



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL POLIMORFISMO *MAD1* 1673 G→A EN EL
FUNCIONAMIENTO DEL PUNTO DE MONITOREO DEL HUSO MITÓTICO

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
MIGUEL SANTIBÁÑEZ ANDRADE

DIRECTOR DE TESIS
DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
COMITÉ TUTOR
DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DR. FABIO ABDEL SALAMANCA GÓMEZ
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

MÉXICO, D. F. MAYO DE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL POLIMORFISMO
MAD1 1673 G→A EN EL FUNCIONAMIENTO DEL
PUNTO DE MONITOREO DEL HUSO MITÓTICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

MIGUEL SANTIBÁÑEZ ANDRADE

DIRECTOR DE TESIS:

DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO

COMITÉ TUTOR:

DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE

DR. FABIO ABDEL SALAMANCA GÓMEZ

DOCTORADO
en
CIENCIAS
BIOMÉDICAS

MÉXICO, D.F. MAYO DE 2013

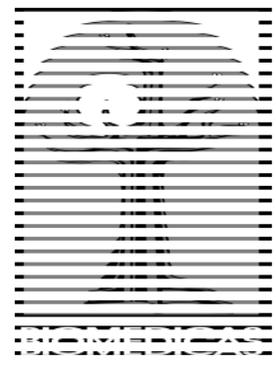


DOCTORADO en CIENCIAS BIOMÉDICAS

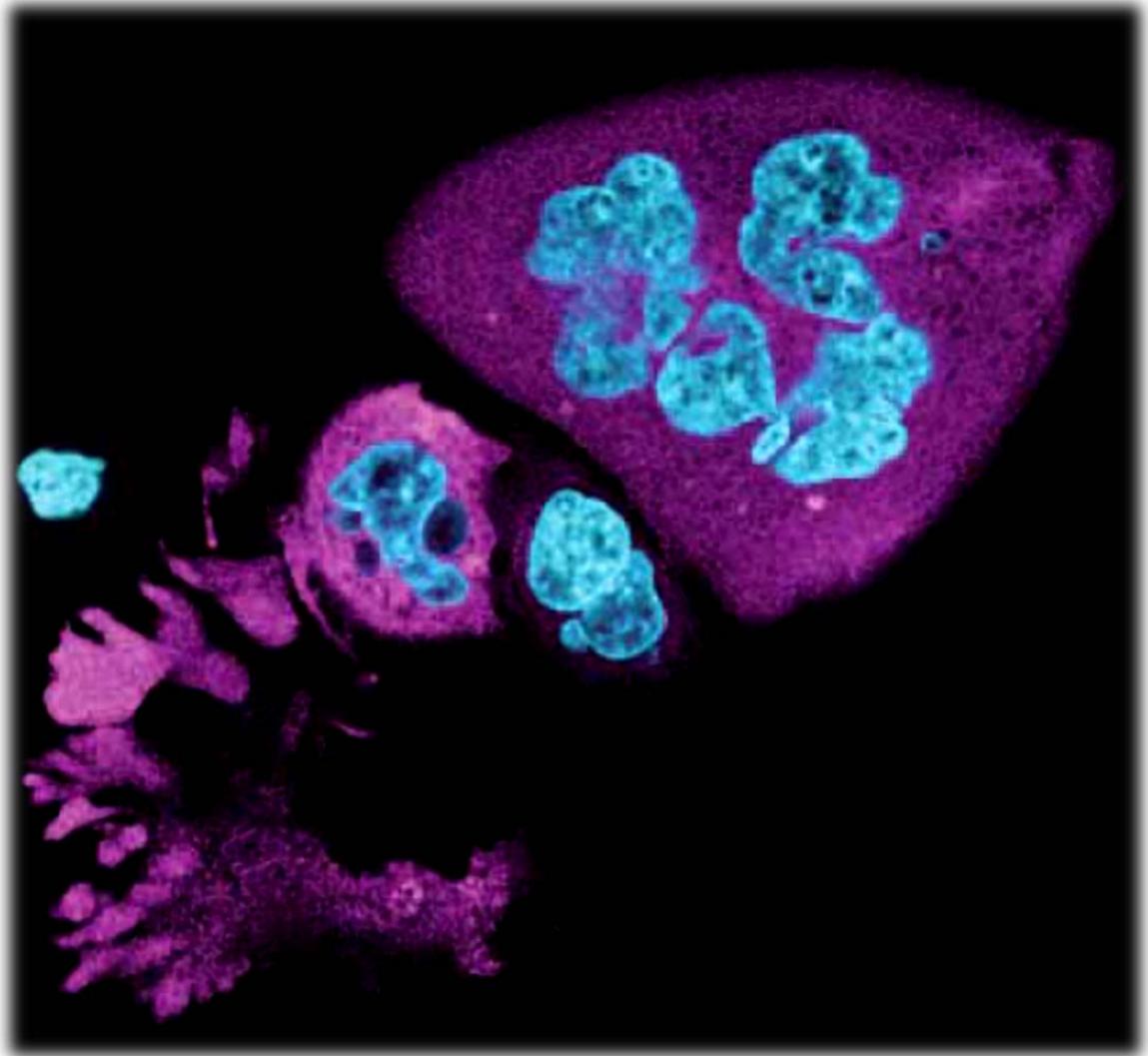
La Tesis que se presenta a continuación fue realizada en el Laboratorio de Carcinogénesis, dentro de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer (UIBC) del Instituto Nacional de Cancerología (INCan), bajo la dirección del Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo y con el apoyo técnico de la M. en I.B.B. Clementina 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 es resultado de la formación profesional adquirida dentro del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM. El proyecto de investigación contó con el apoyo del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT: IN213311), del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT: 83959) y del INCan. Agradezco al CONACYT por el apoyo otorgado mediante el programa de becas para la realización de estudios de posgrado.



*A Carlos,
Por enseñarnos a llenar cada día
de colores y texturas.*



AGRADECIMIENTOS...

A mi familia, por el apoyo recibido desde el primer día de esta aventura científica. Por impulsarme siempre a construir un proyecto de vida, brindándome las herramientas necesarias para alcanzar este logro. Los amo.

A Luis, por doblar la apuesta a mi trabajo y apoyarme nuevamente en la obtención de un grado académico. Pero sobretodo, por promover el crecimiento personal y profesional de sus alumnos. Muchas gracias por brindarme durante estos años, tu amistad, confianza y consejo. Espero haber cumplido con tus expectativas como alumno y como amigo.

Al Dr. Mariano Martínez, el Dr. Jaime Mas, la Dra. Carmen Aceves y el Dr. Luis Benítez, por sus acertados consejos y su valiosa orientación en la elaboración de este escrito.

A mi otra familia, el Laboratorio de Carcinogénesis. Gracias por todas las palabras de aliento y por ayudarme a capitalizar este logro. A Clemen, por el apoyo y cariño que desde hace tiempo nos ha permitido trabajar en equipo y construir una excelente amistad. A Marco, mi camarada con el que he compartido este camino desde el principio, gracias por tantos años de amistad, y que siga la cuenta. A Julia, el lado femenino del sendero, gracias por tu amistad y el sinfin de anécdotas lindas, por la ayuda desinteresada que muestras en todos. A Eunice, Rodrigo, Alex, José, Didier y César por brindarme su amistad y su apoyo en todo momento. A Manuel, Diego, Rodrigo Jr, Ernesto y Daniela, por alentarme con sus palabras a ser mejor. A Fer, Aurea, Iván, Víctor, Angie, Iliana, Liss, Yair, Gil, Irving, Vivian y Jone.

A la familia Hesselbart Márquez, a nombre de todo el Laboratorio, nuestro cariño y nuestro homenaje a Carlitos, Andrea y Pepe.

A los miembros de la “Hora del té”, Erika, Itzel, Dave, Luis y Javier. Por la hermandad y por los buenos momentos que hemos pasado juntos.

Al escuadrón de UNIVERSUM, por llenar mi memoria de increíbles momentos. A Paty, Lalo, Croma, Jaz, Mel, Eze, Rodro, George y Sera.

A Silvia, Karla, Tania, Ileana, Bere, Miri, Laila, Sol, Lisandro, Miguel, Yiré, Diana, Pablo, Julio y a la Facultad de Ciencias, por hacernos coincidir en una etapa que atesoro.

A Kika, por ser, desde hace más de 7 años, la mirada que me impulsa. Por compartir conmigo este proceso, con los múltiples retos que generó esta travesía. Por dejarme construir a tu lado una vida, planteando metas que poco a poco, vamos alcanzando. Te amo.

A la UNAM, por haberme dado desde el bachillerato, la oportunidad de construir un futuro.
Por mi raza hablará el espíritu...

ÍNDICE

RESUMEN	- 4 -
ABSTRACT	- 5 -
INTRODUCCIÓN	- 6 -
Mitosis	- 6 -
Segregación cromosómica.....	- 9 -
Estructura y función del cinetocoro	- 14 -
El punto de monitoreo del huso mitótico	- 17 -
Aneuploidías e Inestabilidad Cromosómica.....	- 22 -
Alteraciones en el punto de monitoreo del huso mitótico	- 28 -
Aneuploidías y cáncer.	- 30 -
Polimorfismos de DNA.....	- 33 -
<i>MAD1</i> . Estructura, función e importancia.....	- 37 -
El polimorfismo MAD1 1673 G→A.....	- 40 -
Cáncer de ovario.....	- 43 -
Tratamiento del cáncer de ovario avanzado. El papel de la quimioterapia de inducción	- 45 -
Mecanismos de acción y resistencia al cisplatino y sus análogos.....	- 48 -
Mecanismos de acción y resistencia a taxanos.....	- 49 -
Factores pronósticos en cáncer epitelial de ovario avanzado.....	- 50 -
Polimorfismo <i>MAD1</i> 1673 G→A y su posible asociación con la respuesta al tratamiento con paclitaxel	- 52 -
JUSTIFICACIÓN.....	- 53 -
RELEVANCIA E IMPACTO	- 54 -
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	- 55 -
HIPÓTESIS	- 56 -
OBJETIVOS.....	- 56 -
Objetivo general	- 56 -
Objetivos particulares.....	- 56 -
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	- 57 -
MATERIAL Y MÉTODOS	- 64 -
Condiciones de muestreo	- 64 -
Aislamiento de DNA genómico	- 64 -
Análisis del genotipo.....	- 66 -

Amplificación del exón 17 de <i>MAD1</i>	- 66 -
Determinación del genotipo por RFLP	- 67 -
Determinación del genotipo por secuenciación	- 68 -
Citometría de flujo	- 71 -
Aislamiento de linfocitos	- 71 -
Condiciones de cultivo y tiempos de exposición	- 71 -
Fijación y tinción celular.....	- 72 -
Lectura de experimentos, obtención y análisis de datos	- 73 -
Índice mitótico.....	- 73 -
Condiciones de cultivo y tiempos de exposición	- 73 -
Fijación celular y preparación de laminillas	- 74 -
Condiciones del conteo y análisis de resultados	- 74 -
Ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis	- 75 -
Condiciones de cultivo y tiempos de exposición	- 75 -
Fijación celular y preparación de laminillas	- 76 -
Condiciones del conteo y análisis de resultados	- 76 -
FISH	- 77 -
Condiciones de hibridación.....	- 77 -
Conteo de micronúcleos positivos para centrómero y de eventos de no disyunción	- 78 -
DISEÑO DEL ESTUDIO EN PACIENTES CON CÁNCER DE OVARIO	- 79 -
Población.....	- 79 -
Criterios de selección	- 79 -
Criterios de inclusión	- 80 -
Criterios de exclusión.....	- 80 -
Criterios de eliminación	- 81 -
Aislamiento de DNA genómico y análisis del genotipo	- 81 -
FISH en muestras tumorales	- 81 -
Pretratamiento y condiciones de hibridación	- 81 -
Conteo celular	- 83 -
Evaluación de la respuesta al tratamiento con CBP-PTX.....	- 83 -
Variables Independientes	- 83 -
Variables Dependientes.....	- 84 -
RESULTADOS.....	- 85 -
El genotipo AA de Mad1 1673 G→A se presenta en individuos sanos, siendo esta condición más frecuente en pacientes con cáncer de ovario.....	- 85 -

El polimorfismo <i>MAD1</i> 1673 G→A afecta la funcionalidad del PMHM	- 85 -		
El polimorfismo <i>MAD1</i> 1673 G→A se asocia a una mayor frecuencia de células aneuploides . -	88 -		
El polimorfismo <i>MAD1</i> 1673 G→A se asocia a un mayor grado de aneuploidía en tumores de	pacientes con cáncer de ovario avanzado.....	- 88 -	
El polimorfismo <i>MAD1</i> 1673 G→A se asocia a una menor respuesta a la quimioterapia de	inducción, citorreducción óptima y sensibilidad al tratamiento en pacientes con cáncer de	ovario avanzado.....	- 92 -
DISCUSIÓN.....	- 95 -		
CONCLUSIONES	- 105 -		
LITERATURA CITADA.....	- 106 -		
ANEXOS.....	- 118 -		
ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TEXTO	- 119 -		
ABREVIATURAS DE MEDIDAS Y REACTIVOS	- 121 -		
ARTÍCULO.....	- 122 -		

RESUMEN

Título: Determinación del efecto del polimorfismo *MAD1* 1673 G→A en el funcionamiento del punto de monitoreo del huso mitótico (PMHM).

Antecedentes: Mitotic Arrest Deficient 1 (*MAD1*), es una proteína del punto de monitoreo del huso mitótico que reconoce a *MAD2* a través de dos zippers de leucina, transportándola y activándola para promover una señal de arresto en metafase. Se ha descrito un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en *MAD1* capaz de alterar la función del PMHM, lo que puede estar relacionado a una mala respuesta a agentes terapéuticos que alteran la dinámica de microtúbulos.

Objetivo: El objetivo de este estudio fue examinar la relación del polimorfismo *MAD1* 1673 G→A (rs1801368) con la eficiencia del PMHM, la generación de aneuploidías y la respuesta a la terapia en pacientes con cáncer de ovario avanzado (PCOA).

Material y métodos: Se evaluó el polimorfismo en 144 individuos sanos y 91 pacientes. El arresto mitótico y la presencia de errores en la segregación fue analizado en cultivos de linfocitos humanos tratados con nocodazol (NDZ) y paclitaxel (PTX). Además, se evaluaron los errores en la segregación en 27 biopsias de pacientes. La respuesta a la quimioterapia y sobrevida fue analizada con base en el polimorfismo *MAD1* 1673 G→A en 74 PCOA.

Resultados: Las frecuencias alélicas en individuos sanos fueron G: 50, A: 50, mientras que en pacientes fueron G: 38%, A: 62% ($p < 0.05$). El porcentaje de células con arresto mitótico fue mayor en células GG ($p < 0.05$). La frecuencia de micronúcleos y eventos de no disyunción se incrementó en las células AA ($p < 0.05$). Los tumores de pacientes polimórficos tuvieron un mayor porcentaje de células aneuploides ($p < 0.05$). Los pacientes GG mostraron una mayor respuesta bioquímica, citorreducción óptima y sensibilidad al tratamiento. No existieron diferencias en la sobrevida libre de progresión y sobrevida global al comparar los grupos.

Conclusión: El polimorfismo *MAD1* 1673 G→A altera la funcionalidad del PMHM, aumentando la frecuencia de células aneuploides. Este polimorfismo modifica la respuesta a agentes que alteran la dinámica de microtúbulos en PCOA.

ABSTRACT

Title: Determination of *MAD1* 1673 G→A polymorphism effect in the mitotic spindle assembly checkpoint function.

Background: Mitotic arrest deficient 1 (*MAD1*), a protein of the mitotic spindle assembly checkpoint (SAC), recognizes *MAD2* through two leucine zippers, transporting and activating *MAD2*, which promotes a metaphase arrest signal. A single nucleotide polymorphism (SNP) of *MAD1* was found to affect the SAC function that could be involved in a bad response to therapeutic agents that alter the dynamics of microtubules.

Objective: The aim of this study was to examine the relationship of the polymorphism *MAD1* 1673 G→A (rs1801368) with the efficiency of the SAC, the generation of aneuploidies, and with the therapeutic response of patients with advanced ovarian cancer (AOC).

Methods: The polymorphism was evaluated in 144 healthy individuals and 91 patients. Mitotic arrest and the presence of errors in segregation were analyzed in cultured human lymphocytes treated with nocodazole (NDZ) and paclitaxel (PTX). Errors in segregation were also evaluated in 27 biopsies of patients. Chemotherapy response and survival were analyzed in 74 AOC, according to *MAD1* 1673 G→A polymorphism

Results: Allele frequencies in healthy individuals were G: 50, A: 50, whereas in the patients, they were G: 38%, A: 62% ($p < 0.05$). The percentage of cells with mitotic arrest was higher among GG cells ($p < 0.05$). The frequency of micronuclei and nondisjunction events increased in AA cells ($p < 0.05$). Tumors from polymorphic patients had a higher percentage of aneuploid cells ($p < 0.05$). The GG patients showed a higher biochemical response, optimal cytoreduction and sensitivity to the treatment. There were no differences in progression-free or overall survival between both groups.

Conclusions: The polymorphism *MAD1* 1673 G→A affects the SAC functionality, increasing the frequency of aneuploid cells. This polymorphism modifies the response to agents that alter the dynamics of microtubules in AOC.

INTRODUCCIÓN

Mitosis

El término mitosis (del griego *mitoss*, hebra o filamento) fue acuñado por Walter Flemming en 1879, al observar la división longitudinal de los cromosomas. En un inicio, la mitosis fue definida como el periodo en que los cromosomas se encuentran condensados (visibles). No fue sino hasta 1884 que Strasburger acuñó los términos profase, metafase y anafase para referirse a los diferentes estadios de la división celular [1].

La mitosis incluye diversos eventos cuya finalidad es la generación de dos células hijas, en principio, genéticamente idénticas [2]. Las fases de la mitosis forman una secuencia dinámica, en la que ciclos independientes, como la condensación de los cromosomas, los cambios de conformación del citoesqueleto y la duplicación y posicionamiento de los centrosomas se coordinan para cumplir con las condiciones necesarias para la división

Durante la interfase, la célula aumenta en tamaño debido a la duplicación de DNA y organelos. El centrosoma, estructura que rige en mayor parte el movimiento de los cromosomas durante la mitosis es duplicado durante esta fase.

Los centrosomas son organelos que junto con los microtúbulos del huso conforman el centro organizador de microtúbulos (COMT) en células eucariontes. Lo compone un par de centriolos, rodeados por una serie de proteínas que forman la matriz del centrosoma.

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. Los centrosomas formados se mantienen unidos por las proteínas C-NAP1 y ROOTELINAS. Para que se lleve a cabo la separación de centrosomas, estas dos proteínas deben disociarse mediante fosforilaciones promovidas por NEK2A. Para que NEK2A actúe, las cinasas PLK1, actúan río arriba en la regulación del complejo MST2-NEK2A, fosforilando a MST2, y previniendo la unión de PP1 y a dicho complejo. Esto permite la activación de NEK2A y, por lo tanto, la separación de los centrosomas [3]. Después de la mitosis, los centriolos pierden su organización ortogonal, permitiendo la duplicación de estas estructuras en la fase S [4].

Los microtúbulos son componentes importantes del citoesqueleto, sirviendo de anclaje a proteínas motoras de transporte intracelular como CINESINAS y DINEÍNAS, proteínas estructurales y proteínas pertenecientes al sistema de control del ciclo celular. Por lo tanto, su papel en la célula es primordial.

Los microtúbulos se forman a partir de subunidades, compuestas por un heterodímero formado a partir de dos proteínas globulares fuertemente relacionadas llamadas α -TUBULINA y β -TUBULINA. Mientras que α y β -TUBULINA constituyen los microtúbulos, la γ -TUBULINA participa en el proceso de polimerización. En conjunto con proteínas accesorias, la γ -TUBULINA conforma el complejo anular, que sirve como templado para la polimerización de microtúbulos. La matriz del centrosoma contiene más de 50 copias del complejo anular de γ -TUBULINA. Conservado desde levaduras hasta seres humanos, el complejo anular de γ -TUBULINA promueve la nucleación de los

microtúbulos. Los protofilamentos mantienen un arreglo radial, donde existen extremos negativos y extremos positivos. La elongación ocurre hacia el extremo positivo. Los extremos positivos exponen subunidades β , mientras que los extremos negativos exponen subunidades α [5]. El arreglo radial permite un rápido crecimiento y proyección de microtúbulos hacia el perímetro celular. Durante la mitosis, los microtúbulos se polimerizan y despolimerizan constantemente, estableciendo la longitud y la fuerza necesaria para el anclaje y migración de las cromátidas hacia los polos del huso [6].

Durante la interfase, los cromosomas pueden ser vistos como filamentos elongados. Al inicio de la profase, cada cromosoma se une a la envoltura nuclear y se organiza en estructuras dobles (cromátidas hermanas). 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 [7]. La prometáfase comienza con el rompimiento de la envoltura nuclear. El huso mitótico empieza a conformarse y los COMT se alejan para formar los polos. Los cromosomas empiezan a ser reconocidos por microtúbulos, lo que promueve su movimiento [4]. En la metafase, los cromosomas se organizan en la placa ecuatorial, conservando la misma distancia hacia ambos centrosomas. Las cromátidas hermanas se unen, por medio del cinetocoro, a microtúbulos provenientes de polos opuestos. En la anafase, la longitud de los microtúbulos se reduce, permitiendo la separación sincrónica de las cromátidas hermanas y su migración a los polos. Después de agruparse los complementos cromosómicos, la telofase inicia con la descondensación de la cromatina y el reensamblaje de la envoltura nuclear alrededor de la misma (*Fig. 1*) [7]. Junto con su complemento cromosómico, cada célula hija conserva un centrosoma [4].

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 división celular [7, 8].

