante A558, sugiriendo que ésta se presentaba sólo en células malignas, resultado de la pérdida de heterocigocidad. En el presente estudio, fueron detectados individuos sanos homocigotos para la variante A558, por lo cual se planteó como **objetivo** determinar la frecuencia del polimorfismo G558A de *Mad1* en una muestra de población mexicana, así como su influencia en el control de la segregación.

**Material y Métodos:** Se obtuvieron muestras de sangre periférica de 144 individuos sanos, mexicanos a tres generaciones. El DNA se obtuvo por extracción doble con fenol-cloroformo-álcool isoamílico y precipitación con etanol. La genotipificación del polimorfismo de *Mad1* en la posición 558 se obtuvo mediante PCR y RFLP. Se secuenciaron 2 muestras de cada genotipo para corroborar los resultados del método anterior. Se seleccionaron 31 individuos para investigar la respuesta al tratamiento con nocodazol en función del polimorfismo. El nocodazol es un compuesto que induce arresto en metafase cuando el punto de monitoreo funciona correctamente. La respuesta del tratamiento con nocodazol se evaluó mediante la determinación del índice mitótico en cultivos de linfocitos tratados durante 2, 6 y 12 horas. Para evaluar la cinética de proliferación, se realizaron cultivos de linfocitos aislados de 2 individuos de cada genotipo. El porcentaje de células en G<sub>2</sub>-M inducido por nocodazol a 2, 6 y 12 horas de tratamiento se obtuvo mediante citometría de flujo. Para evaluar la presencia de errores en la segregación en función del polimorfismo, se realizó tanto el ensayo de micronúcleos por citocinesis bloqueada, como una exploración mediante hibridación *in situ* con fluorescencia en linfocitos con genotipo GG y AA tratados con nocodazol a las 24, 30, 36, 42 y 48 horas. Además, se determinó el genotipo en 19 biopsias de adenocarcinoma gástrico (junto con la biopsia de mucosa normal del mismo paciente).

**Resultados:** De 144 individuos estudiados, 35 presentaron el genotipo GG, 74 GA, y 35 AA, obteniendo una frecuencia de 24.31, 51.39 y 24.31 % respectivamente, con una frecuencia alélica G: 50% y A: 50%. El tratamiento con nocodazol manifestó un mayor índice mitótico en cultivos de individuos con genotipo GG y GA, comparados con los del genotipo AA ( $p < 0.05$ ). El porcentaje de células en G<sub>2</sub>-M observadas por citometría de flujo también fue mayor en los individuos con genotipo GG y GA, comparado con el de los individuos con genotipo AA ( $p < 0.05$ ). Con respecto a la presencia de errores en la segregación, el tratamiento con nocodazol indujo un mayor número de micronúcleos en los linfocitos AA en comparación con los linfocitos GG ( $p < 0.05$ ). A partir de la hibridación *in situ* con fluorescencia, los linfocitos AA manifestaron una tendencia a presentar un mayor número de eventos de no disyunción comparados con los linfocitos GG. De las 19 biopsias de mucosa normal, 6 presentaron el genotipo GG (32 %), 10 el genotipo GA (52 %) y 3 el genotipo AA (16 %). Las frecuencias alélicas fueron G: 58 % y A: 42 %. En el caso de las biopsias de adenocarcinoma gástrico, 5 presentaron el genotipo GG (26 %), 11 el genotipo GA (58 %) y 3 el genotipo AA (16 %), teniendo como resultado una frecuencia del 55 % para el alelo G y del 45 % para el alelo A.

**Conclusiones:** Este trabajo es el primer estudio en población abierta referente al polimorfismo G558A del gen *Mad1*, y muestra que es muy frecuente en la población mexicana sana, incluso en condición homociga, por lo tanto, no es resultado del proceso de transformación maligna como se había propuesto. La variante polimórfica (AA) influye en la respuesta celular al tratamiento con agentes que alteran la segregación cromosómica, ocasionando un arresto deficiente en la metafase. Los resultados de las biopsias nos indican que ambos alelos están representados de manera similar en los dos tipos de muestras, y que esta relación se mantiene entre las biopsias y las muestras de sangre periférica de individuos aparentemente sanos. El hecho de que las células con genotipo AA no presenten un arresto adecuado después del tratamiento con nocodazol, las hace más susceptibles a presentar errores en la segregación cromosómica, teniendo como consecuencia la generación de células aneuploides.



## 1. INTRODUCCIÓN.

En 1858, el patólogo alemán Rudolf Virchow incorporó a la teoría celular un postulado que cambiaría la visión del estudio de la vida: “Omnis cellula e cellula”. La comprobación de que toda célula proviene a partir de una célula pre-existente, permitió adentrarse en el conocimiento de la unidad fundamental de los seres vivos de una manera sorprendente, situación que hizo posible el desarrollo de nuevas estrategias para abordarla, y así, continuar resolviendo miles de incógnitas acerca de su funcionamiento.

### 1.1 El ciclo celular.

Para que una célula se reproduzca, tienen que llevarse a cabo una serie de eventos que le permitan duplicar su contenido y distribuirlo de manera adecuada en dos células hijas. A este ciclo de duplicación y división se le conoce como el ciclo celular. Es por medio del ciclo celular que se reproducen todas las formas de vida: en el caso de organismos unicelulares, como bacterias y levaduras, cada división celular produce un nuevo organismo; en organismos multicelulares, largas y complejas secuencias de divisiones celulares son requeridas para producir un organismo funcional. En organismos adultos, la división celular es necesaria para reemplazar a aquellas células que han cumplido con su función y que por lo tanto deben morir (Alberts *et al*, 2002).

La dinámica del ciclo celular varía de organismo a organismo, e incluso se modifica a lo largo del tiempo de vida. Sin embargo, ciertas características son universales. La serie de eventos que se llevan a cabo en el ciclo celular tiene como objetivo la transferencia de la información genética a la siguiente generación de células. Para producir dos células hijas idénticas, el DNA que compone cada cromosoma debe ser cuidadosamente replicado, posteriormente las dos copias completas, producto de la replicación, tienen que ser distribuidas a las dos células hijas. El control existente en la segregación permite que cada célula reciba su juego cromosómico completo y de esa manera, asegura la integridad del genoma (Lewin, 2004).



La duplicación del DNA ocurre durante la fase S (de Síntesis), la cual en mamíferos requiere aproximadamente de 10 a 12 horas para llevarse a cabo, es decir, más de la mitad del tiempo que dura el ciclo celular (Alberts *et al*, 2002). Después de la fase S, la segregación cromosómica y la división celular ocurren en la fase M (de Mitosis), esta fase requiere no más de una hora para consolidarse. La fase M involucra una serie de eventos importantes: las cadenas duplicadas del DNA, producto de la síntesis, se condensan fuertemente para formar los cromosomas. Al presentarse el DNA en esta estructura, la envoltura nuclear desaparece, y los cromosomas duplicados, compuestos de un par de cromátidas hermanas comienzan a unirse a los microtúbulos del huso mitótico. La célula entra a un estado denominado metafase, en donde los cromosomas se alinean en el ecuador del huso mitótico, formando así la placa metafásica y esperando el inicio de la segregación. La anafase inicia con la separación de las cromátidas hermanas, evento al que le sucede el movimiento de éstas hacia los polos opuestos de las futuras células hijas. Por último la telofase permite la descondensación cromosómica y la organización nuclear del DNA. El ciclo celular culmina con la división del citoplasma o citocinesis, siendo éste el momento en el que las dos células adquieren un comportamiento independiente (Murray y Hunt, 1993).

Además de la duplicación del DNA, la mayoría de las células requieren la duplicación de todos sus componentes para llevar a cabo la división, además de la síntesis de proteínas que intervienen en los procesos regulatorios entre cada fase (Lewin, 2004). Para esto, las fases G (de *Gap*, o hueco), previas a la fase S ( $G_1$ ) y a la fase M ( $G_2$ ), promueven el crecimiento, síntesis de proteínas y duplicación de organelos. Esto permite que se presenten las condiciones adecuadas para la progresión del ciclo celular, y por lo tanto, se mantenga la estabilidad celular. Dentro de las fases *Gap*, la célula lleva a cabo un monitoreo de las condiciones internas y externas, para asegurarse de que las fases S y M, en las que el DNA es susceptible a presentar errores, se desarrollen con éxito. Es así como el ciclo celular se divide en cuatro fases secuenciales:  $G_1$ , S,  $G_2$  y M (*Fig. 1*). Las tres primeras fases componen lo que se conoce como interfase. En una célula humana en cultivo, la interfase ocupa aproximadamente 23 horas, mientras que la fase M abarca 1 hora (Alberts *et al*, 2002).

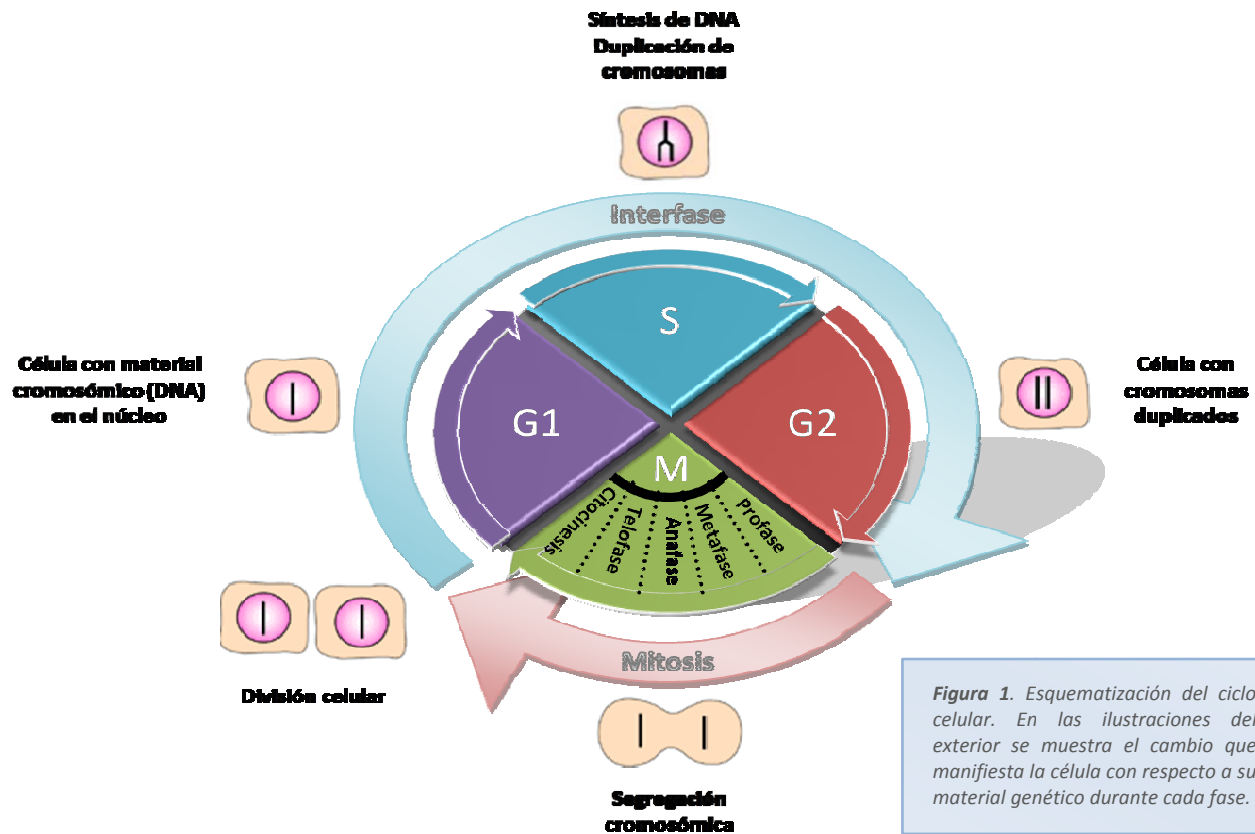


Figura 1. Esquemización del ciclo celular. En las ilustraciones del exterior se muestra el cambio que manifiesta la célula con respecto a su material genético durante cada fase.

## 1.2 Mitosis.

La palabra mitosis (proveniente del griego *mitos* cuyo significado es filamento) fue utilizada por primera vez por Walter Flemming en 1879 para referirse a la división celular. Él fue el primero en observar la división longitudinal de los cromosomas durante la mitosis, pero no fue sino hasta 1884 que Strasburger acuñó los términos profase, metafase y anafase para referirse a los diferentes estadios de la división celular (Passarge, 2001). De manera general, la mitosis se define como una serie de eventos que la célula promueve con la finalidad de generar dos células hijas genéticamente idénticas (Koshland, 1994). Originalmente, la mitosis fue definida como el periodo en el que los cromosomas se mantienen condensados, y por lo tanto, visibles. Las fases de la mitosis forman una secuencia dinámica, en la que muchos ciclos independientes, como la condensación de los cromosomas, los cambios de conformación del citoesqueleto y la duplicación y posicionamiento de los centrosomas tienen que coordinarse para cumplir con los requerimientos de esta fase del ciclo celular.



Durante la interfase, la célula aumenta su tamaño y el DNA que compone a los cromosomas es duplicado. Al mismo tiempo, el centrosoma, estructura que rige en mayor parte el movimiento de los cromosomas durante la mitosis, es duplicado. El centrosoma es el principal centro organizador de microtúbulos (COMT) en las células animales, de hecho, ambos términos son apropiados para referirse a esta estructura. El centrosoma está compuesto por un par de centriolos (estructuras cilíndricas arregladas en ángulo recto una a otra en lo que se conoce como una configuración en forma de L, las cuales son cuerpos basales de cilios y flagelos en células móviles), rodeados por una nube de material amorfo llamada matriz del centrosoma.

Los microtúbulos se forman a partir de subunidades de tubulina. Una subunidad de tubulina está conformada por un heterodímero formado a partir de dos proteínas globulares fuertemente relacionadas llamadas  $\alpha$ -tubulina y  $\beta$ -tubulina. Mientras que  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina son regularmente las que constituyen los microtúbulos, y por lo tanto más abundantes, otro tipo de tubulina presente en mucho menor cantidad llamada  $\gamma$ -tubulina, participa en el proceso de polimerización de microtúbulos, teniendo un papel más especializado. La  $\gamma$ -tubulina en asociación con proteínas accesorias forma lo que se denomina el complejo anular de  $\gamma$ -tubulina, el cual sirve como templado para que a partir de él emanen los microtúbulos. Conservado desde levaduras hasta seres humanos, el complejo anular de  $\gamma$ -tubulina promueve la nucleación de los microtúbulos, es decir, los organiza de tal manera que concentra el extremo negativo y expone el extremo positivo de los protofilamentos (Zheng *et al*, 1995). Este arreglo radial, denominado áster, permite un rápido crecimiento de microtúbulos, proyectados hacia el perímetro celular. La matriz del centrosoma contiene más de 50 copias del complejo anular de  $\gamma$ -tubulina. Además, presenta una gran variedad de proteínas, incluyendo proteínas motoras dependientes de microtúbulos, proteínas *coiled-coil*, proteínas estructurales y proteínas pertenecientes al sistema de control del ciclo celular. Durante la interfase de cada célula animal con ciclo activo, el par de centriolos existente junto con los demás componentes del centrosoma se duplican, formando un complejo dentro del núcleo. En la mitosis, este complejo se separa en dos, cada par de centriolos



comienza a ser parte de un centro organizador de microtúbulos, el cual genera un áster (Alberts *et al*, 2002).

En la transición existente entre la interfase y la mitosis, los cromosomas pueden ser vistos como filamentos elongados (profase). Al inicio de la profase, cada cromosoma se une a la envoltura nuclear y se organiza formando una estructura doble (cromátidas hermanas), resultado de la síntesis del DNA llevada a cabo con anterioridad. Los cromosomas se contraen durante la profase tardía para tener una conformación de mayor grosor y menor longitud, a este fenómeno se le conoce como condensación cromosómica (Lewin, 2004). La prometafase comienza abruptamente con el rompimiento de la envoltura nuclear. El huso mitótico empieza a conformarse y los dos ásteres existentes se alejan para iniciar la formación de los polos. De esta manera, los cromosomas empiezan a ser reconocidos por los microtúbulos, lo que promueve su movimiento (Alberts *et al*, 2002). En la metafase, los cromosomas son organizados en la placa ecuatorial, es decir, conservando la misma distancia hacia ambos centrosomas. Por medio del cinetocoro, las cromátidas hermanas se unen cada una a los microtúbulos provenientes de polos opuestos. En la anafase, se reduce poco a poco la longitud de los microtúbulos y se apartan mucho más los centrosomas, así, las cromátidas hermanas se separan de manera sincrónica, migrando hacia los polos. Una vez agrupados los dos juegos de cromosomas en ambos extremos de la célula en división, la telofase inicia con la descondensación y reensamblaje de la envoltura nuclear alrededor de los mismos (Lewin, 2004) (*Fig. 2*). Aunado a su juego cromosómico, cada célula hija recibe un centrosoma (Alberts *et al*, 2002).

La formación de los dos núcleos es el evento que marca el fin de la mitosis. En la citocinesis, el citoplasma se divide por medio de la formación del anillo contráctil (filamentos de actina), la membrana celular rodea poco a poco a los núcleos recién formados, promoviendo su separación y terminando de esta manera la formación de dos células con la misma información genética (Nurse, 2000; Lewin, 2004).

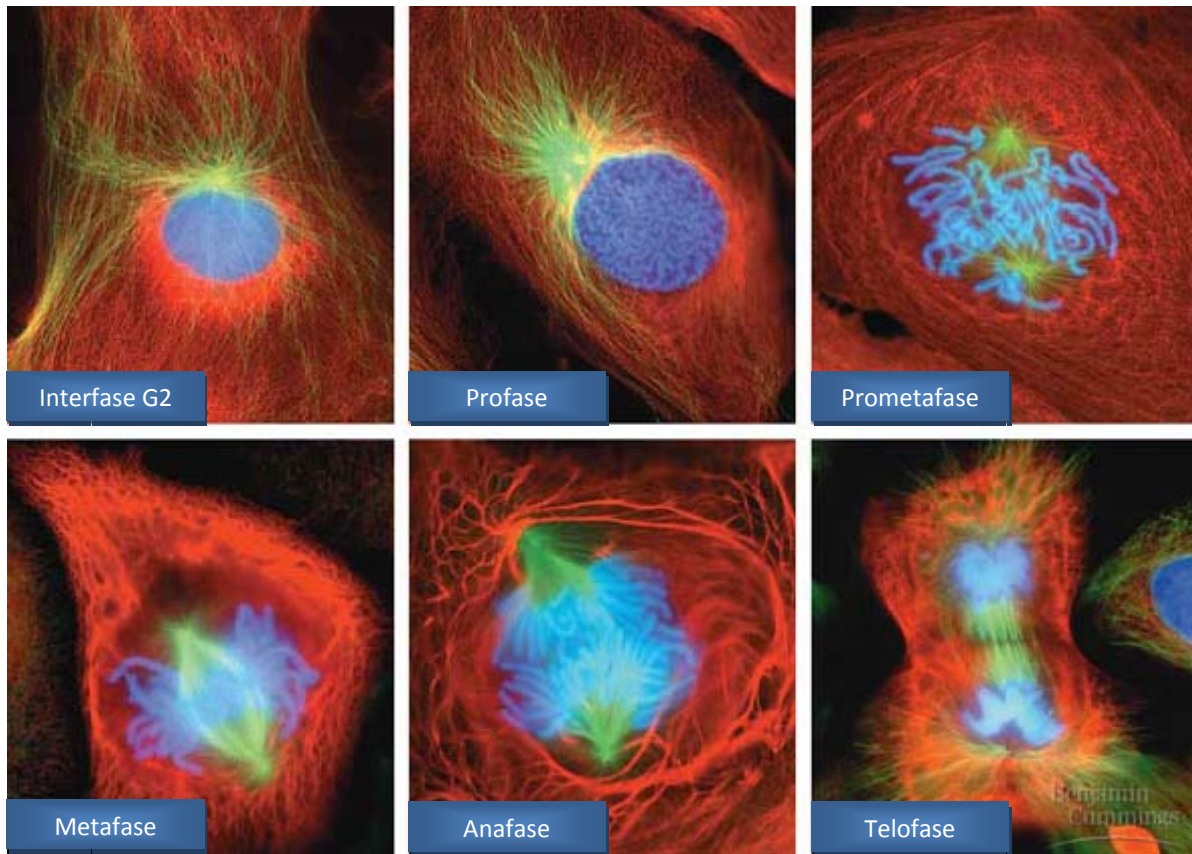


Figura 2. Las diferentes fases que componen las mitosis, obtenidas mediante microscopía confocal. En rojo, el citoesqueleto, en verde, los microtúbulos y en azul el material genético (DNA). Pearson Education, Inc., publicado por Benjamin Cummings.

### 1.3 Segregación cromosómica. La transición metafase-anafase.

En 1879, Flemming se percató de que al utilizar una serie de colorantes rojos, se podía teñir un material en particular dentro del núcleo celular, el cual se hallaba distribuido en forma de pequeños gránulos. Fue a este material al que denominó cromatina. Posteriormente, en 1888, el anatomista alemán Wilhelm Von Waldeyer utilizó por primera vez el término cromosoma haciendo referencia a las estructuras filamentosas con tinción positiva observadas al microscopio durante la mitosis (Asimov, 1985).

En las células eucariontes, el DNA está asociado a una serie de proteínas empaquetadoras, a esta asociación es a lo que denominamos, de manera general, cromatina. La cromatina a su vez, puede dividirse en dos tipos de material, eucromatina y heterocromatina. En muchas



regiones, las fibras de DNA tienen un empaquetamiento menos denso que la que se presenta en el cromosoma mitótico, a este material se le llama eucromatina y aparece disperso en el núcleo, ocupando la mayor parte de él. Otras regiones son empaquetadas casi con la misma densidad que se presenta en el cromosoma mitótico, a este material se le denomina heterocromatina. La heterocromatina, localizada comúnmente en la región centromérica, puede ser constitutiva, cuando su condición de empaquetamiento es constante a lo largo del ciclo celular, o facultativa, cuando la eucromatina tiende a empaquetarse fuertemente. Las fibras de DNA continuamente cambian su estado de heterocromático a eucromático y viceversa, por lo que se puede decir que el material genético está organizado de tal manera que permite estados alternativos de empaquetamiento para que la interfase y la división transcurran (Lewin, 2004).

Durante la interfase, la unidad fundamental que se presenta en el material cromosómico es el nucleosoma. Un nucleosoma está compuesto por un segmento de DNA de aproximadamente 146 pares de bases que gira dos veces alrededor de un octámero de histonas (dos copias de histonas H2 A, H2 B, H3 y H4). Así, el nucleosoma presenta una forma cilíndrica de 11 nm de diámetro por 6 nm de altura (Kornberg y Lorch, 1999). Un segmento de cromatina está compuesto de múltiples nucleosomas, y entre cada uno de ellos se mantiene un segmento de DNA vinculado a otra histona denominada H1. En el cromosoma metafásico, las dos moléculas de DNA condensadas corresponden a las cromátidas hermanas, las cuales se asocian por medio del centrómero. Las regiones terminales existentes en cada brazo del cromosoma reciben el nombre de telómeros. Durante la prometáfase y la metafase, los cromosomas se pueden visualizar mediante microscopía de campo claro y se ha determinado que su longitud varía entre 3 y 7  $\mu\text{m}$  (Koshland, 1994) (*Fig. 3*).

El centrómero es una sub-estructura de los cromosomas que asegura la distribución de éstos hacia ambos núcleos de las células hijas durante la segregación. Regula y promueve el movimiento cromosómico durante la mitosis y la meiosis a través de su interacción con los





microtúbulos del huso. Generalmente se visualiza al centrómero sólo como un fragmento de DNA establecido en cierta posición del cromosoma, sin embargo, la función que realiza es muy compleja. En la mitosis, el centrómero es el sitio de reconocimiento de diversas proteínas que, al trabajar en conjunto, forman una estructura conocida como cinetocoro, la cual actúa como el sitio de unión de los microtúbulos del huso (Cleveland *et al*, 2003).

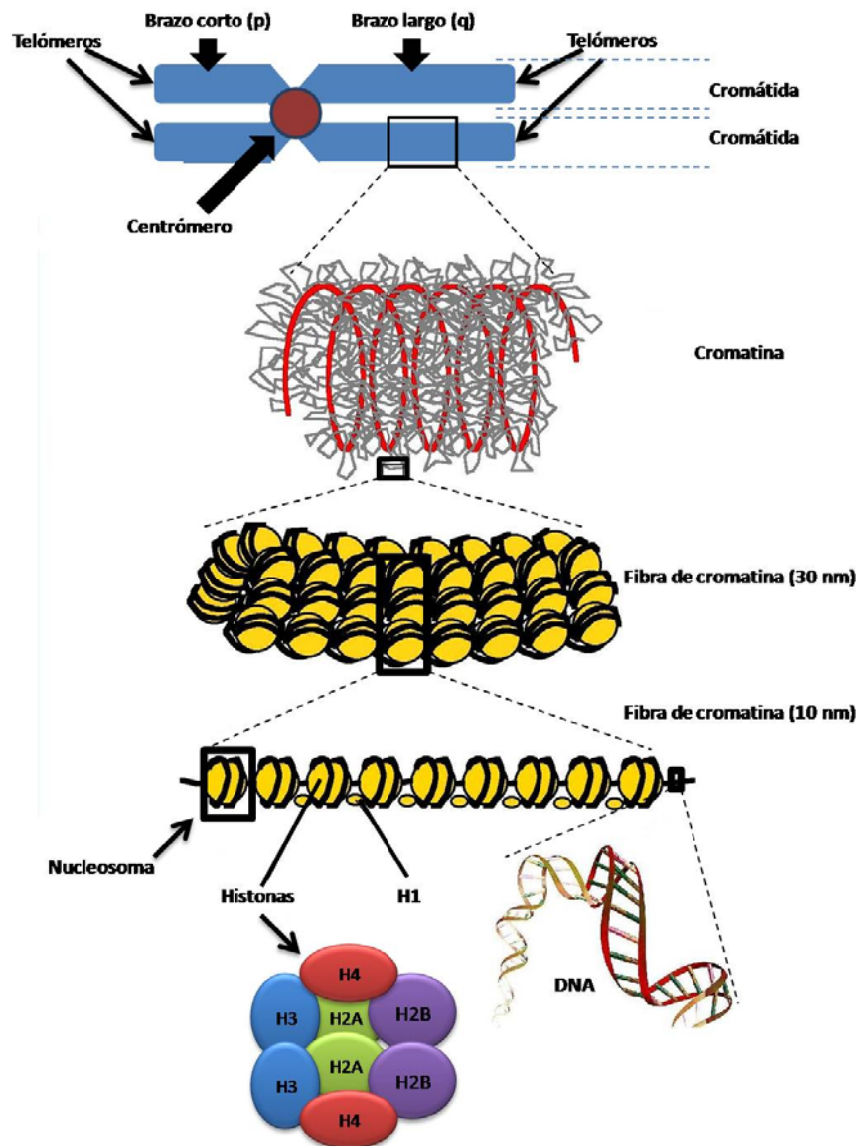


Figura 3. La estructura de un cromosoma metafásico, mostrando los diferentes niveles de organización que presenta. Cada nucleosoma está compuesto por DNA e histonas.



El centrómero, y por lo tanto el cinetocoro, son esenciales para la segregación, esto ha sido demostrado por el comportamiento en la mitosis de cromosomas que han sido fragmentados. Un simple rompimiento genera un fragmento cromosómico que retiene el centrómero, el cual se rige por la dinámica propia de la segregación, y otro fragmento acéntrico que no es reconocido por el huso mitótico y, por lo tanto, no puede ser incluido en alguno de los núcleos hijos (Lewin, 2004).

La organización de los cromosomas en el ecuador de la célula metafásica durante la mitosis es resultado de un proceso estocástico en el que los cinetocoros de los cromosomas son capturados aleatoriamente por una serie de microtúbulos que emanan de ambos husos polares y que se elongan y contraen de manera dinámica. La congregación de los cromosomas en la región central de la célula es posible sólo hasta que las placas cinetocóricas de ambas cromátidas hermanas sean reconocidas por los microtúbulos del huso de polos opuestos. Para asegurar la distribución adecuada del material genético entre los dos núcleos de las células hijas, es necesario que la segregación se lleve a cabo sólo hasta que todos los cromosomas se localicen en la placa metafásica (Nasmyth, 2002; Cleveland *et al*, 2003).