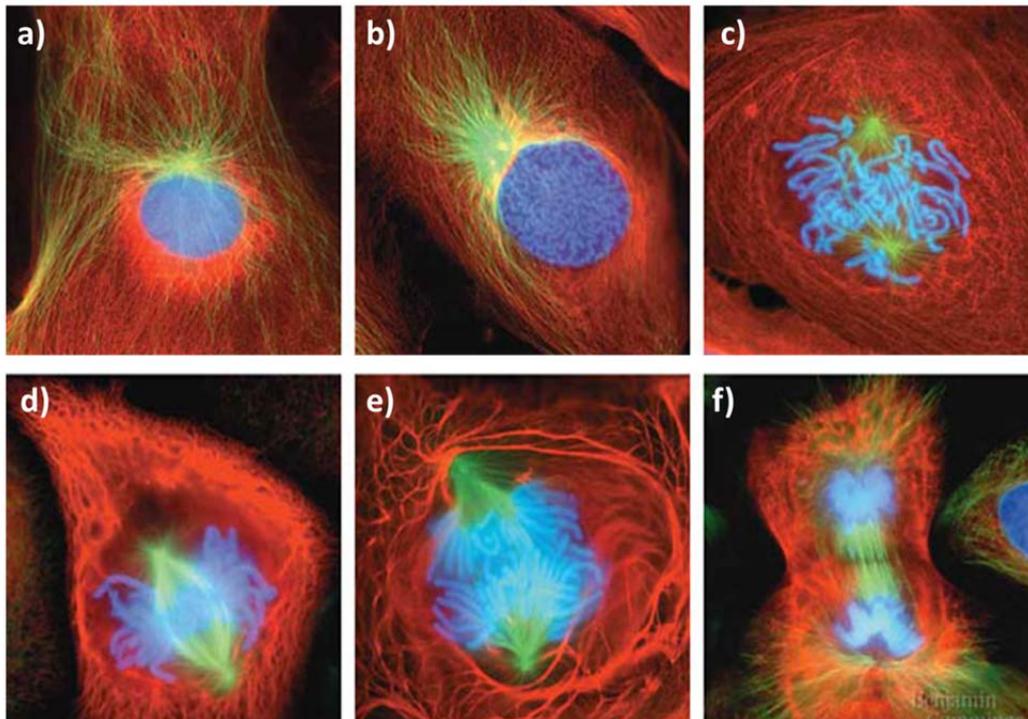


Figura 1. Las diferentes fases que componen las mitosis, obtenidas mediante microscopía confocal. En rojo, el citoesqueleto; en verde, los microtúbulos; en azul el DNA. a) Interfase G2, b) Profase, c) Prometáfase, d) Metafase, e) Anafase y f) Telofase. Pearson Education, Inc., publicado por Benjamin Cummings.

Segregación cromosómica

El ciclo celular garantiza la transmisión del material genético, mediante la división y la generación de dos células. En 1879, Flemming utilizó una serie de colorantes para teñir

el material dentro del núcleo, distribuido en forma de pequeños gránulos. A este material se le denominó cromatina. Posteriormente, en 1888, el anatomista alemán Wilhelm Von Waldeyer utilizó por primera vez el término cromosoma para referirse a las estructuras filamentosas con tinción positiva observadas al microscopio durante la mitosis [9].

En células eucariontes, el DNA se asocia a proteínas empaquetadoras. A esta asociación se le conoce como cromatina. En ciertas regiones, el DNA tiene un empaquetamiento de menor densidad. A este material se le denomina eucromatina, y aparece disperso en el núcleo, ocupando la mayor parte de este. Otras regiones son empaquetadas casi con la misma densidad que el cromosoma mitótico. A este material se le denomina heterocromatina y está localizada comúnmente en la región centromérica y pericentromérica. La heterocromatina puede ser constitutiva, cuando su condición de empaquetamiento es constante a lo largo del ciclo celular, o facultativa, cuando tiende a empaquetarse fuertemente. Existen regiones de DNA que continuamente cambian su estado de heterocromático a eucromático y viceversa. De esta manera se permiten estados alternativos de empaquetamiento para que la interfase y la división transcurran [7].

En la interfase, la unidad fundamental es el nucleosoma, 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). El nucleosoma presenta una forma cilíndrica de 11 nm de diámetro por 6 nm de altura [10]. Un segmento de cromatina se compone de múltiples nucleosomas, y entre estos se

mantiene un segmento de DNA vinculado a la histona H1. En el cromosoma metafásico, las dos moléculas de DNA condensadas corresponden a las cromátidas hermanas, asociadas principalmente por el centrómero. Las secuencias terminales en los brazos de los cromosomas conforman los telómeros. Durante la prometafase 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 μm (*Fig. 2*) [2].

El centrómero es una región cromosómica importante durante la segregación. Regula y promueve el movimiento de los cromosomas durante la mitosis y la meiosis a través de su interacción con los microtúbulos del huso. Los centrómeros son dominios de heterocromatina diferenciados, determinados por la composición y la organización de la cromatina que subyace en ellos. Sirven como el sitio de reconocimiento de diversas proteínas que, al trabajar en conjunto forman el cinetocoro, estructura que actúa como el sitio de unión de los microtúbulos del huso [11, 12].

En la mayoría de los eucariontes, la identidad del centrómero está determinada por la presencia de la variante de histonas H3 (llamada CENP-A en humanos). Se sabe que CENP-A se incorpora a la región centromérica, y se mantiene durante el ciclo celular mediante mecanismos epigenéticos [13].

CENP-A interviene en la delimitación del centrómero, acoplado a proteínas CENP-T/W. Este complejo es necesario para la segregación cromosómica en cada ciclo celular y se ensambla mediante mecanismos de intercambio durante la fase S y G2 [12]

La estructura del centrómero acoplada a CENP-A involucra una mayor compactación. A diferencia del ensamblaje canónico de histonas en la fase S, CENP-A se acopla en telofase y G1 [13]. En nucleosomas del satélite alfa, el DNA se enrolla alrededor del octámero de histonas, el cual contiene dos H2-A, dos H2-B, dos H4 y dos CENP-A. A diferencia de octámeros con H3, los octámeros con CENP-A exponen únicamente 121 bases centrales del DNA en un nucleosoma. La hélice alfa N, importante para la orientación, es más corta en CENP-A que en H3 [14].

El centrómero, y por lo tanto el cinetocoro, son esenciales para la segregación, esto ha sido demostrado por el comportamiento en la mitosis de fragmentos cromosómicos. El fragmento que retiene el centrómero se rige por la dinámica propia de la segregación, mientras que el fragmento acéntrico no es reconocido por el huso mitótico [7].

La organización de los cromosomas en la placa metafásica es resultado de un proceso estocástico en el que los cromosomas, por medio de los cinetocoros, son capturados por los microtúbulos de ambos polos, 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 [11, 15].

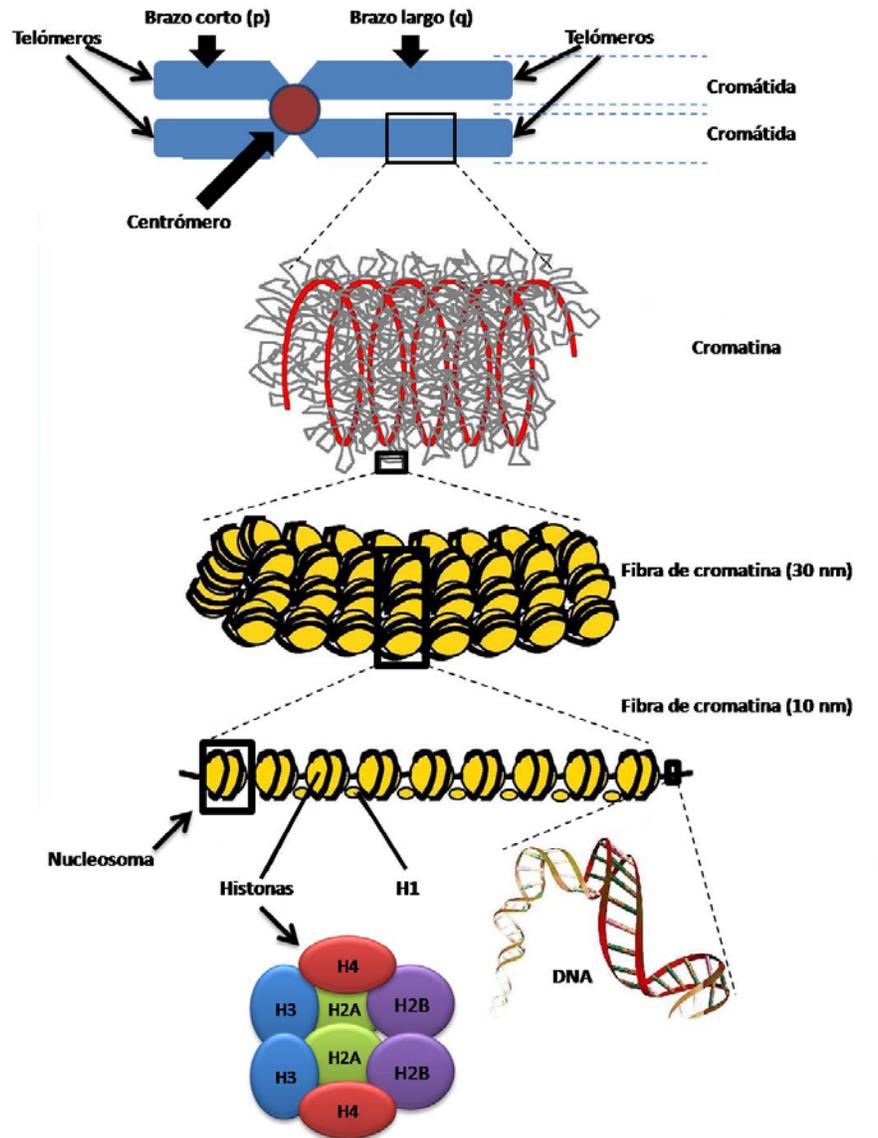


Figura 2. La estructura de un cromosoma metafásico, mostrando los diferentes niveles de organización que presenta. Cada nucleosoma está compuesto por DNA e histonas.

El evento central de una célula en mitosis es la segregación cromosómica. Cuando se lleva a cabo la duplicación del DNA, las cromátidas hermanas permanecen fuertemente unidas [14]. Esta unión se presenta gracias a un conjunto de proteínas de múltiples subunidades que reciben el nombre de cohesinas, las cuales son depositadas a lo largo de cada cromátida cuando el DNA es duplicado. El complejo de cohesinas se conforma

de 4 subunidades: SMC1, SMC3P, SCC1 y SCC3. Las subunidades SMC1 y SMC3 forman un heterodímero con función de ATPasa. Este heterodímero mantiene la estructura cromosómica. La mutación de las subunidades se asocia a una separación prematura de cromátidas hermanas [16-19].

Las cohesinas unen a las cromátidas mediante un anillo compuesto por SCC1-SMC1-SMC3P. Las cohesinas que mantienen unidos los brazos de las cromátidas se remueven por fosforilación. En la anafase, la separación de cromátidas hermanas se debe a una ruptura en los anillos de cohesina, mediante la proteólisis de la subunidad SCC1 [17]. Esta proteólisis es efectuada por una enzima denominada SEPARASA, cuya actividad es regulada negativamente por un inhibidor llamado SECURINA [15, 20-21]. La cohesión 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 intervalo es suficiente para que las cromátidas hermanas sean atraídas por microtúbulos provenientes de polos opuestos [7].

Estructura y función del cinetocoro

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. Los cinetocoros son complejos protéicos ensamblados en el centrómero. A esta estructura se ligan alrededor de 25 microtúbulos que emanan de los polos. Así, se establece la unión entre cromosomas y microtúbulos. El cinetocoro se encarga de dirigir el

posicionamiento de los cromosomas hasta establecer la bi-orientación adecuada [22]. Debido a la cantidad de proteínas que lo conforman, y a su función dentro del ciclo celular, se ha catalogado al cinetocoro como una estructura celular de alta complejidad [23].

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 [24-25]. En la corona fibrosa y la placa externa están contenidas proteínas que interactúan con los microtúbulos (CENP-E y DINEINA), proteínas pertenecientes al punto de monitoreo del huso mitótico (BUB1, BUBR1, BUB3, MAD1, MAD2, MPS1, ZWINT-1, ZW10, ROD) y elementos estables como NDC80, KNL/KBP y CENP-F/MIS. [26-27]. 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 [28]. La placa interna es inmediatamente adyacente al centrómero, asociada a la cromatina centromérica marcada por la presencia de la variante de histona H3 CENP-A. Otras proteínas como CENP-C y CENP-H se acoplan a esta región (*Fig. 3*) [29].

En mitosis, los microtúbulos aumentan y reducen su longitud, sondeando el citoplasma en busca de cinetocoros. Cuando se establece la unión entre cinetocoros de ambas cromátidas y microtúbulos provenientes de polos opuestos, el cromosoma lleva a cabo una serie de movimientos oscilatorios que lo dirigen a la región ecuatorial del huso mitótico, esta movilidad es altamente dinámica [30].

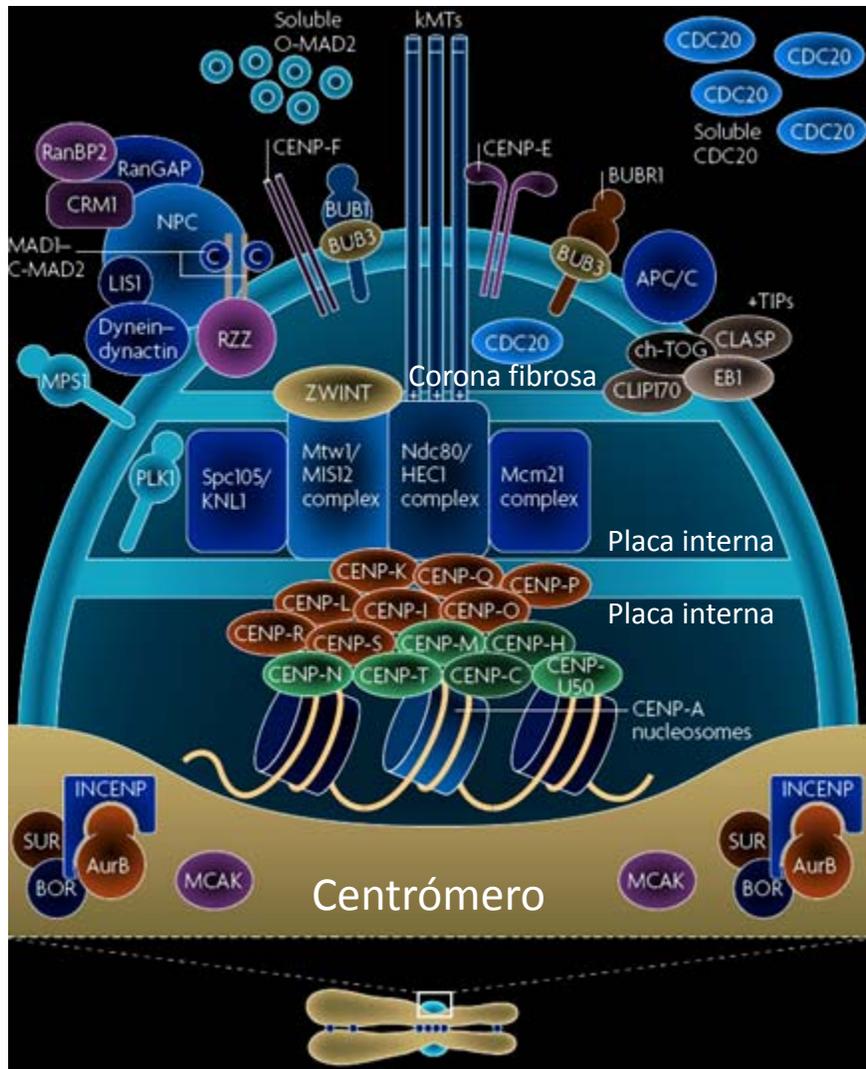


Figura 3. Conformación del cinetocoro en la que se pueden observar sus componentes distribuidos en la estructura tri-laminar. Modificado de [31].

La naturaleza estocástica por la cual los cinetocoros encuentran a los microtúbulos y viceversa en ocasiones resulta en conexiones no productivas [32]. El cinetocoro, además de tener una maquinaria altamente compleja para unir microtúbulos y modular la dinámica existente entre ambos, posee mecanismos de control que detectan y corrigen interacciones defectuosas o no productivas. Muchos estudios se han enfocado a analizar la mecánica del cinetocoro, lo que ha permitido identificar y caracterizar los

componentes moleculares en una gran variedad de especies. Los hallazgos han permitido concluir que la mayoría de las proteínas formadoras del cinetocoro están conservadas desde levaduras, lo que nos da una idea de lo compleja que es su función en la segregación. Aún se trabaja en la determinación de las interacciones que en esta estructura se presentan, así como en evaluar los errores en la mitosis ocasionados por un mal ensamblaje de todos sus componentes.

El punto de monitoreo del huso mitótico

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. Hace ya más de un siglo, Boveri enfatizó el efecto negativo que podría ocasionar en la progenie celular la inadecuada segregación [33].

La sincronía y exactitud de la segregación cromosómica depende de la regulación de ciertos eventos promovidos durante la mitosis, como el reconocimiento de los cromosomas por los microtúbulos y la adecuada separación-migración de las cromátidas hacia los polos de la célula. Para que la segregación se lleve a cabo con éxito, sin comprometer la estabilidad genética, la célula posee una serie de proteínas que, en conjunto, forman 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 [34-35]. 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 [35-40]. 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^{comet} y la proteína motora de unión a microtúbulos CENP-E (*centromere protein E*) (Tabla 1) [41-46].

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 enzima tipo E3 cuya actividad consiste en reconocer y modular la degradación (vía la subunidad 26S del proteosoma mediante ubiquitinación) de dos proteínas importantes en la regulación de la mitosis, la SECURINA y la CICLINA B [47-48]. La SECURINA inhibe a la SEPARASA, la cual es requerida para romper los complejos de cohesina que mantienen juntas a las cromátidas hermanas. La proteólisis de la SECURINA permite a la SEPARASA llevar a cabo su función, promoviendo de esta manera el inicio de la anafase. Al mismo tiempo, 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 [49].

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.

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 ^{comet}	Parte del complejo inhibitorio de APC/C. Se une directamente a CDC20 e inhibe la actividad de APC/C.
CMT2/p31^{comet} (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.

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 [48].

La señal que modula el funcionamiento del PMHM es la presencia de cinetocoros sin unión a microtúbulos. Esta condición activa a las proteínas MAD2, BUBR1 y BUB3, que al agruparse para forman el complejo del punto de monitoreo de la mitosis (conocido en inglés como *mitotic checkpoint complex*, MCC). El MCC se encarga de retener a CDC20 (Fig. 4) [50-52].

Estudios a nivel embrionario han detectado que la ausencia de de componentes del MCC tiene un impacto en la división celular. La inhibición de estos componentes reduce el tiempo de mitosis, debido a la falta de arresto. Además, la pérdida de funcionalidad del PMHM se asoció a la formación de micronúcleos, a la generación de aneuploidías, a una mala implantación y a problemas de desarrollo [53].

La función de las proteínas del PMHM inicia cuando desaparece la envoltura nuclear, y tiene como blanco principal 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). Las cinasas BUB1 y MPS1 reclutan a la mayoría de las proteínas que participan en este mecanismo. La proteína motora CENP-E (fosforilada por BUBR1) y el complejo formado MAD1-MAD2 (fosforilado por MPS1, permitiendo el flujo constante de MAD2) se

activan. En su forma activa, MAD2 se libera del cinetocoro, lo que permite la asociación con las demás proteínas del MCC para inhibir a CDC20, bloqueando de esta manera la mitosis [31, 54].

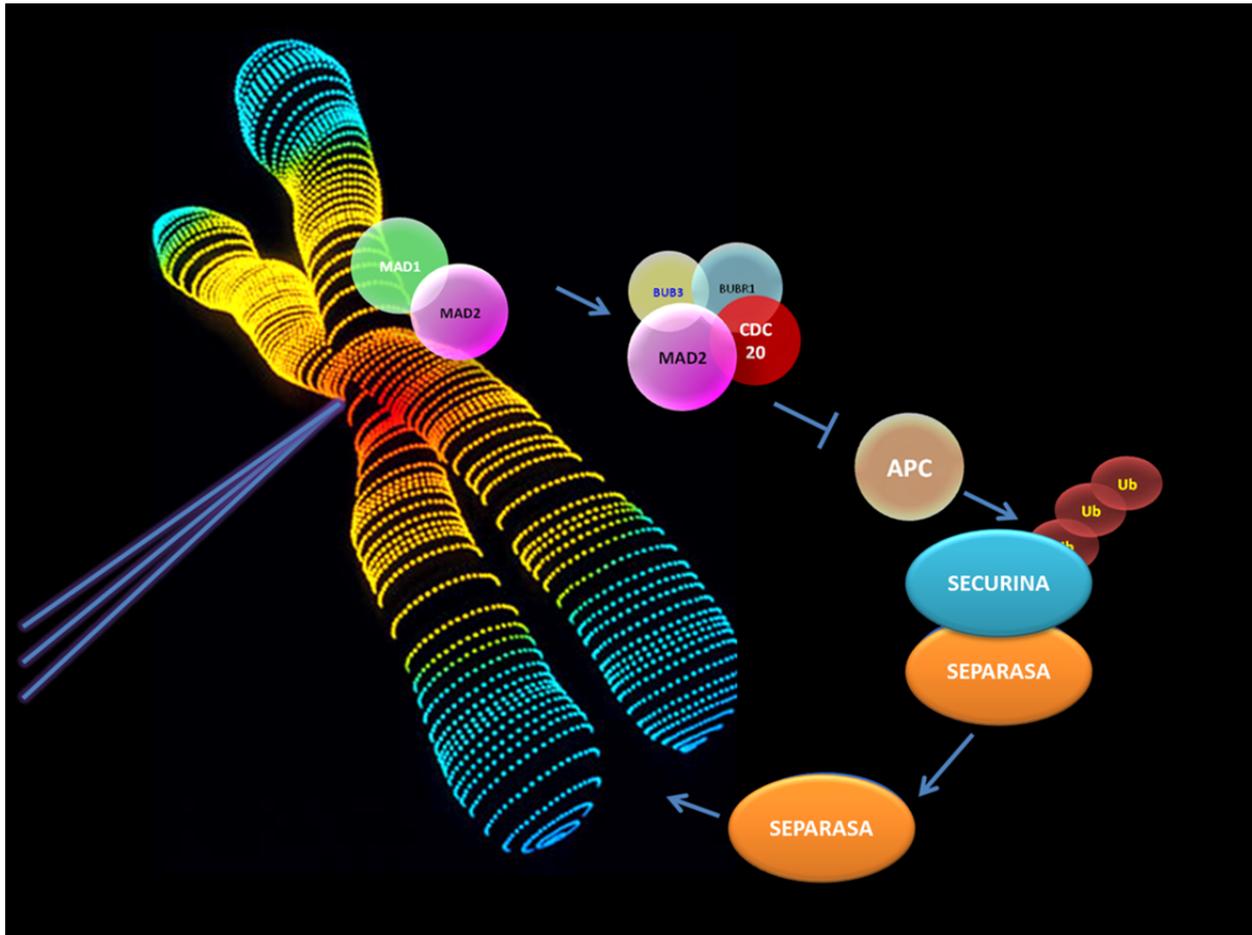


Figura 4. Función del punto de monitoreo del huso mitótico. Cuando no existe una unión adecuada entre cinetocoros y microtúbulos, el punto de monitoreo promueve la formación del complejo formado por BUBR1, BUB3 y MAD2, cuya función es impedir que CDC20 active a APC/C, inhibiendo la degradación de la SECURINA y por lo tanto, la función de la SEPARASA, arrojando el ciclo celular en metafase.

Cuando el reconocimiento de los cinetocoros por los microtúbulos es total, p31^{comet} impide el reclutamiento de MAD2, inhibiendo la formación del MCC, 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 el avance hacia la anafase [55-56].

Las alteraciones en proteínas motoras y del cinetocoro, las mutaciones en el DNA centromérico, la ausencia de unión y/o tensión, la despolimerización de microtúbulos, la presencia de cromosomas dicéntricos y la formación de husos multipolares son algunas causas que activan el arresto en metafase. El PMHM es importante en el control del ciclo celular. Brinda la posibilidad de que se manifieste un adecuado reconocimiento entre microtúbulos y cinetocoros, manteniendo la fidelidad de la segregación. Sin embargo, a partir de experimentos en células expuestas a agentes químicos que intervienen con la polimerización de microtúbulos, se ha determinado que el arresto no puede mantenerse activo por tiempos prolongados. Cuando los errores en la segregación son persistentes, la célula puede entrar en catástrofe mitótica o apoptosis, o evadir el arresto, presentando errores en la distribución cromosómica de las células hijas [57].

Aneuploidías e Inestabilidad Cromosómica

El desarrollo exitoso de la mitosis y la fidelidad en la segregación son producto de una ordenada conjugación de procesos celulares, como la formación de los COMT, la polimerización de los microtúbulos para el reconocimiento del cinetocoro (mediante uniones estables y bi-orientación), la separación de cromátidas hermanas y su

migración hacia los polos del huso. Cuando estos mecanismos se alteran, existe una predisposición al desarrollo de inestabilidad cromosómica (IC).

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 [58].

Una aneuploidía se define como la ganancia o pérdida de cromosomas distinta al complemento haploide o a sus múltiplos [48, 59]. Durante la segregación, la distribución de los cromosomas debe ser equitativa, cada célula hija debe recibir su complemento cromosómico completo. Sin embargo, bajo ciertas condiciones, una célula puede presentar cromosomas extra, o carecer de algunos. Las situaciones que generan aneuploidías incluyen divisiones mitóticas aberrantes a partir de una condición poliploide previa, alteraciones en centrosomas que conducen a la formación de husos multipolares, errores en fusiones celulares y evasión de la mitosis una vez duplicado el DNA (endoreduplicación) [60-61]. Errores en la cohesión existente entre cromátidas hermanas puede derivar también en aneuploidías. En líneas celulares de cáncer y modelos murinos, se ha determinado que tanto la inactivación como la sobre-expresión de la SECURINA tienen como consecuencia la generación de IC [62-63].

En humanos, las consecuencias biológicas de la aneuploidía dependen del tipo de célula en donde se generan, pero sobre todo, de la etapa de desarrollo y diferenciación.

Las aneuploidías generadas en células germinales tienen un mayor impacto en el individuo. Más de un 50% de los abortos se deben a anomalías en el número de cromosomas. En la mayoría de los casos corresponden a trisomías, pero las triploidías, tetraploidías y monosomías también han sido descritas [64]. Las aneuploidías generadas en células somáticas pueden ser susceptibles a la muerte celular por apoptosis [65]. Sin embargo, cuando la célula no muere, la heterogeneidad puede inducir procesos neoplásicos. En tumores, la presencia de aneuploidías promueve la resistencia al tratamiento quimioterapéutico [66].

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 [67]. 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 [31]. Cuando existen errores en interacciones microtúbulo-cinetocoro, las aneuploidías pueden manifestarse como eventos de rezago cromosómico y como eventos de no disyunción, presentándose uniones monotélicas, sintélicas y merotélicas.

Las uniones monotélicas se presentan cuando sólo una de las dos cromátidas ha sido reconocida por los microtúbulos [68]. La cromátida que no ha sido reconocida pierde la capacidad de incorporarse al núcleo de una célula hija, generando un evento de rezago cromosómico. En las uniones merotélicas, una cromátida es reconocida por ambos polos del huso, situación que altera la dinámica de la segregación, ya que existe unión a microtúbulos pero con fuerzas de tensión opuestas [69]. Por último, las uniones

sintéticas se manifiestan cuando ambas cromátidas son reconocidas por microtúbulos originarios del mismo polo, generando eventos de no disyunción (*Fig. 5*) [31].

Las uniones monotéticas son las que reconoce primordialmente el PMHM, retrasando la anafase en casos en los que al menos un cinetocoro no esté unido a la placa metafásica [68]. Las uniones sintéticas tienen un grado de reconocimiento distinto por el PMHM. Si bien la unión y tensión es reconocida, la ausencia de bi-orientación permite el reconocimiento del error. Distinto a lo anterior, las uniones merotéticas no son reconocidas por el PMHM, ya que la bi-orientación manifestada en una sola cromátida produce una señal que impide el arresto [31]. Tanto en la presencia de uniones sintéticas como en la presencia de uniones merotéticas, la participación de las proteínas AURORA B/IPL1, BOREALINA, SURVIVINA e INCENP es muy importante. La cinasa AURORA B/IPL1, localizada en la región centromérica adyacente al cinetocoro, detecta y desestabiliza estas uniones, generando nuevamente cinetocoros sin unión a microtúbulos. De esta manera, el PMHM puede reconocer el error [70-73].

Las aneuploidías pueden ser también consecuencia de divisiones aberrantes producto de husos multipolares. Una fuente generadora de husos multipolares puede ser la poliploidía, producto de defectos en la citocinesis, fusión celular, o evasión del arresto mitótico [60-61].

La división celular con husos multipolares produce frecuentemente células aneuploides. Tanto las amplificaciones en STK15/AURORA A, como la inactivación de P53, RB y BRCA1 se han asociado a poliploidía y defectos en el ciclo del centrosoma [74-76].

Defectos en la cohesión también pueden contribuir a la aneuploidía. Cuando la SECURINA se inactiva, las aneuploidías son más frecuentes. Líneas celulares con la SECURINA inactiva presentan IC [77-78].

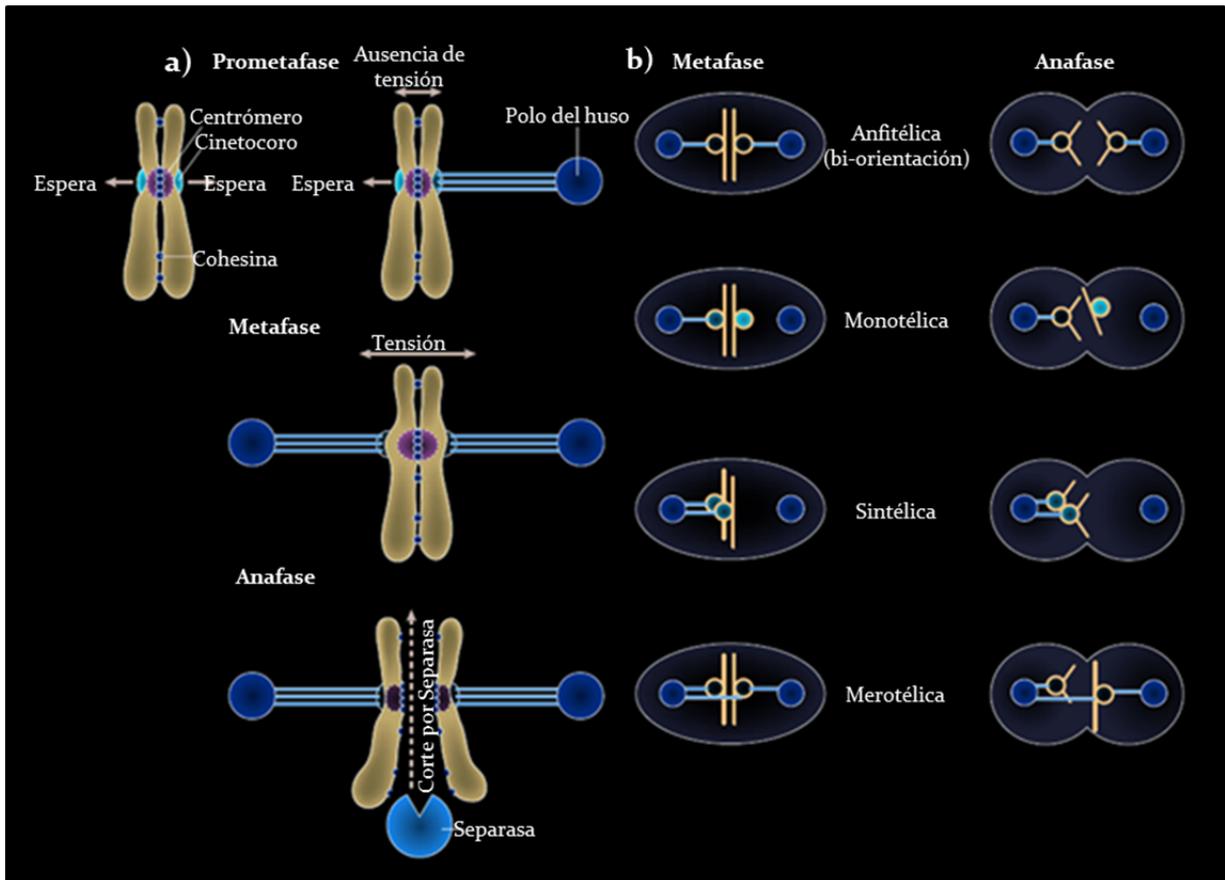


Figura 5. a) La segregación requiere de una bi-orientación de los cromosomas promovida por la unión de los microtúbulos a los cinetocoros. b) Los diferentes tipos de unión que originan eventos de aneuploidía. Modificado de [31].

La pérdida o ganancia constante de cromosomas (y por lo tanto de los genes que los conforman) posibilita a las células a sufrir modificaciones de gran magnitud en procesos encargados de controlar su crecimiento, proliferación y muerte. Un modelo de estudio útil para entender la generación de aneuploidías y la IC es el cáncer de colon.

Aproximadamente el 90% de estos tumores presentan IC. Un factor importante en esta neoplasia es APC [79-80]. APC es un factor inhibidor de señales de crecimiento, que actúa promoviendo la degradación de β -CATENINA. Las mutaciones en APC generan variantes protéicas truncadas incapaces de degradar la β -CATENINA [81]. Se ha reportado que APC también es capaz de desestabilizar de las uniones cromosoma-microtúbulo [82]. Sin embargo, estudios en líneas celulares de cáncer de colon mutantes para APC muestran estabilidad cariotípica [83].

En retinoblastoma, la progresión de la enfermedad se relaciona con el grado de aneuploidía [84]. En líneas celulares, la inactivación de *RB1 confiere* a las células la capacidad de volverse aneuploides, incrementándose esta condición con cada ciclo [85]. Estos hallazgos correlacionan con estudios enfocados a identificar mecanismos inductores de IC en cáncer: La mayoría de los genes asociados a la generación de IC son blancos de E2F, factor que en condiciones normales es inactivado por RB [86]. En células no transformadas, la sub-expresión de RB tiene efectos en la segregación comparables con el comportamiento de células con IC., independientemente del funcionamiento del PMHM [87].

Se ha establecido una asociación entre la sobre-expresión de AURORA A con la amplificación de centrosomas y la poliploidía. Aunque el PMHM se encuentre funcional, un arresto prolongado (producto de husos multipolares) deriva en algunos casos en citocinesis incompletas. Este fenómeno es importante, ya que se ha relacionado la poliploidía a la resistencia al tratamiento con agentes quimioterapéuticos que actúan durante la segregación cromosómica [88].

El acortamiento telomérico también participa en la generación de inestabilidad cromosómica. Las líneas celulares negativas para telomerasa promueven la formación de poliploidías [89]. Sin embargo, se ha descrito que los rompimientos en regiones pericentroméricas son un mecanismo más efectivo en la generación de IC que la erosión de los telomeros. Estos rompimientos pueden acoplarse a otros telomeros, promoviendo fusiones cromosómicas [90].

Alteraciones en el punto de monitoreo del huso mitótico

El PMHM es el principal mecanismo de control de la segregación. Al ser alterado, promueve el desarrollo de IC. Un ejemplo de esto es la alteración de *BUB1B*, el gen que codifica para la proteína BUBR1. En este gen se han encontrado mutaciones en la región que codifica para su dominio cinasa [91]. Las mutaciones en línea germinal de *BUB1B* se asocian a una enfermedad de condición recesiva denominada aneuploidía de mosaico variegado. Esta enfermedad se caracteriza 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 algunas líneas celulares de cáncer de colon se han reportado mutaciones en *BUB1* que generan un efecto dominante-negativo hacia el otro alelo [92]. También se han caracterizado de manera esporádica mutaciones en los genes *MAD1*, *MAD2* y los tres miembros del complejo *ZW10-ROD-ZWILCH*. Sin embargo, no se ha determinado su efecto en el PMHM [93-97].

No existen muchas evidencias de mutaciones en genes del PMHM que conlleven a la generación de IC, por lo que 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 [48].

La sobre-expresión de *BUB1* se ha visto asociada con un pobre pronóstico en algunos tipos de tumores. En modelos murinos, esta sobre-expresión genera aneuploidías por rezago cromosómico (con cariotipos cercanos al complemento 2n) y posteriormente tumores. La sobre-expresión de *BUB1* repercute en la activación de AURORA B. Los ratones utilizados en este diseño desarrollaron diversos tumores sólidos [98].

Otro caso que ejemplifica la complejidad del PMHM es la sobre-expresión de *MAD2*. En ratones transgénicos, la sobre-expresión de *MAD2* promueve la formación de diversos tumores. A nivel celular, ocasiona rupturas cromosómicas, puentes anafásicos y aneuploidías. La sobre-expresión continua no es necesaria para el mantenimiento de los tumores, por lo que se le ha caracterizado como un factor implicado en la iniciación o progresión tumoral [99-100].

Finalmente, deficiencias en los niveles de CENP-E disminuyen la tasa de reclutamiento de MAD1, MAD2 y BUBR1, lo que impide generar una señal suficientemente fuerte para promover un arresto en metafase [101]. Además, la sub-expresión de *MAD2* y *BUB1B* se ha asociado con un incremento en el número de aneuploidías en fibroblastos de rata [102-103].

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 control y armonía dentro de cada tejido. 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. Cuando una célula sufre alteraciones en su genoma, los mecanismos de muerte pueden activarse. Sin embargo, múltiples factores endógenos y exógenos alteran constantemente la homeostasis celular, promoviendo la transformación maligna, y por lo tanto, el desarrollo de cáncer [104].

El cáncer es 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 [105].

En la célula, el fenotipo maligno se adquiere mediante pérdida, mutación o desregulación de genes cuya función es regular positiva o negativamente la progresión

del ciclo celular. Se han caracterizado tres grupos de genes involucrados en el desarrollo tumoral: 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 [7]. 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, que confieren a la célula ventajas en crecimiento y proliferación. Aún con la existencia de puntos de monitoreo distribuidos en la transición de las diferentes fases del ciclo celular, la exposición constante a agentes carcinógenos impide su adecuado funcionamiento. De esta manera, el avance a través del ciclo es un fenómeno común para la célula transformada.

El efecto de la IC 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. En los seres humanos, las aneuploidías son las

causantes del 20% de los abortos espontáneos. Los únicos eventos de aneuploidía que no detienen el desarrollo 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) [48]. Sin embargo, los defectos que se manifiestan en estos individuos incluyen malformaciones, infertilidad y retraso mental, además de reducir la esperanza de vida.

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 [106]. Además, diversas líneas celulares de cáncer manifiestan pérdidas y ganancias de cromosomas completos durante la división [83]. También se ha asociado la frecuencia de aneuploidías con la agresividad del tumor y resistencia al tratamiento [107].

Los cariotipos en tumores sólidos son altamente variables. Su número cromosómico oscila entre 40 y 60 cromosomas, y en algunos casos llega a ser de 70 [108]. Este cariotipo puede mantenerse estable por un determinado número de generaciones [61]. En otros casos, las células manifiestan IC, haciendo inestable su cariotipo [83]. En la célula, los cambios constantes en el contenido cromosómico se asocian a cambios fenotípicos que tienen efecto en el desarrollo tumoral, además de promover la quimioresistencia [109]. Así mismo, se sabe que la aneuploidía y la IC son eventos mucho más comunes en tumores secundarios, comparado con tumores primarios [110].

Defectos en el funcionamiento de los centrosomas han servido para distinguir las lesiones pre-invasivas de aquellas de bajo grado. También existe evidencia de amplificaciones centrosómicas en tumores benignos, producto de la sobre-expresión del complejo CICLINA E/CDK2, o de la inhibición de P21 sugiriendo que estas alteraciones pueden ocurrir tempranamente en el proceso de transformación [111].

La cinasa AURORA A también es un factor promotor de la transformación en varios tipos de tumores. Cuando está sobre-expresada, contribuye a la generación de IC y a la progresión tumoral. Scagliotti y colaboradores, evaluaron la expresión de AURKA en muestras de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas y lo compararon contra el tejido adyacente no canceroso. En muestras de pacientes con cáncer de pulmón se reportó una expresión aumentada de AURORA A en tumores diferenciados y adenocarcinomas, comparada con tejido normal. Aunque la diferencia de expresión no tuvo impacto sobre la supervivencia de los pacientes, actualmente se han desarrollado inhibidores de AURORA A para impedir esta cascada en células cancerosas [112-113].

Polimorfismos de DNA

En la naturaleza existen organismos de la misma especie que 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). 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 para un gen, cada una con un efecto diferente en el fenotipo [114]. Por lo tanto, es inadecuado denominar 'silvestre' a un alelo, cuando existen otras variantes alélicas que no confieren ventaja o desventaja alguna al organismo [115].

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, como la longitud de la heterocromatina centromérica (polimorfismo cromosómico), o en diferencias en la secuencia de nucleótidos existente en el DNA (polimorfismos de DNA). Cuando los polimorfismos no promueven cambios, se dice que son neutrales o silenciosos [1, 114, 116].

Aunque no es evidente fenotípicamente, el alelo considerado 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 [7].

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) [1, 117].

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 [118].

Los SNPs son variantes alélicas que difieren en un solo nucleótido en una posición específica, representando una fuente importante de variación genética [119]. Con el fin de realizar estudios funcionales, los SNPs pueden agruparse, formando haplotipos para examinar la variación alélica a gran escala, como el caso de genes completos.

El estudio de SNPs tiene impacto en la biología por diferentes razones. Cuando un SNP se encuentra en una región génica funcional, puede conferir diferencias en la expresión y estructura proteica, que puede conferir un riesgo al desarrollo de enfermedades. La presencia de SNPs también puede marcar diferencias genéticas causantes de fenotipos

de interés en la práctica clínica. Finalmente, los SNPs son útiles para estudiar la tasa mutacional, permitiendo la construcción de la historia evolutiva de las especies [120]. Estimaciones actuales reportan que un SNPs con una frecuencia alélica menor de al menos 1% puede encontrarse cada 200-300 pb en el genoma [121-122]. 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 [123]. 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 15 millones de SNPs con una frecuencia alélica mayor al 1 %. En 2001 fueron aproximadamente 1.4 millones han sido identificados [124]. Sin embargo, el estudio del *International HapMap Consortium* detectó en 2007 más de 3 millones de SNPs [125].

Los SNPs se clasifican por el cambio generado en transiciones (cuando el cambio es purina por purina o pirimidina por pirimidina) o transversiones (purina por pirimidina o viceversa). Con respecto al efecto fenotípico se clasifican en sinónimos (cuando no alteran el aminoácido a traducir), no sinónimos (cuando afectan la secuencia de aminoácidos en la proteína). Los SNPs pueden influenciar la actividad promotora (expresión génica), la conformación del RNA mensajero (estabilidad) y la localización subcelular de mRNAs y proteínas [126].