El problema central de una célula en mitosis reside en la forma en la que va a separar y distribuir (segregar) sus cromosomas, con la finalidad de que cada célula hija reciba una copia de su genoma. Cuando se lleva a cabo la duplicación en la fase S, las dos copias de cada cromosoma permanecen fuertemente unidas, recibiendo el nombre de cromátidas hermanas. Esta unión se presenta gracias a un conjunto de proteínas de múltiples subunidades que reciben el nombre de cohesinas (Guacci *et al*, 1997; Michaelis *et al*, 1997; Losada *et al*, 1998), las cuales son depositadas a lo largo de cada cromátida cuando el DNA es duplicado (Uhlmann y Nasmyth, 1998). Las cohesinas mantienen a las cromátidas asociadas durante la formación del huso mitótico. La separación de las cromátidas hermanas durante la anafase se lleva a cabo debido a la ruptura de los anillos de cohesina, particularmente, de la proteólisis de una subunidad, la Scc1 (Michaelis *et al*, 1997). Esta proteólisis es efectuada por una enzima



denominada separasa, cuya actividad es regulada negativamente por un inhibidor asociado llamado securina (Zou *et al*, 1999; Nasmyth *et al*, 2000; Nasmyth, 2002). La cohesión que se presenta entre cromátidas hermanas es determinante para el proceso de segregación cromosómica, y en condiciones normales llega a perderse únicamente en el lapso de tiempo existente entre el final de la metafase y el inicio de la anafase. Sin embargo, este breve intervalo es suficiente para que las cromátidas hermanas se separen y sean atraídas por microtúbulos provenientes de polos opuestos (Lewin, 2004).

#### 1.4 Estructura del cinetocoro y función.

El cinetocoro es una estructura compleja cuyo papel se concentra en especificar las uniones entre microtúbulos y cromosomas, por lo tanto, es esencial para que los cromosomas presenten una bi-orientación y se segreguen de manera adecuada. En vertebrados, el cinetocoro se sitúa de un extremo a otro de la heterocromatina centromérica, presentando una estructura tri-laminar compuesta por la corona fibrosa en la región exterior, la placa externa en la región intermedia, y la placa interna adyacente al centrómero (Brinkley y Stubblefield, 1966; Ris y Witt, 1981). En la corona fibrosa y la placa externa están contenidas tanto proteínas que interactúan con los microtúbulos (CENP-E y dineína) como proteínas pertenecientes al punto de monitoreo del huso mitótico (BUB<sub>1</sub>, BUBR<sub>1</sub>, BUB<sub>3</sub>, MAD<sub>1</sub>, MAD<sub>2</sub>, MPS<sub>1</sub>, ZWINT-1, ZW<sub>10</sub>, ROD) (Cooke *et al*, 1997; Jablonski *et al*, 1998), de las que se hablará más adelante. Aunque la composición proteica de la zona intermedia no se ha determinado del todo, se han detectado proteínas centroméricas como CENP-M, N y T que se postula, son un enlace entre las tres láminas (Mellone *et al*, 2006). La placa interna es inmediatamente adyacente al centrómero y además incluye cromatina centromérica que está especificada por la presencia de la variante de histona H<sub>3</sub> CENP-A (Warburton *et al*, 1997) (Fig. 4).

Los microtúbulos existentes al inicio de la mitosis, aumentan y reducen su longitud, sondeando el citoplasma en busca de cinetocoros. Una vez que los cinetocoros de ambas cromátidas hermanas se unen a microtúbulos provenientes de polos opuestos, el cromosoma

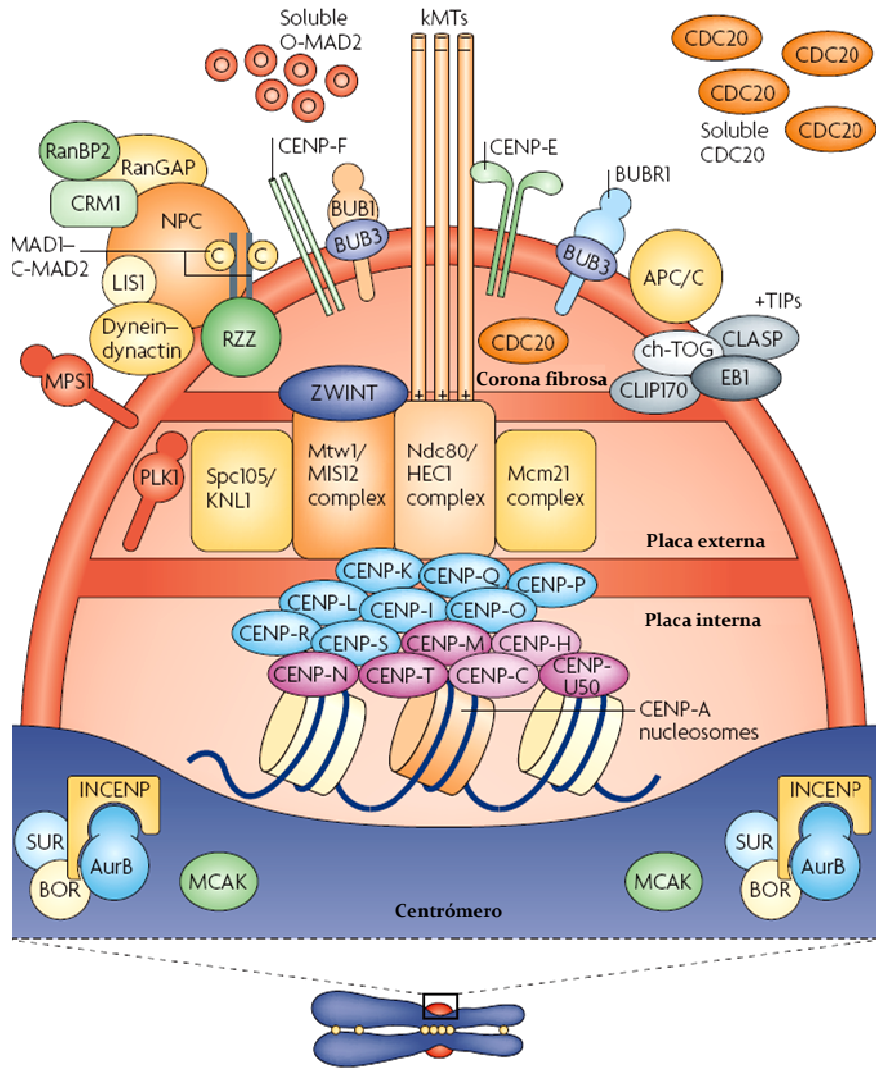


Figura 4. Conformación del cinetocoro en la que se pueden observar sus componentes distribuidos en la estructura tri-laminar. Modificado de Musacchio y Salmon, 2007.

lleva a cabo una serie de movimientos oscilatorios que lo dirigen a la región ecuatorial del huso mitótico, esta movilidad es altamente dinámica (Chan *et al*, 2005).

La naturaleza estocástica por la cual los cinetocoros encuentran a los microtúbulos y viceversa es un proceso de prueba y error que en ocasiones resulta en conexiones no productivas (Nicklas, 1997). El cinetocoro además de tener una maquinaria altamente compleja para unir y modular la dinámica existente entre él y sus microtúbulos unidos, posee mecanismos de control que detectan y corrigen interacciones defectuosas o no productivas.



Algunas investigaciones dirigidas a analizar la mecánica del cinetocoro han permitido identificar y caracterizar los componentes moleculares en una gran variedad de especies. Los hallazgos han permitido concluir que muchas proteínas que conforman al cinetocoro están conservadas desde levaduras, lo que nos da una idea de lo compleja que es su función en la segregación. Los esfuerzos de muchos laboratorios están dirigidos en este momento a la determinación de las interacciones que en esta estructura se presentan, así como a evaluar los errores en la mitosis ocasionados por un mal ensamblaje de todos sus componentes.

### 1.5 El punto de monitoreo del huso mitótico. Componentes y dinámica de su funcionamiento.

El mecanismo por el cual los cromosomas se segregan para dar origen a los núcleos de las futuras células hijas ha planteado numerosos retos a la biología desde que Theodor Boveri, basado al trabajo de Walter Fleeming en 1882, describió la sincronía con la que se llevaba a cabo la segregación de los cromosomas durante las primeras divisiones mitóticas de los huevecillos fertilizados de erizo de mar, enfatizando el efecto negativo que podría ocasionar en la progenie celular la inadecuada segregación, hace ya más de 100 años (Boveri, 1902).

Actualmente, se sabe que la sincronía y exactitud con la que se lleva a cabo la segregación depende de la regulación de ciertos eventos promovidos durante la mitosis, como el reconocimiento de los cromosomas por los microtúbulos y la adecuada separación y migración de las cromátidas hacia los polos de la célula en división. La segregación cromosómica es tan importante, que para llevarse a cabo con éxito y mantener la estabilidad genética en las células hijas, existe una serie de proteínas que, en conjunto, forma un mecanismo conocido como el punto de monitoreo del huso mitótico (PMHM).

Los primeros estudios referentes a este mecanismo fueron hechos en *Saccharomyces cerevisiae* en 1991 (Hoyt *et al*, 1991; Li y Murray, 1991). En ellos se identificaron a los genes de la familia Mad (de Mitotic arrest deficient), *Mad1*, *Mad2* y *Mad3* (éste último conocido en



humanos como *Bub1b*, que da origen a la cinasa BUBR1, de *BUB1-Related protein*) así como a los genes *Bub* (de *Budding uninhibited by benzimidazole*), *Bub1* y *Bub3*. Estos genes, conservados en todos los organismos eucariontes, participan en el funcionamiento del PMHM (activo en prometafase) previniendo la separación prematura de cromátidas hermanas (Li y Murray, 1991; Taylor *et al*, 1998 y 2004; Jin *et al*, 1998; Musacchio y Hardwick, 2002; Shin *et al*, 2003). En vertebrados, el PMHM requiere de otros componentes, como la cinasa MPS1 (*MonoPolar Spindle 1*), el complejo de proteínas ZW10 (*Zeste White-10*)-ROD (*Rough deal*)-ZWILCH, la proteína p31<sup>comet</sup> y la proteína motora de unión a microtúbulos CENP-E (*Centromere Protein E*) (Chan *et al*, 1999 y 2000; Abrieu, *et al*, 2000 y 2001; Mao *et al*, 2003; Taylor *et al*, 2004) (Tabla 1).

Proteína	Unión con:	Función en el PMHM
BUB1 (122 kDa)	BUB3	Inhibe la actividad de CDC20 por fosforilación.
BUBR1 (120 kDa)	CENPE,BUB3, CDC20	Parte del complejo inhibitorio de APC/C. Se une directamente a CDC20 e inhibe la actividad de APC/C.
BUB3 (37 kDa)	BUB1, BUBR1	Parte del complejo inhibitorio de APC/C. Localiza a BUB1 y BUBR1 en el cinetocoro.
MAD1 (83 kDa)	MAD2	Transporta a MAD2 al cinetocoro y lo activa.
MAD2 (23 kDa)	MAD1, CDC20, CMT/p31 <sup>comet</sup>	Parte del complejo inhibitorio de APC/C. Se une directamente a CDC20 e inhibe la actividad de APC/C.
CMT2/p31 <sup>comet</sup> (31 kDa)	MAD2	Inhibe la señalización del punto de monitoreo, evitando el reclutamiento de MAD2.
MPS1 (97 kDa)	Se desconoce	Se requiere para la localización de MAD1-MAD2 y CENP-E en el cinetocoro.
CENP-E (312 kDa)	BUBR1	Activa a BUBR1 en el cinetocoro. Responsable del reconocimiento de microtúbulos y del movimiento cromosómico.
ZW10 (89 kDa)	ROD, ZWILCH	Parte del complejo que recluta el heterodímero MAD1-MAD2 hacia los cinetocoros.
ROD (251 kDa)	ZW10, ZWILCH	Parte del complejo que recluta el heterodímero MAD1-MAD2 hacia los cinetocoros.
ZWILCH (67 kDa)	ROD, ZW10	Parte del complejo que recluta el heterodímero MAD1-MAD2 hacia los cinetocoros.

Tabla 1. Características de las proteínas que conforman principalmente el punto de monitoreo del huso mitótico, modificada de Kops *et al*, 2005 y actualizada de Musacchio y Salmon, 2007. Se muestran las funciones que llevan a cabo, así como las proteínas con las que interactúan.



La progresión de la mitosis y la segregación cromosómica son controladas por el complejo promotor de la anafase (APC/C, *Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*), una ubiquitina-ligasa del tipo E<sub>3</sub> cuya actividad consiste en reconocer y modular la degradación (vía proteosoma) de dos proteínas importantes en la regulación de la mitosis, la securina y la ciclina B (Peters, 2002; Kops *et al*, 2005). Como ya se había mencionado, la securina inhibe una proteasa conocida como separasa, la cual es requerida para romper los complejos de cohesina que mantienen juntas a las cromátidas hermanas. La proteólisis de la securina, por lo tanto, permite a la separasa llevar a cabo su función, promoviendo de esta manera el inicio de la anafase. Por otro lado, la degradación de la ciclina B inactiva la función de la cinasa dependiente de ciclina 1 (CDK1, *Cyclin-Dependent Kinase 1*), acción que emite una señal celular para terminar la mitosis (Peters, 2006).

El reconocimiento de los sustratos de APC/C requiere de una activación previa llevada a cabo por la proteína reguladora CDC20 (*Cell-Division-Cycle 20 homologue*). Activado al iniciar la mitosis y meiosis, la estrategia del PMHM radica en controlar los eventos proteolíticos debidos a la interacción entre APC/C y CDC20, permitiendo la progresión del ciclo celular sólo hasta que todos los cromosomas se encuentren bi-orientados entre los polos del huso (Kops *et al*, 2005).

La principal señal que dirige el funcionamiento del PMHM es la presencia de cinetocoros sin unión a microtúbulos, esto permite que se lleve a cabo una serie de interacciones entre proteínas pertenecientes a este mecanismo con el objetivo de activar la función de MAD2, BUBR<sub>1</sub> y BUB3, las cuales se agrupan para formar el complejo del punto de monitoreo de la mitosis (CPMM, conocido en inglés como *Mitotic Checkpoint Complex*, MCC), encargado de retener a CDC20 (Sudakin *et al*, 2001; Tang *et al*, 2001; Fang, 2002) (Fig. 5).

La movilización de todas las proteínas pertenecientes al PMHM inicia cuando la envoltura nuclear desaparece, y es direccionada exclusivamente a la superficie de aquellos cinetocoros que manifiestan tanto ausencia de unión a microtúbulos (reconocida por CENP-E en la

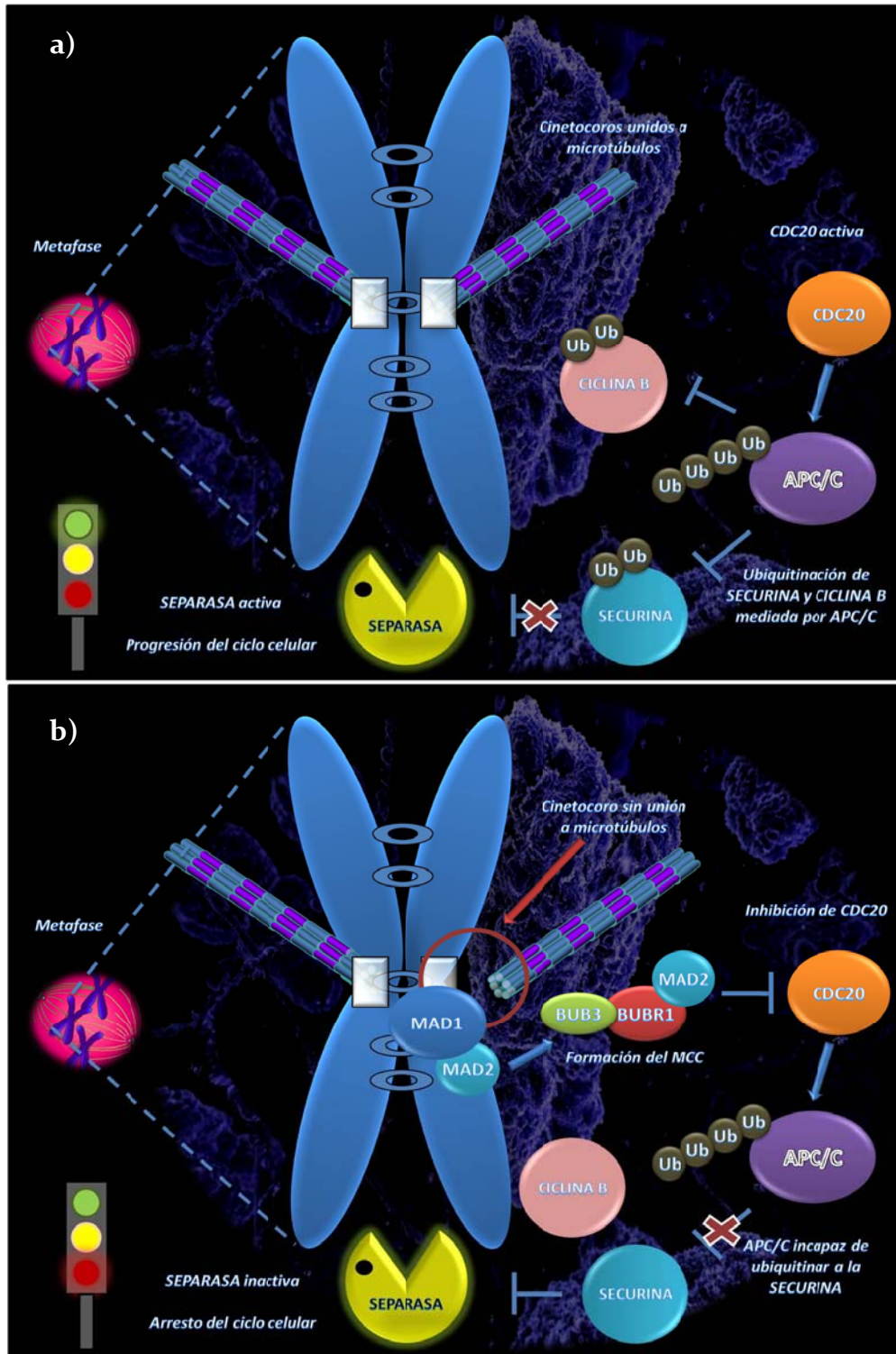


corona fibrosa), como tensión deficiente (reconocida por las proteínas Aurora B/Ipl1, Survivina, Borealina e INCENP-1 en la región centromérica adyacente al centrómero). BUB1 y MPS1 reclutan a la mayoría de las proteínas que participan en este mecanismo, siendo de suma importancia la proteína motora CENP-E (por la cual BUBR1 es activada, llevando a cabo su actividad de cinasa) y el complejo formado por MAD1-MAD2 (el cual al ser situado en el cinetocoro promueve el reclutamiento y activación de MAD2 en un flujo constante). En su forma activa, MAD2 es liberada del cinetocoro, lo que permite la asociación con las demás proteínas del CPMM para inhibir a CDC20 (Sironi *et al*, 2002; Musacchio y Salmon, 2007) y bloquear la mitosis.

Cuando el reconocimiento de los cinetocoros por los microtúbulos es total, p31<sup>comet</sup> impide el reclutamiento de MAD2, inhibiendo la formación del CPMM, BUBR1 se inactiva (por el reconocimiento de unión a microtúbulos manifestado por CENP-E) y el complejo formado por las proteínas motoras dineína-dinactina dirige la remoción de los componentes del PMHM a los polos del huso. De esta manera, la señal de arresto empieza a silenciarse. CDC20 se libera y se une con APC/C, permitiendo la degradación de securina y ciclina B, y por ende, el avance a la anafase (Reddy *et al*, 2007; Mao *et al*, 2005).

El arresto en metafase promovido por el PMHM es sumamente importante en el control del ciclo celular, ya que otorga la posibilidad de que se manifieste un adecuado reconocimiento entre microtúbulos y cinetocoros, manteniendo de esta manera la fidelidad de la segregación cromosómica. Sin embargo, se ha determinado (mediante experimentos en los que las células son expuestas a agentes químicos que intervienen con la polimerización de microtúbulos) que la señal que promueve este mecanismo no puede mantenerse activa por tiempos prolongados. Cuando los errores en la maquinaria de segregación son persistentes, la célula tiene dos caminos a seguir: morir, ya sea por catástrofe mitótica o por apoptosis, o evadir el arresto, y por lo tanto, presentar errores al llevarse a cabo la distribución de cromosomas a las células hijas (Weaver y Cleveland, 2005).





**Figura 5.** a) El punto de monitoreo del huso mitótico inactivo, en el que el reconocimiento de los cinetocoros por los microtúbulos del huso permite la degradación de la securina y la actividad de la separasa. b) Cuando no existe una unión adecuada entre cinetocoros y microtúbulos, el punto de monitoreo promueve la formación del complejo formado por BUBR1, BUB3 y MAD2, cuya función es impedir que CDC20 active a APC/C, inhibiendo la degradación de la securina y por lo tanto, la función de la separasa, arrojando el ciclo celular en metafase.



## 1.6 Aneuploidías e inestabilidad cromosómica. La presencia de errores en la maquinaria de división.

El desarrollo exitoso de la mitosis y la fidelidad en la segregación son producto de la conjugación ordenada de ciertos procesos celulares, como la formación de los COMT, la polimerización de los microtúbulos a partir de estos para el reconocimiento del cinetocoro (a partir de una unión estable y una tensión bi-orientada), la separación de cromátidas hermanas y la migración hacia los polos del huso. Cuando el funcionamiento de estos mecanismos se ve alterado, el genoma de la célula se vuelve inestable, es decir, manifiesta una alta susceptibilidad a presentar alteraciones, a esta condición se le conoce como inestabilidad cromosómica (IC). Recordemos que la inestabilidad genética incluye la inestabilidad microsatelital y la cromosómica. La primera es caracterizada por una alta carga mutacional como consecuencia de errores en los mecanismos de reparación del DNA, mientras que la segunda, producto de errores en la segregación, tiene como consecuencia la presencia en la célula de un número aberrante de cromosomas, es decir, la generación de aneuploidías (Bharadwaj y Yu, 2004).

Una aneuploidía se define como un estado anormal en el número y contenido cromosómico (Kops *et al*, 2005). Durante la segregación, la distribución de los cromosomas debe ser equitativa, es decir, cada célula hija debe recibir su complemento cromosómico completo, aunque bajo ciertas condiciones una célula puede presentar más o menos cromosomas de los que corresponden a su número euploide. Las condiciones por las que se puede generar una aneuploidía incluyen divisiones mitóticas aberrantes a partir de una condición poliploide previa, alteraciones en centrosomas que conducen a la formación de múltiples polos en el huso mitótico (Nigg, 2002), errores al llevarse a cabo fusiones celulares y evasión de la mitosis una vez duplicado el DNA (fenómeno conocido como endoreduplicación) (Storchova y Pellman, 2004). La presencia de errores en la cohesión existente entre cromátidas hermanas puede derivar también en aneuploidías. En estudios realizados con líneas celulares de cáncer y con ratones desnudos, se ha determinado que tanto la inactivación como la



sobre-expresión de la securina pueden tener como consecuencia la generación de IC (Zhang *et al*, 1999; Jallepalli *et al*, 2001).

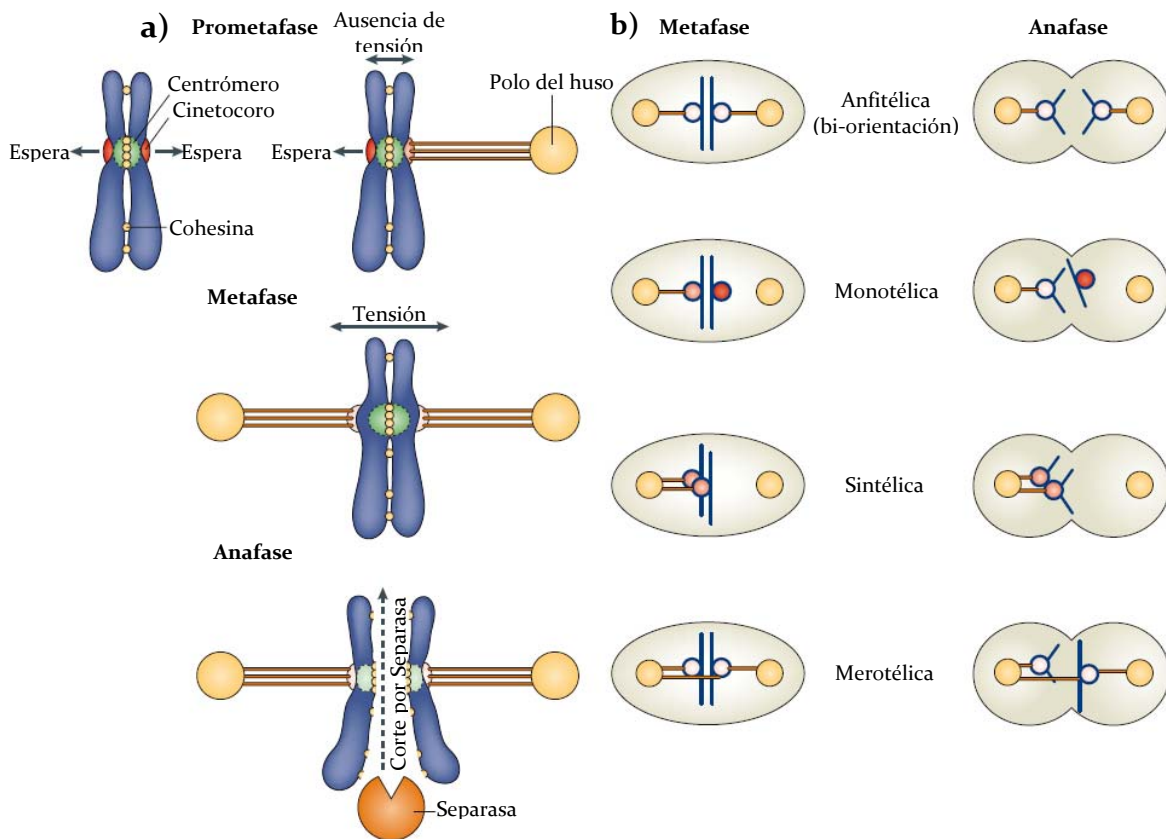
El reconocimiento inadecuado de los cinetocoros por los microtúbulos del huso, ya sea por falta de unión o por falta de tensión, juega un papel importante en la generación de células aneuploides, situación que activa el PMHM (Nicklas *et al*, 1995). La bi-orientación, producto de la interacción entre microtúbulos de diferentes polos con cada cromátida hermana (unión anfitélica), es la única condición que asegura la segregación adecuada (Musacchio y Salmon, 2007). Cuando existen errores en interacciones microtúbulo-cinetocoro, las aneuploidías pueden manifestarse de dos maneras, como eventos de rezago cromosómico y como eventos de no disyunción. Con base en lo anterior, se pueden presentar uniones monotélicas, sintéticas y merotélicas. Las uniones monotélicas se presentan cuando sólo una de las dos cromátidas ha sido reconocida por los microtúbulos (Rieder *et al*, 1995). Aquella cromátida que no ha sido reconocida pierde la capacidad de incorporarse al núcleo de una célula hija, generando un evento de rezago cromosómico. En el caso de las uniones merotélicas, una cromátida es reconocida por ambos polos del huso, situación que altera la dinámica de la segregación generando también rezagos cromosómicos, pues existe unión a microtúbulos, pero fuerzas de tensión opuestas (Cimini y Degrossi, 2005). Por último, las uniones sintéticas se manifiestan cuando las dos cromátidas hermanas son reconocidas por microtúbulos originarios del mismo polo, generando eventos de no disyunción (Fig. 6).

Las uniones monotélicas son las que reconoce primordialmente el PMHM, de hecho, el inicio de la anafase en una célula puede retardarse al existir sólo un cinetocoro sin unión a microtúbulos (Rieder *et al*, 1995). Las uniones sintéticas manifiestan un grado de reconocimiento diferente por el PMHM. Si bien la unión y tensión es reconocida, la ausencia de bi-orientación permite el reconocimiento del error. Las uniones merotélicas, a diferencia de las dos anteriores, no pueden ser reconocidas por el PMHM, ya que la bi-orientación manifestada en una sola cromátida produce una señal que permite su inactivación (Musacchio y Salmon, 2007). Tanto en la presencia de uniones sintéticas como en la



presencia de uniones merotéticas, la participación de la cinasa Aurora-B/Ipl1 es muy importante para corregir el problema. Esta cinasa, localizada en la región centromérica adyacente al cinetocoro, detecta y desestabiliza estas uniones, con la intención de generar nuevamente cinetocoros sin unión a microtúbulos, para que de esta manera, se reactive la función del PMHM (Lampson *et al*, 2004; Pinsky y Biggins, 2005).