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 [7]. 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 [115].

MAD1. Estructura, función e importancia

El primer trabajo en el que se determinó la presencia de *MAD1* en humanos fue reportado en 1998 por el grupo de Jin y colaboradores [127]. A *MAD1* se le nombró provisionalmente TXBP181 (*tax-binding protein 181*). Este estudio se enfocó a determinar el papel de la TAX (portada por el virus 1 de leucemia de células T, HTLV-1) en la formación de células multi y micronucleadas. Se reportó que el mecanismo por el cual se generaba esta condición se debía a la unión TAX-TXBP181. Esta interacción inhibía la formación de homodímeros de TXBP181. Al comparar la secuencia de aminoácidos de TXBP181 con las secuencias existentes en bases de datos, se descubrió que la homología con la proteína *MAD1* en levaduras era muy elevada. Además, mediante ensayos de co-inmunoprecipitación, se estableció que TXBP181 interactúa con *MAD2*. Estos hallazgos permitieron establecer que TXBP181 era en realidad la proteína *MAD1* en humanos.

El gen *MAD1* está localizado en el brazo corto del cromosoma 7 (7p22) y tiene una longitud de 2754 pb [128]. Se han encontrado tres variantes de su transcrito que

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 MCC y el posterior secuestro de CDC20, inhibiendo así la función de APC/C y, por lo tanto, la progresión a la anafase [54].

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 [133]. Además, las uniones MAD1-MAD2 y CDC20-MAD2 se llevan a cabo en ausencia de las demás proteínas del PMHM *in vitro*. 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) [135].

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. Una vez que se lleva a cabo esta unión, C-MAD2-CDC20 amplifica la señal de reclutamiento [136]. Si bien es cierto que las dos conformaciones de MAD2 se reconocen, esto sólo sucede en el cinetocoro, no en el citosol. Una proteína de unión a C-MAD2 denominada p31^{comet} 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^{comet} se disocia

para permitir la captación de MAD2 libre y así, continuar la transducción de señales que promueven el arresto [31].

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^{comet} 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 MAD1 y MAD2 y su redistribución a los polos del huso se lleva a cabo por el complejo DINEÍNA-DINACTINA [31, 131, 137-138].

El polimorfismo MAD1 1673 G→A

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 [93]. 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. 7*). 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 1673 G→A (*Fig. 8-a*). 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* [92].

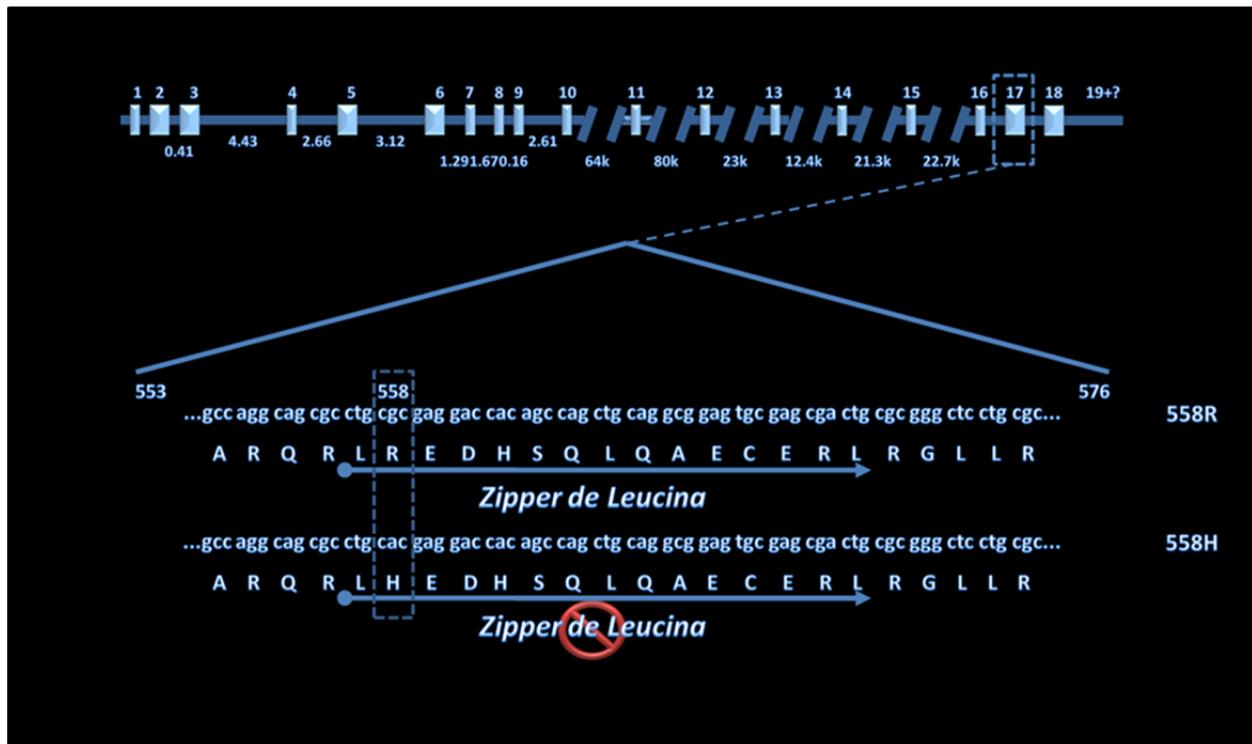


Figura 7. Representación esquemática del polimorfismo *MAD1* 1673 G→A, ubicado en el exón 17.

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 *MAD1* 1673 G→A tenía una mayor representación, aunque el efecto biológico aún no había sido evaluado (*Fig. 8-b*) [96].

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 *MAD1* 1673 G→A estuvo presente en más del 50 % de éstas. En este estudio se determinó que la interacción entre *MAD1* y *MAD2* era promovida por la presencia de los dos zippers de leucina (entre los aminoácidos 501-522 y 557-571) en *MAD1*. 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 9 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 producir la proteína silvestre promovían un mayor arresto del ciclo celular en metafase (*Fig. 8-c*). Al determinar el genotipo a partir muestras de sangre periférica de individuos aparentemente sanos, no encontraron individuos homocigos para el polimorfismo, sugiriendo que esta condición se presentaba sólo en células malignas como resultado de la pérdida de heterocigocidad.

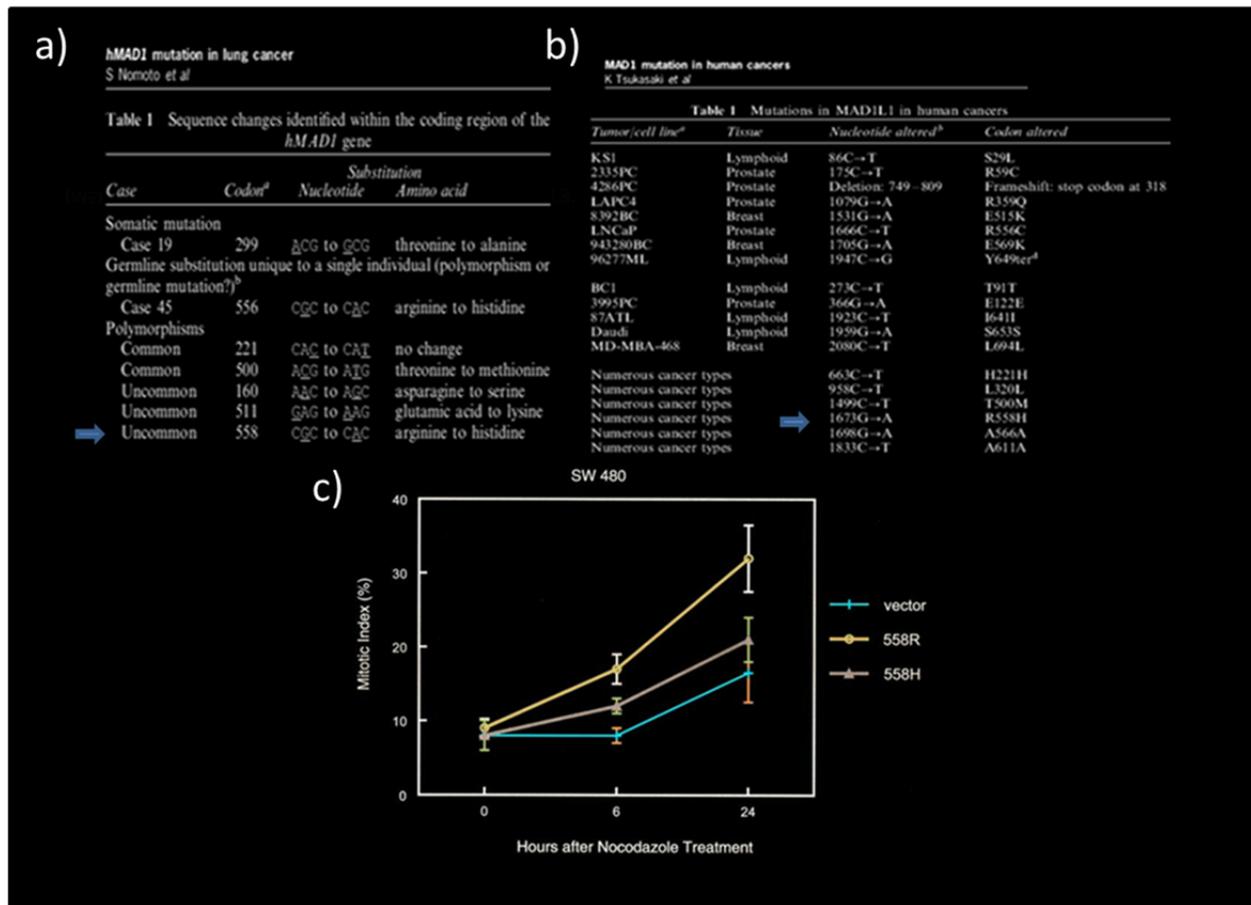


Figura 8. a) Primer reporte del SNP *MAD1* 1673 G→A realizado en biopsias de cáncer de pulmón [93]. b) Determinación del polimorfismo en diversas líneas celulares de cáncer [96]. c) Índices mitóticos resultantes de transfecciones de la proteína silvestre en la línea celular de cáncer de colon SW480 [129].

Cáncer de ovario

El cáncer epitelial de ovario (CEO) es uno de los tumores más frecuentes a nivel mundial, representando el 5% de la mortalidad por cáncer. En 2008 se catalogó como la tercera neoplasia ginecológica más frecuente con 225, 000 casos nuevos y 140,200 muertes [139]. A nivel nacional, de los 100,094 casos reportados en el Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas de 2003, el 2.64% corresponde a CEO, representando la cuarta causa de muerte por cáncer en la población femenina [140]. En

el INCan, el CEO ha sido catalogado como uno de los tumores ginecológicos más frecuentes, ocupando el tercer lugar.

En la mayoría de los casos, el CEO se diagnostica en mujeres posmenopáusicas, con una edad promedio entre 50 y 70 años. Cerca del 70% de las pacientes se presentan con enfermedad avanzada al diagnóstico, siendo los tumores epiteliales la histología más frecuente (80-90%) [140-143]

Una herramienta útil tanto para el diagnóstico como para determinar la extensión de la enfermedad, es el marcador tumoral CA125. El CA125 es una glicoproteína perteneciente a la familia de las mucinas, de alto peso molecular (aproximadamente 200 kD). Se produce de manera normal en estructuras como el mesotelio, las trompas de Falopio, el endocérvix y el fondo vaginal. Este marcador se encuentra elevado en más del 80% de los casos. Aunque puede elevarse en algunas condiciones benignas y otras neoplasias no ginecológicas, el CA125 es un indicador útil para la determinación de la actividad tumoral, respuesta al tratamiento y recurrencias tempranas [144]. En cuanto a los estudios de imagen, la tomografía tiene una sensibilidad de 92.3%, especificidad de 79.3%, valor predictivo positivo de 67% y negativo de 96%. Es útil para detectar ascitis, carcinomatosis peritoneal y enfermedad mesentérica, aunque se encuentra limitada en la evaluación de implantes esplénicos, enfermedad vesical e implantes peritoneales menores de 2 cm [145-146].

La etapificación del CEO se basa en el sistema de la International Federation of Gynecology and Obstretics (FIGO) establecido en 1988 y actualizado en 1998. De

acuerdo a esta clasificación, las etapas avanzadas corresponden a los estadios clínicos III y IV (Tabla 2) [148].

Tabla 2. Etapificación quirúrgica del cáncer de ovario de acuerdo a la FIGO.

ETAPA	CARACTERÍSTICA
IA	Limitado a un ovario, sin ascitis, sin afección superficial externa y cápsula intacta
IB	Limitado a ambos ovarios, sin ascitis, sin afección superficial externa y cápsula intacta
IC	Tumor IA o IB, pero con afección superficial externa de uno o ambos ovarios o con cápsula rota o con ascitis maligna o con lavados peritoneales positivos
IIA	Extensión o metástasis a útero o trompas de Falopio
IIB	Extensión a otros tejidos pélvicos
IIC	Tumor IIA o IIB, pero con afección superficial externa de uno o ambos ovarios o con cápsula rota o con ascitis maligna o con lavados peritoneales positivos
IIIA	Tumor limitado a la pelvis verdadera con ganglios negativos pero con diagnóstico histológico confirmatorio de implantes microscópicos en la superficie peritoneal incluyendo la superficie hepática
IIIB	Tumor de uno o ambos ovarios con ganglios negativos pero con diagnóstico histológico confirmatorio de implantes peritoneales incluyendo la superficie hepática, pero que ninguno de ellos exceda 2cm de diámetro
IIIC	Implantes abdominales mayores de 2cm de diámetro o ganglios positivos retroperitoneales o inguinales
IV	Extensión a uno o ambos ovarios, con metástasis a distancia incluyendo metástasis hepáticas parenquimatosas; si hay derrame pleural debe confirmarse malignidad en citológico

Tratamiento del cáncer de ovario avanzado. El papel de la quimioterapia de inducción

La base del tratamiento para el CEO es la citorreducción óptima, que de lograrse tiene un impacto positivo en la supervivencia. Por ser una neoplasia quimiosensible, el

tratamiento adyuvante ha incrementado tanto la supervivencia global como el periodo libre de enfermedad. Cuando la citorreducción no es posible, se suministra quimioterapia de inducción. La respuesta a quimioterapia de inducción se manifiesta en aproximadamente un 70% de pacientes con enfermedad avanzada, y es altamente efectiva en enfermedad de menor volumen. Actualmente, la combinación de cirugía citorreductora, quimioterapia, y el surgimiento de opciones de tratamiento sistémico para enfermedad recurrente, han contribuido al aumento en la supervivencia a 5 años para las etapas III y IV, incrementándola hasta casi un 30% [147-148].

El objetivo de la citorreducción quirúrgica es remover los tumores necróticos voluminosos con pobre aporte sanguíneo que se encuentran en fase de crecimiento lento, con la intención de ocasionar una mayor sensibilidad a la quimioterapia. El término citorreducción óptima se ha redefinido a través del tiempo, pero actualmente se denomina así a la cirugía que logra una enfermedad residual menor de 1 cm. Esta definición es aceptada y utilizada por el Gynecologic Oncology Group (GOG) en su informe de resultados de ensayos clínicos. Se ha demostrado que un tumor residual de mayor tamaño se asocia a un efecto negativo en la supervivencia. Un estudio realizado por Bristow y colaboradores encontró que por cada incremento del 10% en la citorreducción, la mediana de supervivencia aumenta 5.5% [149-150].

En principio, todas las pacientes con enfermedad avanzada son candidatas a cirugía citorreductora primaria [151]. Sin embargo, la cirugía no puede realizarse en pacientes con pobre estado funcional, incapaces de someterse a un tratamiento quirúrgico agresivo, con enfermedad hepática parenquimatosa, involucro ganglionar retrocrural o

supraclavicular y metástasis mediastinales o pulmonares. Dado que no existen criterios definitivos de irresecabilidad, un porcentaje importante de pacientes deben someterse primero al tratamiento quimioterapéutico, para después de 2 o 3 ciclos someterse a laparotomía de intervalo con intento de citorreducción. A este abordaje se le denomina quimioterapia de inducción.

Las ventajas potenciales de la quimioterapia de inducción son: reducción del impacto negativo de la cirugía debido a un decremento en el volumen tumoral, mejoría del estado funcional y nutricional con la regresión tumoral, y resolución de la ascitis con mejoría en la recuperación posquirúrgica. Un reto en el manejo de la enfermedad continúa siendo el establecimiento de criterios que permitan predecir que pacientes serán irresecables con tratamiento quirúrgico inicial. Actualmente, el nivel basal de CA125, el volumen de ascitis y diversos criterios radiológicos no han sido suficientemente efectivos para la identificación de estos pacientes. Estudios que comparan cirugía primaria contra quimioterapia de inducción seguida de cirugía apoyan el valor del tratamiento con inducción [152].

El tratamiento de quimioterapia estándar en enfermedad avanzada se basa en el uso de carboplatino y paclitaxel (CBP-PTX) por 6 ciclos, resultando en una mediana de supervivencia libre de enfermedad de 20.7 meses, y una mediana de supervivencia global de 56.7 meses. El esquema se divide en tratamiento de inducción y quimioterapia posterior a la citorreducción primaria óptima. En el primero se ofrece un esquema basado en platinos y taxanos: 3 ciclos previos al tratamiento quirúrgico y 3 ciclos después de la cirugía. Para el caso de la quimioterapia posterior a la

citorreducción óptima primaria, se ofrece un esquema de 6 ciclos de adyuvancia. Aunque en principio la vía de administración es intravenosa, se ha reportado mejoría en la supervivencia con la administración de quimioterapia intraperitoneal basada en CBP [153-155].

Mecanismos de acción y resistencia al cisplatino y sus análogos

El potencial para ocasionar muerte celular de los compuestos platinados fue descubierto por Rosenberg a mediados de la década de los sesenta. El cis-diaminodichloroplatino (II) (CDDP), o comúnmente llamado cisplatino, es el prototipo de esta familia de agentes. Su análogo, el CBP, tiene el mismo rango de actividad clínica, sin embargo, es menos nefrotóxico y emetogénico. Aunque existe diferencia entre las moléculas de CDDP y CBP, una vez que sus grupos residuales son disociados funcionan de manera similar: inducen muerte celular principalmente a través de la formación de aductos covalentes bifuncionales con el DNA, que pueden ser intra o intercatenarios. Los aductos intracatenarios N7-d (GpG) corresponden casi al 60%, los aductos N7-d (ApG) al 30%, los aductos N7-d (GpXpG) representan el 10% y otros aductos tienen una presencia menor al 2% del total. El nivel de DNA dañado se asocia directamente con el nivel de muerte celular, independientemente del tipo de aducto. La resistencia a compuestos platinados es mediada por dos grandes mecanismos: 1) falla en la cantidad suministrada que permita un daño suficiente al DNA y 2) falla para ocasionar muerte celular una vez formados los aductos. Muchas células resistentes muestran un fenotipo alterado en vías involucradas como captación del fármaco, reconocimiento-reparación del daño al DNA y apoptosis [147, 156].

Mecanismos de acción y resistencia a taxanos

Los microtúbulos son estructuras dinámicas que juegan un papel importante en la división, transporte de organelos y vesículas, señalización, estructura del citoesqueleto y polaridad celular. Se componen de protofilamentos lineales de heterodímeros de tubulina, polimerizados y arreglados en forma paralela alrededor de un eje cilíndrico. La polimerización dinámica de los microtúbulos es mediada por un proceso de nucleación y elongación llevado a cabo por dos mecanismos básicos: el primero consiste en el crecimiento neto en un extremo y el acortamiento del extremo opuesto, mientras que el segundo, conocido como mecanismo de inestabilidad dinámica, se refiere un cambio espontáneo de los microtúbulos entre estados de crecimiento lento sostenido y rápido acortamiento [157].

El taxol, o paclitaxel (PTX), se caracterizó como el constituyente activo del árbol *Taxus brevifolia* en 1971. Aún con las dificultades iniciales para aislar y extraer a gran escala un producto natural de pobre solubilidad de una fuente limitada, el conocimiento del mecanismo de acción hizo que se mantuviera el interés por este compuesto. El paclitaxel se une a la superficie interior del lumen del microtúbulo, en sitios completamente distintos a los requeridos para el intercambio de GTP por GDP por la colchicina, podofilotoxina y alcaloides de la vinca [158]. Los taxanos son capaces de alterar el índice de disociación de tubulina en ambos extremos del microtúbulo, suprimiendo los mecanismos dinámicos principales. La capacidad de inducir arresto mitótico ocurre a concentraciones de orden nanomolar. La resistencia a taxanos se encuentra asociada al transportador ABC1 (adenosine triphosphate binding cassette 1),

a ABCB4 (MDR2), a alteraciones estructurales en TUBULINA, a mutaciones en genes para isotipos de la TUBULINA y a la presencia de amplificaciones genéticas y cambios de isotipos [147, 158].

Factores pronósticos en cáncer epitelial de ovario avanzado

A pesar de la relevancia de los factores pronósticos clásicos en CEO avanzado, el entendimiento de la patogénesis molecular de la enfermedad ha sido útil para identificar nuevos biomarcadores que faciliten el diagnóstico temprano, la predicción de respuesta al tratamiento y el pronóstico [160].

La etapa clínica sigue siendo la variable de pronóstico más importante: los estadios clínicos III y IV se asocian con supervivencia a largo plazo de 35 y 10% respectivamente. En el caso del grado histológico, la histología mucinosa o de células claras confieren un pronóstico adverso. El tamaño del tumor residual posterior a la cirugía citorreductora impacta significativamente en la supervivencia. En pacientes en los que se logra la citorreducción óptima, la mediana de supervivencia es de 25-40 meses y disminuye hasta 10-18 meses en caso de existir enfermedad residual mayor. El significado pronóstico de la edad es bien conocido: la mediana de supervivencia es al menos 2 años mayor en pacientes menores de 65 o más años [147, 161].

La evaluación de respuesta al tratamiento en oncología, se realiza de acuerdo a definiciones estándar como los criterios de RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors), donde el volumen tumoral posterior a la quimioterapia es el principal factor. Sin embargo, en pacientes con CEO la ausencia de enfermedad medible es

común. Debido a esto, el marcador tumoral CA125 es una opción. El nivel sérico de CA125 refleja el volumen tumoral, y en quimioterapia de inducción, es valioso para optimizar el manejo, al ser un indicador temprano de respuesta al tratamiento y supervivencia. El valor de CA125 establecido para determinar respuesta a la quimioterapia es de 35 U/ml o menor [162-165]

Se han evaluado nuevos factores pronósticos moleculares. La mayoría han sido identificados en estudios retrospectivos y otros durante estudios experimentales de biología tumoral del CEO. Estos factores incluyen ploidía del DNA, fracción celular en fase S, marcadores de proliferación celular, inestabilidad genética, resistencia a apoptosis, capacidad de invasión local, metástasis y angiogénesis. No obstante, estos marcadores aún no son utilizados de manera rutinaria para la toma de decisiones terapéuticas [166-168].

En el proceso de transformación maligna del epitelio ovárico intervienen alteraciones genéticas y epigenéticas, que conllevan a un fenotipo maligno y, por lo tanto, a la pérdida de control sobre la proliferación, al desarrollo de inestabilidad genética, resistencia a apoptosis, potencial invasivo, metástasis y angiogénesis. Estas alteraciones, además de asociarse a la biología tumoral, pueden asociarse a la resistencia al tratamiento antitumoral. Cerca del 20% de los tumores epiteliales de ovario son resistentes al tratamiento quimioterapéutico de primera línea a base de CBP-PTX. La búsqueda de factores predictivos ha incluido la determinación de polimorfismos en genes que codifican para proteínas involucradas en el mecanismo de acción de los fármacos antineoplásicos [169].

Polimorfismo *MAD1* 1673 G→A y su posible asociación con la respuesta al tratamiento con paclitaxel

El estudio realizado por Iwanaga propuso que el polimorfismo de *MAD1* podría afectar la unión *MAD1*-*MAD2*, alterando el funcionamiento del PMHM [129]. Células transformadas portadoras del polimorfismo tienen un menor arresto en metafase cuando son expuestas a compuestos que inhiben la maquinaria de segregación cromosómica. Algunos compuestos con este mecanismo de acción son utilizados en la práctica clínica para el tratamiento de diversos tipos de cáncer.

Actualmente se sabe que el tratamiento con agentes anti-microtúbulos requiere de un PMHM estable y funcional para ocasionar muerte celular. Células con la incapacidad de generar un arresto en mitosis pueden dividirse (independientemente del estado del huso mitótico), generando células aneuploides, o evadir la división, haciéndose poliploides e incrementando el riesgo a desarrollar IC [170].

En la práctica clínica, el estudio de SNPs tiene relevancia a nivel del tratamiento. Recientemente, el esquema de medicina personalizada pretende (mediante el conocimiento de factores genéticos de riesgo) diseñar estrategias terapéuticas basadas en características individuales, incrementando la efectividad y reduciendo la toxicidad [171]. El estudio del polimorfismo *MAD1* 1673 G→A en tumores cuyo abordaje terapéutico implica el uso de agentes que interfieren con la segregación puede tener relevancia clínica, permitiendo un manejo adecuado y objetivo en pacientes con cáncer portadores de la variante. Un ineficiente arresto asociado al polimorfismo *MAD1* 1673

G→A puede ser información importante al determinar el esquema de tratamiento. Este SNP puede ser un factor a considerar en la quimioterapia basada en compuestos cuyo mecanismo de acción se basa en la detención del ciclo celular en metafase, como los alcaloides de la vinca y taxanos.

JUSTIFICACIÓN

El polimorfismo *MAD1* 1673 G→A tiene un efecto en el arresto en mitosis de líneas células transformadas. Sin embargo, los modelos experimentales reportados utilizan la expresión exógena como mecanismo para inducir esta condición. Actualmente no existen estudios que evalúen el efecto del polimorfismo en células normales que evaden el arresto, donde la principal consecuencia biológica es la generación de células aneuploides con IC. La localización y activación de *MAD2* es promovida por la unión con *MAD1*. Esta función es determinante en el PMHM. La presencia del polimorfismo puede ser un factor importante en el proceso de segregación cromosómica. Se desconoce la frecuencia del SNP en población sana, por lo que no es posible concluir que la transición es resultado del proceso de transformación maligna.

Actualmente, el manejo terapéutico del CEO representa el mayor desafío en las neoplasias ginecológicas. Cerca del 70% de los casos se diagnostican en etapas avanzadas, de los cuales sólo 35% sobrevive a 5 años. En etapas avanzadas, el esquema de tratamiento combina la cirugía y la quimioterapia. La investigación oncológica enfocada a predecir la eficacia y toxicidad de fármacos basada en un perfil genético se ha incrementado. Sin embargo, son pocos los estudios clínicos enfocados a la detección de nuevos factores pronósticos e indicadores de respuesta al tratamiento

con quimioterapia de inducción en cáncer de ovario avanzado. El estudio de factores genéticos como una fuente potencial de variables predictivas de respuesta a quimioterapia de inducción es importante. Además, se puede establecer una sinergia con la evaluación del único factor confiable en el abordaje de las pacientes con cáncer de ovario avanzado (PCOA): la respuesta bioquímica basada en la determinación del marcador tumoral CA125.

RELEVANCIA E IMPACTO

Analizar el impacto que tiene el polimorfismo MAD1 1673 G→A en el arresto del ciclo celular en metafase en células normales puede ser de gran utilidad en la biología del PMHM. El mayor impacto reside en determinar la consecuencia biológica posterior a la división cuando las células presentan el reto de activar el mecanismo. Identificar la generación de aneuploidías y el posible mecanismo por el cual se generaron, será una evidencia útil para reafirmar el papel de la IC como un factor promotor del desarrollo tumoral.

La identificación de factores genéticos de diagnóstico temprano, pronóstico y predicción de respuesta al tratamiento son estrategias recientes para el manejo del cáncer. La variación interindividual en la respuesta a quimioterapia no puede explicarse únicamente por factores clínico-farmacológicos. El conocimiento de factores genéticos asociados al mecanismo de acción de los fármacos puede ser determinante para explicar la eficacia y toxicidad a la quimioterapia, donde en ocasiones los factores clínicos pierden precisión.

El reconocimiento de nuevos biomarcadores permitirá estratificar a los pacientes en grupos con posibilidades distintas de responder a la terapia. Esta condición será útil en la toma de decisiones terapéuticas, ofreciendo esquemas que no estén comprometidos por el perfil genético, incrementando la posibilidad de respuesta patológica y reduciendo la toxicidad.

El manejo sistémico de las pacientes con cáncer de ovario avanzado se basa en el uso de platino y taxanos. El SNP *MAD1* 1673 G→A puede jugar un papel importante en el control de la segregación en el PMHM, y, por tanto, modular la respuesta al tratamiento con quimioterapia de inducción basada en PTX. El estudio y aplicación clínica de este SNP como predictor de la resistencia o sensibilidad a la quimioterapia en CEO permitirá individualizar y optimizar tanto el manejo de pacientes, como las intervenciones terapéuticas realizadas en la práctica oncológica rutinaria.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto del polimorfismo *MAD1* 1673 G→A en el funcionamiento del punto de monitoreo del huso mitótico y en la respuesta a la quimioterapia de inducción en pacientes con cáncer de ovario avanzado (PCOA) tratadas con carboplatino y paclitaxel (CBP-PTX)?

HIPÓTESIS

El polimorfismo *MAD1* 1673 G→A altera el punto de monitoreo del huso mitótico, ocasionando errores en la segregación cromosómica en presencia de un reto, como lo es el tratamiento con agentes anti-microtúbulos. Pacientes con cáncer de ovario avanzado (PCOA) portadoras del alelo silvestre (G) tendrán una mejor respuesta al tratamiento de quimioterapia de inducción basado en carboplatino y paclitaxel (CBP-PTX), en comparación con las pacientes portadoras del alelo polimórfico (A).

OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar el efecto del polimorfismo *MAD1* 1673 G→A en el control de la segregación cromosómica, así como su influencia en la respuesta al tratamiento, sobrevida libre de progresión y sobrevida global en pacientes con cáncer de ovario epitelial avanzado (PCOA) tratadas con carboplatino-paclitaxel (CBP-PTX)

Objetivos particulares

- Analizar la frecuencia del polimorfismo *MAD1* 1673 G→A en una muestra de población sana.
- Determinar el efecto del polimorfismo *MAD1* 1673 G→A en el arresto del ciclo celular en metafase (mitosis).
- Evaluar el impacto del polimorfismo *MAD1* 1673 G→A en el control de la segregación cromosómica, mediante el uso de agentes que activan el PMHM.

- Determinar la frecuencia de aneuploidías por rezago cromosómico y eventos de no disyunción en células portadoras del polimorfismo *MAD1* 1673 G→A, mediante el uso de agentes que activan el PMHM.
- Analizar la frecuencia del polimorfismo *MAD1* 1673 G→A en una muestra de pacientes con cáncer de ovario avanzado (PCOA).
- Determinar, en función del polimorfismo *MAD1* 1673 G→A, el grado de aneuploidía en muestras tumorales de pacientes con cáncer de ovario avanzado (PCOA).
- Evaluar el efecto del polimorfismo *MAD1* 1673 G→A en la respuesta, sobrevida libre de progresión (SLP) y sobrevida global (SG) en pacientes con cáncer de ovario avanzado (PCOA) tratadas con carboplatino-paclitaxel (CBP-PTX).

DISEÑO EXPERIMENTAL

Para analizar la frecuencia del polimorfismo *MAD1* 1673 G→A, tanto en una muestra de población sana como en PCOA, utilizamos DNA genómico extraído de personas cuyas características se enlistan más adelante. El análisis del genotipo se realizó por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) y secuenciación.

Con la intención de determinar el efecto del polimorfismo *MAD1* 1673 G→A en el arresto del ciclo celular en metafase (mitosis), se realizó citometría de flujo y se determinó el índice mitótico en cultivos primarios de linfocitos expuestos a nocodazol (NDZ) [172].

El NDZ es un benzimidazol carbamatado. Los benzimidazoles son compuestos orgánicos aromáticos heterocíclicos producto de la fusión de benceno e imidazol. Estos compuestos son más conocidos por su efecto anti-helmíntico de amplio espectro. El NDZ es un agente desestabilizador de microtúbulos. Su mecanismo de acción está dirigido a inhibir la asociación de sub-unidades de TUBULINA (α y β) en el extremo positivo de los microtúbulos, mediante la unión a residuos de arginina presentes en la β -TUBULINA. De esta manera, se impide 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 [173-174].

Una técnica que permite evaluar indirectamente la capacidad de arresto en metafase es el análisis del ciclo celular por citometría de flujo basado en el contenido de DNA. La citometría de flujo es una técnica cuyo fundamento se basa en el movimiento de una suspensión de 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, como yoduro de propidio, que al ser excitados, generan datos que permiten establecer grupos de células dentro de las transiciones G0-G1, S y G2-M (*Fig. 9*) [175].

El índice mitótico se define como la proporción existente entre el número de células en metafase y el número de células sujetas a conteo (usualmente 1000). Al someter a los linfocitos al tratamiento con NDZ, se activa el PMHM, promoviendo un arresto. De esta manera es posible relacionar el índice mitótico con la funcionalidad del PMHM,

infiriendo que un mayor número de metafases refleja una mayor eficiencia del mecanismo (Fig. 10).

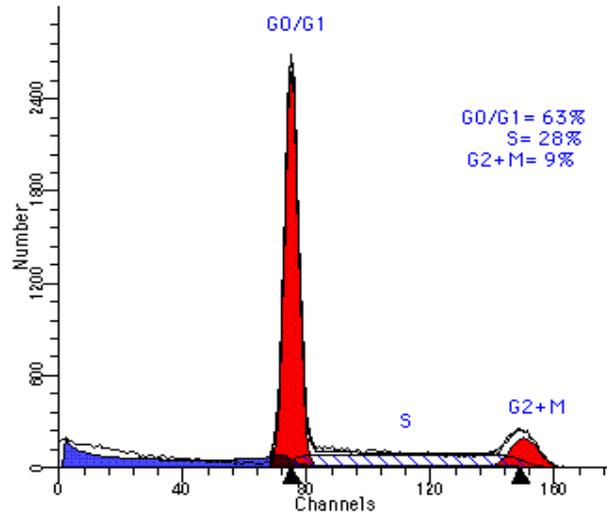


Figura 9. Histograma obtenido a partir del análisis del ciclo celular con base en el contenido de DNA, mediante el software CELLQuest™ y ModFit™.

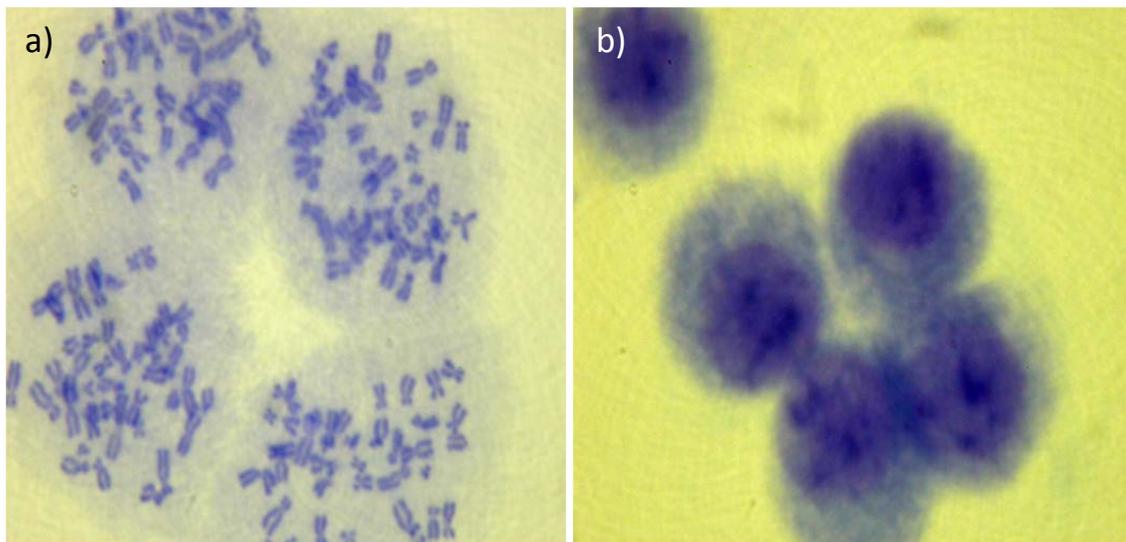


Figura 10. Linfocitos observados en microscopía de campo claro para la determinación del índice mitótico. a) Células en metafase. B) Células en interfase.

Con el objetivo de evaluar el impacto del polimorfismo *MAD1* 1673 G→A en el control de la segregación cromosómica, se utilizó la técnica de micronúcleos con citocinesis bloqueada en linfocitos tratados con NDZ y PTX.

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 bloqueo de la citocinesis [176]. 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 [177]. 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 CITOICALASINA-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. 11*). 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 [178].

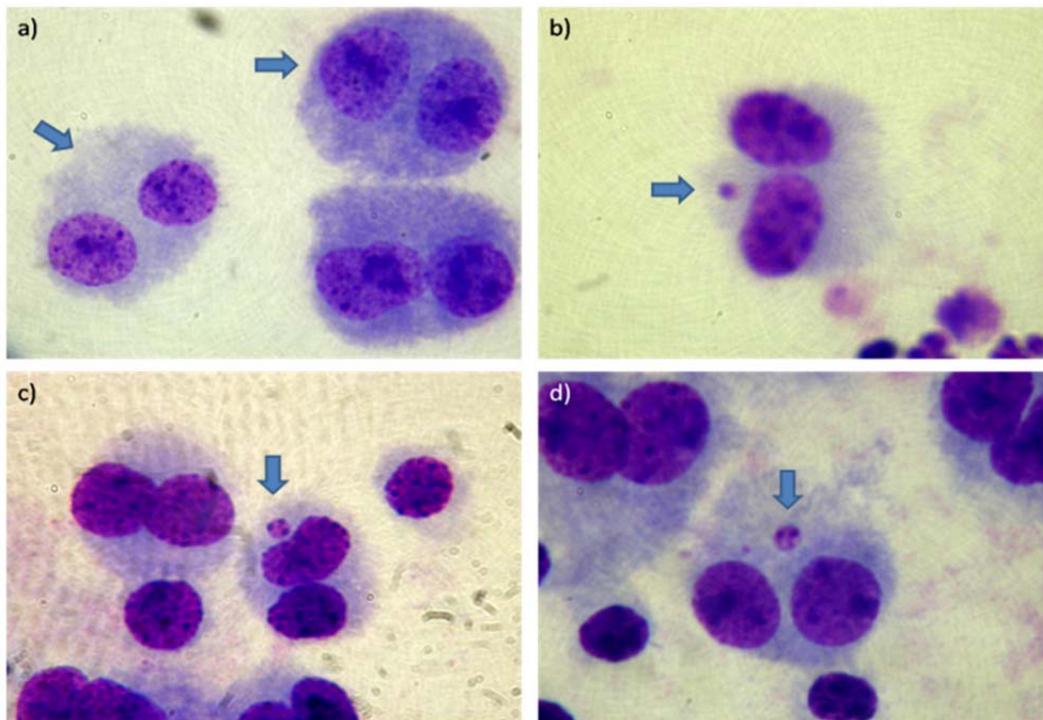


Figura 11. Células obtenidas a partir de la implementación de la técnica de micronúcleos por citocinesis bloqueada. a) Células binucleadas normales. b-d) Células binucleadas con micronúcleos. Aumento → 100X.

El PTX, a diferencia del NDZ, es un agente estabilizador de microtúbulos. Al impedir el intercambio de GTP por GDP en su extremo N-terminal, impide la despolimerización de microtúbulos, anulando la tensión necesaria para la segregación cromosómica en la metafase [158, 179]. Al utilizar NDZ y PTX, podemos evaluar dos situaciones que activan el PMHM: ausencia de unión y ausencia de tensión.

Para determinar la frecuencia de aneuploidías por rezago cromosómico y eventos de no disyunción en células portadoras del polimorfismo *MAD1* 1673 G→A en células tratadas con NDZ y PTX, utilizamos la técnica de FISH (*fluorescence in situ hybridization*).

Si bien la técnica de micronúcleos es una herramienta útil para evaluar errores en el mecanismo de segregación, también tiene la posibilidad de detectar micronúcleos derivados de rompimientos cromosómicos. Además, los rezagos cromosómicos no son el único mecanismo que explica la IC. Las aneuploidías también pueden generarse debido a eventos de no disyunción. En estos casos, la técnica de FISH es una estrategia experimental útil, ya que permite evaluar dos aspectos importantes: la presencia de cromosomas completos en los micronúcleos y los eventos de no disyunción. La detección se realiza mediante sondas satélite complementarias a bloques centroméricos que son acopladas a un fluoróforo, ya sea para un cromosoma específico o para todos los cromosomas. De esta manera, podemos identificar la presencia de cualquier cromosoma, y por lo tanto, determinar su distribución (*Fig. 12*).

La sonda pan-centromérica está diseñada para hibridar en secuencias alfoides repetidas localizadas en la constricción primaria o el centrómero, por lo que puede

reconocer a todos los cromosomas. Por el contrario, las sondas específicas para cromosomas están dirigidas a satélite alfa, II o III, dependiendo de la secuencia que brinde mayor afinidad.

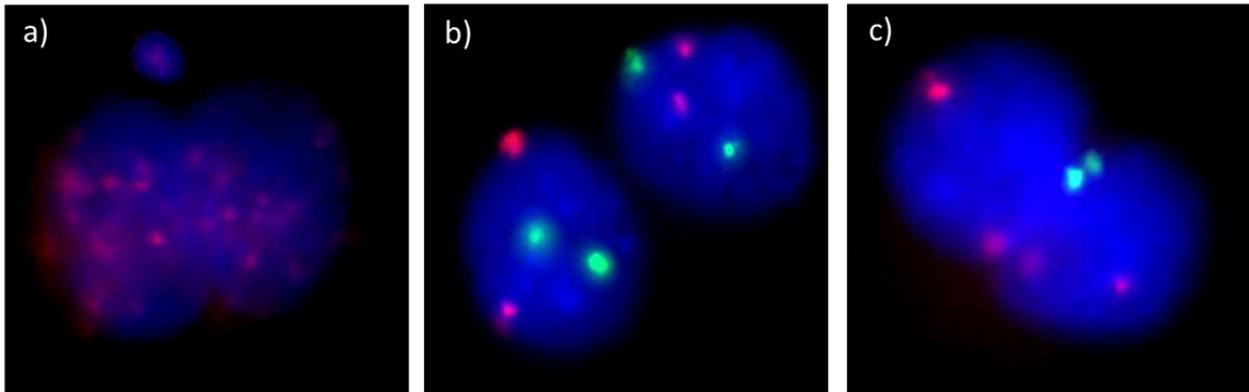


Figura 12. Imagen de hibridación in situ en células binucleadas obtenida mediante microscopía de fluorescencia. a) detección de micronúcleo positivo para centrómero. b) Segregación normal de cromosomas 1 (rojo) y 9 (verde). c) Evento de no disyunción en el cromosoma Y. Aumento → 100X.