La pérdida o ganancia constante de cromosomas (y por lo tanto de los genes que los conforman), producto de la IC originada de las distintas formas que se han descrito, posibilita a las células a sufrir modificaciones de gran magnitud en procesos encargados de controlar su crecimiento, proliferación y muerte. Dependiendo del grado de inestabilidad, la célula puede morir (opción que impide la propagación del daño a la siguiente generación celular), o mantenerse (y mediante mitosis aberrantes, extender el daño a las células hijas).



**Figura 6.** a) La segregación requiere de una bi-orientación de los cromosomas promovida por la unión de los microtúbulos a los cinetocoros. b) Los diferentes tipos de unión que originan eventos de aneuploidía. Modificado de Musacchio y Salmon, 2007.



## 1.7 Alteraciones en el punto de monitoreo del huso mitótico y desarrollo de inestabilidad cromosómica.

El papel que juega el PMHM en la segregación cromosómica postula a los genes involucrados en este mecanismo como un grupo que, al ser alterado en su funcionamiento, promueve el desarrollo de IC. Quizá el mejor ejemplo de esta situación es el observado en el gen que codifica para la proteína BUBR1, denominado *Bub1b*. En este gen se han encontrado múltiples mutaciones en la región que codifica para su dominio cinasa (Hanks *et al*, 2004). Las mutaciones en línea germinal de *Bub1b* están asociadas a una enfermedad de condición recesiva denominada aneuploidía de mosaico variegado, caracterizada por un retardo en el crecimiento, microcefalia y cáncer en etapa infantil. Los individuos que presentan esta enfermedad manifiestan un alto índice de IC.

En células de ratón, se ha observado que las deficiencias en la proteína CENP-E impiden el reclutamiento de MAD1, MAD2 y BUBR1 en los niveles necesarios, lo que impide generar una señal inhibitoria suficientemente fuerte para promover un arresto en metafase, permitiendo la generación de células aneuploides (Weaver *et al*, 2003). Además, la sub-expresión de *Mad2* y *Bub1b* se ha asociado con un incremento en el número de aneuploidías en fibroblastos de rata (Michel *et al*, 2001; Dai *et al*, 2004).

En algunas líneas celulares de cáncer de colon se han detectado mutaciones en *Bub1* que generan un efecto dominante-negativo hacia el otro alelo que no ha sufrido alteraciones (Cahill *et al*, 1998). También se han caracterizado mutaciones en los genes *Mad1*, *Mad2* y los tres miembros del complejo *Zw10-Rod-Zwilch*, aunque no se ha determinado su efecto en el desarrollo del PMHM (Nomoto *et al*, 1999; Gemma *et al*, 2000; Hernando *et al*, 2001; Tsukasaki *et al*, 2001; Wang *et al*, 2004). Aunque estas son algunas evidencias de alteraciones en genes del PMHM, se ha planteado que, a excepción del efecto de las mutaciones de *Bub1b*, no parecen ser un mecanismo común en la generación de células aneuploides (Kops *et al*, 2005).



## 1.8 Aneuploidías y cáncer.

El ser humano está conformado por grupos de células que realizan procesos sumamente complejos para promover su desarrollo. En condiciones normales, crecimiento, proliferación y diferenciación celular se llevan a cabo con espectacular control y armonía dentro de cada tejido del cuerpo. Tan importantes son estas actividades para un organismo, que si se manifiestan con errores, los puntos de monitoreo distribuidos a lo largo del ciclo celular junto con los mecanismos de reparación del DNA impiden la generación de inestabilidad genética, incluso si una célula tiene un riesgo elevado a generar esta condición, se activan mecanismos que desencadenan su muerte. Sin embargo, la perturbación constante de este sistema debida a múltiples factores endógenos y exógenos altera la homeostasis celular, promoviendo la transformación maligna, y por lo tanto, el desarrollo de cáncer (Varmus y Weinberg, 1993).

Al hablar del cáncer, nos referimos a un conjunto de enfermedades con varios mecanismos etiológicos en los que algunas células adquieren, principalmente, la capacidad de proliferar de manera exacerbada así como de evadir la apoptosis mediada por diferentes circunstancias. A partir de estas alteraciones, las células tumorales adquieren un potencial invasivo, y mediante mecanismos cada vez más complejos, como el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya existentes (angiogénesis), o la invasión de tejidos adyacentes (viajando por el sistema sanguíneo y linfático para infiltrarse en órganos distantes al punto de origen), su condición transformante se vuelve irreversible (Vogelstein y Kinzler, 1993).

En la célula, el fenotipo maligno puede adquirirse mediante la pérdida, mutación o desregulación de genes cuya función es regular positiva o negativamente la progresión del ciclo celular. Así se han caracterizado tres grupos principales de genes involucrados en su desarrollo: oncogenes, genes supresores de tumores y genes de reparación del DNA. Los oncogenes son genes cuya ganancia de función promueve el desarrollo de cáncer, y están comúnmente ligados a rutas que permiten la proliferación celular. Por el contrario, los genes



supresores de tumores ejercen un control negativo sobre la progresión del ciclo celular cuando existe la posibilidad de que en éste se presenten errores, en este caso la pérdida de función predispone al desarrollo de cáncer. Por último los genes de reparación del DNA impiden la generación de inestabilidad genética mediante múltiples mecanismos, evitando que el daño manifestado en esta molécula se transfiera a la siguiente generación de células (Lewin, 2004). Al igual que los genes supresores, su pérdida de función es un factor de predisposición al desarrollo tumoral.

En la carcinogénesis, la etapa de iniciación involucra la adquisición de múltiples alteraciones al DNA, las cuales confieren a la célula ciertas ventajas en crecimiento y proliferación. A pesar de contar con puntos de monitoreo distribuidos en la transición de las diferentes fases del ciclo celular, la exposición constante a agentes carcinógenos impide el adecuado funcionamiento de éstos. De esta manera, el avance a través del ciclo es, entonces, algo común para la célula transformada.

El efecto de la IC en el ser humano varía dependiendo del momento en el que se presente. Si durante la formación de células germinales (meiosis) existen errores en el mecanismo de segregación que originen gametos aneuploides, el cigoto conformado a partir de un gameto de este tipo proyecta la inestabilidad a las células que se originen posteriormente, daño que resulta letal. Los únicos eventos de aneuploidía que no detienen el desarrollo, pero manifiestan serios defectos en éste, son ciertas combinaciones de cromosomas sexuales (que pueden derivar en Síndrome de Turner y de Klinefelter, por ejemplo) y las trisomías 13 (Síndrome de Patau), 18 (Síndrome de Edwards) y 21 (Síndrome de Down) (Kops *et al*, 2005).

Cuando el mecanismo de segregación no funciona adecuadamente en células ya diferenciadas y se presentan los eventos de aneuploidía, se puede promover la transformación maligna. Se ha comprobado que diversos tumores sólidos están compuestos de células que presentan diferencias en el número de cromosomas que contienen (Heim y Mitelman, 1995). Además, diversas líneas celulares de cáncer manifiestan pérdidas y



ganancias de cromosomas completos durante la división (Lengauer *et al*, 1997). Con estas evidencias de soporte, la IC se propone como una condición que facilita la redistribución de cromosomas completos en las células tumorales, teniendo como consecuencia tanto la pérdida de heterocigocidad de genes supresores de tumores, como la amplificación de oncogenes mediante la duplicación de aquellos cromosomas que portan el alelo mutado. También se ha asociado la presencia de IC con la resistencia al tratamiento del cáncer mediante agentes quimioterapéuticos que interfieren con la dinámica de la segregación cromosómica, como la vincristina o el paclitaxel (Kops *et al*, 2005).

### 1.9 Polimorfismos de DNA. Definición e importancia.

En la naturaleza existen organismos de la misma especie que usualmente difieren en algunos aspectos de su apariencia. La visión mendeliana de la genética sobre los caracteres que conforman a los seres vivos permitió, en un principio, establecer una clasificación de alelos (variantes genéticas que promueven diferentes estados del carácter en cuestión) de tal manera que su manifestación podía ser, con base en la capacidad de expresarse fenotípicamente, dominante o recesiva; silvestre (cuando se habla del alelo más representado y estable en la población) o mutante (cuando ha sufrido un cambio, producto de errores en la transmisión de la información genética). En la actualidad, se ha reconocido la existencia de múltiples alelos, es decir, diversas manifestaciones de un gen, cada una con un efecto diferente en el fenotipo (Ayala, 1978). Debido a esto, en ocasiones resulta inadecuado denominar un alelo como silvestre, cuando existen otras variantes alélicas que no confieren ventaja o desventaja alguna al organismo (Lewontin, 1978).

Cuando múltiples alelos coexisten en un locus como componentes estables de la población, se dice que ese gen presenta polimorfismos. Un alelo es considerado polimórfico si está presente con una frecuencia de al menos 1 % en la población. Los polimorfismos pueden manifestarse en las características físicas de un individuo (fenotipo), en formas variantes de proteínas donde se modifica su actividad enzimática o afinidad de unión (polimorfismo





bioquímico), en características morfológicas y estructurales de los cromosomas, por ejemplo, la longitud de la heterocromatina centromérica (polimorfismo cromosómico), o en diferencias en la secuencia de nucleótidos existente en el DNA (polimorfismos de DNA) (Ayala, 1978; Brown, 1999; Passarge, 2001).

Cuando un polimorfismo no promueve alguna de las situaciones antes mencionadas, se dice que es neutral. Aunque no es evidente fenotípicamente, el alelo que se considera silvestre puede ser polimórfico. Múltiples versiones del alelo silvestre pueden ser distinguidas por diferencias en su secuencia que no afectan su función, es decir, no tienen un efecto visible (Lewin, 2004).

Existen dos tipos de polimorfismos de DNA: polimorfismos de longitud de secuencia (*Simple Sequence Length Polymorphism*, SSLP) y polimorfismos de un solo nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) (Collins *et al*, 1998; Passarge, 2001).

Los SSLPs son variantes alélicas que difieren en el número de repeticiones en tándem de secuencias de nucleótidos en DNA no codificante. Estas pueden ser repeticiones en tándem de secuencias cortas (STR, *Short Tandem Repeats*) o repeticiones en tándem de secuencia variable (VNTR, *Variable Number of Tandem Repeats*). Las STRs son unidades de 1 hasta 4 pares de bases repetidas de 3 a 10 veces (microsatélites). En este caso, las repeticiones son usualmente de Citosina-Adenina en la cadena 5'→3' y alternancia de Citosina-Guanina y Adenina-Timina en doble cadena. Por otro lado, las VNTRs (minisatélites), consisten en unidades repetidas de 20 a 200 pares de bases (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Cada alelo es definido mediante el número de repeticiones, las cuales pueden ser determinadas mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) (Passarge, 2001).

Los SNPs son variantes alélicas que difieren en un solo nucleótido en una posición específica. Se ha calculado que al comparar el genoma tan sólo de dos seres humanos, una de cada 1330



bases difiere. Definido por sus SNPs, cada ser humano es único. Un objetivo del mapeo genético es registrar y catalogar todas las variantes existentes en el DNA en los seres humanos (Deloukas *et al*, 1998). La frecuencia observada de SNPs por genoma predice que, tomando al ser humano como modelo de estudio, es decir, comparando los genomas de cada persona, deben existir más de 10 millones de SNPs con una frecuencia alélica mayor al 1 %. Hasta el momento aproximadamente 1.4 millones han sido identificados (The International SNP Map Workig Group, 2001).

Con fundamento en esta información, y enfatizando el papel de los polimorfismos de DNA, es posible decir que los genes pueden presentar polimorfismos que no alteran la secuencia de la proteína; polimorfismos que alteran la secuencia de aminoácidos en la proteína sin alteran su función; polimorfismos que pueden alterar la función de la proteína, dando origen a variantes con diferentes niveles de actividad y polimorfismos que pueden dar origen a proteínas no funcionales (Lewin, 2004). Es importante señalar que la presencia de polimorfismos puede representar a largo plazo una ventaja evolutiva, promoviendo variantes de respuesta ante condiciones ambientales adversas o ante otra serie de cambios que no podrían ser soportados al existir uniformidad genética (Lewontin, 1978).

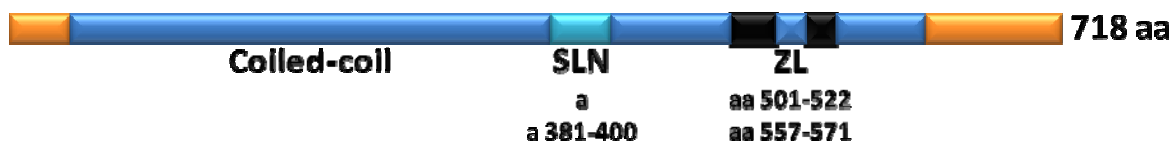
#### 1.10 *Mad1*. Estructura, función e importancia dentro del punto de monitoreo del huso mitótico.

El primer trabajo en el que se determinó la presencia de MAD<sub>1</sub> en humanos fue reportado en 1998 por el grupo de Jin y colaboradores. Aquí, a MAD<sub>1</sub> se le daba el nombre provisional de TXBP<sub>181</sub> (*Tax-Binding Protein 181*). Este estudio se enfocó a determinar el papel de una proteína denominada TAX (portada por el virus 1 de leucemia de células T, HTLV-1) en la formación de células multinucleadas y células con micronúcleos. Se estableció que el mecanismo por el cual se generaba esta condición residía en la unión de TAX a TXBP<sub>181</sub>, situación que inhibía la formación de homodímeros de la segunda. Al comparar la secuencia de aminoácidos de TXBP<sub>181</sub> con las secuencias existentes en las bases de datos, se descubrió



que la homología con la proteína MAD<sub>1</sub> en levaduras era muy elevada, además, se determinó mediante ensayos de co-inmunoprecipitación que TXBP18<sub>1</sub> interactúa con MAD<sub>2</sub>. Estos hallazgos permitieron establecer que TXBP18<sub>1</sub> era, en realidad, la proteína MAD<sub>1</sub> en humanos.

El gen *Mad1* está localizado en el brazo corto del cromosoma 7 (7p22) (Jin, 1999) y tiene una longitud de 2754 pb. Se han encontrado tres variantes de su transcrito que codifican para la misma proteína (MAD<sub>1</sub>), la cual presenta una estructura *coiled-coil* de 83 kDa altamente conservada desde levaduras hasta primates, lo cual sugiere que su papel en la transducción de señales llevada a cabo en el PMHM es de suma importancia en todos los organismos eucariontes. Compuesta de 718 residuos de aminoácidos, MAD<sub>1</sub> presenta una región caracterizada como señal de localización nuclear (aa 381-400) y dos zippers de leucina entre los aminoácidos 501-522 y 557-571 (Iwanaga *et al*, 2002) (Fig. 7).



**Figura 7.** Esquemización de las regiones de la proteína MAD<sub>1</sub>. El extremo N-terminal contiene la región *coiled-coil* necesaria para la localización en el cinetocoro, mientras que el extremo C-terminal contiene la región necesaria para unir a la proteína MAD<sub>2</sub>.

Como componente del PMHM y presente como un homodímero, MAD<sub>1</sub> interactúa con MAD<sub>2</sub> por medio de su dominio C-terminal, esto permite la formación de una estructura tetramérica 2:2 (Sironi *et al*, 2002; Chung y Chen, 2002). En esta conformación, MAD<sub>1</sub> y MAD<sub>2</sub> son inmovilizadas en la envoltura nuclear, siendo hasta el final de la profase el momento en el que el tetrámero se libera para migrar hacia los cinetocoros sin unión a microtúbulos (Chen *et al*, 1998; Hardwick *et al*, 2000; Chung y Chen, 2002). A diferencia de todos los componentes del PMHM, la unión de MAD<sub>1</sub> al cinetocoro (mediada por su extremo N-terminal) es muy estable, esto permite que en la prometafase, MAD<sub>1</sub> y MAD<sub>2</sub> sean rápidamente localizadas en la corona fibrosa (Luo *et al*, 2002, Howell *et al*, 2004). El



transporte de MAD2 a los cinetocoros sin unión a microtúbulos es mediado exclusivamente por la interacción existente con MAD1, por esta razón, esta proteína es de suma importancia para el arresto del ciclo celular en metafase, ya que promueve la disponibilidad de MAD2 en el cinetocoro para la conformación del CPMM y el posterior secuestro de CDC20, inhibiendo así la función de APC/C y, por lo tanto, la progresión a la anafase (Sironi *et al*, 2002).

MAD1 y CDC20 son las únicas proteínas que forman complejos con MAD2. Al comparar las regiones en la que se presenta esta interacción, se determinó que existía una alta similitud (Luo *et al*, 2002). Además, las uniones MAD1-MAD2 y CDC20-MAD2 se llevan a cabo en ausencia de las demás proteínas del PMHM *in vitro* (Sironi *et al*, 2001). Cuando MAD2 se une tanto a MAD1 como a CDC20 adopta una conformación conocida como cerrada (C-MAD2), mientras que al mantenerse sin unión a estos ligandos mantiene la conformación abierta (O-MAD2). La diferencia entre ambas conformaciones de MAD2 reside en un cambio estructural que presenta en su región conocida como el “cinturón de seguridad” (*safety belt*), ubicada en el extremo C-terminal (50 aminoácidos) (Sironi *et al*, 2001). La unión MAD1-MAD2, y por lo tanto la promoción de la conformación cerrada, funciona como un templado para el reclutamiento de MAD2 libre (O-MAD2) en el cinetocoro capaz de unirse a CDC20, y una vez que se lleva a cabo esta unión, C-MAD2-CDC20 vuelve a amplificar la señal (De Antoni *et al*, 2005). Si bien es cierto que las dos conformaciones de MAD2 se reconocen, esto sólo sucede en el cinetocoro, más no en el citosol. Una proteína de unión a C-MAD2 denominada p31<sup>comet</sup> se moviliza junto con MAD1-C-MAD2, lo que impide que O-MAD2 interactúe con C-MAD2 hasta que exista un anclaje del complejo en la corona fibrosa. Cuando el tetrámero se establece, p31<sup>comet</sup> se disocia para permitir la captación de MAD2 libre y así, continuar la transducción de señales que promueven el arresto (Musacchio y Salmon, 2007).

Una vez que todos los errores han sido corregidos, la señal de silenciamiento del PMHM comienza a manifestarse. La inhibición del reclutamiento de MAD2 mediada por MAD1 envuelve nuevamente a p31<sup>comet</sup> compitiendo con O-MAD2 en la unión a MAD1-C-MAD2 y a CDC20-C-MAD2. Esto promueve la presencia de CDC20 libre para interactuar con APC/C. la



disociación del cinetocoro de MAD<sub>1</sub> y MAD<sub>2</sub> y su redistribución a los polos del huso se lleva a cabo por el complejo dineína-dinactina (Chen, *et al*, 1996 y 1998; Waters, *et al*, 1998; Musacchio y Salmon, 2007).

### 1.11 El polimorfismo G558A del gen *Mad1*. Antecedentes.

En un estudio realizado por Nomoto y colaboradores en 1999, se reportó un polimorfismo en el nucleótido 1673 de la secuencia génica de *Mad1*, perteneciente al codón 558. Este polimorfismo, ubicado en el exón 17, sustituye una guanina (G) por un adenina (A), lo que ocasiona una modificación en la secuencia de aminoácidos (Arginina, R → Histidina, H) (*Fig. 8*). Utilizando el cáncer de pulmón como modelo experimental, este trabajo se enfocó a investigar el potencial de *Mad1* en el desarrollo tumoral. Se examinaron 49 biopsias de cáncer de pulmón (carcinomas de células pequeñas y no pequeñas, adenocarcinomas y carcinomas de células escamosas) y 156 biopsias de tejido normal (incluidas las 49 correspondientes a los casos de cáncer) con el objetivo de detectar modificaciones en la secuencia génica. En los casos analizados, se reportaron siete modificaciones. Dos de ellas, presentes en un solo caso, fueron postuladas como posible mutación somática y posible mutación germinal respectivamente. De las cinco modificaciones restantes, consideradas como polimorfismos, la más común no tuvo manifestación en el fenotipo, mientras que la menos común fue el polimorfismo G558A. En otro estudio con 19 líneas celulares de cáncer de colon realizado el mismo año por Cahill y colaboradores no fueron descritas nuevas alteraciones para *Mad1*.

No fue sino hasta dos años después, en 2001, que Tsukasaki y colaboradores analizaron 44 líneas celulares de cáncer de humano, encontrando 15 modificaciones adicionales en el gen. En este trabajo, el polimorfismo G558A tenía una mayor representación, aunque el efecto biológico aún no había sido evaluado (*Fig. 8*).

El único reporte que ha intentado evaluar el efecto del polimorfismo en el desarrollo de la mitosis fue realizado por Iwanaga y colaboradores en 2002. En 23 muestras de diversos tipos



de cáncer se encontraron seis alteraciones diferentes a las reportadas con anterioridad, y el polimorfismo G558A estuvo presente en más del 50 % de éstas. En este estudio se determinó que la interacción entre MAD<sub>1</sub> y MAD<sub>2</sub> era promovida por la presencia de los dos zippers de leucina (entre los aminoácidos 501-522 y 557-571) en MAD<sub>1</sub>. Se estableció que al presentarse el polimorfismo, el cambio en la secuencia de aminoácidos (R→H) impedía la adecuada formación de un zipper de leucina, alterando esta interacción. Analizando nueve líneas celulares de cáncer de colon, la frecuencia del polimorfismo fue del 66%. A partir de estas mismas líneas celulares se realizaron transfecciones con la intención de sobre-expresar la proteína silvestre y la proteína polimórfica, llegando a la conclusión de que aquellas células transfectadas para expresar la proteína silvestre promovían un mayor arresto del ciclo celular en metafase (Fig. 8). Al determinar el genotipo a partir muestras de sangre periférica de individuos aparentemente sanos, no encontraron individuos homocigos para el polimorfismo G558A, sugiriendo que esta condición se presentaba sólo en células malignas como resultado de la pérdida de heterocigidad.

### 1.12 Importancia del estudio.

Considerando el hecho de que la localización y activación de MAD<sub>2</sub> es determinante en el funcionamiento del PMHM y que esto es promovido por la unión con MAD<sub>1</sub>, la presencia del polimorfismo G558A puede ser un factor importante en el proceso de segregación cromosómica. Los estudios previos referentes a este SNP tienen únicamente como modelo experimental células transformadas. Debido al reducido muestreo en individuos sanos, no es posible concluir que el polimorfismo es resultado del proceso de transformación maligna. Si bien se ha determinado (al menos en líneas celulares de cáncer) que el fenotipo generado por el cambio en la secuencia de aminoácidos altera la dinámica de la mitosis, ningún estudio ha evaluado el efecto que podría tener en la generación de inestabilidad cromosómica. Por todo lo anterior, la importancia del trabajo radica en evaluar de manera más amplia la frecuencia del polimorfismo *Mad1* G558A en la población sana, e implementar una estrategia que nos permita definir su efecto en el funcionamiento del PMHM.

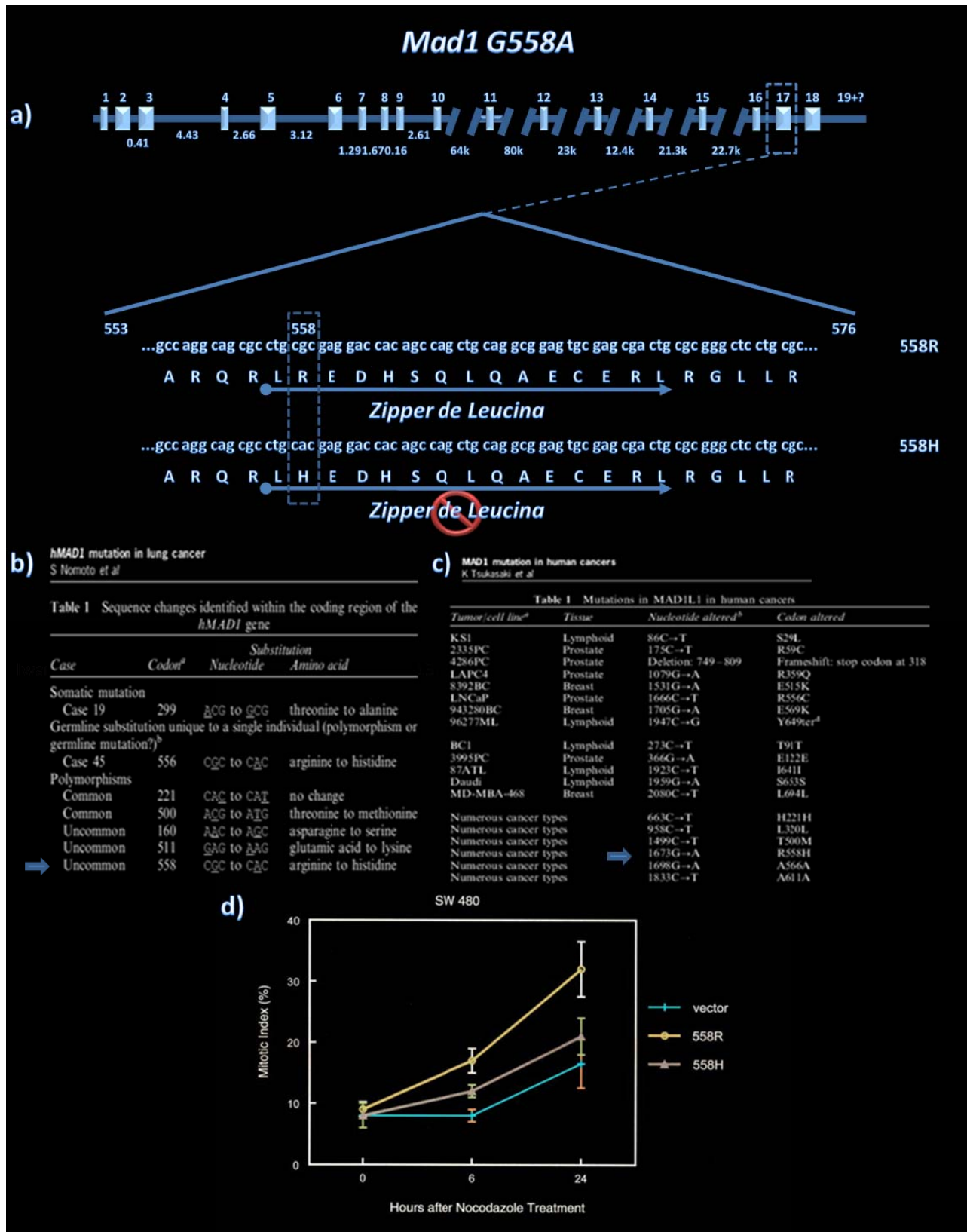


Figura 8. a) Representación esquemática del polimorfismo G558A del gen *Mad1*, ubicado en el exón 17. b) Primer reporte del polimorfismo G558A realizado en biopsias de cáncer de pulmón (Nomoto et al, 1999). c) Determinación del polimorfismo en diversas líneas celulares de cáncer (Tsukasaki et al, 2001). d) Índice mitótico a partir de transfecciones en una línea celular de cáncer de colon (Iwanaga et al, 2002).



## 2. OBJETIVOS.

### 2.1 Objetivo general.

Determinar la frecuencia del polimorfismo G558A del gen *Mad1* en una muestra de la población mexicana y evaluar el efecto que tiene durante la segregación cromosómica.

### 2.2 Objetivos particulares.

- Aislar DNA genómico a partir de muestras de sangre periférica y generar de esta manera un banco de información que pueda ser de utilidad en estudios posteriores.
- Determinar el genotipo referente al polimorfismo G558A de *Mad1* a partir de las muestras de DNA.
- Evaluar, en función del polimorfismo, la capacidad de arresto del ciclo celular en metafase ante la presencia de un agente que altera la segregación cromosómica.
- Valorar el efecto del polimorfismo en la generación de inestabilidad cromosómica (manifestada en eventos de aneuploidía) ante la exposición prolongada al mismo agente.
- Determinar la frecuencia con la que se manifiesta el polimorfismo en células tumorales a partir de la genotipificación de biopsias de adenocarcinoma gástrico.