Para determinar el grado de aneuploidía en función del polimorfismo *MAD1* 1673 G→A en muestras tumorales de PCOA, se utilizó tejido preservado en bloques de parafina y se montó la técnica de FISH.

Para evaluar el efecto del polimorfismo *MAD1* 1673 G→A en PCOA tratadas con CBP-PTX se utilizaron parámetros como el CA125, la citorreducción óptima, la respuesta a la quimioterapia, la SLP y la SG. El diseño del estudio en pacientes se describe a detalle en la sección de Material y Métodos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Condiciones de muestreo

Para la determinación del polimorfismo *MAD1* 1673 G→A, se obtuvieron y procesaron 144 muestras de DNA genómico. 106 muestras fueron proporcionadas por el Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Las 38 muestras restantes fueron procesadas en el Laboratorio de Carcinogénesis del Instituto Nacional de Cancerología (INCan), laboratorio que también forma parte del mismo departamento del IIB.

Las muestras de sangre periférica fueron obtenidas (con previo consentimiento y explicación de la finalidad de uso del material biológico) de individuos aparentemente sanos, nacidos en México, de padres y abuelos mexicanos. Las características de los donadores fueron: rango de edad entre 20 y 30 años, no fumadores, sin consumo de alcohol y sin esquema de tratamiento médico. 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. De esta manera se caracterizó al banco de DNA utilizado como una muestra de la población mexicana.

Aislamiento de DNA genómico

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, Franklin Lakes, New Jersey, 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°C . Pasado este tiempo, la sangre fue incubada a 37°C 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 $3500 \times G$ durante 5 min. El pellet obtenido fue adicionado con 2 ml de acetato de sodio 0.2 M, 125 μl de SDS al 10% y 30 μl de proteinasa K (Qiagen, Hilden, Germany) en una concentración de 20 mg/ml. El producto fue incubado durante 1 h a 55°C para posteriormente añadir 600 μl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico en una proporción 50/48/2. El tubo se mantuvo en agitación 10 min y se centrifugó a $3500 \times G$ durante 5 min. La fase acuosa fue recuperada y se adicionaron 600 μl de cloroformo, para dar paso a otro ciclo de agitación y centrifugación. La fase acuosa fue nuevamente sustraída y se añadió etanol absoluto (-20°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. La recuperación del material se hizo utilizando un tubo de 1.5 ml, al que se le añadió 1 ml etanol al 70 %. Se centrifugó el tubo a $153 \times G$ durante 2 min para después retirar el etanol. Se permitió la evaporación de etanol residual a temperatura ambiente. Se resuspendió el material en buffer TE en una concentración 10/0.1 a 55°C durante 24 h.

El material fue cuantificado (lectura a partir de 1.5 μl de muestra en espectrofotómetro ND-1000 (Nanodrop Technologies, Inc., Wilmington, Delaware, USA) y analizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8 %, utilizando buffer TBE 0.5x y tinción con bromuro de etidio (*Fig. 13*).

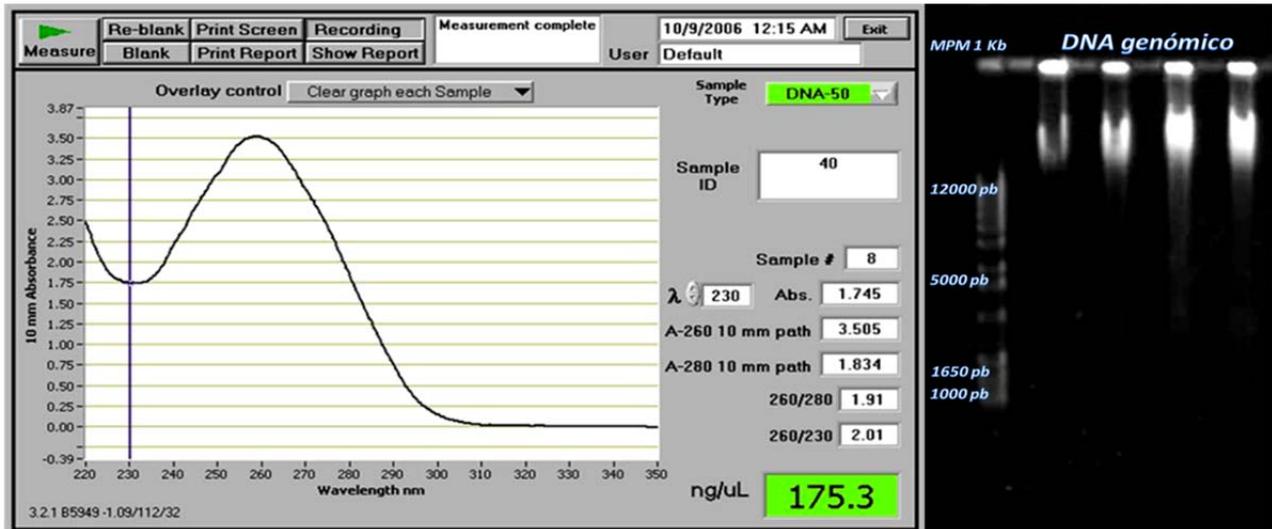


Figura 13. Cuantificación del DNA genómico obtenido a partir de sangre periférica (linfocitos) de individuos aparentemente sanos, así como el análisis de su integridad mediante electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

Análisis del genotipo

Amplificación del exón 17 de *MAD1*

A partir de las muestras de DNA genómico obtenidas, se realizaron PCRs utilizando oligonucleótidos diseñados para la amplificación del exón 17 del gen *MAD1* reportados en el trabajo de Iwanaga y con el previo reconocimiento de la secuencia (GenBank, GeneID 8379, NM 003550) [129].

MAD1 → Exón 17

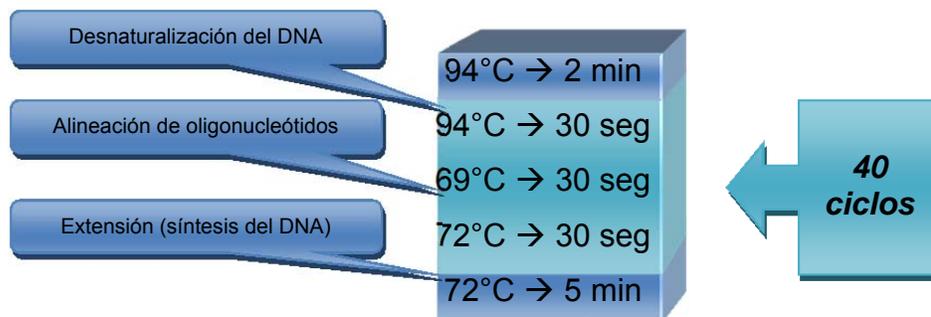
Sentido (*Forward*)→5'-GTGTGAGAATTCCTGCAGGGTGA CTATGACCAG-3'

Antisentido (*Reverse*)→5'GAGTCTGGATCCCTGCCACCTCCTTGGACGATGGCAGAC-3'

La amplificación se realizó a partir de 1 µl de DNA en una mezcla de componentes de PCR (Invitrogen, Sao Paulo, 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
MgCl₂ 50mM	0.3
MAD1 Forward 10 µM	0.2
MAD1 Reverse 10 µM	0.2
Templado (DNA)	1.0
Platinum Taq polimerasa (5 u/µl)	0.1
H₂O	7.0
<u>Volumen total</u>	<u>10.0</u>

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 obtuvo en las condiciones anteriormente descritas presenta una longitud de 241 pb (*Fig. 14*).

Determinación del genotipo por RFLP

La genotipificación a partir del producto de PCR se realizó por medio de RFLP utilizando la enzima BStU1 (*Bacillus stearothermophilus U458*) (New England BioLabs,

Ipswich, Massachusetts, 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
H₂O	5.7
<u>Volumen total</u>	<u>10.0</u>

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 homocigoto silvestre (GG), 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. 14*), de manera que la secuencia en este caso es *cacg*. Este cambio impide el reconocimiento y corte enzimático, dando como resultado un fragmento de 136 pb. Los individuos heterocigotos (GA) presentan todos los fragmentos posibles.

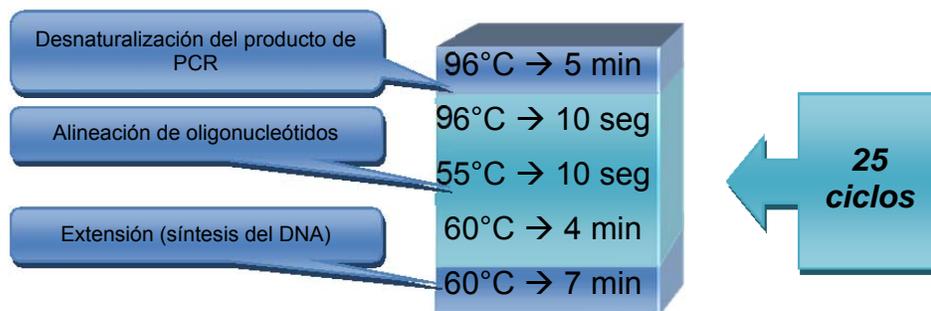
Determinación del genotipo por secuenciación

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 μl de Big DyeTM Terminator V 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Las condiciones se describen a continuación:

Componente	Volumen/reacción (μl)
Buffer 5x	2.0
<i>Mad1</i> Forward 10 μM	3.0
Producto de PCR <i>Mad1</i> -Exón 17	2.0
Byg Dye TM	0.5
H ₂ O	2.5
<u>Volumen total</u>	<u>10.0</u>

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 (Amersham Biosciences, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) en una concentración de 50 mg/ml de H₂O. 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 μl) 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 Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) durante 20 min, y resuspendido posteriormente en 25 μl de Hi-DiTM Formamide (Applied Biosystems, Foster City, California, 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, Foster City, California, USA). El análisis de la secuencia obtenida se realizó utilizando el software BioEdit© (Biological Sequence Alignment Editor, 2007, Ibis Biosciences) (Fig. 14).

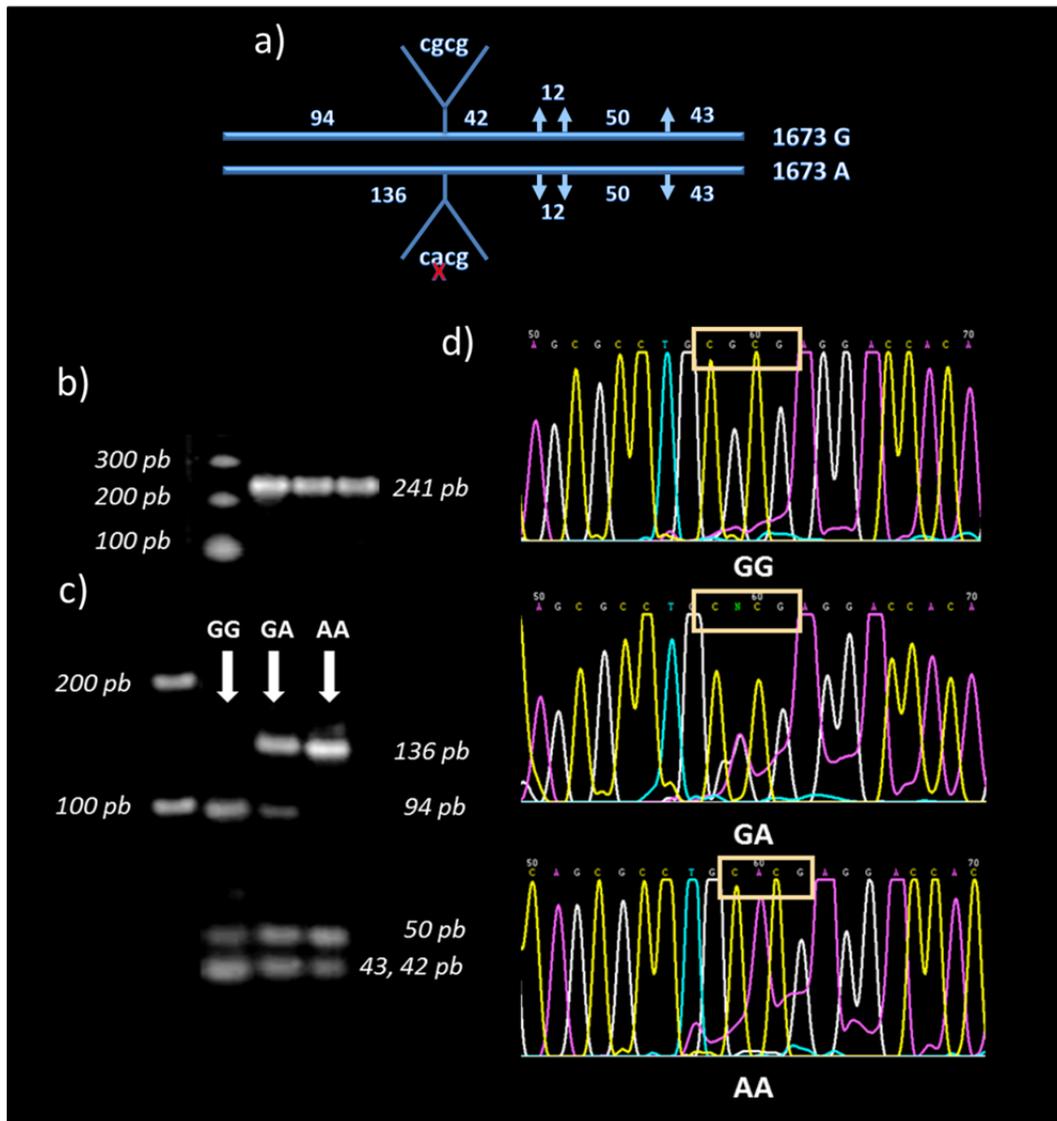


Figura 14. a) Mapa de restricción de la enzima BStU1 para el exón 17 de *MAD1*. b) Amplificación del exón 17 de *MAD1*, correspondiente a 241 pb. c) Genotipificación del polimorfismo *MAD1* 1673 G→A por RFLP. d) Secuenciación del exón 17 de *MAD1*, resaltando la presencia de los tres posibles genotipos.

Citometría de flujo

Para evaluar la cinética de proliferación con base en el contenido de DNA, se seleccionaron 18 individuos sanos, de sexo masculino (6 GG, 6 GA y 6 AA) y se realizaron cultivos primarios a partir de linfocitos aislados. Los cultivos fueron tratados con NDZ, para promover la activación del PMHM.

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 (BioWhittaker, Boehringer Ingelheim, Heidelberg, Germany) 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 5 ml de RPMI-1640 (GIBCO®, Invitrogen, Carlsbad, California, USA) adicionado con 1% de L-glutamina (L-glut.) (GIBCO®, Invitrogen, Carlsbad, California, USA), 1% de aminoácidos no esenciales (ANE) (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) y 10 % de Suero Bovino Fetal (SBF) (HyClone, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Se prepararon 2 diluciones celulares (1:50) a partir de 20 µl de células en medio, 900 µl de PBS y 80 µl de azul tripano, con ellas se determinó la viabilidad celular mediante conteos realizados en la cámara de Neubauer.

Condiciones de cultivo y tiempos de exposición

Se sembraron aproximadamente 2×10^6 células en 10 ml de medio RPMI-1640 (con las condiciones previamente descritas) por cada frasco de cultivo. Los linfocitos fueron estimulados con fitohemaglutinina al 2 % (GIBCO®, Invitrogen, Carlsbad, California,

USA). Se cultivaron durante 48 h a 37 °C en una atmósfera al 5% de CO₂. Posterior a esto, las células fueron sometidas al tratamiento con NDZ en una concentración final de 0.2 µg/ml (663 nM) (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) 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 triplicado.

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, Franklin Lakes, New Jersey, 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 Corp., Cleveland, Ohio, USA), 200 µl de yoduro de propidio (1 mg/ml) (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), 10 µl de TRITON x-100 (USB Corp., Cleveland, Ohio, 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.

Lectura de experimentos, obtención y análisis de datos

Las lecturas de los experimentos se realizaron utilizando el citómetro de flujo FACSort (Fluorescence-Activated Cell Sorting) (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA), mediante el software CELLQuest™ y contabilizando 20,000 eventos (células). Se determinó el porcentaje de muerte celular (fracción Sub-G1), con el objetivo de descartar diferencias en la viabilidad celular. Los eventos fueron modelados por el software ModFit LT™ y expresados (con base en el contenido de DNA) en porcentajes de células en G0-G1, S y G2-M. Los datos fueron analizados mediante la prueba de ANOVA de una sola vía, en función del genotipo. El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS v 20.0 con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

Índice mitótico

Para la determinación del índice mitótico, se obtuvieron muestras de 18 individuos sanos, de sexo masculino (6 GG, 6 GA y 6 AA). Las muestras de sangre fueron recolectadas en tubos Vacutainer® (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) adicionados con heparina sódica. Posteriormente se realizaron cultivos primarios a partir de sangre total. Los cultivos fueron tratados con NDZ, para promover la activación del PMHM.

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, Carlsbad, California, USA) adicionado con 1 % L-glut. y 1 %

de ANE. Los linfocitos fueron estimulados con fitohemaglutinina al 2%. Se permitió el crecimiento durante 48 h a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂. Posterior a esto, las células fueron sometidas al tratamiento con NDZ (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) disuelto en dimetil-sulfóxido (DMSO) (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) 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. Cada cultivo fue realizado por triplicado.

Fijación celular y preparación de laminillas

Al término de cada periodo de exposición al NDZ, 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 CO₂ 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, Darmstadt, Germany).

Condiciones del conteo y análisis de resultados

El índice mitótico se obtuvo realizando conteos por triplicado de 1000 células por donador en cada tiempo de exposición a NDZ, mediante microscopía de campo claro. Los datos fueron analizados mediante la prueba de ANOVA de una sola vía, en función

del genotipo. El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS v 20.0 con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

Ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis

Para determinar la frecuencia de micronúcleos en células binucleadas se obtuvieron muestras de 8 individuos sanos, de sexo masculino (4 GG y 4 GA) y se realizaron cultivos primarios a partir de linfocitos aislados. Los cultivos fueron tratados con NDZ y PTX (para promover la activación del PMHM) y con citocalasina-B 24 horas antes de la fijación, para obtener células binucleadas.

Condiciones de cultivo y tiempos de exposición

Se realizaron cultivos de linfocitos aislados a partir de sangre periférica (en las condiciones indicadas anteriormente). Por cada frasco de cultivo se sembraron aproximadamente 2×10^6 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 CO₂. Posteriormente, se realizó un cambio de medio centrifugando los cultivos a 288 x G por 8 min. Las células fueron resuspendidas nuevamente en 10 ml de medio RPMI. A partir de este momento, las células fueron tratadas con NDZ (0.2 µg/ml, 663 nM) o PTX (0.085 µg/ml, 100 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 triplicado.

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. Posteriormente, las células fueron sometidas a 3 lavados con solución fijadora. 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 por triplicado en 1000 células binucleadas por laminilla.

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 datos fueron analizados mediante la prueba de χ^2 de independencia, en función del genotipo. El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS v 20.0 con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

FISH

Con la intención de analizar la presencia de micronúcleos positivos para centrómero, se utilizaron las células obtenidas de 8 individuos (4 GG y 4 GA) tratadas con NDZ y previamente procesadas para el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis. Para determinar la frecuencia de eventos de no disyunción en células binucleadas se utilizaron las células procesadas para el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis. El análisis fue realizado a partir de los cultivos de linfocitos de 8 individuos (4 GG y 4 GA) tratados con NDZ o PTX.

Condiciones de hibridación

Los ensayos de FISH se realizaron utilizando una sonda pan-centromérica (Kreatech Biotechnology, Amsterdam, the Netherlands) y cuatro sondas centroméricas (VYSIS™, Abbot Molecular, Des Plaines, Illinois, U.S.A) dirigidas a tres cromosomas autosómicos de diferente tamaño: 1 (CEP 1-Spectrum Orange: satélite II/III), 9 (CEP 9-Spectrum Green: α satélite) y 16 (CEP 16-Spectrum Orange: satélite II), así como a un cromosoma sexual: Y (CEP Y-Spectrum Green: satélite III).

Las células binucleadas fijadas en metanol fueron montadas en laminillas de vidrio, corroborando su distribución en microscopía de contraste de fases. Se marcó el área de hibridación utilizando un lápiz con punta diamante. La sonda se aplicó en una mezcla de hibridación de 10 μ l (1 μ l de cada sonda, 7 μ l de Buffer y 1 μ l de H₂O). Una vez

suministrada la mezcla de hibridación, se colocó un cubreobjetos y se sellaron los bordes con un polímero.

En una cámara húmeda (HyBrite, VYSIS™, Abbot Molecular, Des Plaines, Illinois, U.S.A) las células fueron llevadas a una temperatura de desnaturalización (75°C) durante dos min, 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 µl de contracolorante DAPI II-Vectashield H-1200 (Vector Laboratories Inc., Burlingame, California, USA) a cada área de hibridación. Se colocó un cubreobjetos y se sellaron los bordes.

Conteo de micronúcleos positivos para centrómero y 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 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). La frecuencia de micronúcleos positivos para centrómero y eventos de no disyunción para los cromosomas 1, 9, 16 y Y fue obtenida con base en un conteo de 1000 células binucleadas. Los datos fueron analizados mediante la prueba de χ^2 de independencia, en función del genotipo. El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS v 20.0 con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

DISEÑO DEL ESTUDIO EN PACIENTES CON CÁNCER DE OVARIO

El análisis de la frecuencia del polimorfismo *MAD1* 1673 G→A en PCOA tratadas con CBP-PTX, el grado de aneuploidía en muestras tumorales y el efecto clínico (respuesta, sobrevida libre de progresión, SLP y sobrevida global, SG) se realizaron bajo los parámetros que a continuación se describen.