## 3. DISEÑO EXPERIMENTAL.

### 3.1 Genotipificación del polimorfismo *Mad1* G558A a partir de DNA de sangre periférica.

Para la determinación del genotipo del polimorfismo *Mad1* G558A, el material biológico utilizado tuvo dos orígenes. De 144 muestras de DNA genómico incluidas en esta parte del estudio, 106 fueron proporcionadas por el Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Este Instituto cuenta con un banco de





DNA genómico de individuos que cumplen con las características que requirió el trabajo. Las 38 muestras restantes fueron totalmente procesadas en el Laboratorio de Carcinogénesis del Instituto Nacional de Cancerología (INCan), laboratorio que también forma parte del IIB.

Las muestras de sangre periférica fueron obtenidas, con previo consentimiento y explicación de los fines para la utilización del material biológico, de individuos aparentemente sanos, de edad entre 20 y 40 años, no fumadores, de nacionalidad mexicana por nacimiento de padres y abuelos (maternos y paternos) también nacidos en México. La información recabada en la base de datos de los donadores incluye el lugar de nacimiento de padres y abuelos, con la finalidad de establecer el origen del componente genético. Con base en esta información, se estableció que el banco de DNA utilizado en este estudio representa una muestra de la población mexicana.

### 3.1.1 Aislamiento de DNA mediante extracción doble con fenol-cloroformo.

De cada individuo se obtuvieron (por venopunción de la región cubital del brazo) 5 ml de sangre periférica, la cual fue recolectada en tubos Vacutainer® (Becton Dickinson, USA) adicionados con EDTA. Para promover la lisis de eritrocitos, el volumen de sangre obtenido fue trasladado posteriormente a un tubo cónico de polipropileno para ser almacenado durante 24 h a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Pasado este tiempo, la sangre fue llevada a una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  aproximadamente 15 min. Con la intención de eliminar la mayor cantidad posible de glóbulos rojos, se realizó a la sangre una serie de lavados con buffer SSC 1x, seguidos de una centrifugación a  $3500 \times G$  5 min. Al pellet que se obtuvo, se le añadieron 2 ml de acetato de sodio 0.2 M, 125  $\mu\text{l}$  de SDS al 10% y 30  $\mu\text{l}$  de proteinasa K (20 mg/ml, Qiagen, Germany). El producto fue incubado durante 1 h a  $55^{\circ}\text{C}$  para posteriormente añadir 600  $\mu\text{l}$  de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico en una proporción 25/24/1. El tubo se mantuvo en agitación 10 min y se centrifugó a  $3500 \times G$  5 min. Se recuperó la fase acuosa y se adicionaron 600  $\mu\text{l}$  de cloroformo, para dar paso a otro ciclo de agitación y centrifugación. La fase acuosa fue nuevamente sustraída y se añadió etanol absoluto ( $-20^{\circ}\text{C}$ , 2.5 volúmenes con respecto al



volumen de la fase acuosa), para después mezclar por inversión y permitir la asociación y precipitación del DNA, en este momento, el material puede ser detectado a simple vista. El DNA fue recuperado en un tubo de 1.5 ml, al que se le añadió 1 ml etanol al 70 %. Se centrifugó el tubo a 153 x G durante 2 min para posteriormente retirar el etanol. Se permitió la evaporación del etanol residual a temperatura ambiente y se resuspendió el material en TE (10/0.1) a 55°C durante 24 h. Finalmente, el material fue cuantificado (lectura a partir de 1.5 µl de muestra en espectrofotómetro ND-1000, Nanodrop Technologies, Inc., USA) y analizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8 %, utilizando buffer TBE 0.5x y tinción con bromuro de etidio (Fig. 9).

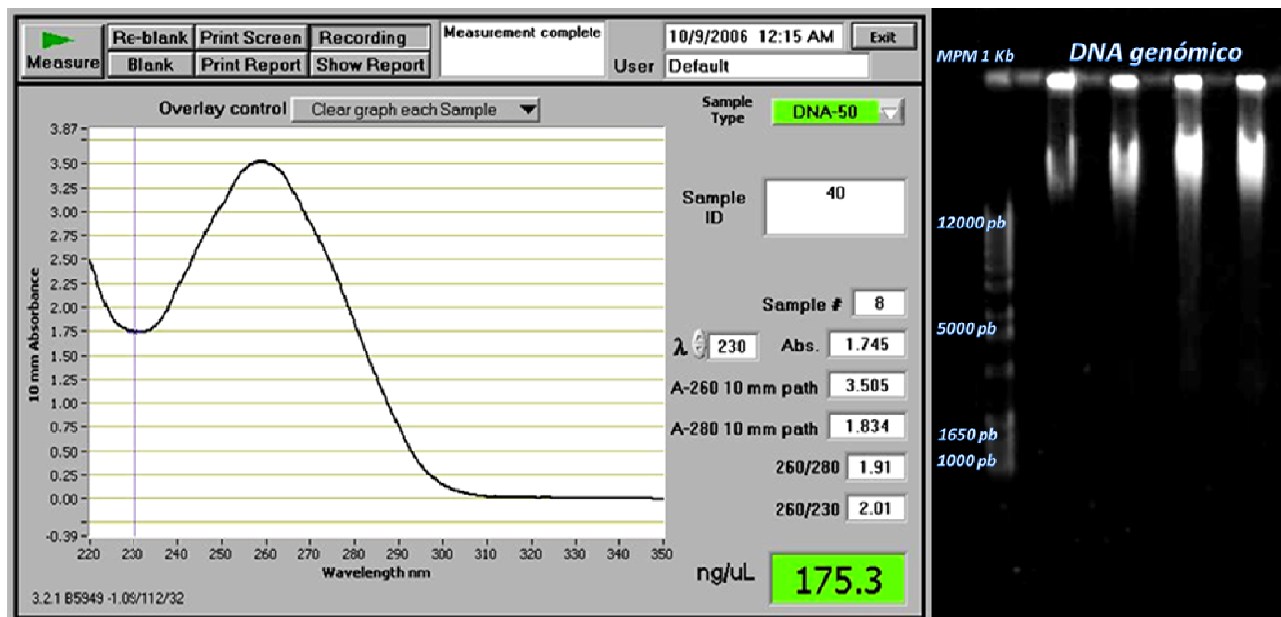


Figura 9. Cuantificación del DNA genómico obtenido a partir de sangre periférica (linfocitos) de individuos aparentemente sanos, así como el análisis de su integridad mediante electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

### 3.1.2 Amplificación del exón 17 del gen *Mad1*. Condiciones.

A partir de las muestras de DNA genómico obtenidas, se llevo a cabo la PCR utilizando los oligonucleótidos para la amplificación del exón 17 del gen *Mad1* reportados en el trabajo de Iwanaga y colaboradores, 2002 (con el previo reconocimiento de la secuencia, GenBank, GeneID 8379, NM 003550).



*Madi* → Exón 17

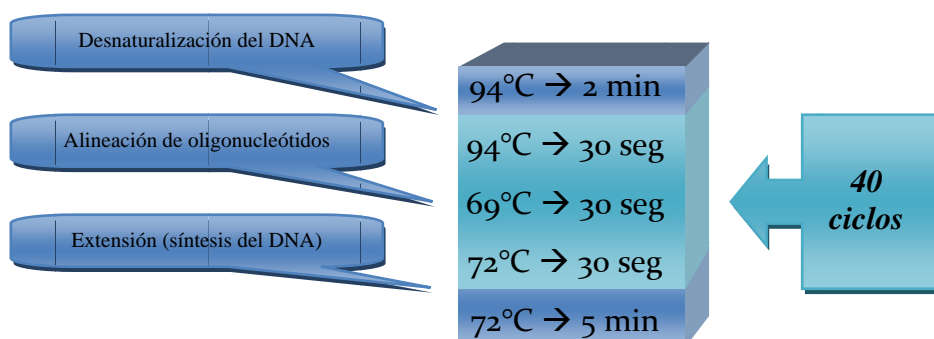
Sentido (*Forward*) → 5'-GTGTGAGAATTCCTGCAGGGTGACTATGACCAG-3'

Anti-sentido (*Reverse*) → 5'-GAGTCTGGATCCCTGCCACCTCCTTGGACGATGGCAGAC-3'

La amplificación se realizó a partir de 1 µl de DNA en una mezcla de componentes de PCR (Invitrogen, Brasil) con un volumen final de 10 µl como se muestra a continuación:

Componente	Volumen/reacción (µl)
Buffer 10x	1.0
DNTP's 10 mM	0.2
MgCl <sub>2</sub> 50mM	0.3
<i>Madi</i> Forward 10 µM	0.2
<i>Madi</i> Reverse 10 µM	0.2
Templado (DNA)	1.0
Platinum Taq polimerasa (5 u/µl)	0.1
H <sub>2</sub> O	7.0
<b>Volumen total</b>	<b>10.0</b>

Las temperaturas y tiempos de la reacción fueron los siguientes:



El producto de PCR de cada muestra de DNA fue analizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 3%, utilizando buffer TBE 0.5x y tinción con bromuro de etidio. El fragmento de DNA que se obtiene en las condiciones anteriormente descritas tiene una longitud de 241 pb (*Fig. 10*).



### 3.1.3 Determinación del genotipo mediante RFLP.

La genotipificación a partir del producto de PCR se realizó por medio de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, polimorfismo de tamaño de fragmento por enzima de restricción), utilizando la enzima BStU1 (*Bacillus stearothermophilus* U458. New England BioLabs, USA), la cual reconoce un sitio de corte entre la secuencia *cgcg*. Las condiciones se especifican a continuación:

Componente	Volumen/reacción (µl)
Buffer 10x	1.0
BStU1 (10 U/µl)	0.3
Producto de PCR	3.0
H <sub>2</sub> O	5.7
<b>Volumen total</b>	<b>10.0</b>

La reacción de digestión se llevó a cabo a una temperatura de 60 °C por un mínimo de 16 h. Las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 4 % utilizando buffer TBE 0.5x y tinción con bromuro de etidio.

Dentro de la secuencia amplificada de un individuo que no presenta el polimorfismo, existen 4 sitios *cgcg*, lo que da origen a 5 fragmentos de diferente longitud (94, 50, 43, 42 y 12 pb). La sustitución de una guanina por una adenina, presente en el polimorfismo, modifica un sitio de restricción (el que se presenta entre el fragmento de 94 y 42 pb, véase *Fig. 10*), de manera que la secuencia en este caso es *cacg*. Este cambio inhabilita el reconocimiento y corte enzimático dando como resultado un fragmento de 136 pb. Los individuos heterocigos presentan todos los fragmentos posibles.

### 3.1.4 Determinación del genotipo por medio de secuenciación.

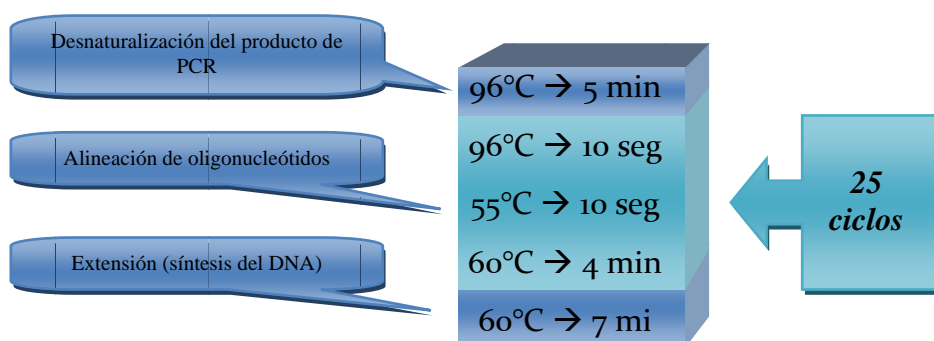
Con el objetivo de corroborar los resultados obtenidos por medio de la digestión con enzimas de restricción específicas, se secuenciaron 2 muestras de cada genotipo. Esto fue



realizado a partir de 300 ng de producto de PCR para el exón 17 del gen *Mad1* (por reacción), utilizando el oligonucleótido sentido (*forward*) descrito en la amplificación (aprox. 3 pmoles) y 0.5  $\mu$ l de Big Dye<sup>TM</sup> Terminator V 3.1 Cycle Sequencing Kit. Las condiciones se describen a continuación:

Componente	Volumen/reacción ( $\mu$ l)
Buffer 5x	2.0
<i>Mad1</i> Forward 10 $\mu$ M	3.0
Producto de PCR <i>Mad1</i> -Exón 17	2.0
Byg Dye <sup>TM</sup>	0.5
H <sub>2</sub> O	2.5
<b>Volumen total</b>	<b>10.0</b>

La PCR para la secuenciación se realizó con los siguientes parámetros:



La purificación se llevó a cabo mediante la precipitación en columnas de Sephadex G-50 DNA Grade (50 mg/ml de H<sub>2</sub>O, Pharmacia Biotech, Sweden). Las columnas fueron previamente deshidratadas por centrifugación a 750 x G durante 1 min. El volumen final de PCR de secuenciación de cada muestra (10  $\mu$ l) fue administrado al centro de la columna para después centrifugar a 2000 x G 3 min. El producto purificado fue deshidratado utilizando el DNA 120 SpeedVac Concentrator (Thermo Electron Corporation, USA) durante 20 min, y resuspendido posteriormente en 25  $\mu$ l de Hi-Di<sup>TM</sup> Formamide (Applied Biosystems, USA). Finalmente, se desnaturalizó a 96 °C por 5 min, y se incubó inmediatamente en hielo el mismo tiempo.



Las muestras fueron colocadas en placas y secuenciadas utilizando el secuenciador ABI PRISM® 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems, USA). El análisis de la secuencia obtenida se realizó utilizando el software BioEdit© (Biological Sequence Alignment Editor, 2007, Ibis Biosciences).

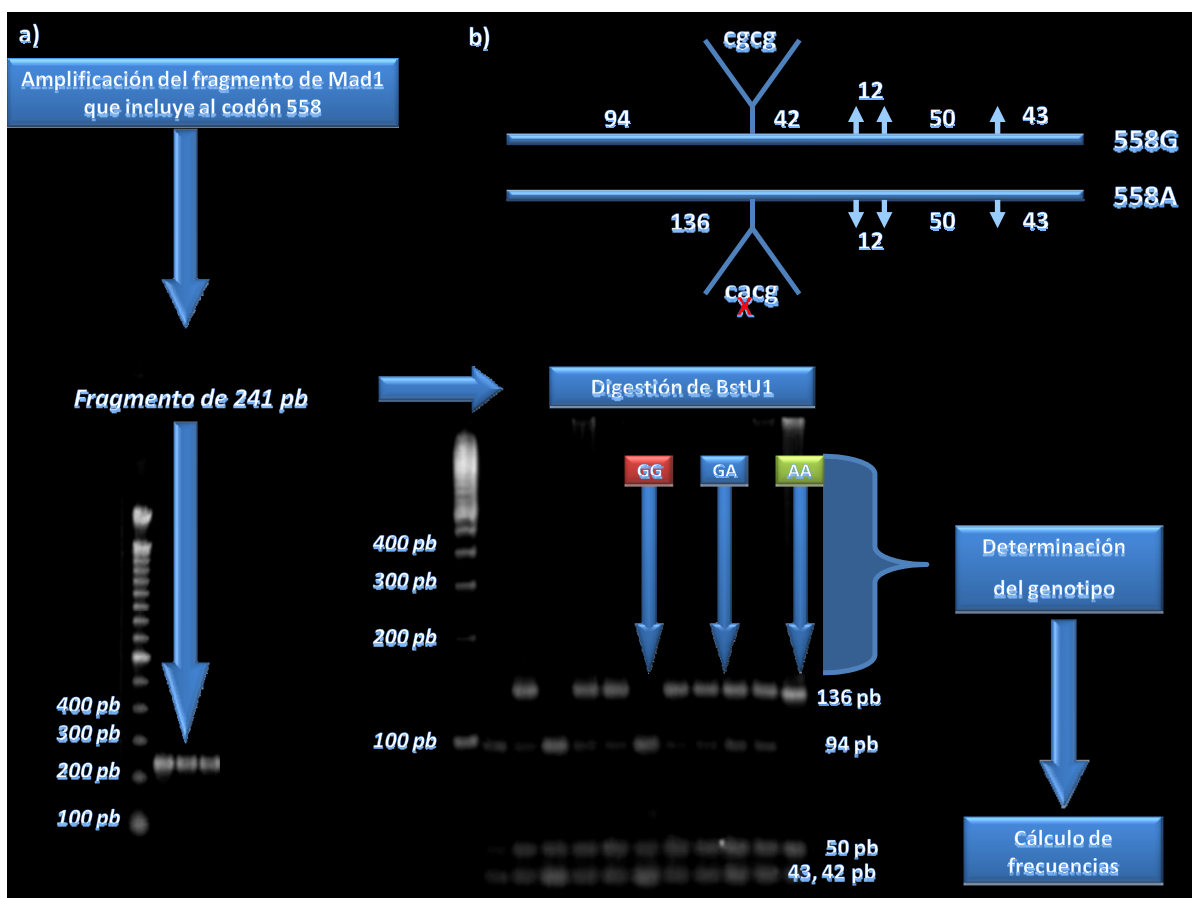


Figura 10. a) Genotipificación del polimorfismo G558A de *Mad1* por medio de la amplificación del exón 17 y la digestión alelo-específica. b) Mapa de restricción de la enzima BstU1, donde se observa la pérdida de un sitio de corte en la variante polimórfica.

### 3.2 Estimación del índice mitótico en función del polimorfismo *Mad1* G558A.

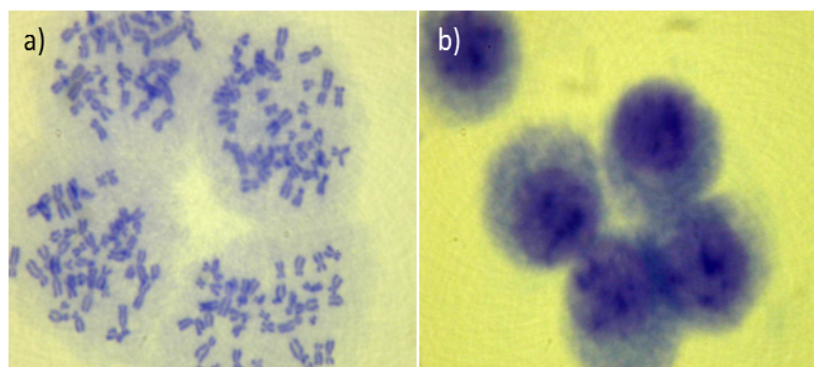
Con la intención de evaluar la capacidad de arresto del ciclo celular en metafase en las diferentes condiciones genotípicas para *Mad1*, se decidió estimar el índice mitótico en cultivos primarios de linfocitos expuestos a nocodazol, un agente que altera la segregación cromosómica mediante la desestabilización de microtúbulos (Chen y Horwitz, 2002). Para



realizar estos cultivos, se obtuvieron muestras de sangre periférica de 31 individuos (18 mujeres y 13 hombres), de los cuales 6 eran portadores genotipo GG, 17 del genotipo GA y 8 del genotipo AA. Las muestras de sangre fueron recolectadas en tubos Vacutainer® (Becton Dickinson, USA) adicionados con heparina sódica (un agente anticoagulante).

El nocodazol es un benzimidazol carbamatado. Los benzimidazoles son compuestos orgánicos aromáticos heterocíclicos producto de la fusión de benceno e imidazol. Estos compuestos tienen un efecto anti-helmínticos de amplio espectro. El mecanismo de acción del nocodazol está dirigido a inhibir la asociación de sub-unidades de tubulina ( $\alpha$  y  $\beta$ ) en el extremo positivo de los microtúbulos, impidiendo la polimerización. Esta condición altera la dinámica de los microtúbulos, ya que se bloquea la polimerización, más no la disociación de sub-unidades de tubulina del extremo negativo (Lacey, 1990; Campbell, 1990).

El índice mitótico usualmente es representado como la proporción existente entre el número de células en metafase (en las que se observa una adecuada condensación cromosómica) y el número de células sujetas a conteo (usualmente 1000). Al someter a los linfocitos al tratamiento con nocodazol, activamos el PMHM, promoviendo un arresto del ciclo celular en metafase. De esta manera podemos relacionar el índice mitótico con la eficiencia del PMHM, infiriendo que un mayor número de metafases refleja una mayor eficiencia del PMHM (Fig. 11).



**Figura 11.** Tipos de células sometidas a los conteos para la determinación del índice mitótico en función del polimorfismo. a) Células en metafase. B) Células en interfase



### 3.2.1 Condiciones de cultivo y tiempos de exposición.

Los cultivos se realizaron a partir de 1 ml de sangre periférica y 9 ml de medio RPMI-1640 (GIBCO®, Invitrogen, USA) adicionado con 1% de L-glutamina (L-glut., GIBCO®, Invitrogen, USA) y 1% de aminoácidos no esenciales (ANE, Sigma, USA). Los linfocitos fueron estimulados con fitohemaglutinina (GIBCO®, Invitrogen, USA) al 2%. Se permitió el crecimiento durante 48 h a 37°C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. Posterior a esto, las células fueron sometidas al tratamiento con nocodazol (Sigma, USA) disuelto en dimetil-sulfóxido (DMSO) en una concentración final de 0.2 µg/ml (663 nM) e incubadas en las mismas condiciones durante 2, 6 y 12 h, realizando la fijación correspondiente a cada tiempo de tratamiento. A los respectivos controles se les suministró únicamente DMSO, respetando el volumen utilizado en los cultivos tratados.

### 3.2.2 Fijación celular y preparación de laminillas.

Al término de cada periodo de exposición al nocodazol, los cultivos celulares fueron centrifugados a 288 x G durante 8 min. El sobrenadante fue retirado y reemplazado con solución hipotónica (KCl 0.075 M). Las células fueron incubadas nuevamente a 37°C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> durante 30 min. Pasado este tiempo, se prefijaron las células añadiendo 2 ml de solución Carnoy (metanol: ácido acético → 3: 1) a -20°C, centrifugando en las condiciones antes mencionadas, reemplazando el sobrenadante con 0.5 ml de solución fijadora y almacenando a -20 °C durante 20 min. Las células fueron montadas (por goteo) en laminillas a 4°C, teñidas con eosina y azul de metileno (tinción de Wright) y preservadas utilizando Entellan® (Merck, Germany).

### 3.2.3 Condiciones del conteo y análisis de resultados.

El índice mitótico se obtuvo realizando 2 conteos de 1000 células por donador en cada tiempo de exposición al nocodazol, con su respectivo control, mediante microscopía de





campo claro. Con la intención de evitar el sesgo en las lecturas, el conteo fue realizado desconociendo el genotipo del individuo y apoyándose en un segundo conteo por una persona distinta, de esta manera, el total de células contabilizadas por individuo fue de 4000 para cada condición experimental. Los resultados fueron analizados mediante la prueba de  $\chi^2$  de independencia.

### 3.3 Evaluación de la cinética de proliferación en función del polimorfismo *Mad1* G558A.

Otra técnica experimental implementada para evaluar la capacidad de arresto en metafase fue el análisis del ciclo celular por citometría de flujo con base en el contenido de DNA. Para esto se seleccionaron 2 individuos de cada genotipo (GG, GA y AA) y se realizaron cultivos primarios a partir de linfocitos aislados. Los cultivos fueron sometidos al mismo tratamiento con nocodazol utilizado para la determinación del índice mitótico.

La citometría de flujo es una técnica cuyo fundamento se basa en el movimiento de una suspensión de partículas (generalmente células) por un haz de láser focalizado. Cuando el láser incide en la célula, se dispersa, generando información como granularidad, tamaño y forma. Para analizar el contenido de DNA se utilizan diversos fluoróforos, que al ser excitados, generan datos que son procesados y analizados por el software del citómetro, permitiendo establecer grupos de células dentro de las transiciones G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>-M (Rieseberg *et al*, 2001).

#### 3.3.1 Aislamiento de linfocitos.

El aislamiento de linfocitos se realizó en tubos cónicos de 50 ml, a partir de 20 ml de medio de separación de linfocitos (Bio-Whittaker, USA) y 20 ml de sangre periférica, manteniendo la interfase. Se centrifugó a 512 x G (aceleración media y sin frenado para mantener el gradiente) durante 30 min. La capa linfocitaria fue sustraída e incorporada a un nuevo tubo para lavar con PBS y centrifugar a 1200 x G durante 8 min. Se sustrajo el PBS y se



resuspendieron las células en un volumen arbitrario de medio RPMI-1640 (1 % L-glut., 1 % ANE y 10 % de Suero Bovino Fetal-SBF, HyClone, USA). Se prepararon 2 diluciones celulares (1:50) a partir de 20  $\mu$ l de células en medio, 900  $\mu$ l de PBS y 80  $\mu$ l de azul tripano, con ellas se determinó la viabilidad celular mediante conteos realizados en la cámara de Neubauer.

### 3.3.2 Condiciones de cultivo y tiempos de exposición.

Se sembraron aproximadamente  $2 \times 10^6$  células en 10 ml de medio (con las condiciones previamente descritas) por cada frasco de cultivo. Los linfocitos fueron estimulados con fitohemaglutinina (2 %). Se cultivaron durante 48 h a 37 °C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. Posterior a esto, las células fueron sometidas al tratamiento con nocodazol en una concentración final de 0.2  $\mu$ g/ml (663 nM) e incubadas en las mismas condiciones durante 2, 6 y 12 h, realizando la fijación respectiva a cada tiempo de exposición. Cada cultivo fue realizado por duplicado.

### 3.3.3 Fijación y tinción celular.

Los cultivos celulares fueron centrifugados a 288 x G durante 8 min. Se retiró el sobrenadante, resuspendiendo las células en PBS y llevándose a cabo otro ciclo de centrifugación. El PBS fue retirado y las células fueron resuspendidas en 1 ml de etanol al 70 %, almacenándose en tubos de poliestireno para citometría (Falcon®, Becton Dickinson, USA) a -20 °C durante 24 h.

Para la tinción, las células en etanol fueron centrifugadas a 200 x G durante 5 min. Se retiró el etanol, resuspendiendo el pellet en PBS para, después de 60 seg, centrifugar de nuevo en las mismas condiciones. Finalmente, el PBS fue retirado para resuspender las células en 1 ml de solución de tinción a base de yoduro de propidio/TRITON/RNAsa (esta solución fue preparada al momento de ser utilizada, en stocks de 10 ml utilizando 1 ml de PBS 10x, 1 ml de RNAsa A libre de DNAsas (2 mg/ml, USB, USA), 200  $\mu$ l de yoduro de propidio (1 mg/ml,



Sigma, USA), 10 µl de TRITON X-100 (USB, USA) y 8 ml de agua bidestilada estéril. Los linfocitos se mantuvieron en ausencia de luz 30 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, las células podían utilizarse inmediatamente para la lectura o ser almacenadas a 4 °C en ausencia de luz para hacer la lectura en un tiempo no mayor a 24 h.

### 3.3.4 Lectura de experimentos, obtención y análisis de datos.

Las lecturas de todos los experimentos se hicieron en el citómetro de flujo FACSsort (Fluorescence-Activated Cell Sorting, Becton Dickinson, USA), utilizando el software CELLQuest™ y contabilizando 20,000 eventos (células). Los eventos fueron modelados por el software ModFit LT™ y expresados (con base en el contenido de DNA) en porcentajes de células en Go-G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>-M. Los resultados de la transición G<sub>2</sub>-M en cultivos expuestos a nocodazol en las diferentes condiciones genotípicas fueron contrastados con los resultados obtenidos mediante la determinación del índice mitótico para cada genotipo. Todo esto fue realizado en el citómetro de flujo de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, INCan (Fig. 12). Los resultados obtenidos por genotipo (GG, GA y AA) fueron analizados realizando la prueba de  $\chi^2$  de independencia.

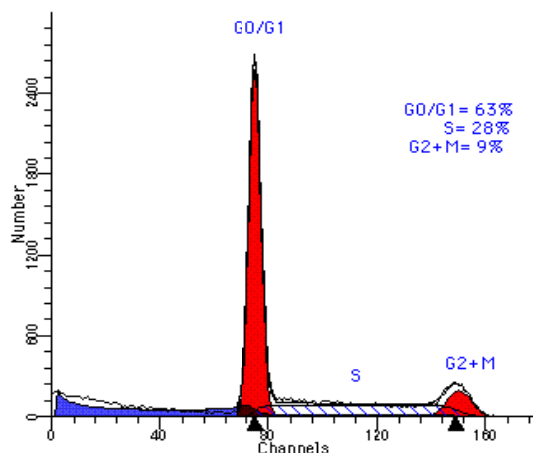


Figura 12. Histograma obtenido a partir del análisis del ciclo celular en base al contenido de DNA, mediante el software CELLQuest™ y ModFit™.



### 3.4 Ensayo de micronúcleos por citocinesis bloqueada en función del polimorfismo *Madi* G558A.

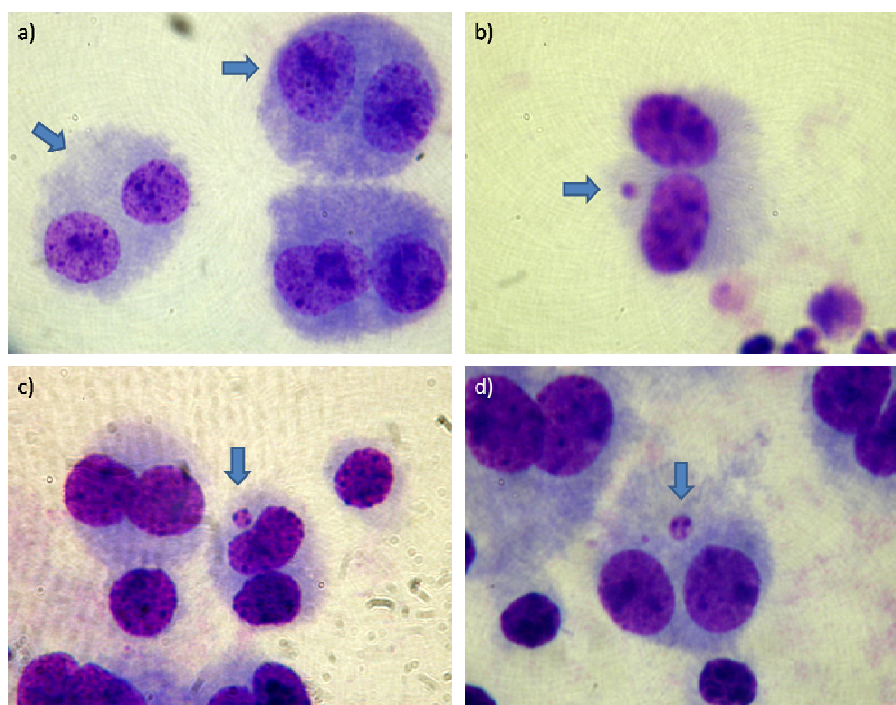
Para determinar el efecto que tiene el polimorfismo en la generación de inestabilidad cromosómica, se determinó la frecuencia de micronúcleos en células binucleadas, partiendo de cultivos primarios de linfocitos expuestos a nocodazol hasta por 48 h. Estos experimentos se realizaron a partir de sangre periférica de dos individuos con genotipo GG y dos individuos con genotipo AA.

Cuando en la división celular existen cromosomas que no son reconocidos por los microtúbulos del huso, o se presentan rompimientos cromosómicos que originan fragmentos acéntricos, la fidelidad de la segregación se pierde. Como este material no migra a los polos del huso, no puede ser integrado a los núcleos de las células hijas. Sin embargo, en la telofase, el material cromosómico excluido de la mitosis es cubierto por una envoltura nuclear. Al llevarse a cabo la citocinesis, alguna de las dos células hijas mantiene este material, el cual se descompacta y adquiere la morfología de un núcleo en interfase, sólo que mucho más pequeño. Esto es lo que se conoce como un micronúcleo. Las causas por las que se originan los micronúcleos incluyen alteraciones en el DNA, alteraciones en la estructura de los cromosomas y alteraciones en los mecanismos implicados en la segregación cromosómica.

Una estrategia que permite monitorear los eventos de fragmentación cromosómica, así como la pérdida de cromosomas completos, es el ensayo de micronúcleos por citocinesis bloqueada (Kirsch-Volders *et al*, 2003). Esta metodología implementada por Fenech y Morley en 1986 se ha mantenido como un eficiente mecanismo para estudiar las condiciones que inducen la formación de micronúcleos. La estrategia que sigue esta técnica es la inhibición de la citocinesis (división celular total), más no de la cariocinesis (conformación de los dos núcleos de las células hijas), mediante la utilización de citocalasina-B, una molécula aislada del hongo *Helminthosporium dematoideum*. La citocalasina-B impide la polimerización de la actina, necesaria para la formación del anillo contráctil y para la separación total de las



células hijas. Esto da como resultado la acumulación en un cultivo de células binucleadas. Mediante esta técnica, nos aseguramos que el posible daño observado (presencia de micronúcleos) se manifiesta en un solo ciclo de división (Fig. 13). Así, es posible evaluar tanto el efecto que tiene en la célula la exposición a ciertos agentes químicos, como el efecto de ciertas condiciones capaces de alterar los mecanismos encargados de la segregación. Para el ensayo de micronúcleos, los linfocitos humanos son ampliamente utilizados, ya que su obtención y su manejo es mucho menos complicado que otro tipo celular (Clare *et al.*, 2006).



**Figura 13.** Células obtenidas a partir de la implementación de la técnica de micronúcleos por citocinesis bloqueada. a) Células binucleadas normales. b-d) Células binucleadas con micronúcleos. Aumento → 100X.

### 3.4.1 Condiciones de cultivo y tiempos de exposición.

Se realizaron cultivos de linfocitos aislados a partir de sangre periférica (como se indica en 3.3.1). Por cada frasco de cultivo se sembraron aproximadamente  $2 \times 10^6$  células estimuladas con fitohemaglutinina al 2 % en 10 ml de medio medio RPMI-1640 (1 % L-glut., 1 % ANE y 10






% SBF). Se permitió el crecimiento durante 48 h a 37 °C en una atmósfera al 5 % de CO<sub>2</sub>. Posterior a esto, se realizó un cambio de medio centrifugando los cultivos a 288 x G por 8 min, retirando el medio metabolizado y resuspendiendo las células nuevamente en 10 ml de medio RPMI. A partir de este momento, las células fueron sometidas al tratamiento con nocodazol en una concentración final de 0.2 µg/ml (663 nM) e incubadas en las mismas condiciones durante 24, 30, 36, 42 y 48 h. Se administró citocalasina-B (6 µg/ml, Sigma, USA) 24 h antes de concluir cada periodo de exposición. Cada cultivo fue realizado por duplicado.

### 3.4.2 Fijación celular y preparación de laminillas.

Al término de cada tiempo de exposición, los cultivos fueron prefijados con 2 ml de metanol : ácido acético (3:1) a -20 °C y centrifugados a 288 x G por 8 min. Se retiró el sobrenadante, se resuspendieron las células nuevamente en solución fijadora y se almacenaron a -20 °C durante 20 min. Después de esto, las células fueron sometidas a varios ciclos de lavado, hasta ser totalmente aisladas. Mantenido en un rango de 0.5 a 1 ml de metanol, las células fueron montadas en laminillas y teñidas con eosina y azul de metileno (tinción de Wright). La frecuencia de micronúcleos se analizó en 4000 células binucleadas por donador (1000 células por laminilla, 2 laminillas por experimento, 2 experimentos de cada individuo).

### 3.4.3 Condiciones del conteo y análisis de resultados.

Las laminillas fueron analizadas mediante microscopía de campo claro utilizando el objetivo de mayor aumento (100x) y aceite de inmersión. Los conteos que se realizaron por laminilla fueron los siguientes:

-  La proporción de células binucleadas con micronúcleos existente en 1000 células binucleadas.
-  La proporción de células mono, tri y tetranucleadas existente en 1000 células viables.
-  La proporción de células con morfología apoptótica existente en 1000 células.

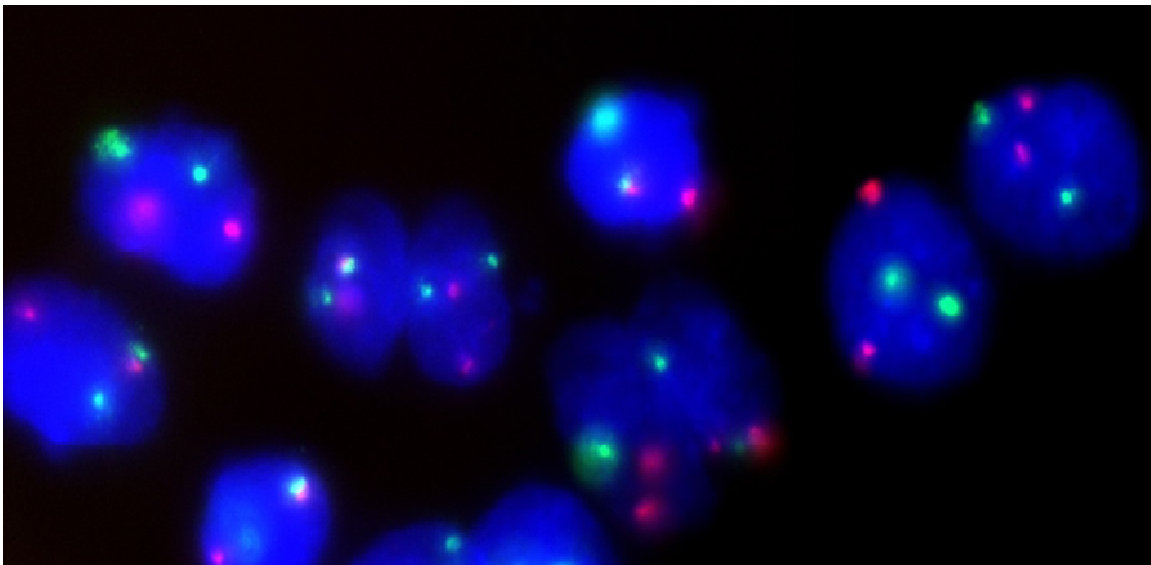


- La proporción de células en metafase en un total de 1000 células viables.

Los resultados obtenidos para ambos genotipos (GG y AA) fueron analizados mediante la prueba de  $\chi^2$  de independencia.

### 3.5 Evaluación de eventos de no disyunción en función del polimorfismo *Mad1* G558A.

Si bien la técnica de micronúcleos es una herramienta útil para evaluar errores en el mecanismo de segregación en función de una condición biológica en particular, tiene el inconveniente de estar dirigida exclusivamente al reconocimiento de rompimientos y rezagos cromosómicos. Como ya se había mencionado, las aneuploidías también pueden generarse debido a eventos de no disyunción. En estos casos, la hibridación *in situ* con fluorescencia (*Fluorescence in situ Hybridization*, FISH) nos permite evaluar los eventos de no disyunción mediante la detección de secuencias de DNA en núcleos interfásicos a partir de sondas satélite complementarias a bloques centroméricos acopladas a un fluoróforo. De esta manera, podemos identificar la presencia de cualquier cromosoma, y por lo tanto, determinar su distribución (*Fig. 14*).



**Figura 14.** Imagen de hibridación *in situ* en células binucleadas obtenida mediante microscopía de fluorescencia. Se puede observar en azul, los núcleos, en rojo, detección de cromosoma 1, y en verde, detección del cromosoma Y. Aumento  $\rightarrow$  100X.



A partir de los linfocitos expuestos a nocodazol y citocalasina-B durante 24, 30, 36, 42 y 48 h de dos individuos (uno con genotipo GG y otro con genotipo AA), se realizaron hibridaciones con sondas VYSIS™ (Abbot Molecular Inc., U.S.A) dirigidas a tres cromosomas autosómicos de diferente tamaño: 1 (CEP 1-Spectrum Orange: satélite II/III), 9 (CEP 9-Spectrum Green:  $\alpha$  satélite) y 16 (CEP 16-Spectrum Orange: satélite II), así como a un cromosoma sexual: Y (CEP Y-Spectrum Green: satélite III).

### 3.5.1 Hibridación *in situ* con fluorescencia.

Las células binucleadas fueron montadas en laminillas de vidrio, corroborando su distribución en microscopía de contraste de fases. Se marcaron dos áreas de hibridación utilizando un lápiz con punta diamante. A cada área se le aplicaron 2 sondas con diferente fluoróforo (espectro naranja y espectro verde) en una mezcla de hibridación de 10  $\mu$ l (1  $\mu$ l de cada sonda, 7  $\mu$ l de Buffer y 1  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O). Las sondas para los cromosomas 1 y 16 están acopladas a un fluoróforo de espectro naranja, mientras que las sondas para los cromosomas 9 y Y están acopladas a un fluoróforo de espectro verde, de tal manera que en una laminilla tenemos un experimento para los cuatro cromosomas (un área para las sondas de cromosomas 1 y 9 y otra para los cromosomas 16 y Y). Una vez suministrada la mezcla de hibridación, se colocó un cubreobjetos y se sellaron las orillas con un polímero plástico.

En una cámara húmeda (HyBrite, VYSIS™, Abbot Molecular Inc., U.S.A) las células fueron llevadas a una temperatura de desnaturalización (75°C) durante dos minutos, para posteriormente mantenerse a 37°C durante 4 h como mínimo. Pasado este tiempo se retiró el polímero, las laminillas fueron sumergidas en *buffers* de citratos con la presencia de un detergente a diferentes concentraciones: a) 2x SSC x 2 min; b) 0.4 SSC-0.3 % NP-40 a 73 °C x 2 min; c) 2x SSC-0.1 % NP-40 x 1 min. Finalmente, se aplicaron 10  $\mu$ l de contracolorante DAPI II (Vectashield Antifade, VYSIS™) a cada área de hibridación, se colocó un cubreobjetos y se sellaron los bordes con un esmalte transparente.





### 3.5.2 Conteo de eventos de no disyunción.

Las laminillas fueron analizadas utilizando el microscopio de fluorescencia Zeiss™ Axioskop 2 Mot. Plus y el software analizador de imágenes Axiovision™ 4.0. El número de eventos de no disyunción para cada cromosoma (1, 9, 16 y Y) fue obtenido en base a un conteo de 1000 células binucleadas.

### 3.6 Genotipificación del polimorfismo *Mad1* G558A a partir de biopsias de adenocarcinoma gástrico.

Con el objetivo de monitorear la condición genotípica de *Mad1* en células transformadas, se evaluaron 19 casos de adenocarcinoma gástrico de tipo difuso, determinando la frecuencia del polimorfismo tanto en biopsias de tejido normal como en biopsias de tejido tumoral. Las muestras fueron obtenidas de pacientes del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) con previo consentimiento y con todas las implementaciones de aspecto ético necesarias para su utilización.

El adenocarcinoma gástrico es el segundo tipo de cáncer más frecuente en el mundo, sin embargo, los países orientales, el este de Europa y Sudamérica son las regiones donde se presenta el mayor número de casos. Hoy se sabe que en el desarrollo de esta neoplasia intervienen múltiples factores ambientales, epidemiológicos y genéticos. Entre algunos factores de riesgo se encuentran los relacionados con el estilo de vida, como dietas altas en sal, el constante consumo de alimentos ahumados, picantes y ricos en nitritos (de la Riva *et al*, 2004). La infección con *Helicobacter pylori*, una bacteria gram-negativa que desarrolla gastritis crónica, predispone a un individuo al desarrollo de adenocarcinoma gástrico. También se ha determinado la presencia del virus de Epstein Barr, aunque no su mecanismo carcinogénico. Además, la sub-expresión de la molécula de adhesión celular E-cadherina ocasionada por la presencia de mutaciones a nivel germinal en el gen que la codifica, ha permitido caracterizar a ésta como un marcador tumoral (Dicken *et al*, 2005).



La clasificación de Lauren (1965) divide al adenocarcinoma gástrico en dos tipos, intestinal y difuso. Esta clasificación se basa en la configuración microscópica del tumor y en el patrón de crecimiento. El adenocarcinoma tipo intestinal surge de una lesión conocida como gastritis crónica atrófica, presentando una formación glandular con apariencia microscópica similar a la mucosa del colon (de ahí el nombre de intestinal) con un crecimiento expansivo. En el adenocarcinoma de tipo difuso, las células tumorales tienen la capacidad de infiltrarse hacia el estroma e incluso llegar a la pared del estómago, sin formación glandular. En un estudio realizado en 1997 por López-Carrillo y colaboradores, se determinó que los dos tipos de adenocarcinoma tenían la misma representación en la población mexicana, sin embargo se ha visto que el tipo difuso es el que predomina en la población adulta joven (Mohar *et al*, 1997). La mortalidad ocasionada por este tipo de cáncer se distribuye principalmente en las entidades de Chiapas, Distrito Federal y Estado de México (Oñate, 2001).

### 3.6.1 Colecta y manejo de las biopsias.

La obtención de las biopsias se llevó a cabo (con todas las medidas de seguridad necesarias) durante las cirugías (gastrectomías) realizadas a los pacientes del INCan. Se obtuvieron de cada paciente (previo reconocimiento de cirujanos y patólogos) muestras tanto de mucosa normal como de tejido tumoral (adenocarcinoma gástrico tipo difuso). Las muestras (en fragmentos de aproximadamente 1 cm<sup>3</sup>) fueron estabilizadas, inmediatamente después de su colecta, utilizando RNA later (Qiagen, Germany), un agente que permite estabilizar el RNA de las células que forman parte del tejido, impidiendo su degradación. Una vez estabilizadas, las biopsias fueron mantenidas a 4°C durante 24 h y llevadas finalmente a -20°C para ser preservadas por tiempo indefinido.

Aunque el manejo del tejido tiene como objetivo la estabilización y preservación del RNA, las ventajas que confiere el trabajo con DNA, al ser una molécula estable, nos permitieron realizar las extracciones correspondientes.



### 3.6.2 Aislamiento de DNA mediante extracción doble con fenol-cloroformo (modificado).

De cada muestra de tejido, se obtuvieron fragmentos de 150 mg. Cada fragmento fue transferido a un tubo cónico junto con 2 ml de buffer para aislamiento de DNA (100 mM NaCl, 10 mM Tris, 25 mM EDTA y 0.5% SDS) y 30 µl de proteinasa K (20 mg/ml). Se incubó a 55°C durante 48 h. Una vez disgregado el tejido, se adicionaron 2 ml de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico en una proporción 25/24/1, agitando lentamente por inversión durante 10 min, para posteriormente centrifugar a 3500 x G durante 5 min. Se removió la fase acuosa y se agregó 1 ml de cloroformo repitiendo el ciclo de agitación y centrifugación. La fase acuosa fue removida nuevamente y adicionada con acetato de sodio 3 M (1/10 del volumen de la fase). Se añadió etanol absoluto (-20°C, 2.5 volúmenes), y se mezcló por inversión permitiendo la precipitación del DNA. El material fue recuperado en un tubo de 1.5 ml, con etanol al 70% (1 ml). Se centrifugó el tubo a 153 x G durante 2 min. El etanol fue retirado totalmente y el DNA fue resuspendido en TE (10/0.1) a 55 °C durante 24 h. El material fue cuantificado por espectrofotometría y analizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8%, utilizando buffer TBE 0.5x y tinción con bromuro de etidio.

### 3.6.3 Determinación del genotipo mediante PCR y RFLP.

El genotipo se obtuvo utilizando las condiciones experimentales previamente descritas en el apartado 3.1.3. Los datos obtenidos de las biopsias de mucosa normal y de tejido tumoral fueron agrupados para comparar las frecuencias.

## 4. RESULTADOS.

### 4.1 Genotipificación del polimorfismo *Mad1* G558A a partir de DNA de sangre periférica.

De 144 individuos estudiados, 35 presentaron el genotipo GG (24.31%), 74 el genotipo GA (51.39%) y 35 el genotipo AA (24.31 %). Las frecuencias alélicas fueron G: 50% y A: 50%



(Gráfico 1). Por otro lado, la secuenciación corroboró los resultados obtenidos mediante RFLP. En el caso del cromatograma correspondiente al genotipo GA es posible observar el reconocimiento de ambas bases en el nucleótido correspondiente al sitio en el que se presenta el polimorfismo (Figura 15).

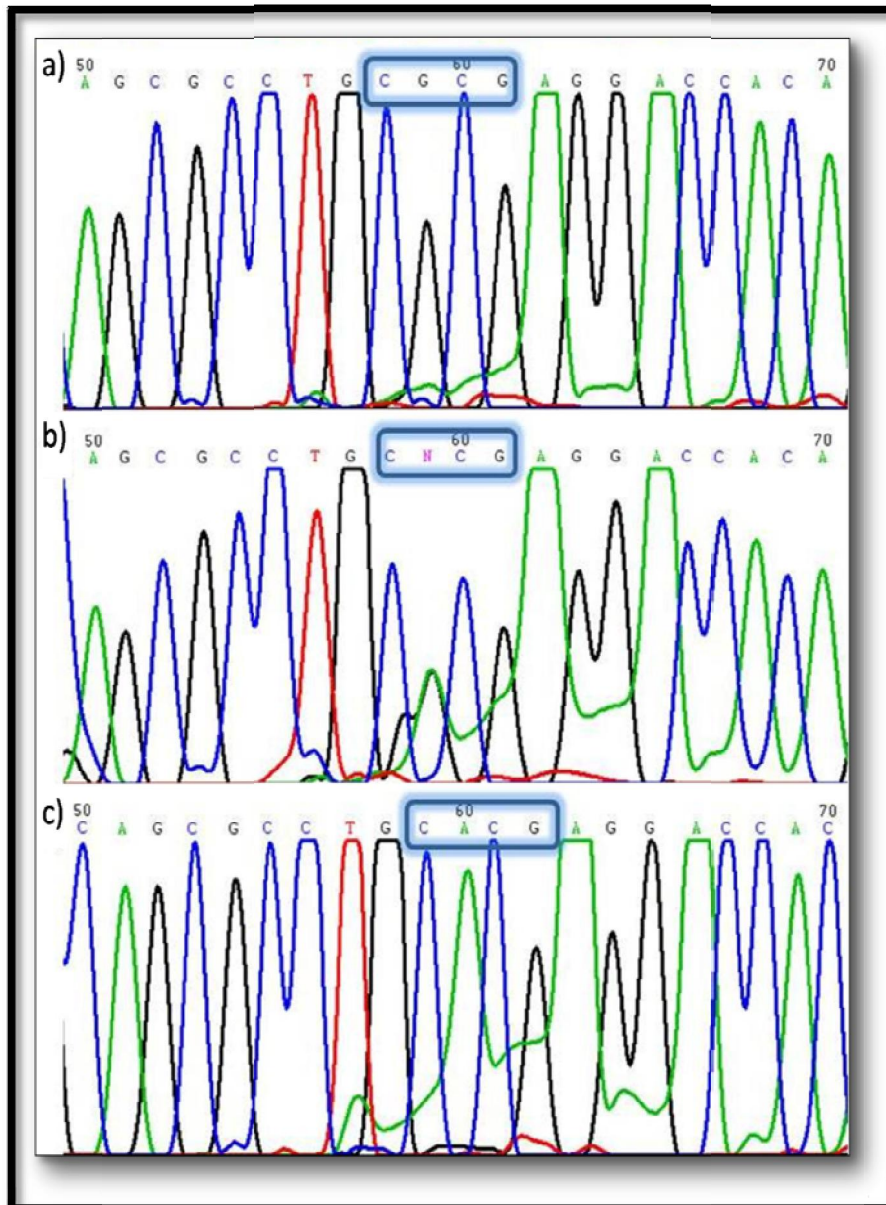


Figura 15. Cromatogramas obtenidos de la secuenciación del producto de PCR de Mad1 (exón 17) en la que se muestra el genotipo en función del polimorfismo G558A. Se señala el sitio de reconocimiento de BStU1 en el RFLP. a) Genotipo GG, b) Genotipo GA, c) Genotipo AA.

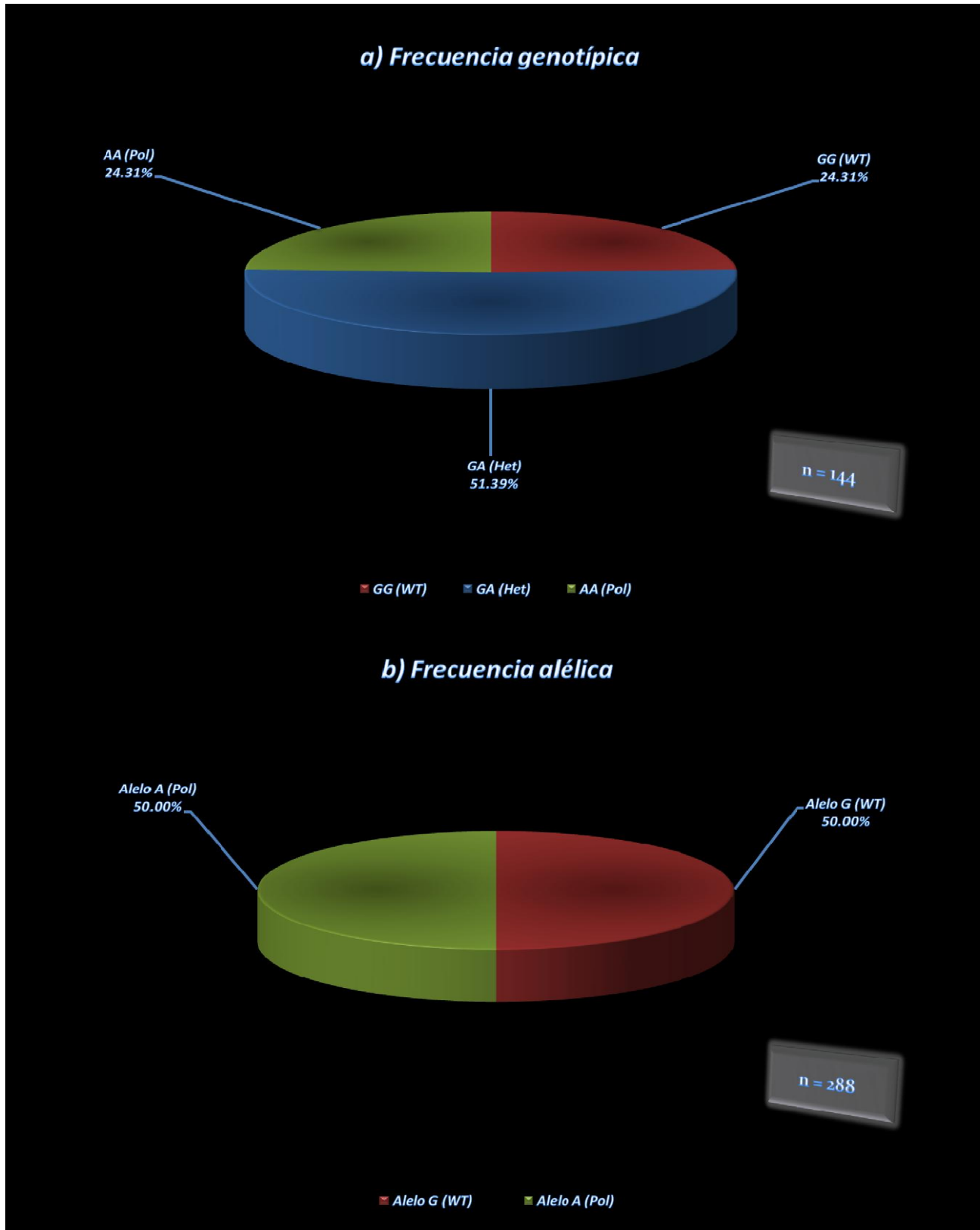
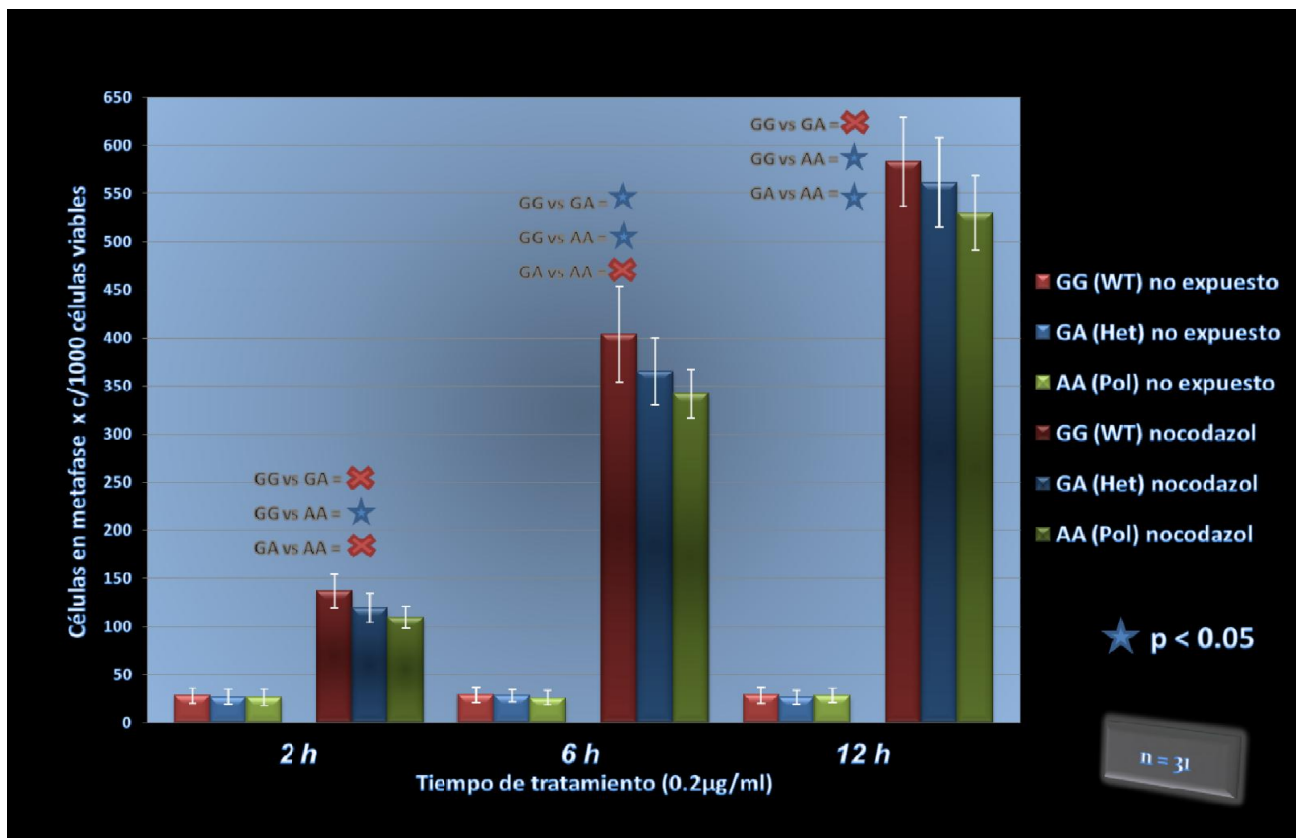


Gráfico 1. Frecuencia genotípica (a) y alélica (b) referente al polimorfismo G558A de *Mad1* en una muestra de la población mexicana.