Población

La población de estudio estuvo conformada por PCOA evaluadas el Instituto Nacional de Cancerología (INCan), en el periodo comprendido entre Junio de 2002 y Febrero de 2009. Este protocolo fue aprobado por el comité de bioética del Instituto. A las pacientes incluidas, se les informó tanto el objetivo del estudio, como el esquema de manejo de las muestras de sangre y tejido tumoral. Para comparar la frecuencia del polimorfismo *MAD1* 1673 G→A entre población sana Y PCOA, el tamaño de muestra para obtener un poder estadístico del 90% se requirió de al menos 87 pacientes, con un $\alpha=0.05$ y una $\beta=0.90$. El número de pacientes reclutadas fue de 91, de las cuales, 74 fueron incluidas en la evaluación de la respuesta, basándose en los siguientes criterios.

Criterios de selección

El grupo de estudio estuvo conformado por mujeres tratadas inicialmente con quimioterapia de inducción (3 ciclos de CBP AUC 6 más PTX, 175 mg/m²) y cirugía citorrreductora de intervalo, seguido de 3 ciclos más de consolidación bajo el mismo régimen. Todas las pacientes tuvieron un seguimiento mensual o bimensual, con determinaciones de CA125 y evaluación clínica para detectar recurrencia de la enfermedad. Para determinar la sobrevida libre de progresión, el seguimiento inició

después del último ciclo de quimioterapia de consolidación y se mantuvo hasta 5 años (60 meses) en cada paciente.

Criterios de inclusión

- Diagnóstico inicial de cáncer epitelial de ovario avanzado, histológicamente confirmado, con enfermedad irreseccable o sometido a citorreducción primaria subóptima.
- Haber recibido al menos 3 ciclos de quimioterapia de inducción basada en CBP-PTX como primera línea de tratamiento.
- Con archivo completo.
- No haber recibido quimioterapia o radioterapia previamente a la inclusión.
- Edad 18-75 años.
- Karnofsky mayor o igual a 70.
- Adecuado funcionamiento de la médula ósea: leucocitos $3.5 \times 10^9/l$; plaquetas $100 \times 10^9/l$; hemoglobina 10.0 g/dl.
- Adecuado funcionamiento renal: depuración de creatinina mayor de 40 ml/min.
- Adecuado funcionamiento hepático: bilirrubina menor de 2.0 μM ; transaminasas menos del doble de límite superior normal.

Criterios de exclusión

- Pacientes no candidatas o que rehusaron tratamiento con quimioterapia.
- Pacientes que no aceptaron inclusión en el estudio.

Criterios de eliminación

- Pacientes con muestra de DNA insuficiente o en estado no apto para la determinación del polimorfismo.
- Pacientes que expresen su deseo de no continuar con el estudio.
- Pacientes que iniciaron el tratamiento con quimioterapia de inducción, sin haber completado al menos 3 ciclos.

Aislamiento de DNA genómico y análisis del genotipo

Para la determinación del polimorfismo *MAD1* 1673 G→A, se obtuvieron y procesaron 91 muestras de DNA genómico obtenido a partir de 5 ml de sangre periférica de PCOA. El aislamiento de DNA, la amplificación del exón 17 de *MAD1* y la obtención del genotipo mediante RFLP se realizaron bajo las mismas condiciones descritas con anterioridad. Para comparar las frecuencias obtenidas en población sana y PCOA, se realizó la prueba de χ^2 de independencia, en función del genotipo. El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS v 20.0 con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

FISH en muestras tumorales

Con la intención de determinar el grado de aneuploidía (en función del polimorfismo *MAD1* 1673 G→A), se utilizó el tejido tumoral embebido en parafina, disponible en 27 PCOA incorporadas al estudio (3 GG, 15 GA y 9 AA).

Pretratamiento y condiciones de hibridación

Se realizaron cortes de aproximadamente 5 μm de tejido tumoral embebido en parafina por medio de micrótomo. Los cortes fueron incubados a 40°C en agua destilada, para

posteriormente ser montados en laminillas cargadas positivamente. Las laminillas se secaron a temperatura ambiente durante 2 h, para después ser incubadas a 56°C durante 16 h. Para la desparafinación, las laminillas fueron sumergidas en xilol durante 10 min dos veces (reemplazando el xilol en cada lavado), deshidratadas en etanol al 100% a temperatura ambiente durante 5 min (dos veces con reemplazo de etanol). Para el secado, las laminillas se incubaron en cámara húmeda (HyBrite, VYSIS™, Abbot Molecular, Des Plaines, Illinois, U.S.A) durante 5 min. Transcurrido ese tiempo, las laminillas fueron sumergidas en HCl (0.2N) durante 20 min, en agua destilada durante 3 min, en buffer de lavado (VYSIS™) durante 3 min. Se realizó una incubación a 80°C utilizando solución de pretratamiento (VYSIS™) durante 30 min, para después sumergir las laminillas en agua destilada durante 1 min y nuevamente en buffer de lavado (VYSIS™) durante 5 min, dos veces. Se realizó un tratamiento con solución de proteasa a 37°C durante 10 min, para después utilizar buffer de lavado (VYSIS™) durante 5 min, primero a temperatura ambiente y después a 50°C. Finalmente, las muestras fueron sumergidas en buffer de formalina al 10% a temperatura ambiente durante 10 min, sumergidas en buffer de lavado (VYSIS™) durante 5 min, primero a temperatura ambiente y después a 50°C.

Los ensayos de FISH se realizaron utilizando tres sondas centroméricas (VYSIS™, Abbot Molecular, Des Plaines, Illinois, U.S.A) dirigidas a los cromosomas 1, 9 y 16, utilizadas bajo las condiciones descritas anteriormente.

Conteo celular

Las laminillas fueron analizadas utilizando el microscopio de fluorescencia Zeiss™ Axioskop 2 Mot. Plus y el software analizador de imágenes Axiovision™ 4.0 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). El grado de aneuploidía se obtuvo contando 100 células por muestra, en un ensayo doble ciego y fue expresado como el porcentaje de células aneuploides del total de células contadas por experimento. Los datos fueron analizados mediante la prueba de ANOVA de una sola vía, en función del genotipo. El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS v 20.0 con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

Evaluación de la respuesta al tratamiento con CBP-PTX

La respuesta se evaluó utilizando el valor de CA125 posterior a los tres ciclos de quimioterapia de inducción, la citorreducción óptima y la sensibilidad al tratamiento. Además, se analizó la SLP y la SG. La descripción de las variables se enlista a continuación

Variables Independientes

Las pacientes fueron divididas de acuerdo al genotipo de *MAD1* 1673 G→A en dos grupos: polimórfico y no polimórfico.

- El grupo polimórfico incluyó a las pacientes portadoras de al menos un alelo polimórfico (GA y AA).
- El grupo no polimórfico incluyó a las pacientes portadoras del genotipo homocigoto silvestre (GG).

Variables Dependientes

- *Respuesta a quimioterapia.* Evidencia de respuesta parcial o completa por criterios de RECIST asociada a la respuesta bioquímica en nivel sérico del marcador tumoral CA 125 (>35 U/ml) posterior a 3 ciclos de quimioterapia de inducción.
- *Citorreducción óptima o microscópica.* Enfermedad residual menor de 1 cm o sin evidencia de enfermedad, tras la realización de cirugía citorreductora de intervalo.
- *Sensibilidad al tratamiento.* No evidencia de progresión durante el tratamiento o recaída de la enfermedad después de al menos 6 meses de haber concluido la quimioterapia.
- *Sobrevida libre progresión (SLP).* Periodo comprendido entre el inicio del tratamiento y la documentación de recaída o progresión de la enfermedad, ya sea por criterios clínicos (elevación del CA125), de laboratorio o de imagen.
- *Sobrevida global (SG).* Periodo comprendido entre el inicio y fin del seguimiento a pacientes, con corte a 5 años en caso de alcanzar dicho periodo de supervivencia.

Los indicadores de respuesta anteriormente descritos fueron analizados mediante la prueba de χ^2 de independencia, en función de los grupos descritos para el polimorfismo MAD1 1673 G→A (polimórficos y no polimórficos). Para las variables cuantitativas se efectuó estadística descriptiva con promedios y frecuencias. La respuesta bioquímica se analizó mediante regresión logística, ajustada por edad y estadio clínico. La supervivencia libre de progresión y la supervivencia global fueron analizadas por el método de Kaplan-Meier con prueba estadística de *log-rank*. El análisis estadístico se

realizó con el paquete estadístico SPSS v 20.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

RESULTADOS

El genotipo AA de Mad1 1673 G→A se presenta en individuos sanos, siendo esta condición más frecuente en pacientes con cáncer de ovario

De 144 muestras de individuos aparentemente sanos evaluadas, la distribución de genotipos fue: 35 (24.3%) GG, 74 (51.4%) GA y 35 (24.3%) AA. Esta distribución mantiene el equilibrio de Hardy-Weinberg. En las 91 muestras de sangre de pacientes analizadas la distribución fue: 15 (16.4%) GG, 40 (43.9%) GA y 36 (39.7%) AA. Al comparar ambas poblaciones, existe una mayor frecuencia del alelo A en las muestras de PCOA ($P=0.014$), así como un mayor número de individuos con genotipo AA ($P=0.013$). A diferencia de la población sana, la distribución de PCOA no se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg.

El polimorfismo MAD1 1673 G→A afecta la funcionalidad del PMHM

Los resultados de la citometría de flujo con base en el contenido de DNA muestra que el porcentaje de células tratadas con NDZ que permanecieron en la fase G2-M fue mayor en células portadoras del genotipo GG, comparado con las células con genotipo GA y AA en los diferentes tiempos de exposición ($P<0.05$; Fig. 15). El porcentaje de muerte celular (fracción Sub-G1) fue el mismo en los tres genotipos (aproximadamente 4% para todos los genotipos en los diferentes tiempos de exposición).

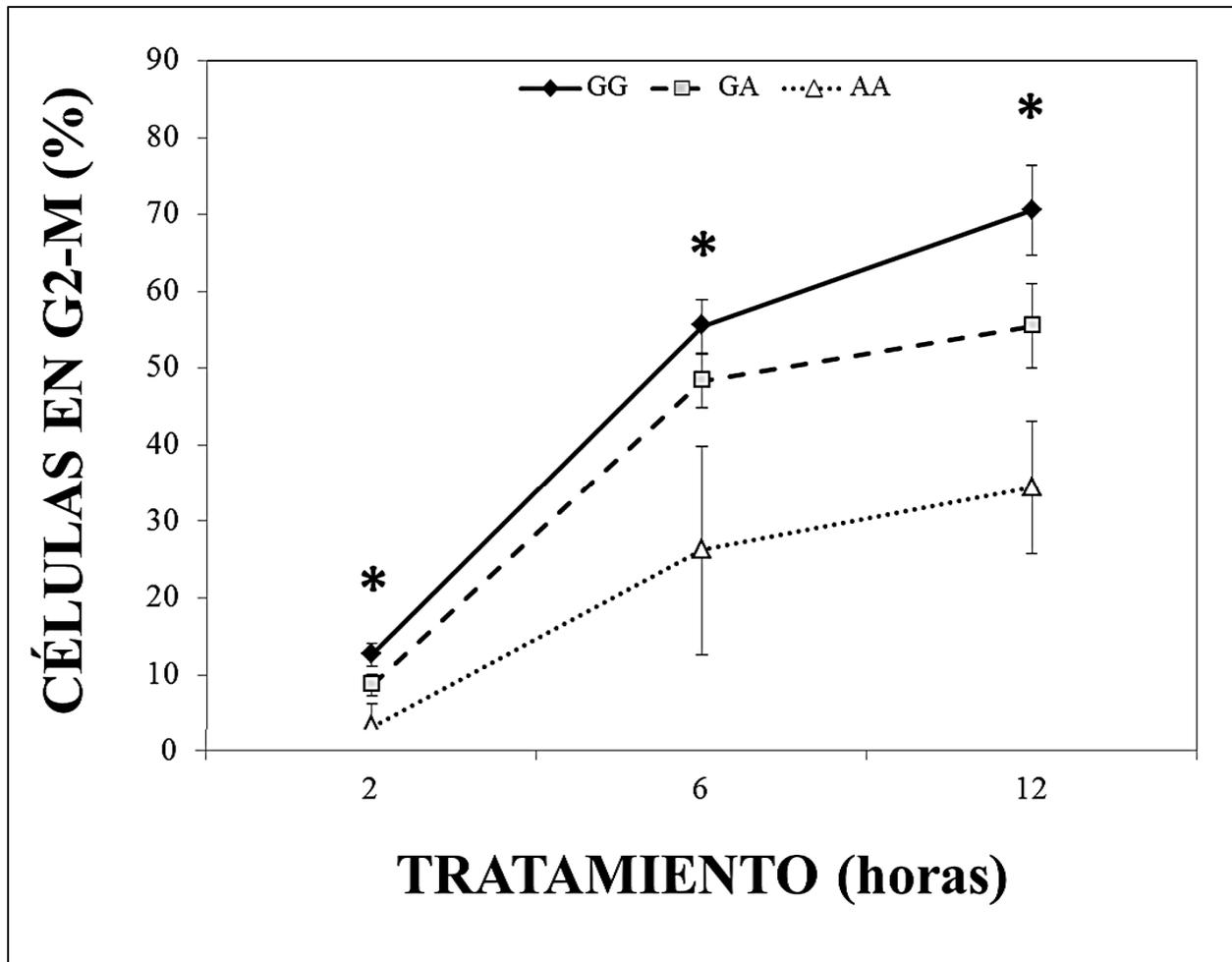


Figura 15. Análisis del arresto del ciclo celular en función del polimorfismo MAD1 1673 G→A. Citometría de flujo con base en el contenido de DNA en linfocitos estimulados con fitohemaglutinina y tratados con NDZ (0.2 µg/ml) durante 2, 6 y 12 h. Los puntos en la recta indican el porcentaje de células en la fase G2-M. Todos los resultados representan promedios de tres ensayos diferentes. G: Alelo silvestre; A: alelo polimórfico. *P<0.05.

El índice mitótico también muestra un mayor número de metafases en células portadoras del genotipo GG, comparado con las células con genotipo GA y AA en los diferentes tiempos de exposición (P<0.05; Fig. 16).

Estos resultados indican que, en presencia de un agente que desestabiliza los microtúbulos (impidiendo la unión microtúbulos-cinecotoro), el PMHM pierde funcionalidad en células portadoras de al menos un alelo polimórfico.

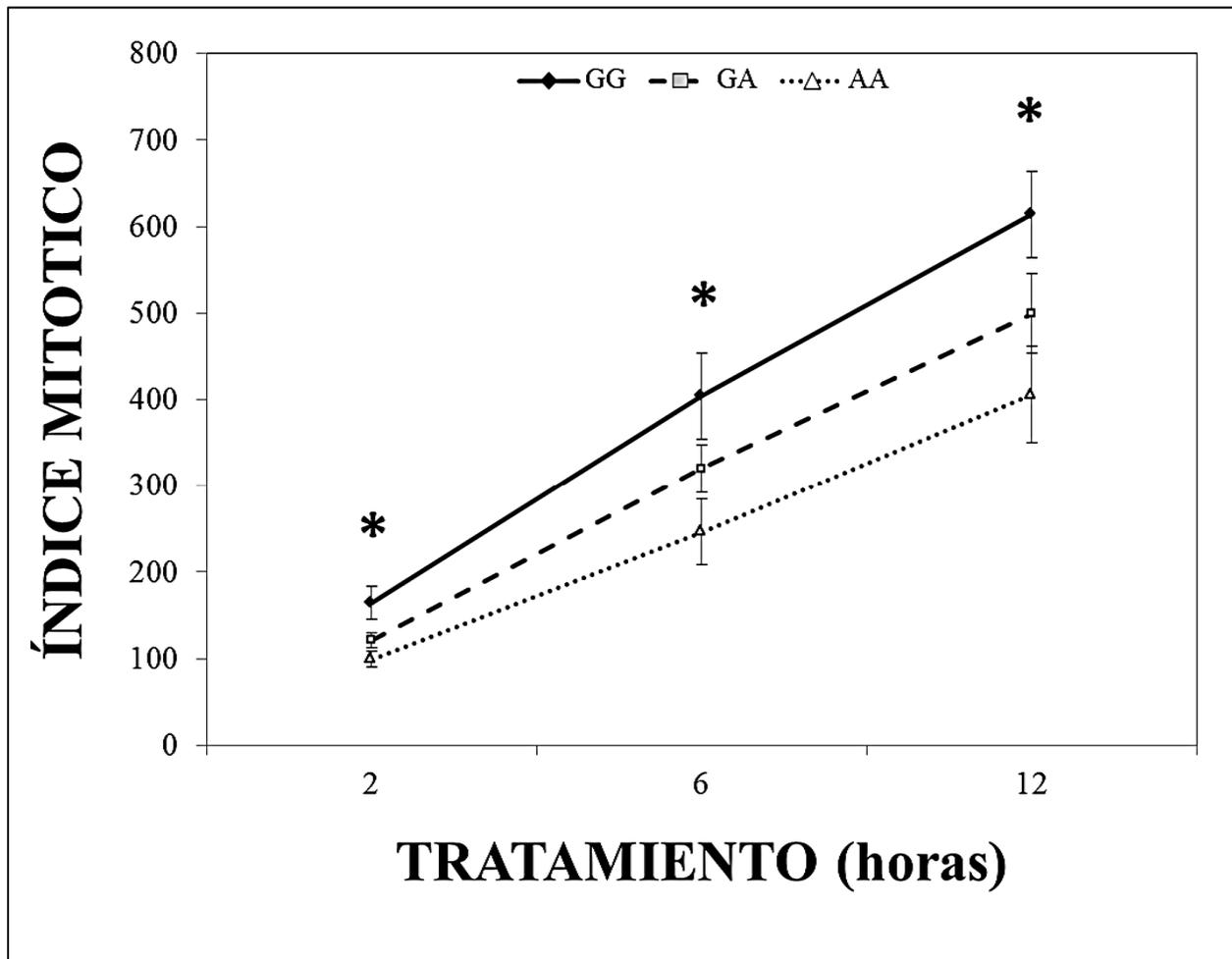


Figura 16. Análisis del arresto del ciclo celular en función del polimorfismo MAD1 1673 G→A. Índice mitótico en linfocitos estimulados con fitohemaglutinina y tratados con NDZ (0.2 µg/ml) durante 2, 6 y 12 h. Los puntos en la recta indican el número de células arrestadas en metafase. Todos los resultados representan promedios de tres ensayos diferentes. G: Alelo silvestre; A: alelo polimórfico. *P<0.05.

El polimorfismo MAD1 1673 G→A se asocia a una mayor frecuencia de células aneuploides

Los datos obtenidos por el ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis muestran una mayor frecuencia de células con micronúcleos en linfocitos de individuos AA que fueron tratados *in vitro* con NDZ y PTX, en comparación con las frecuencias obtenidas en linfocitos de individuos GG ($P < 0.05$; Fig. 17b y c). La frecuencia de micronúcleos se incrementa en las células GG en función del tiempo de tratamiento. No existieron diferencias con respecto al número de células apoptóticas observadas (2% en controles y hasta 5% en células tratadas). Los datos obtenidos mediante FISH utilizando una sonda pan-centromérica confirman la presencia de cromosomas completos en los micronúcleos. El porcentaje de micronúcleos con señal positiva para centrómero muestra una distribución del 80 al 100%, sin diferencias entre genotipos o tiempos de exposición (Fig. 17d). Sin embargo, el ensayo de FISH diseñado para sondas 1, 9, 16 y Y muestra un mayor número de eventos de no disyunción en células AA comparado con células GG después del tratamiento con NDZ o PTX, independientemente de la duración ($P < 0.05$; Fig. 18b y c).

El polimorfismo MAD1 1673 G→A se asocia a un mayor grado de aneuploidía en tumores de pacientes con cáncer de ovario avanzado

Los tumores de pacientes portadoras de al menos un alelo polimórfico (GA y AA) mostraron un mayor porcentaje de células aneuploides en comparación con los tumores de pacientes no polimórficas (GG). El porcentaje de células aneuploides en muestras de individuos AA y GA (70.6 y 64.3%, respectivamente) es mayor en comparación con las muestras de pacientes GG (38%) ($P < 0.05$; Fig. 19a y b).