## 4.2 Estimación del índice mitótico.

El *Gráfico 2* muestra que los cultivos de individuos portadores del genotipo GG manifestaron una tendencia a presentar un mayor índice mitótico, siguiendo los individuos portadores del genotipo GA y finalmente los individuos portadores del genotipo AA. Al analizar los resultados, se obtuvieron diferencias significativas en el arresto del ciclo celular en metafase entre los linfocitos con genotipo GG y los linfocitos con genotipo AA en los tres tiempos de exposición a nocodazol (2 h  $\rightarrow p = 0.013$ ; 6 h  $\rightarrow p < 0.01$ ; 12 h  $\rightarrow p < 0.01$ ). A excepción del segundo tiempo de exposición (6 h  $\rightarrow p = 0.014$ ), los individuos GA manifestaron un comportamiento similar a los individuos GG (2 h  $\rightarrow p = 0.12$ ; 12 h  $\rightarrow p = 0.18$ ). Entre los linfocitos GA y AA existe diferencia únicamente en el último periodo de tratamiento (2 h  $\rightarrow p = 0.33$ ; 6 h  $\rightarrow p = 0.11$ ; 12 h  $\rightarrow p = 0.041$ ).



*Gráfico 2.* Índice mitótico obtenido a partir del cultivo de linfocitos expuestos a nocodazol, en base al polimorfismo G558A del gen *Mad1*.



### 4.3 Evaluación de la cinética de proliferación.

Los resultados arrojados por la citometría de flujo corroboran lo obtenido por el índice mitótico. En este caso, el comportamiento de los individuos con genotipo AA (manifestando el menor porcentaje de células en la transición G<sub>2</sub>-M durante los tres tiempos de exposición a nocodazol) difiere tanto de los individuos con genotipo GA (2 h →  $p = 0.036$ ; 6 h →  $p < 0.01$ ; 12 h →  $p < 0.01$ ), como de los individuos con genotipo GG (2 h →  $p < 0.01$ ; 6 h →  $p < 0.01$ ; 12 h →  $p < 0.01$ ). Entre las células con genotipo GG y GA las diferencias en respuesta no existen más que en el tercer tiempo de exposición (2 h →  $p = 0.234$ ; 6 h →  $p = 0.107$ ; 12 h →  $p < 0.01$ ), sin embargo, la tendencia de las primeras a presentar un mayor porcentaje de células en la transición G<sub>2</sub>-M en los diferentes tiempos de exposición se mantiene (Gráfico 3). El Gráfico 4 muestra los resultados de la transición G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> y S.

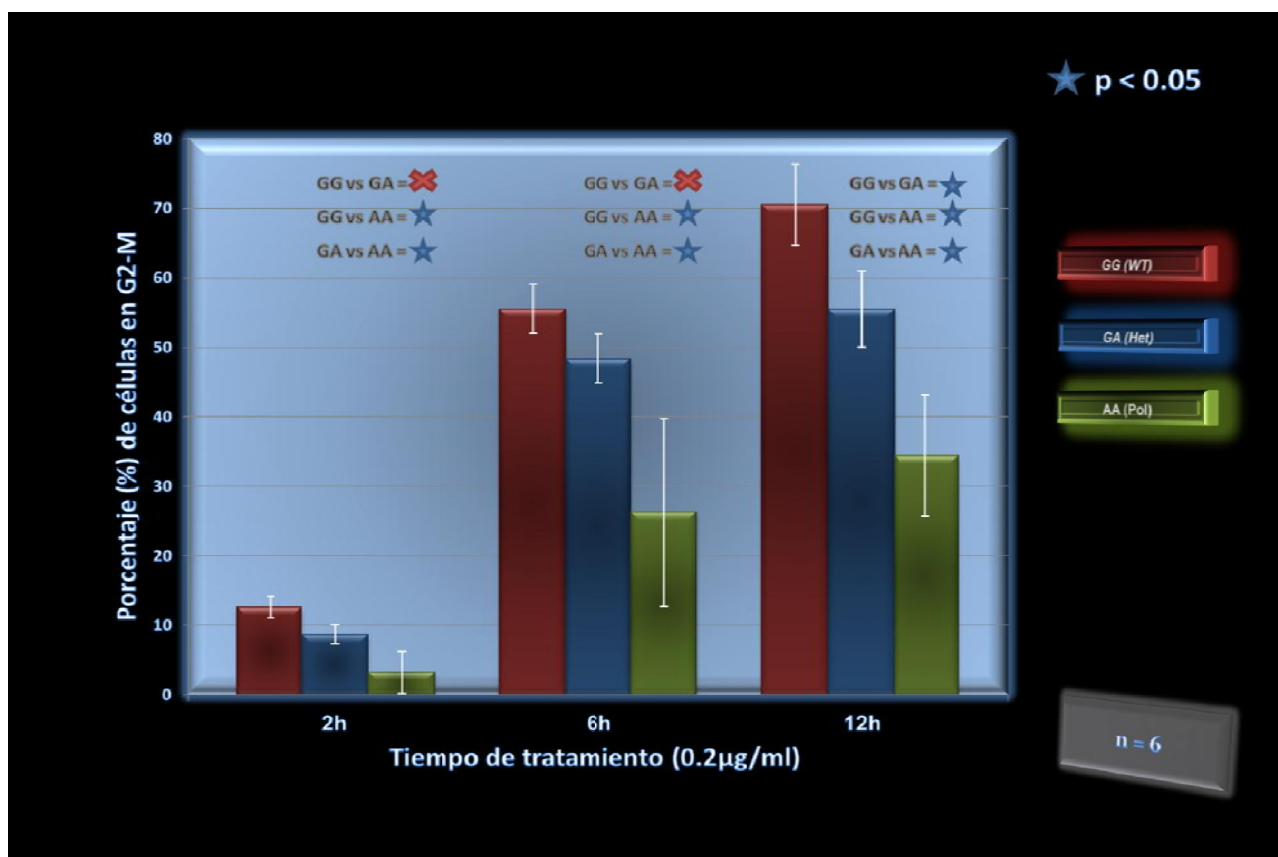


Gráfico 3. Porcentaje de células en la transición G<sub>2</sub>-M en cultivos de linfocitos expuestos a nocodazol, genotipificados para Mad1 G558A.

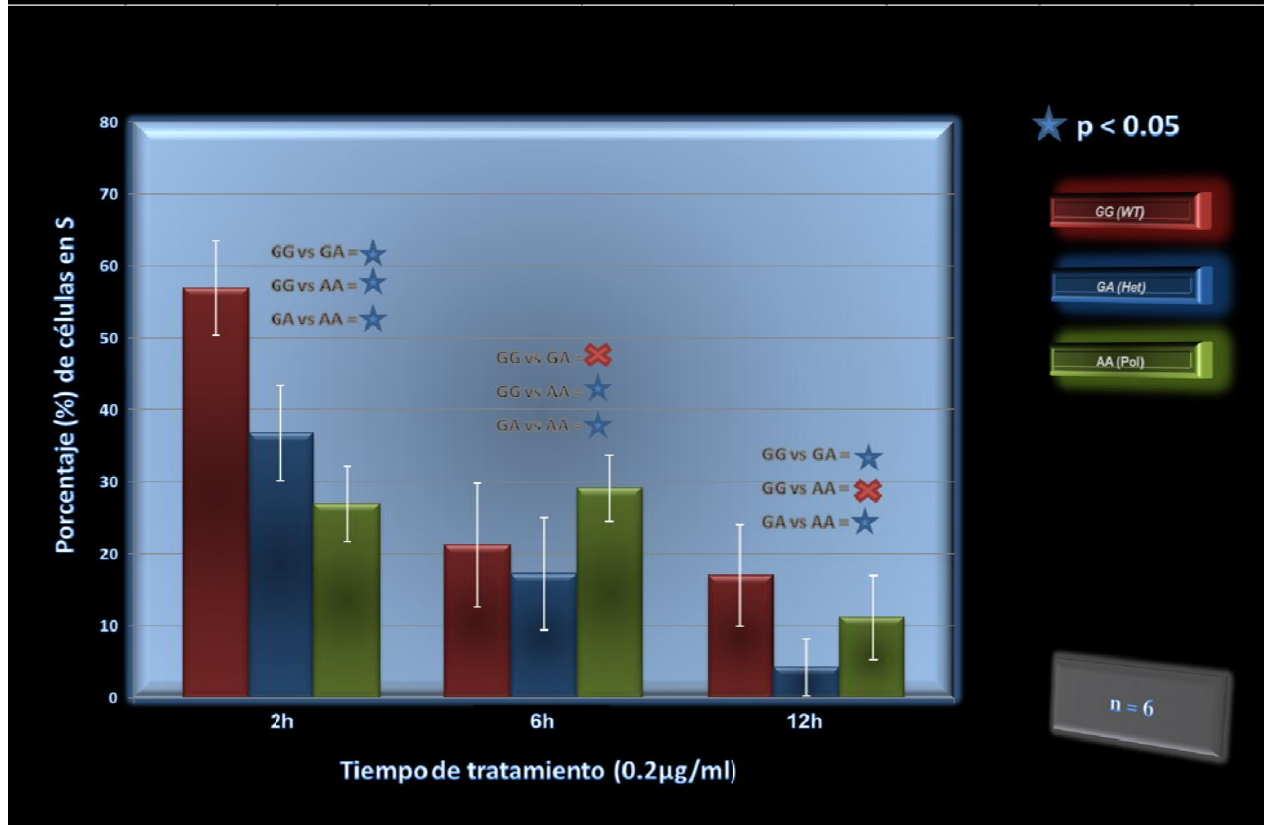
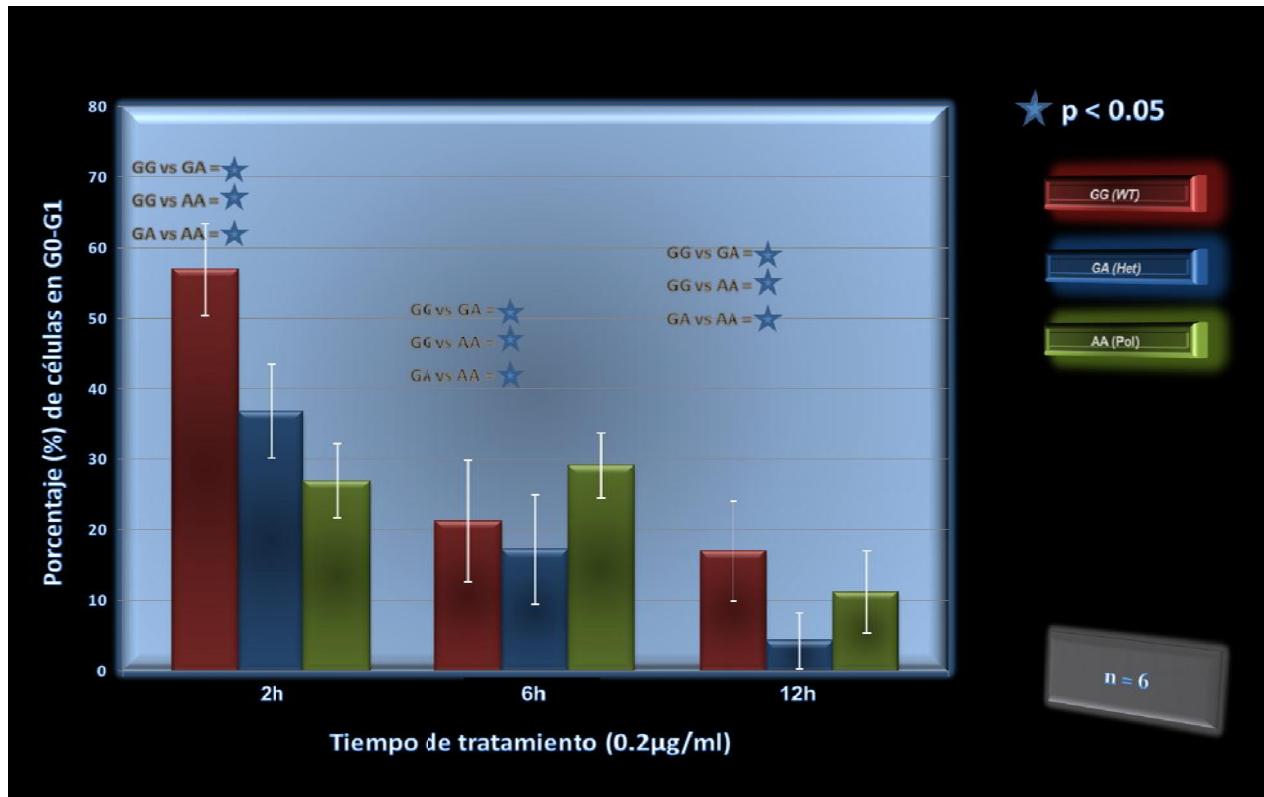


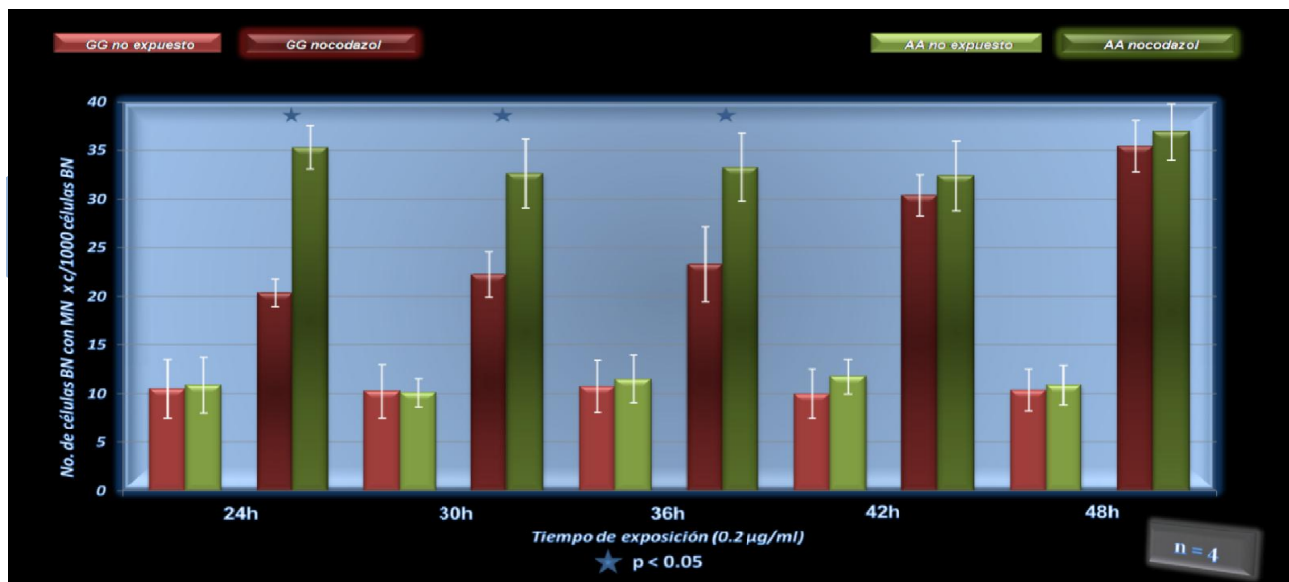
Gráfico 4. Porcentaje de células en la transición G0-G1 (arriba) y en la fase S (abajo) en cultivos de linfocitos expuestos a nocodazol, genotipificados para Mad1 G558A.





#### 4.4 Ensayo de micronúcleos por citocinesis bloqueada.

El tratamiento con nocodazol indujo un mayor número de micronúcleos en los linfocitos AA en comparación con los linfocitos GG (*Gráfico 5*) a las 24, 30 y 36 horas ( $p = 0.0007, 0.017$  y  $0.034$  respectivamente). Si bien los resultados referentes a las 42 y 48 horas de exposición no muestran diferencias significativas ( $p = 0.71$  y  $0.86$ ), es importante destacar que las células con genotipo GG manifiestan un incremento en el número de micronúcleos a medida que aumenta el tiempo de exposición, mientras que las células con genotipo AA tienen un comportamiento constante durante el todo el experimento. En el *Gráfico 6* se muestran los resultados de los diferentes tipos celulares contabilizados en el ensayo de micronúcleos. Las células mononucleadas, trinucleadas, tetranucleadas y con morfología apoptótica se encuentran representadas de manera similar en ambos genotipos ( $p > 0.05$  en todos los casos). Los linfocitos GG manifiestan un alto número de células en metafase en comparación con los linfocitos AA a las 24, 30, 36 y 42 horas (con valores de  $p < 0.01$ ), sin embargo, es evidente una disminución gradual a medida que aumenta el tiempo de exposición, de tal manera que a las 48 h, se encuentran representadas de manera similar en ambas condiciones genotípicas ( $p = 0.8$ ).



*Gráfico 5.* Células binucleadas con micronúcleos obtenidas mediante el tratamiento con nocodazol, en función del polimorfismo *Mad1* G558A

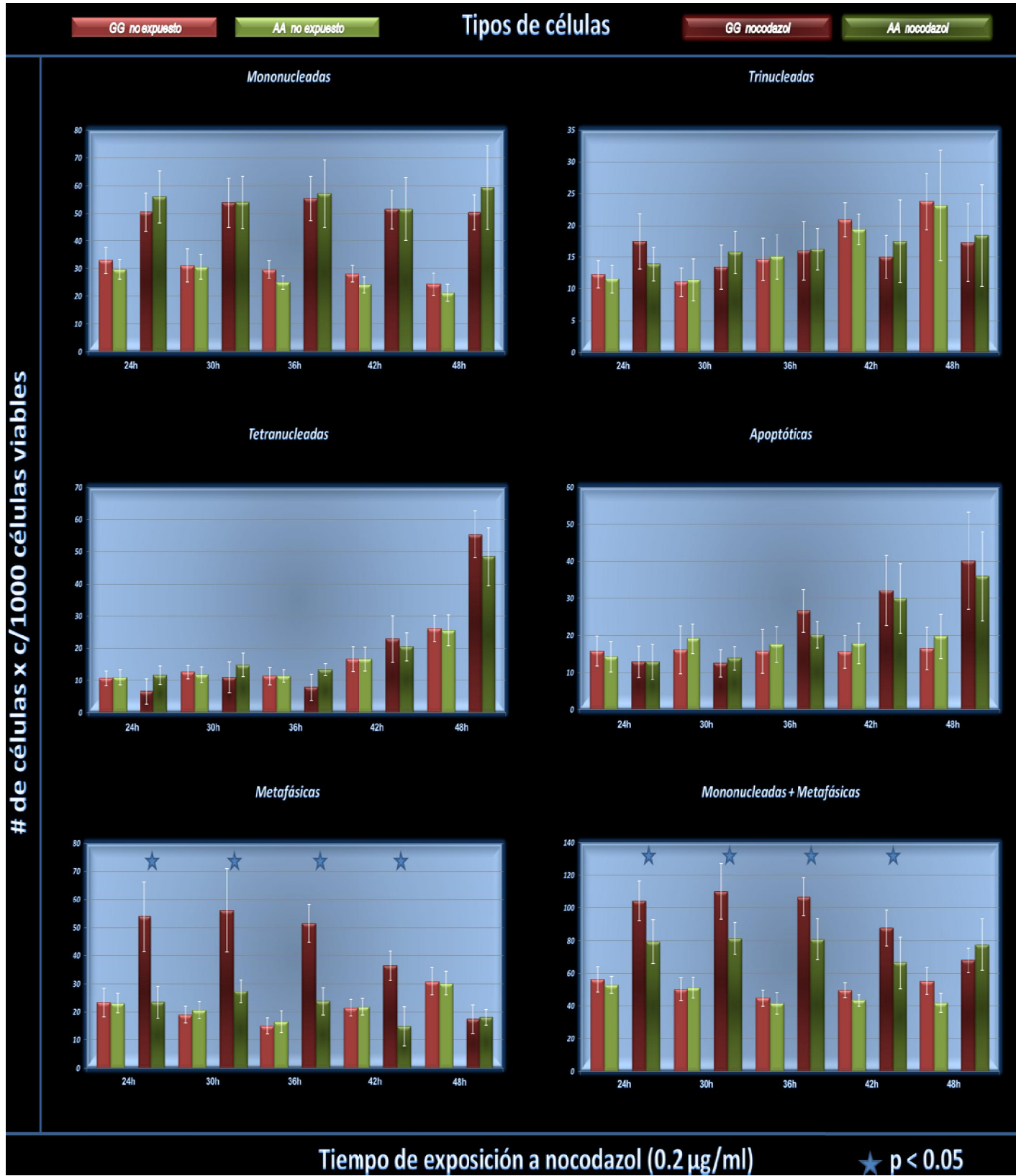
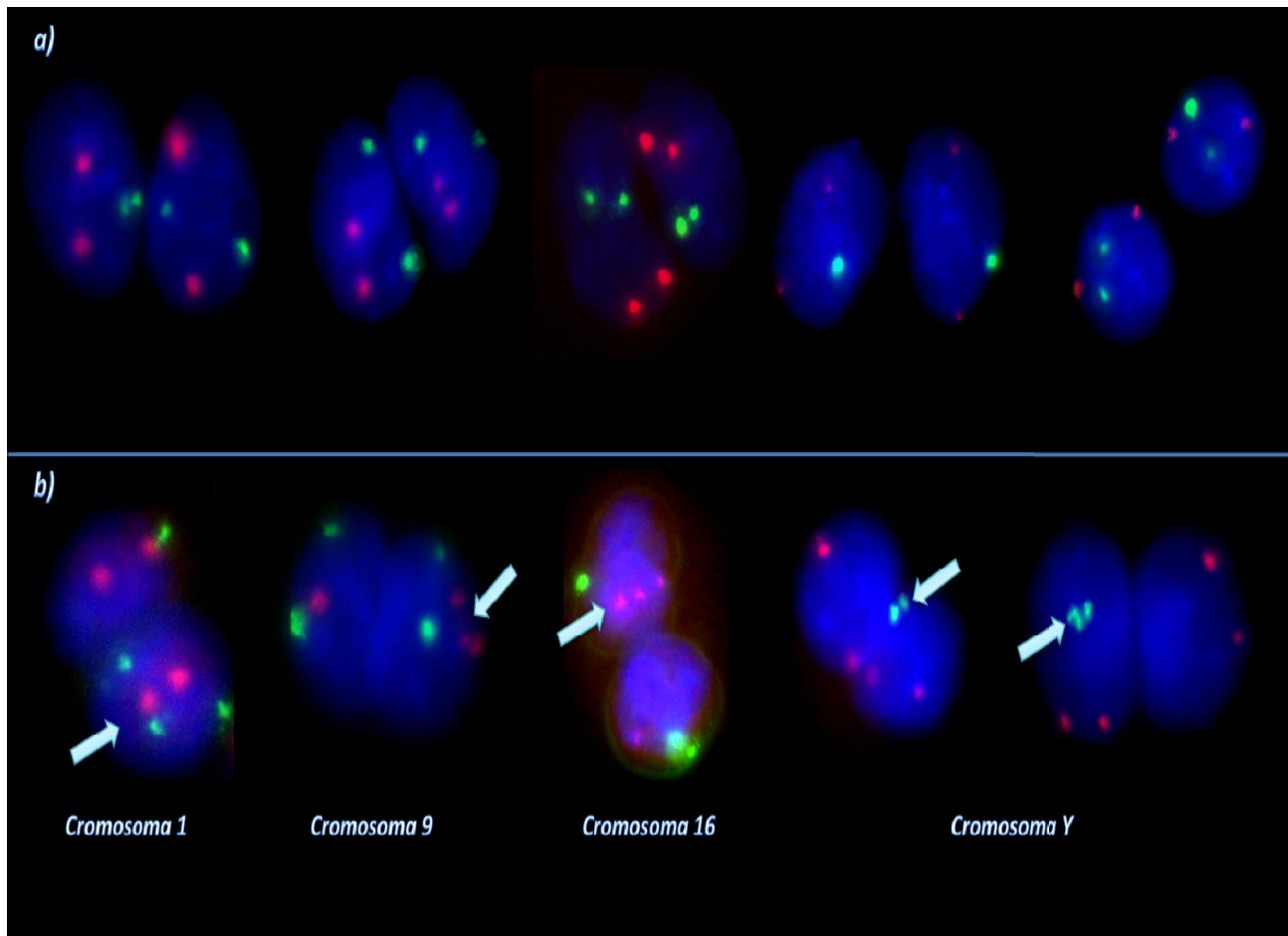


Gráfico 6. Conteo de los diferentes tipos celulares, obtenido a partir en el ensayo de micronúcleos por citocinesis bloqueada en linfocitos tratados con nocodazol genotipificados para Mad1 G558A.



#### 4.5 Evaluación de eventos de no disyunción.

A partir de los experimentos de FISH se puede establecer que las células portadoras del genotipo AA tienden a manifestar un mayor número de eventos de no disyunción en comparación con las células portadoras del genotipo GG para los cromosomas 1, 9, 16 y Y (Gráfico 7). Estos resultados son, en cierta manera, un reflejo del comportamiento de los genotipos observado en el ensayo de micronúcleos. En la Fig. 16 se pueden observar algunos ejemplos de células binucleadas que presentan un patrón de segregación normal, así como de células binucleadas que sufrieron eventos de no disyunción durante la mitosis.



**Figura 16.** Imágenes de hibridación in situ en células binucleadas (linfocitos) obtenidas mediante microscopía de fluorescencia. a) Células binucleadas cuyo patrón de segregación es normal para los cromosomas 1, 9, 16 y Y. Los núcleos que presentan 4 marcas fluorescentes corresponden a hibridaciones para cromosoma 1 (rojo) y 9 (verde), mientras que los que presentan 3 marcas corresponden a hibridaciones para cromosoma 16 (rojo) y Y (verde). b) Eventos de no disyunción observados en los cromosomas sujetos al experimento señalados con una flecha Aumento  $\rightarrow$  100X..

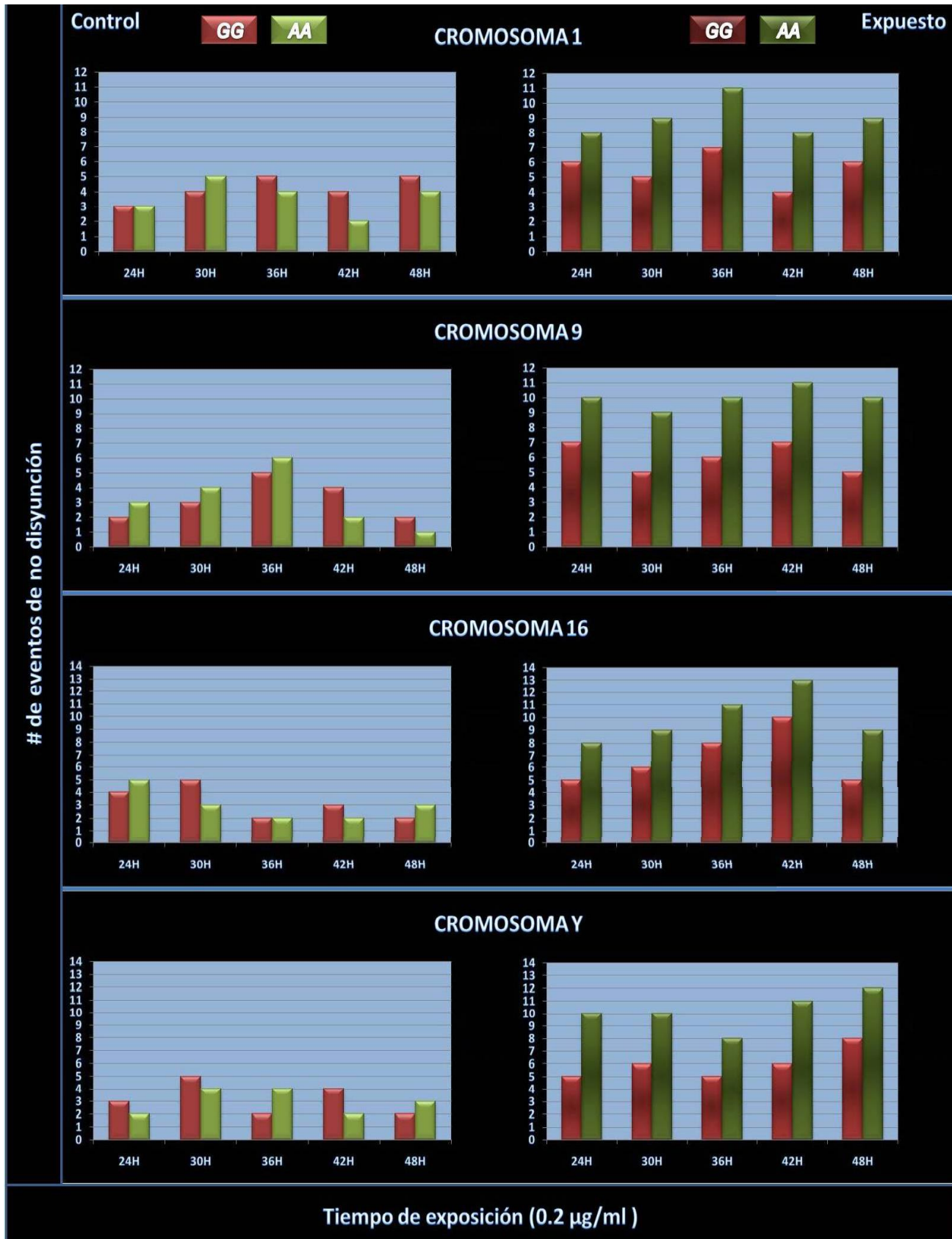


Gráfico 7. Conteo de eventos de no disyunción (cromosomas 1, 9, 16 y Y) en linfocitos binucleados genotipificados para Mad1 G558A.



#### 4.6 Genotipificación del polimorfismo *Mad1* G558A a partir de biopsias de adenocarcinoma gástrico.

En el *Gráfico 8* se puede observar que, de las 19 biopsias de mucosa normal, 6 presentaron el genotipo GG (32 %), 10 el genotipo GA (52 %) y 3 el genotipo AA (16 %). Las frecuencias alélicas fueron G: 58 % y A: 42 %. En el caso de las biopsias de adenocarcinoma gástrico, 5 presentaron el genotipo GG (26 %), 11 el genotipo GA (58 %) y 3 el genotipo AA (16 %), teniendo como resultado una frecuencia del 55 % para el alelo G y del 45 % para el alelo A. Esto nos indica que los dos alelos están representados de manera similar entre ambos tipos de biopsias, y que esta relación se mantiene entre las biopsias y las muestras de sangre periférica de individuos aparentemente sanos.

### 5. DISCUSIÓN.

El PMHM es un mecanismo producto de múltiples interacciones proteicas, que tiene como objetivo asegurar una segregación cromosómica adecuada en la célula en división. Si bien el arresto del ciclo celular en metafase está determinado por la inhibición de APC/C, esto no puede llevarse a cabo sin antes existir una adecuada disponibilidad de las proteínas que conforman el CPMM (*MAD2*, *BUBR1* y *BUB3*) capaz de secuestrar a *CDC20*. Para la formación de este complejo es muy importante la función de *MAD1*, ya que promueve la disponibilidad de *MAD2* en los cinetocoros. Mediante el empleo de RNAs de interferencia (RNAi), se ha demostrado que la inhibición tanto de *MAD1* como de *MAD2* tiene como consecuencia la muerte celular, lo cual indica que el papel de estas dos proteínas es crucial para que la viabilidad de la célula se mantenga (Luo *et al*, 2002; Martin-Lluesma *et al*, 2002; Meraldi *et al*, 2004). Incluso ha sido posible determinar, mediante el empleo de una línea celular de cáncer de colon, HCT-116, con el PMHM funcional, que al ser desregulados parcialmente ambos componentes del PMHM, el arresto del ciclo celular en metafase es ineficiente, ocasionando una salida prematura de la fase de mitosis (Kienitz *et al*, 2005).

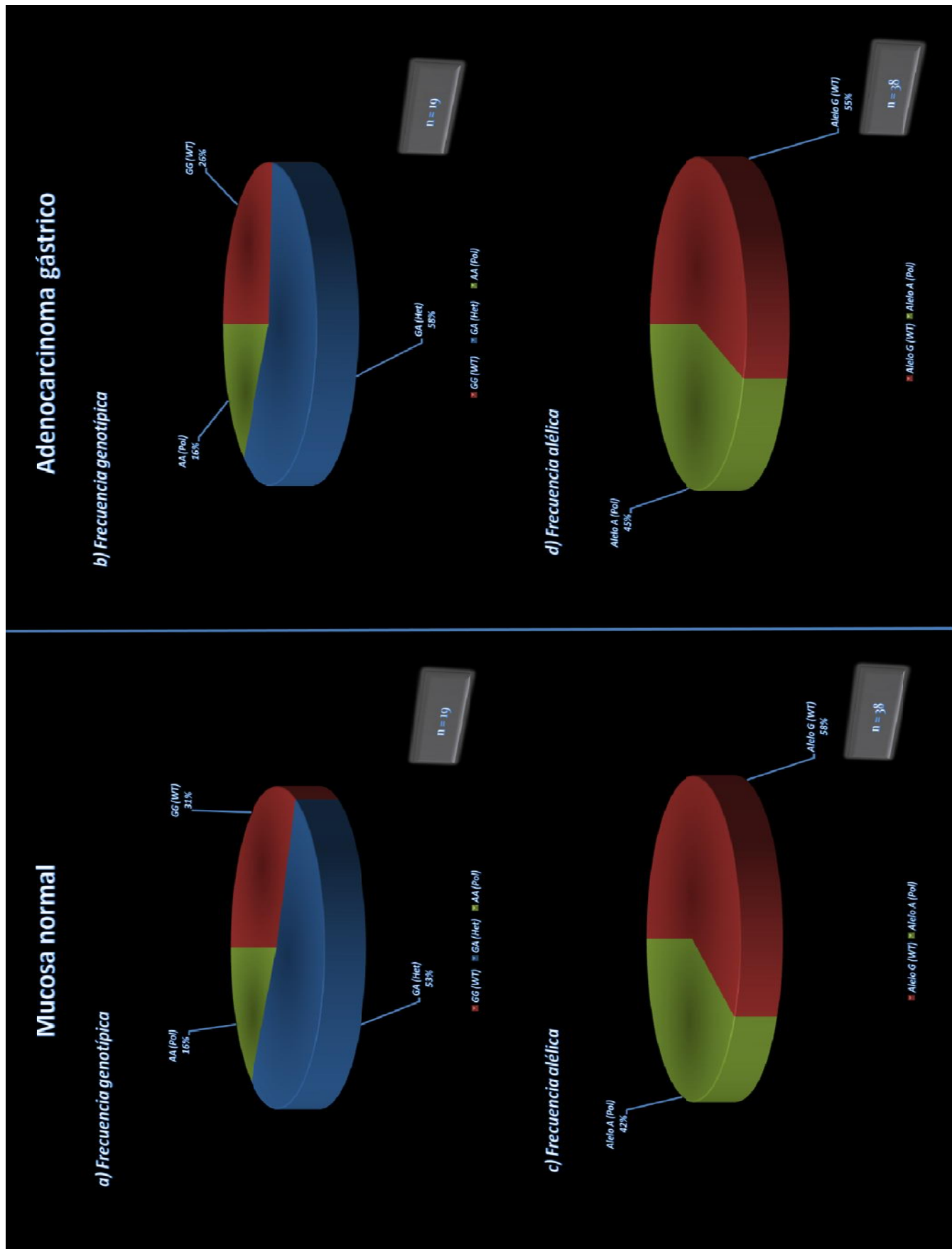


Gráfico 8. Frecuencia genotípica (a y b) y alélica (c y d) referente al polimorfismo G558A de Mad1 obtenida de biopsias de mucosa normal y adenocarcinoma gástrico de tipo difuso.



Con respecto a la generación de aneuploidías, en el mismo reporte de Kienitz y colaboradores se realizó un conteo cromosómico en las células que evadían el arresto en metafase. El resultado fue un alto número de células aneuploides que se manifestaban por la represión parcial tanto de MAD<sub>1</sub> como de MAD<sub>2</sub>.

Además de los hallazgos mencionados con anterioridad, se han realizado estudios con el objetivo de identificar alteraciones en la secuencia de nucleótidos (mutaciones) en los genes *Mad1* y *Mad2*. El análisis de múltiples líneas celulares de cáncer aneuploides ha permitido establecer que la presencia de mutaciones en *Mad2* es poco común (Takahashi *et al*, 1999; Cahill *et al*, 1999; Percy *et al*, 2000). Algunos trabajos han caracterizado diversas modificaciones en *Mad1*, correspondientes en la mayoría de los casos a polimorfismos de un solo nucleótido (Nomoto *et al*, 1999; Cahill *et al*, 1999; Tsukasaki *et al*, 2001). Realizando un estudio con la finalidad de caracterizar las regiones determinantes para la unión entre ambos productos génicos, el reporte de Iwanaga y colaboradores en 2002 estableció que la migración de MAD<sub>2</sub> hacia los cinetocoros sin unión a microtúbulos está dirigida principalmente por su reconocimiento y unión a través de la región correspondiente a los *zipper*s de leucina presentes en el extremo C-terminal de MAD<sub>1</sub>. Al transfectar células HeLa con diversas construcciones de MAD<sub>1</sub>, se observó que aquellas carentes de al menos uno de los dos *zipper*s de leucina no co-localizaban con MAD<sub>2</sub>. Con este antecedente, y considerando que el polimorfismo G558A alteraba el fenotipo de la proteína modificando la secuencia de aminoácidos en la región correspondiente al segundo *zipper* de leucina (aa 557-571), se determinó el genotipo y el índice mitótico (ante el tratamiento con nocodazol) en diversas líneas celulares de cáncer, de las cuales sólo una (HCT-116) mostró un genotipo homocigoto para la condición GG, manifestando un arresto más eficiente en comparación con las demás.

Se ha establecido que MAD<sub>1</sub> también interactúa (mediante los *zipper*s de leucina) con otra proteína denominada NEK2A (*NIMA-related Kinase 2A*; NIMA → *Never In Mitosis A*) (Lou *et al*, 2004). Esta proteína se localiza tanto en centrosomas (guardando una relación con la



maduración de estas estructuras, Faragher y Fry, 2003) como en cinetocoros (sitio en el que se manifiesta la unión con MAD<sub>1</sub>, Lou *et al*, 2004) y se ha postulado como un componente del PMHM. En células donde existen defectos en el funcionamiento de NEK2A, el arresto en metafase es ineficiente aún cuando se manifiestan errores en la separación de cromátidas hermanas, situación que conduce a la célula a una salida prematura de la fase de mitosis, promoviendo así la generación de aneuploidías.

En estudios realizados en ratones, se ha caracterizado una interacción entre MAD<sub>1</sub> y una proteína implicada en la regulación de la longitud de los telómeros denominada TRF<sub>1</sub> (*Telomeric Repeat Binding Factor 1*) (Prime y Markie, 2005). Algunos reportes han sugerido que esta proteína está implicada en la regulación negativa de la mitosis con base en la integridad telomérica (Shen *et al*, 1997; Zhou *et al*, 2003). La región de MAD<sub>1</sub> en la que se manifiesta la interacción ha sido localizada entre los aa 536-571. Con este antecedente, recientemente en nuestro laboratorio se están implementando las condiciones experimentales para determinar mediante ensayos de co-inmunoprecipitación si esta interacción se presenta también en seres humanos.

La condición genotípica en función del polimorfismo G558A de *Mad1* caracterizada en múltiples líneas celulares de cáncer, así como la exploración realizada a partir de muestras de sangre periférica de individuos aparentemente sanos (en la cual no fueron encontrados individuos homocigotos polimórficos) llevó a suponer que esta condición se manifestaba exclusivamente en células malignas como resultado de la pérdida de heterocigocidad. En el presente estudio nos dimos a la tarea de determinar la frecuencia genotípica en una muestra mucho más amplia de la que se había evaluado con anterioridad. Los resultados obtenidos a partir de este análisis muestran que el polimorfismo G558A se encuentra altamente representado en la población mexicana, reportando la existencia de individuos AA en una alta proporción (aproximadamente 1 de cada 4 individuos sujetos al estudio fueron portadores de este genotipo). Es importante señalar que este es el primer estudio en población abierta en el que se evalúa esta condición.





Además de los hallazgos mencionados con anterioridad, la postura en contra del planteamiento manejado para la condición homóciga del polimorfismo adquiere mayor solidez mediante la determinación de las frecuencias genotípicas y alélicas en las muestras de adenocarcinoma gástrico. Al comparar los resultados de las biopsias de mucosa normal con las del tejido tumoral, no se observan cambios significativos. En ambos casos, las frecuencias observadas guardan una estrecha relación con los resultados obtenidos para las muestras de sangre periférica. Es importante mencionar que sólo en el caso de una muestra se manifestó un cambio de genotipo, de GG a GA. Tomando en cuenta que en las células que conforman un tumor se pueden distinguir subpoblaciones (debido a diferencias en la información genética), existiría una mayor certeza de estos cambios al hacer la comparación del tejido tumoral con una muestra de sangre periférica del mismo paciente.

A partir de la evaluación del índice mitótico y el análisis de los resultados obtenidos mediante la citometría de flujo en linfocitos tratados con nocodazol, se determinó que los individuos con genotipo GG presentan un mayor arresto del ciclo celular en G<sub>2</sub>-M, comparados con los individuos con genotipo AA. Esto concuerda con lo reportado en la literatura para líneas celulares de cáncer transfectadas para expresar tanto la proteína silvestre como su variante alélica. El hecho de que los cultivos primarios manifiesten el mismo comportamiento observado en líneas celulares de cáncer anula la posibilidad de que en la respuesta de estas últimas interfiera de manera importante algún otro factor, ocasionando un efecto negativo en el funcionamiento del PMHM. Los individuos homócigos silvestres y los heterócigos presentan un índice mitótico similar ante la exposición a un agente que altera la polimerización de microtúbulos, esto sugiere que la presencia de al menos un alelo en condición silvestre permite que la detención del ciclo en mitosis se lleve a cabo de manera eficiente.

El hecho de que los individuos AA manifiesten un menor índice mitótico y un menor porcentaje de células en la transición G<sub>2</sub>-M, generó la inquietud de averiguar si el



mecanismo de segregación cromosómica en células portadoras de este genotipo (las cuales evadían el arresto en mitosis) manifestaba irregularidades que pudieran tener como consecuencia la generación de células con un número cromosómico anormal (aneuploides). Mediante el ensayo de micronúcleos por citocinesis bloqueada fue posible determinar que los individuos homocigos polimórficos para *Madi* (AA) tienen un mayor número de aneuploidías a diferencia de los individuos con genotipo homocigo silvestre (GG), al ser expuestas de manera prolongada al nocodazol. Al final del tratamiento, ambas condiciones genotípicas presentan similitudes en el conteo de células binucleadas con micronúcleos. Además, el número de células metafásicas en los individuos GG disminuye gradualmente a medida que aumenta el tiempo de exposición a nocodazol, situación que permite establecer que el arresto mitótico en las células con este genotipo no puede ser mantenido por largos periodos, y que al evadirse, se presentan errores en la segregación. Si bien estos experimentos tienen como premisa el hecho de que el inadecuado funcionamiento del PMHM predispone a la célula a tener una pérdida de cromosomas completos, es importante determinar si los micronúcleos observados corresponden a esta condición. Esta pregunta puede contestarse ya sea mediante FISH (utilizando una sonda pancentromérica) o la inmunodetección indirecta del centrómero (por el reconocimiento de algunas CENP) a partir de la utilización de suero de pacientes con síndrome CREST.

La tendencia de los individuos AA a generar un mayor número de eventos de no disyunción guarda relación con los resultados de la técnica de micronúcleos. Sin embargo, resulta necesario el montaje de más experimentos que nos permitan establecer con claridad estas diferencias. Con la utilización de ambas técnicas, es posible hacer una evaluación de aneuploidías ocasionadas tanto por rezago cromosómico, como por eventos de no disyunción, siguiendo este fenómeno de manera total.

Si bien los resultados obtenidos a partir de estos experimentos demuestran diferencias en la funcionalidad de las dos condiciones alélicas de *Madi*, hace falta determinar, a nivel bioquímico, como se manifiesta la interacción entre *MAD1* polimórfica y *MAD2*. Además,



resulta de gran interés evaluar la interacción con NEK2A y, en caso de obtener resultados positivos en seres humanos, con TRF1, ya que como se ha discutido con anterioridad, estas uniones parecen ser muy importantes en la orquestación de la señal de arresto mitótico.

La generación de aneuploidías es un factor importante en el desarrollo del cáncer. Si el PMHM no funciona adecuadamente, las células adquieren y propagan la IC a su descendencia. Agentes quimioterapéuticos que alteran el huso mitótico, incluidos taxanos y vinca-alcaloides, son utilizados frecuentemente en el tratamiento diversos tipos de cáncer (tumores de ovario, mama, pulmón y linfomas) (Jordan y Wilson, 2004). El mecanismo por el cual actúan involucra la inducción de la apoptosis mediada por un arresto prolongado en metafase, y se sabe que, cuando las células tienen defectos en el funcionamiento del PMHM, este arresto no se lleva a cabo, ocasionando resistencia al tratamiento (Tao, 2005). Con este trabajo como antecedente, podría ser abordada en experimentos posteriores la relación que existe entre la presencia del polimorfismo y la inducción de apoptosis por agentes que alteran la segregación utilizados en la práctica clínica (p. ej. taxol). En caso de encontrar que la muerte se manifiesta en una mayor proporción en células con genotipo GG, el polimorfismo podría ser utilizado como un factor predictor de la respuesta al tratamiento.



## 6. CONCLUSIONES.

- La variante polimórfica A558 del gen *Mad1* está representada ampliamente en la población mexicana sana, encontrándose también en condición homociga, por lo tanto, no es resultado del proceso de transformación maligna como se había propuesto.
- Esta variante de *Mad1* tiene una influencia en la respuesta celular al tratamiento con agentes que alteran la segregación cromosómica, ocasionando un deficiente arresto del ciclo celular en metafase cuando está presente en ambos alelos.
- Por lo anterior, en los individuos portadores del genotipo AA, se incrementa la posibilidad de presentar errores en la distribución de cromosomas hacia las células hijas llevada a cabo en la mitosis, teniendo como consecuencia la generación de aneuploidías.



## 7. LITERATURA CITADA.

- Abrieu, A., Kahana, J. A., Wood, K. W. & Cleveland, D. W. CENP-E as an essential component of the mitotic checkpoint *in vitro*. *Cell* **102**, 817-826 (2000).
- Abrieu, A., Magnaghi-Jaulin, L., Kahana, J. A., Peter, M., Castro, A., Vigneron, S., Lorca, T., Cleveland, D. W., Labbé, J. C. Mps1 is a kinetochore-associated kinase essential for the vertebrate mitotic checkpoint. *Cell* **106**, 83-93 (2001).
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. *Molecular Biology of the Cell* (Garland Science, New York, 2002).
- Asimov, I. *Introducción a la Ciencia* (Plaza & Janés, S.A., México, 1985).
- Ayala, F.J. Mechanisms of evolution. *Scientific American* **329**, 48-61 (1978).
- Bharadwaj, R., Yu, H. The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. *Oncogene* **23**, 2016-2027 (2004).
- Boveri, T. Über mehrpolige mitosen als mittel zur analyse des zellkerns. *Verh. d. phys.med. Ges. Würzburg N. F.* **35**, 67-90 (1902).
- Brinkley, B.R., Stubblefield, E. The fine structure of the kinetochore of a mammalian cell *in vitro*. *Chromosoma* **19**, 28-43 (1966).
- Brown, T.A. *Genomes* (Bios Scientific Publications, Oxford, 1999).
- Cahill, D.P., Lengauer, C., Yu, J., Riggins, G. J., Willson, J. K., Markowitz, S. D., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* **392**, 300-303 (1998).
- Cahill, D.P., da Costa, L. T., Carson-Walter, E. B., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. & Lengauer, C. Characterization of MAD2B and other mitotic spindle checkpoint genes. *Genomics* **58** (1999).
- Campbell, W.C. Benzimidazoles: veterinary uses. *Parasitol. Today* **6**, 130-133 (1990).
- Chan, G.K., Jablonski, S. A., Sudakin, V., Hittle, J. C. & Yen, T. J. 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 (1999).
- Chan, G.K., Jablonski, S. A., Starr, D. A., Goldberg, M. L. & Yen, T. J. Human Zw10 and ROD are mitotic checkpoint proteins that bind to kinetochores. *Nature Cell Biol.* **2**, 944-947 (2000).
- Chan, G.K., Liu, S. T. & Yen, T. J. Kinetochore structure and function. *Trends in Cell Biology* **15**, 589-598 (2005).



- ✿ Chen, J.G., Horwitz, S. B. Differential mitotic responses to microtubule-stabilizing and -destabilizing drugs. *Cancer Research* **62**, 1935-1938 (2002).
- ✿ Chen, R.H., Waters, J. C., Salmon, E. D. & Murray, A. W. Association of spindle assembly checkpoint component XMad2 with unattached kinetochores. *Science* **274**, 242-246 (1996).
- ✿ Chen, R.H., Shevchenko, A., Mann, M. & Murray, A. W. Spindle checkpoint protein Xmad1 recruits Xmad2 to unattached kinetochores. *J. Cell Biol.* **143**, 283-295 (1998).
- ✿ Chung, E., Chen, R. H. Spindle checkpoint requires Mad1-bound and Mad1-free Mad2. *Mol. Biol. Cell* **13**, 1501-1511. (2002).
- ✿ Cimini, D., Degrossi, F. Aneuploidy: a matter of bad connections. *Trends in Cell Biology* **15**, 442-451 (2005).
- ✿ Clare, M.G., Lorenzon, G., Akhurst, L. C., Marzin, D., Van Delft, J., Montero, R., Botta, A., Bertens, A., Cinelli, S., Thybaud, V. & Lorge, E. . SFTG international collaborative study on in vitro micronucleus test II. Using human lymphocytes. *Mutation Research* **607**, 37-60 (2006).
- ✿ Cleveland, D.W., Mao, Y. & Sullivan, K. F. Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell* **112**, 407-421 (2003).
- ✿ Collins, F.S., Guyer, M. S. & Chakravarti, A. Variations on a theme: cataloguing human DNA sequence variation. *Science* **282**, 682-689 (1998).
- ✿ Cooke, C.A., Schaar, B., Yen, T. J. & Earnshaw W. C. Localization of CENP-E in the fibrous corona and outer plate of mammalian kinetochores from prometaphase through anaphase. *Chromosoma* **106**, 446-455 (1997).
- ✿ Dai, W., Wang, Q., Liu, T., Swamy, M., Fang, Y., Xie, S., Mahmood, R., Yang, Y. M., Xu, M. & Rao, C. V. Slippage of mitotic arrest and enhanced tumor development in mice with BubR1 haploinsufficiency. *Cancer Research* **64**, 440-445 (2004).
- ✿ De Antoni, A., Pearson, C. G., Cimini, D., Canman, J. C., Sala, V., Nezi, L., Mapelli, M., Sironi, L., Faretta, M., Salmon, E. D. & Musacchio, A. The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint. *Curr. Biol.* **15**, 214-225 (2005).
- ✿ de la Riva, S., Muñoz-Navas, M., Sola, J. J. Carcinogénesis gástrica. *Revista Española de Enfermedades Digestivas* **96**, 265-276 (2004).
- ✿ Deloukas, P., Schuler, G., Gyapay, G. A physical map of 30,000 human genes. *Science* **282**, 744-746 (1998).



- Dicken, B.J., Bigam, D. L., Cass, C., Mackey, J. R., Joy, A. A. & Hamilton, S. M. Gastric adenocarcinoma. Review and considerations for future directions. *Annals of Surgery* **241**, 27-39 (2005).
- Fang, G. Checkpoint protein BubR1 acts synergistically with Mad2 to inhibit anaphase-promoting complex. *Mol. Biol. Cell* **13**, 755-766 (2002).
- Faragher, A.J., Fry, A. M. Nek2A kinase stimulates centrosome disjunction and is required for formation of bipolar mitotic spindle. *Mol. Biol. Cell* **14**, 2876-2879 (2003).
- Fenech, M., Morley, A. A. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Research* **161**, 193-198 (1986).
- Flemming, W. Zellsubstanz, kern und zelltheilung (FCW Vogel, Leipzig, 1882).
- Gemma, A., Seike, M., Seike, Y., Uematsu, K., Hibino, S., Kurimoto, F., Yoshimura, A., Shibuya, M., Harris, C. C. & Kudoh, S. Somatic mutation of the hBUB1 mitotic checkpoint gene in primary lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **29**, 213-218 (2000).
- Guacci, V., Koshland, D. & Strunnikov, A. A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through analysis of MCD1 in *S. cerevisiae*. *Cell* **91**, 47-57 (1997).
- Hanks, S., Coleman, K., Reid, S., Plaja, A., Firth, H., Fitzpatrick, D., Kidd, A., Méhes, K., Nash, R., Robin, N., Shannon, N., Tolmie, J., Swansbury, J., Irrthum, A., Douglas, J. & Rahman, N. Constitutional aneuploidy and cancer predisposition caused by biallelic mutations in BUB1B. *Nature Genet.* **36**, 1159-1161 (2004).
- Hardwick, K.G., Johnston, R. C., Smith, D. L. & Murray, A. W. MAD3 encodes a novel component of the spindle checkpoint which interacts with Bub3p, Cdc20p, and Mad2p. *J. Cell Biol.* **148**, 871-882 (2000).
- Heim, S., Mitelman, F. *Cancer Cytogenetics* (Wiley Liss Inc., New York, 1995).
- Hernando, E., Orlow, I., Liberal, V., Nohales, G., Benezra, R. & Cordon-Cardo, C. Molecular analyses of the mitotic checkpoint components hMAD2, hBUB1 and hBUB3 in human cancer. *Int. J. Cancer* **95**, 223-227 (2001).
- Howell, B.J., Moree, B., Farrar, E. M., Stewart, S. & Salmon E. D. Spindle checkpoint protein dynamics at kinetochores in living cells. *Curr. Biol.* **14**, 953-964 (2004).
- Hoyt, M.A., Totis, L. & Roberts, B. T. *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell* **66**, 507-517 (1991).
- International-Human-Genome-Sequencing-Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921 (2001).



- Iwanaga, Y., Kasai, T., Kibler, K. & Jeang, K. T. Characterization of regions in hsMAD<sub>1</sub> needed for binding hsMAD<sub>2</sub>. A polymorphic change in an hsMAD<sub>1</sub> leucine zipper affects MAD<sub>1</sub>-MAD<sub>2</sub> interaction and spindle checkpoint function. *J. Biol. Chem.* **277**, 31005-31013 (2002).
- Jablonski, S.A., Chan, G. K., Cooke, C. A., Earnshaw, W. C. & Yen, T. J. The hBUB<sub>1</sub> and hBUBR<sub>1</sub> kinases sequentially assemble onto kinetochores during prophase with hBUBR<sub>1</sub> concentrating at the kinetochore plates in mitosis. *Chromosoma* **107**, 386-396 (1998).
- Jallepalli, P.V., Waizenegger, I. C., Bunz, F., Langer, S., Speicher, M. R., Peters, J. M., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. & Lengauer C. Securin is required for chromosomal stability in human cells. *Cell* **105**, 445-457 (2001).
- Jin, D.Y., Spencer, F. & Jeang, K. T. Human T cell leukemia virus type 1 oncoprotein Tax targets the human mitotic checkpoint protein Mad<sub>1</sub>. *Cell* **93**, 81-91 (1998).
- Jin, D.Y., Kozak, C. A., Pangilian, F., Spencer, F., Green, E. D. & Jeang, K. T. Mitotic checkpoint locus MAD<sub>1</sub>L<sub>1</sub> maps to human chromosome 7p22 and mouse chromosome 5. *Genomics* **55**, 363-364 (1999).
- Jordan, M.A., Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Rev. Cancer* **4**, 253-265 (2004).
- Kienitz, A., Vogel, C., Morales, I., Müller, R. & Bastians, H. Partial downregulation of MAD<sub>1</sub> causes spindle checkpoint inactivation and aneuploidy, but does not confer resistance towards taxol. *Oncogene* **24**, 4301-4310 (2005).
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surrallés, J., Vanhauwaert, A. & Wakata A. Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutation Research* **540**, 153-163 (2003).
- Kops, G.J., Weaver, B. A. & Cleveland, D. W. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nature Rev. Cancer* **5**, 773-785 (2005).
- Kornberg, R.D., Lorch, Y. Twenty five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* **98**, 285-294 (1999).
- Koshland, D. Mitosis. Back to the basics. *Cell* **77**, 951-954 (1994).
- Lacey, E. Mode of action of benzimidazoles. *Parasitol. Today* **6**, 112-115 (1990).
- Lampson, M.A., Renduchitala, K., Khodjakov, A. & Kapoor, T. M. Correcting improper chromosome spindle attachments during cell division. *Nature Cell Biol.* **6**, 232-237 (2004).
- Lauren, T. The two histological main types of gastric carcinoma. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.* **64**, 34 (1965).





- Lengauer, C., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* **386**, 623-627 (1997).
- Lewin, B. Genes VIII (ed. Education, P.) (Pearson Education, USA, 2004).
- Lewontin, R. Adaptation. *Scientific American* **239**, 156-169 (1978).
- Li, R., Murray, A. Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* **66**, 519-531 (1991).
- Lopez-Carrillo, L., Vega-Ramos, B., Costa-Dias, R. & Rascon-Pacheco R. A. Histological types of gastric cancer in Mexico. *Int. J. Epidemiol.* **26**, 1166-1171 (1997).
- Losada, A., Hirano, M. & Hirano, T. Identification of *Xenopus* SMC protein complexes required for sister chromatid cohesion. *Genes Dev.* **12** (1998).
- Lou, Y., Yao, J., Zereshki, A., Dou, Z., Ahmed, K., Wang, H., Hu, J., Wang, Y. & Yao, X. NEK2A interacts with MAD1 and possibly functions as a novel integrator of the spindle checkpoint signaling. *J. Biol. Chem.* **279**, 20049-20057 (2004).
- Luo, X., Tang, Z., Rizo, J. & Yu H. The Mad2 spindle checkpoint protein undergoes similar major conformational changes upon binding to either Mad1 or Cdc20. *Mol. Cell* **9**, 59-71 (2002).
- Mao, Y., Abrieu, A. & Cleveland, D. W. Activating and silencing the mitotic checkpoint through CENP-E-dependent activation/inactivation of BubR1. *Cell* **114**, 87-98 (2003).
- Mao, Y., Desai, A. & Cleveland, D. W. Microtubule capture by CENP-E silences BubR1-dependent mitotic checkpoint signalling. *J. Cell Biol.* **170**, 873-880 (2005).
- Martin-Lluesma, S., Stucke, V. M. & Nigg, E. A. Role of Hec1 in spindle checkpoint signaling and kinetochore recruitment of Mad1/Mad2. *Science* **297**, 2267-2270 (2002).
- Mellone, B., Erhardt, S. & Karpen G. The ABCs of centromeres. *Nature Cell Biol.* **8**, 427-429 (2006).
- Meraldi, P., Draviam, V. M. & Sorger, P. K. Timing and checkpoints in the regulation of mitotic progression. *Dev. Cell* **7**, 45-60 (2004).
- Michaelis, C., Ciosk, R. & Nasmyth, K. Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell* **91**, 35-45 (1997).
- Michel, L.S., Liberal, V., Chatterjee, A., Kirchwegger, R., Pasche, B., Gerald, W., Dobles, M., Sorger, P. K., Murty, V. V. & Benezra, R. . MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nature* **409**, 355-359 (2001).
- Mohar, A., Suchil-Bernal, L., Hernandez-Guerrero, A., Podolsky-Rapoport, I., Herrera-Goepfert, R., Mora-Tiscareno A. & Aiello-Crocifoglio, V. Intestinal type: diffuse type ratio of gastric carcinoma in a mexican population. *J. Exp. Clin. Cancer. Res.* **16**, 189-194 (1997).
- Murray, A.W., Hunt, T. The Cell Cycle: An introduction (WH Freeman, New York, 1993).



- Musacchio, A., Hardwick, K. G. The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 731–741 (2002).
- Musacchio, A., Salmon, E. D. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 379–393 (2007).
- Nasmyth, K., Peters, J. M. & Uhlmann, F. Splitting the chromosome: cutting the ties that bind sister chromatids. *Science* **288**, 1379–1384 (2000).
- Nasmyth, K. Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation. *Science* **297**, 559–565 (2002).
- Nicklas, R.B., Ward, S. C. & Gorbsky, G. J. Kinetochore chemistry is sensitive to tension and may link mitotic forces to a cell cycle checkpoint. *J. Cell Biol.* **130**, 929–939 (1995).
- Nicklas, R.B. How cells get the right chromosomes. *Science* **275**, 632–637 (1997).
- Nigg, E.A. Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nature Rev. Cancer* **2**, 815–825 (2002).
- Nomoto, S., Haruki, N., Takahashi, T., Masuda, A., Koshikawa, T., Takahashi, T., Fujii, Y., Osada, H. & Takahashi, T. Search for *in vivo* somatic mutations in the mitotic checkpoint gene, *hMAD1*, in human lung cancers. *Oncogene* **18**, 7180–7183 (1999).
- Nurse, P. The incredible life and times of biological cells. *Science* **289**, 1711–1716 (2000).
- Oñate, L.F. Gastric cancer in Mexico. *Gastric Cancer* **4**, 162–164 (2001).
- Passarge, E. Color Atlas of Genetics (Thieme, Stuttgart, Germany, 2001).
- Percy, M.J., Myrie, K. A., Neeley, C. K., Azim, J. N., Ethier, S. P. & Petty, E. M. Expression and mutational analyses of the human *MAD2L1* gene in breast cancer cells. *Genes Chromosomes Cancer* **29**, 356–362 (2000).
- Peters, J.M. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol. Cell* **9**, 931–943 (2002).
- Peters, J.M. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 644–656 (2006).
- Pinsky, B.A., Biggins, S. The spindle checkpoint: tension versus attachment. *Trends in Cell Biology* **15**, 486–493 (2005).
- Prime, G., Markie, D. The Telomere repeat binding protein Trf1 interacts with the spindle checkpoint protein Mad1 and Nek2 mitotic kinase. *Cell Cycle* **4**, 121–124 (2005).
- Reddy, S., Raoer, M., Margansky, W. & Kirschner, M. Ubiquitination by the anaphase-promoting complex drives spindle checkpoint inactivation. *Nature* **446**, 921–925 (2007).



- Rieder, C.L., Cole, R. W., Khodjakov, A. & Sluder, G. The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *J. Cell Biol.* **130**, 941–948 (1995).
- Rieseberg, M., Kasper, C., Reardon, K. F. & Scheper, T. Flow cytometry in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 350–360 (2001).
- Ris, H., Witt, P. L. Structure of the mammalian kinetochore. *Chromosoma* **82**, 153–170 (1981).
- Shen, M., Haggblom, C., Vogt, M., Hunter, T. & Lu, K. P. Characterization and cell cycle regulation of the related human telomeric proteins Pin2 and Trf1 suggest a role in mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 13618–13623 (1997).
- Shin, H.J., Baek, K. H., Jeon, A. H., Park, M. T., Lee, S. J., Kang, C. M., Lee, H. S., Yoo, S. H., Chung, D. H., Sung, Y. C., McKeon, F. & Lee C. W. Dual roles of human BubR1, a mitotic checkpoint kinase, in the monitoring of chromosomal instability. *Cancer Cell* **4**, 483–497 (2003).
- Sironi, L., Melixetian, M., Faretta, M., Prosperini, E., Helin, K. & Musacchio, A. Mad2 binding to Mad1 and Cdc20, rather than oligomerization, is required for the spindle checkpoint. *EMBO J.* **20**, 6371–6382 (2001).
- Sironi, L., Mapelli, M., Knapp, S., De Antoni, A., Jeang, K.T. & Musacchio, A. Crystal structure of the tetrameric Mad1-Mad2 core complex: implications of a safety belt binding mechanism for the spindle checkpoint. *EMBO J.* **21**, 2496–2506 (2002).
- Storchova, Z., Pellman, D. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 45–54 (2004).
- Sudakin, V., Chan, G. K. & Yen, T. J. 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 (2001).
- Takahashi, T., Haruki, N., Nomoto, S., Masuda, A., Saji, S., Osada, H. & Takahashi, T. Identification of frequent impairment of the mitotic checkpoint and molecular analysis of the mitotic checkpoint genes, hSMAD2 and p53CDC, in human lung cancers. *Oncogene* **18**, 4295–4300 (1999).
- Tang, Z., Bharadwaj, R., Li, B. & Yu, H. Mad2-Independent inhibition of APC/Cdc20 by the mitotic checkpoint protein BubR1. *Dev. Cell* **1**, 227–237 (2001).
- Tao, W. The mitotic checkpoint in cancer therapy. *Cell Cycle* **4**, 1495–1499 (2005).
- Taylor, S.S., Ha, E. & McKeon, F. The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase. *J. Cell Biol.* **142**, 1–11 (1998).



- ✿ Taylor, S.S., Scott, M. I. & Holland, A. J. The spindle checkpoint: a quality control mechanism which ensures accurate chromosome segregation. *Chromosome Res.* **12**, 599–616 (2004).
- ✿ The-International-SNP-Map-Working-Group. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* **409**, 928–933 (2001).
- ✿ Tsukasaki, K., Miller, C. W., Greenspun, E., Eshaghian, S., Kawabata, H., Fujimoto, T., Tomonaga, M., Sawyers, C., Said, J.W. & Koeffler, H. P. Mutations in the mitotic check point gene, MAD1L1, in human cancers. *Oncogene* **20**, 3301–3305 (2001).
- ✿ Uhlmann, F., Nasmyth, K. Cohesion between sister chromatids must be established during DNA replication. *Curr. Biol.* **8**, 1095–1101 (1998).
- ✿ Varmus, H., Weinberg, R. A. *Genes: the Biology of Cancer* (Scientific American Library, New York, 1993).
- ✿ Vogelstein, B., Kinzler, K. W. The multistep nature of cancer. *Trends in Genetics* **9**, 138–141 (1993).
- ✿ Wang, Z., Cummins, J. M., Shen, D., Cahill, D. P., Jallepalli, P. V., Wang, T. L., Parsons, D. W., Traverso, G., Awad, M., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Willson, J. K., Markowitz, S. D., Goldberg, M. L., Karess, R., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Velculescu, V. E. & Lengauer, C. Three classes of genes mutated in colorectal cancers with chromosomal instability. *Cancer Research*, 2998–3001 (2004).
- ✿ Warburton, P.E., Cooke, C. A., Bourassa, S., Vafa, O., Sullivan, B. A., Stetten, G., Gimelli, G., Warburton, D., Tyler-Smith, C., Sullivan K. F., Poirier, G. G. & Earnshaw, W. C. Immunolocalization of CENP-A suggests a distinct nucleosome structure at the inner kinetochore plate of active centromeres. *Curr. Biol.* **7**, 901–904 (1997).
- ✿ Waters, J.C., Chen, R. H., Murray, A. W. & Salmon, E. D. Localization of Mad2 to kinetochores depends on microtubule attachment, not tension. *J. Cell Biol.* **141**, 1181–1191 (1998).
- ✿ Weaver, B., Cleveland, D. W. Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: the mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. *Cancer Cell* **8**, 7–12 (2005).
- ✿ Weaver, B.A., Bonday, Z. Q., Putkey, F. R., Kops, G. J., Silk, A. D., & Cleveland D. W. Centromere-associated protein-E is essential for the mammalian mitotic checkpoint to prevent aneuploidy due to single chromosome loss. *J. Cell Biol.* **162**, 551–563 (2003).
- ✿ Zhang, X., Horwitz, G. A., Prezant, T. R., Valentini, A., Nakashima, M., Bronstein, M. D. & Melmed, S. Structure, expression, and function of human pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol. Endocrinol.* **13**, 156–166 (1999).



- ✿ Zheng, Y., Wong, M. L., Alberts, B. & Mitchison T. Nucleation of microtubule assembly by a  $\gamma$ -tubulin-containing ring complex. *Nature* **378**, 578-583 (1995).
- ✿ Zhou, X.Z., Perrem, K. & Lu, K. P. Role of Pin2/Trfi in telomere maintenance and cell cycle control. *J. Cell Biochem.* **89**, 19-37 (2003).
- ✿ Zou, H., McGarry, T. J., Bernal, T. & Kirschner, M. W. Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. *Science* **285**, 418-422 (1999).



## **ANEXOS**



## Abreviaturas utilizadas en el texto

APC/C	Anaphase Promoting Complex/Cyclosome
A	Adenina
aa	aminoácido
BUBR1	BUB1-Related protein
BUB1	Budding Uninhibited by Benzimidazole 1
BUB3	Budding Uninhibited by Benzimidazole 3
C-MAD2	Closed-MAD2
C-terminal	Carboxilo-terminal
CDC20	Cell Division Cycle homologue 20
CDK1	Cyclin Dependent Kinase 1
CENP-A	CENtromere Protein A
CENP-E	CENtromere Protein E
CENP-M	CENtromere Protein M
CENP-N	CENtromere Protein N
CENP-T	CENtromere Protein T
COMT	Centro Organizador de MicroTúbulos
CREST	Calcinosis-Raynaud's phenomenon-Esophageal dismobility-Sclerodactyly Telangiectaxis
DNA	DeoxyriboNucleic Acid
G	Guanina
H	Histidina
HTLV-1	Human T-Lymphotropic Virus 1
IC	Inestabilidad Cromosómica
INCENP-1	Inner CENtromere Protein-1
iRNA	interference RiboNucleic Acid
MAD1	Mitotic Arrest Deficient 1
MAD2	Mitotic Arrest Deficient 2
MAD3	Mitotic Arrest Deficient 3
MCC	Mitotic Checkpoint Complex
MPS1	MonoPolar Spindle 1
N-terminal	Amino-terminal
NEK2A	NIMA-rElated Kinase 2A
NIMA	Never In Mitosis A
O-MAD2	Open-MAD2
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMHM	Punto de Monitoreo del Huso Mitótico
R	Arginina
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
ROD	RQughDeal
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSLP	Simple Sequence Length Polymorphism
STR	Short Tandem Repeats
TRF1	Telomeric Repeat Binding Factor 1
TXBP181	TAX Binding Protein 181
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
ZWINT-1	ZW INTeractor-1
ZW10	Zeste White 10



## Abreviaturas de medidas y reactivos

nm	nanómetros
µm	micras (micrómetros)
pb	pares de bases
kb	kilobases
kDa	kilodaltones
ml	mililitros
EDTA	del inglés <i>Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid</i> , ácido etileno-diamino-tetra-acético
°C	grados Celsius
h	horas
min	minutos
SSC	del inglés <i>Saline Sodium Citrate</i> , citrato de sodio salino
x G	unidades de fuerza centrífuga relativa (del inglés <i>relative centrifuge force</i> , rcf)
M	molar
µl	microlitros
SDS	del inglés <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> , dodecil sulfato de sodio
mg	miligramos
TE	<i>buffer</i> compuesto por Tris y EDTA
TBE	<i>Tris-Borato-EDTA</i>
DNTPs	del inglés <i>Deoxy-riboNucleotide TriPhosphate</i> , deoxi-ribonucleótidos trifosfatados, dATP, dCTP, dGTP y dTTP
µM	micromolar
Taq polimerasa	enzima utilizada en la PCR proveniente de la bacteria <i>Thermophilus aquaticus</i>
ng	nanogramos
pmoles	picomoles
ANE	<i>Aminoácidos No Esenciales</i>
RPMI 1640	medio de cultivo de linfocitos desarrollado en el <i>Roswell Park Memorial Institute</i> por Moore y colaboradores en 1976 <sup>1</sup> , de ahí las siglas
DMSO	<i>DiMetil SulfÓxido</i>
µg	microgramos
nM	nanomolar
PBS	del inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i> , <i>buffer</i> salino de fosfatos
L-glut	<i>L-glutamina</i>
SBF	<i>Suero Bovino Fetal</i>
seg	segundos
cm <sup>3</sup>	centímetros cúbicos
mM	nanomolar
NaCl	cloruro de sodio
KCl	cloruro de potasio
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono

1. Moore, G.E. and Woods L.K., (1976). Culture Media for Human Cells- RPMI 1603, RPMI 1634, RPMI 1640 and GEM 1717. Tissue Culture Association Manual. 3, 503-508.





## Glosario

**Adenocarcinomas.** Tipo de cáncer que se origina en tejido glandular. El término deriva de “adeno” que significa *perteneciente a una glándula* y “carcinoma” que describe un cáncer que se ha desarrollado en las células epiteliales.

**Aneuploidía.** Evento mediante el cual una célula manifiesta diferencias en el número cromosómico con respecto al número euploide. Se origina principalmente por errores en los mecanismos de segregación.

**Áster.** Arreglo radial manifestado por los microtúbulos que emanan de los centrosomas ubicados en los polos del huso mitótico.

**Angiogénesis.** Mecanismo que implica la formación de vasos sanguíneos a partir de la red preexistente. En el desarrollo de cáncer, la angiogénesis es el evento que les permite a las células tumorales obtener el suministro de nutrientes y oxígeno necesario para seguir proliferando, además de constituir el medio por el cual las células tumorales pueden transportarse e infiltrarse en otros tejidos.

**Apoptosis.** Muerte celular programada mediada por zimógenos (proteínas que para ser activadas requieren un corte proteolítico) denominados caspasas, ya sea por estímulos externos o internos. La consecuencia de este tipo de muerte es la formación de vesículas con un contenido de DNA constante que es fagocitado por las células adyacentes.

**Carcinogénesis.** Proceso mediado por factores exógenos y endógenos que derivan en la capacidad de una célula para iniciar la transformación maligna (Proliferación y sobrevivencia).

**Centrómero.** Región constreñida de DNA en un cromosoma cuya función es mantener a las cromátidas hermanas juntas. Es además el sitio donde se forma el cinetocoro.

**Centrosoma.** Organelo (compuesto principalmente por un par de centriolos) localizado en los polos del huso mitótico. Tiene como función la organización de los microtúbulos, véase *COMT*.

**Cinetocoro.** Complejo proteico adyacente al centrómero que rige la unión de los microtúbulos del huso a los cromosomas.

**Codón.** Grupo de tres bases nitrogenadas que codifica para un aminoácido.

**Cohesinas.** Proteínas distribuidas a lo largo de las cromátidas hermanas, que tienen como función mantener unidas a estas últimas hasta el inicio de la anafase.

**Complejo anular de  $\gamma$  tubulina.** Complejo formado por  $\gamma$ -tubulina y otras proteínas, a partir del cual emanan los microtúbulos.

**COMT.** Centro Organizador de MicroTúbulos. Región en la célula (conocida también como centrosoma) compuesta por un par de centriolos rodeada por una matriz de material amorfo. A partir de esta región se lleva a cabo el crecimiento de microtúbulos)

**CREST.** Síndrome que corresponde a una forma cutánea limitada de la esclerodermia y que posee una fuerte relación con los anticuerpos anticentrómero.

**Cromatina.** Se conoce de esta manera al complejo de DNA y proteínas que constituye a los cromosomas eucariontes.

**Cromosoma.** Estructura presente en el núcleo celular compuesta de cromatina, que contiene a los genes. Se visualiza durante el momento en que la célula se divide (metafase)

**DNA.** Del inglés *DeoxyriboNucleic Acid* (ácido desoxirribonucleico). Ácido nucleico de doble cadena que contiene información genética codificada en la forma de secuencias específicas de los nucleótidos que lo constituyen.

**Euploide.** Condición genética en la que se mantienen juegos cromosómicos completos con respecto al número haploide.

**Exón.** Cada una de las regiones de un gen que contienen la información para producir la proteína codificada en el gen. Cada exón codifica una región específica de la proteína completa. En eucariotas los exones de un gen están separados por regiones largas de ADN (llamadas intrones) que no codifican.

**Fenotipo.** La expresión del genotipo en un determinado ambiente. Los rasgos fenotípicos incluyen rasgos tanto físicos como conductuales.

**Fibroblastos.** Tipo de célula residente del tejido conectivo propiamente dicho, ya que nace y muere allí. También se la denomina "célula fija" Sintetiza fibras y mantiene la matriz extracelular del tejido de muchos animales.



**Fragmentos acéntricos.** Fragmentos cromosómicos carentes de la región centromérica, por lo que no se segregan correctamente.

**Gen.** Secuencia determinada de nucleótidos de uno de los lados de la escalera del cromosoma referenciado. La secuencia puede llegar a formar proteínas, o inhibir esta información, dependiendo del programa asignado para la célula portadora.

**Genoma.** La información genética (DNA) total de un organismo o de una célula.

**Genotipo.** El contenido genético (el genoma específico) de un individuo, en forma de ADN. Junto con la variación ambiental que influye sobre el individuo, codifica el fenotipo del individuo.

**HCT116.** Línea celular de cáncer de colon, que tiene la característica de manifestar un punto de monitoreo del huso mitótico estable.

**HeLa.** Línea celular derivada de cáncer cervicouterino.

**Helicobacter pylori.** Bacteria gram-negativa que desarrolla gastritis crónica, predisponiendo a un individuo al desarrollo de adenocarcinoma gástrico.

**Histonas.** Proteínas pequeñas con carga positiva (básicas) presentes en el núcleo y que se unen al DNA (con carga negativa).

**HTLV-1.** Del inglés *Human T-Lymphotropic Virus 1*, virus linfotrófico humano de células T. Retrovirus que promueve el desarrollo de la leucemia de células T.

**Huso mitótico.** Arreglo de microtúbulos y moléculas asociadas que se forma entre los polos opuestos de la célula eucarionte durante la mitosis y que sirve para dirigir el movimiento de los cromosomas duplicados.

**MCC.** *Mitotic Checkpoint Complex* (Complejo del Punto de Monitoreo de la Mitosis, CPMM). Complejo formado por MAD2, BUBR1 y BUB3 que se encarga de retener a CDC20, evitando así la activación de APC/C y la progresión del ciclo celular hacia la anafase

**Meiosis.** Proceso en el cual una célula diploide experimenta dos divisiones nucleares sucesivas (meiosis I y II), con la potencialidad de producir cuatro núcleos haploides. Conduce a la formación de gametos en animales y esporas en plantas.

**Microtúbulos.** Estructura cilíndrica y hueca constituida por sub-unidades de tubulina. Son componentes importantes del citoesqueleto, y se encuentran en el huso mitótico, cilios, flagelos y centriolos.

**Mitosis.** División del núcleo celular, que da por resultado (en condiciones normales) dos núcleos hijos con el mismo número de cromosomas que el núcleo progenitor.

**Nucleosoma.** Unidad repetitiva de estructura cromatínica, compuesta por un segmento de DNA que gira alrededor de un complejo de ocho histonas (dos de cuatro tipos distintos) más una región de DNA de unión asociada con una quinta histona.

**No disyunción.** Evento en el que ambas cromátidas hermanas son atraídas hacia el mismo polo del huso (unión sintética).

**Paclitaxel.** Agente quimioterapéutico que se utiliza en el tratamiento del sarcoma de Kaposi, cáncer de mama, ovario, pulmón, cabeza y cuello y muchos otros tipos de cáncer. El paclitaxel se elabora con las hojas y la corteza de ciertos tipos de tejos, siendo el más común el *Taxus brevifolia*. Actúa estabilizando microtúbulos al unirse a la beta-tubulina e impedir el intercambio de GDP por GTP:

**PMHM.** Punto de Monitoreo del Huso Mitótico. Mecanismo celular formado por un complejo de proteínas, cuya función es promover el arresto del ciclo celular en metafase cuando existen errores de reconocimiento entre los microtúbulos y los cinetocoros.

**Polimorfismo.** Alelo estable que está presente al menos en el 1% de la población

**Proteosoma.** Complejo proteico de gran tamaño ubicado en el citoplasma de una célula. Es el responsable de la degradación de proteínas que han sido marcadas para su destrucción por medio de la unión de moléculas de ubiquitina. **RNAi.** RNA (*Ribonucleic Acid*, ácido ribonucleico) de interferencia. RNA de doble cadena que interviene en el silenciamiento génico post-transcripcional, induciendo la degradación de transcritos endógenos homólogos. Mediante la implementación de este tipo de RNA, es posible evaluar el efecto de la reducción o pérdida de la actividad de un gen de interés.

**Rezag cromosómico.** Evento en el que una cromátida no es reconocida por los microtúbulos del huso (unión monotética), lo que deriva en la generación de una aneuploidía. Puede manifestarse también cuando una cromátida es reconocida por microtúbulos de ambos polos del huso (unión merotética).



**RFLP.** Del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*, polimorfismo de tamaño de fragmento por enzima de restricción. Técnica que permite determinar los SNP's mediante digestiones alelo-específicas, esto es, con base en el reconocimiento o no de una secuencia determinada como sitio de corte para una enzima.

**Securina.** Proteína inhibidora que se une a la separasa, impidiendo la separación de las cromátidas hermanas hasta el comienzo de la anafase.

**Segregación.** Distribución de los cromosomas hacia los polos del huso mitótico llevada a cabo durante la anafase.

**Separasa.** Enzima encargada de la degradación de ciertas sub-unidades de las cohesinas, lo que permite la separación de las cromátidas hermanas, y por tanto, la segregación.

**Telómeros.** Región terminal de un cromosoma, con una secuencia de DNA no codificante y altamente repetitiva. Se encarga de mantener una estabilidad estructural y se acorta en cada ciclo de replicación.

**Tubulina.** Sub-unidad proteica de los microtúbulos. Mientras que la sub-unidad  $\gamma$  de la tubulina rodea el centrosoma, las sub-unidades  $\alpha$  y  $\beta$  se asocian, promoviendo el crecimiento de los microtúbulos desde los polos hacia el ecuador de la célula en división.

**Ubiquitin ligasa.** Enzima que une moléculas de ubiquitina a una proteína, señalizando la destrucción de esta última por medio del proteosoma. El proceso llevado a cabo por esta enzima se denomina ubiquitinación.

**Vinca-alcaloides.** Juego de drogas que son derivadas de la planta del bígaro, *Catharanthus roseus* (también *Vinca rosea*, *Lochnera rosea*, y *Ammocallis rosea*). Son utilizadas para el tratamiento del cáncer, ya que impiden la polimerización de la tubulina.

**Virus de Epstein-Barr.** Virus de la familia de los herpesvirus (que incluye *Herpes simplex* y citomegalovirus o CMV), es uno de los virus más comunes en humanos.