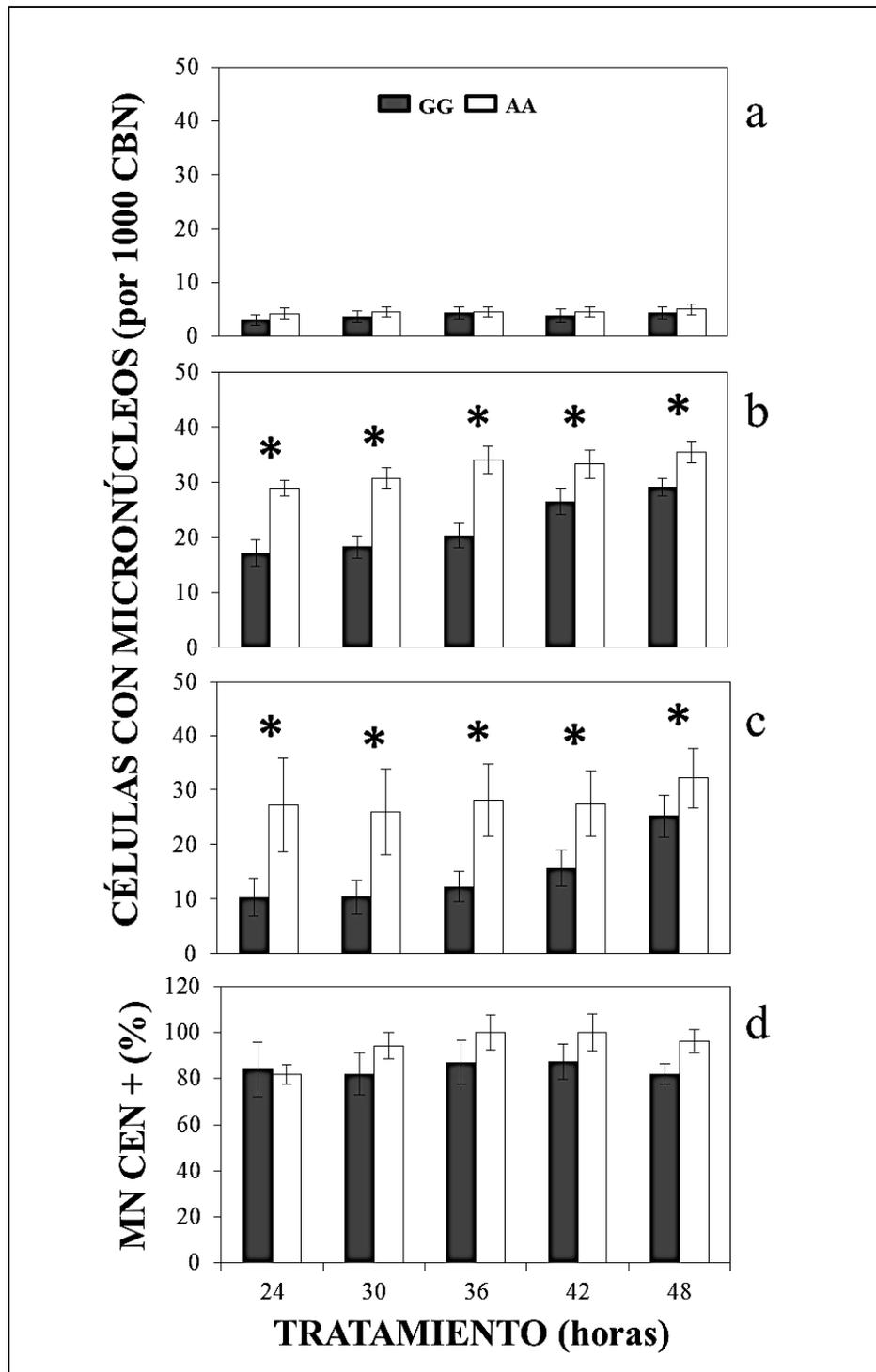


Figura 17. Frecuencia de micronúcleos (MN) por cada 1000 células binucleadas (CBN) en función del polimorfismo MAD1 1673 G→A. a) Controles (sin tratamiento); células tratadas con b) nocodazol (0.2 µg/ml) o c) paclitaxel (0.085 µg/ml). d) Porcentaje de micronúcleos positivos para centrómero (MN CEN+)

determinados usando una sonda pan-centromérica. Todos los resultados representan promedios de tres ensayos diferentes. *P<0.05.

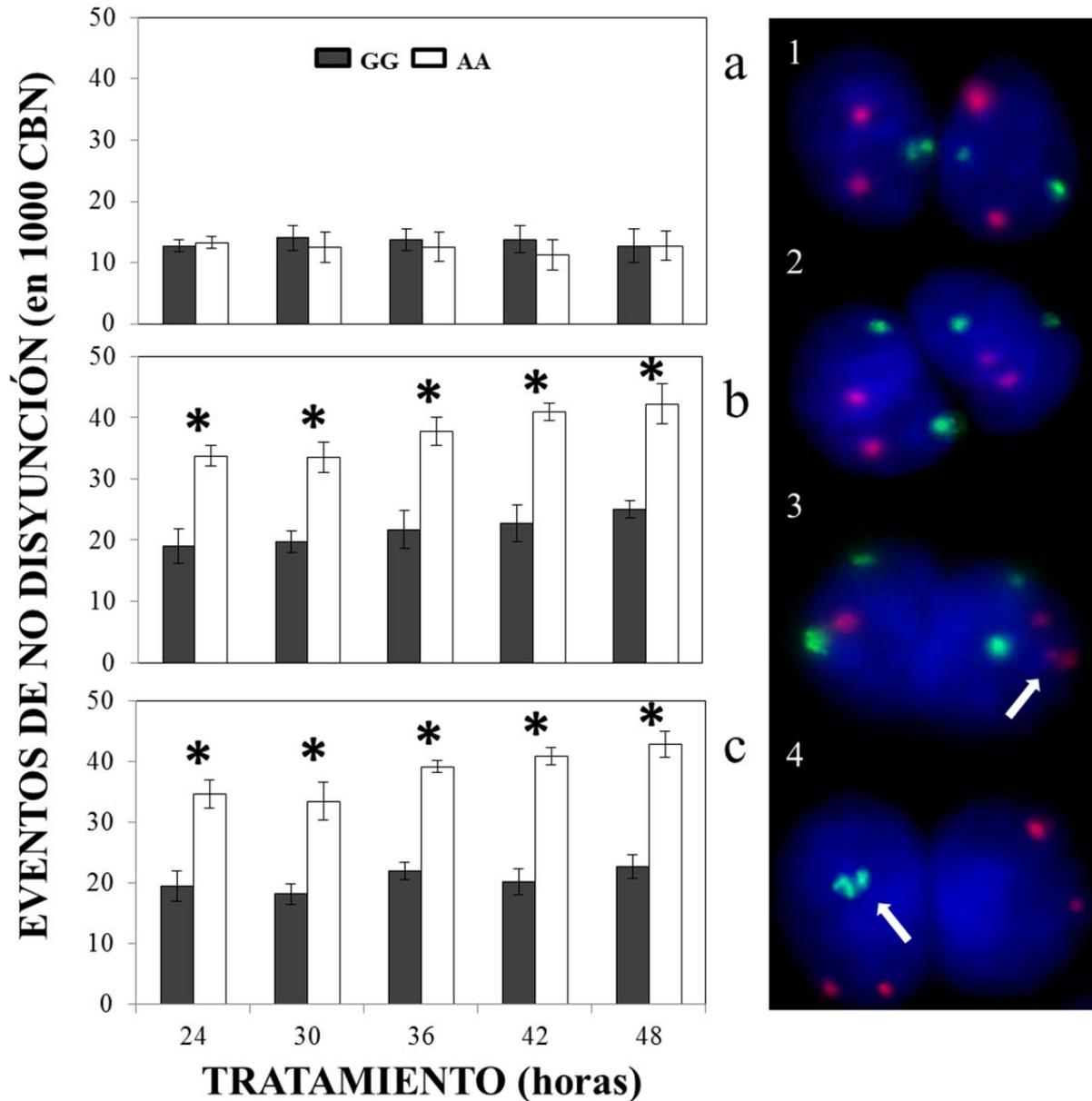


Figura 18. Análisis de eventos de no disyunción en función del polimorfismo MAD1 1673 G→A. a) Controles sin tratamiento. Células tratadas con b) nocodazol (0.2 µg/ml) o c) paclitaxel (0.085 µg/ml). d) Células con (1-2) segregación cromosómica normal o con eventos de no disyunción (3-4; flechas blancas). Las barras muestran el promedio de eventos de no disyunción en cromosomas 1, 9, 16 y Y en

células binucleadas a diferentes tiempos de exposición. Todos los resultados representan promedios de tres ensayos diferentes. *P<0.05.

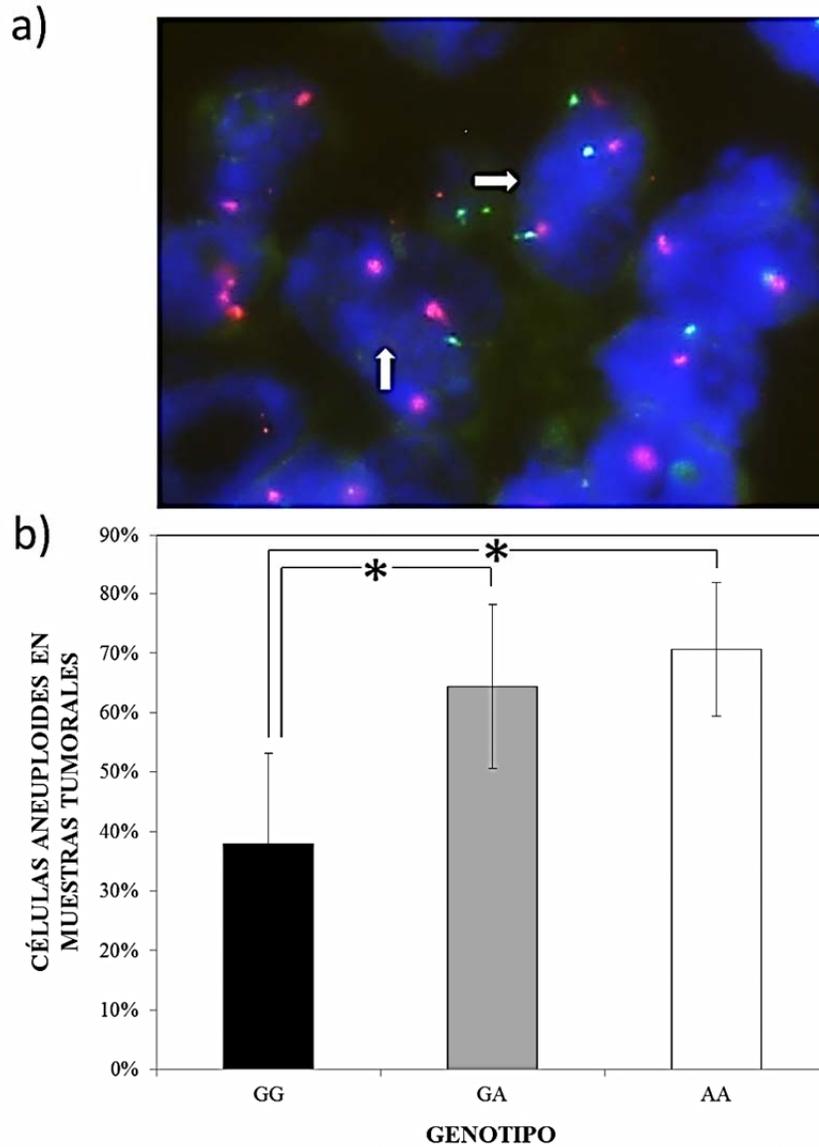


Figura 19. Porcentaje de células aneuploides en tejido tumoral de pacientes con cáncer de ovario epitelial avanzado en función del genotipo MAD1 1673 G→A. a) Eventos de aneuploidía detectados en tejido mediante FISH. b) porcentajes obtenidos a partir del conteo de 100 células tumorales en un ensayo doble-ciego utilizando muestras de 3 individuos GG, 15 individuos GA y 9 individuos AA. *P<0.05.

El polimorfismo *MAD1* 1673 G→A se asocia a una menor respuesta a la quimioterapia de inducción, citorreducción óptima y sensibilidad al tratamiento en pacientes con cáncer de ovario avanzado

De acuerdo a los criterios mencionados con anterioridad, de las 91 pacientes analizadas para la determinación del genotipo, 74 pacientes fueron incluidas en el análisis de respuesta al tratamiento (13 GG, 30 GA y 31 AA). Se agruparon en dos categorías: aquellas con al menos un alelo polimórfico (AA+GA) y aquellas no polimórficas (AA). Así, se obtuvieron 61 pacientes polimórficas y 13 no polimórficas.

La mediana de edad en la muestra analizada fue de 55 años (rango 36-83 años). Un 74% de las pacientes fueron menores de 65 años (55/74). Con respecto a la etapa clínica, 54 pacientes fueron diagnosticadas con etapa clínica III (73%) y 20 pacientes con etapa clínica IV (27%). El diagnóstico inicial mediante laparotomía exploratoria se realizó en 48 pacientes (65%). En los casos restantes, el diagnóstico se obtuvo mediante biopsia guiada de la lesión pélvica y/o en análisis citológico de fluido ascítico. El tipo histológico predominante fue seroso papilar de alto grado (n=44, 59%). Otros tipos histológicos encontrados fueron endometrioides (n=3), de células claras (n=3), mucinoso (n=1) y mixto (n=23). La Tabla 3 resume las características clínicas de los pacientes incluidos en el análisis de respuesta.

El nivel sérico del marcador tumoral CA125 al momento del diagnóstico tuvo una variabilidad en el rango de 28.6 hasta 38,219 U/ml, con un nivel basal promedio de 4594.5 U/ml. El valor promedio de CA125 basal fue mayor en las pacientes no

polimórficas en comparación con las pacientes polimórficas (5075 vs. 4492 U/ml), sin existir diferencias significativas ($P=0.86$).

Tabla 3. Características clínicas de las pacientes con cáncer de ovario avanzado evaluadas,

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS		MEDIANA	RANGO
Edad		55	36-83
CA125 basal		4594.48	28.60-38219.00
Característica clínica		n=74	%
Etapa clínica			
	III	54	73
	IV	20	27
Histología			
	Seroso papilar	44	59.5
	Endometriode	3	4.1
	Células claras	3	4.1
	Mucinoso	1	1.4
	Otro	23	31.1
Grado de diferenciación			
	Bien	7	9.5
	Moderado	3	4.1
	Pobre	64	86.5
Genotipo MAD1 1673 G→A			
	GG	13	17.6
	GA	30	40.5
	AA	31	41.9
CA125 previo a la cirugía			
	<35 u/ml	27	36.5
	>35 u/ml	47	63.5
Citorreducción óptima			
	Si	55	74.3
	No	19	25.7
Recurrencia			
	Si	30	12.2
	No	9	40.5
	Sin dato (debido a la progresión)	35	47.3

La respuesta global al tratamiento tras 3 ciclos de quimioterapia de inducción se demostró con las determinaciones seriadas del nivel sérico del marcador tumoral CA125, considerando una respuesta bioquímica al demostrar niveles menores o iguales a 35 U/ml. Así, se observó una respuesta bioquímica en 36% de las pacientes (27/74). Un 77% (10/13) de las pacientes no polimórficas presentaron respuesta bioquímica, mientras que para las pacientes polimórficas se obtuvo una respuesta en 31% (19/61). Los datos obtenidos a partir del modelo de regresión logística, ajustados por edad y

estadio clínico, indican que la presencia de al menos un alelo polimórfico se asocia con una menor respuesta bioquímica, con un OR de 3.994 (95% IC → 1.01-15.83; Tabla 4). Aun cuando el valor basal fue mayor en las pacientes no polimórficas, la media de CA125 previo a la cirugía fue menor en este grupo (170.1 vs. 231.6 U/ml).

Tabla 4. Análisis de regresión logística de la respuesta bioquímica al tratamiento con carboplatino-paclitaxel en función del polimorfismo MAD1 1673 G→A.*

Variables	B	DE	Wald	gl	Sig	Exp(B)	95% IC para EXP(B)	
							Mayor	Menor
Polimorfismo MAD1	1.385	0.703	3.885	1	0.049	3.994	1.008	15.826
Edad	-0.054	0.023	5.375	1	0.020	0.948	0.906	0.992
Etapa clínica	0.712	0.661	1.159	1	0.282	2.037	0.558	7.444
Constante	2.280	1.333	2.926	1	0.087	9.779		

* La presencia de al menos un alelo polimórfico incrementa el riesgo a no responder a la quimioterapia de inducción en pacientes con cáncer de ovario avanzado (CA125 >35 U/ml; P<0.05). Los resultados fueron ajustados por edad y etapa clínica. Exp(B)→ Riesgo relativo, DE→ Desviación estándar, Wald→ Estadístico Wald, gl→grados de libertad, Sig→Significance, IC→ Intervalo de confianza.

La citorreducción óptima se logró en 74% (55/74) del total de pacientes estudiadas. Todas las pacientes no polimórficas (13/13) tuvieron citorreducción óptima, en contraste con un 68.85% (42/61) de las pacientes polimórficas.

El 53% de las pacientes (39/74) fueron consideradas sensibles a la quimioterapia, mientras que el 47% restante (35/74) presentaron progresión de la enfermedad. El 69% (9/13) de las pacientes no polimórficas fue sensible al tratamiento, mientras que para

las pacientes polimórficas la sensibilidad se manifestó en un 49% (30/61). Las pacientes del grupo no polimórfico se asociaron a la recurrencia de la enfermedad en un 89% (8/9 pacientes), mientras que en el grupo polimórfico la recurrencia se asoció en un 73% (22/30).

La mediana de SLP fue de 6.5 meses con un rango de 0-39 meses ($P=0.8$; *Fig.20*). Aunque no se observó diferencia estadísticamente significativa, existe una tendencia a presentar progresión en forma tardía en pacientes no polimórficas, con un periodo libre de progresión de 11.3 meses (95% IC 2.8–37), en comparación con las pacientes no polimórficas, cuyo periodo libre de progresión fue de 9.11 meses (95% IC 7.9–14, $P=0.3$). La SG media de las pacientes fue de 35.5 meses con un rango de 5–85 meses. Al comparar la SG, se observó que el 85% (11/13) de las pacientes no polimórficas están vivas al término del seguimiento, comparado con el 82% (50/61) de las pacientes polimórficas ($P=0.316$; *Fig. 21*).

DISCUSIÓN

La presencia de células aneuploides y la generación de inestabilidad cromosómica es un factor característico de los tumores sólidos [180]. En algunos casos, es posible asociar el grado de aneuploidía con el estadio clínico del tumor. Las causas que conllevan al desarrollo de inestabilidad cromosómica incluyen alteraciones en genes cuyas proteínas juegan un papel importante en la maquinaria de segregación cromosómica. Tal es el caso de proteínas que conforman los centrosomas, cinetocoro, huso mitótico y PMHM [181].

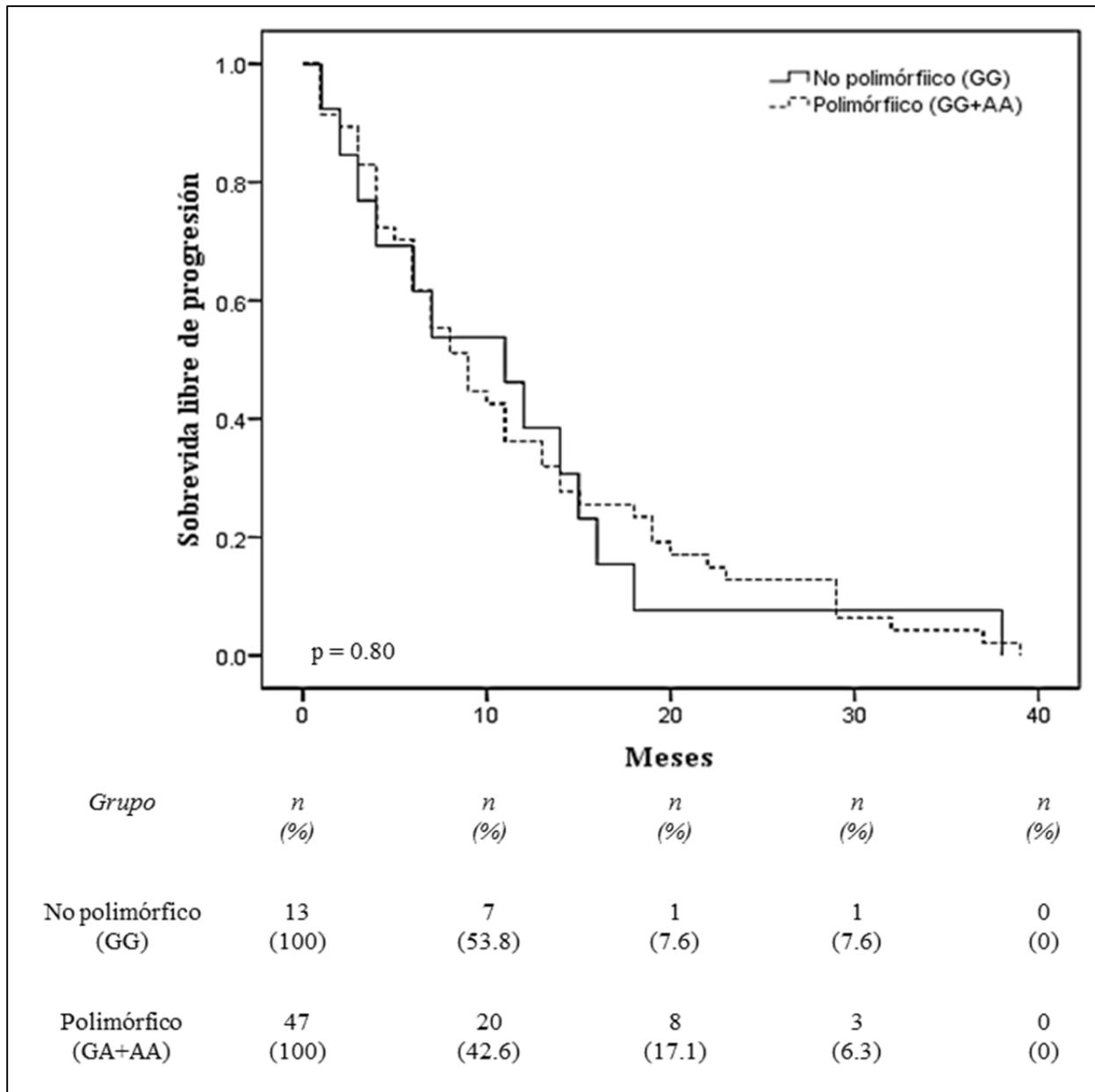


Figura 20. Curva de sobrevida libre de progresión en pacientes con cáncer de ovario avanzado en función del polimorfismo *MAD1* 1673 G→A. Las pacientes fueron divididas en dos grupos: polimórfico y no polimórfico. El grupo polimórfico incluyó pacientes portadoras de al menos un alelo polimórfico (GA y AA), mientras que el grupo no polimórfico incluyó a las pacientes homocigas para el alelo silvestre (GG). La tabla abajo indica el número de casos que se mantienen sin progresión hasta el final del seguimiento.

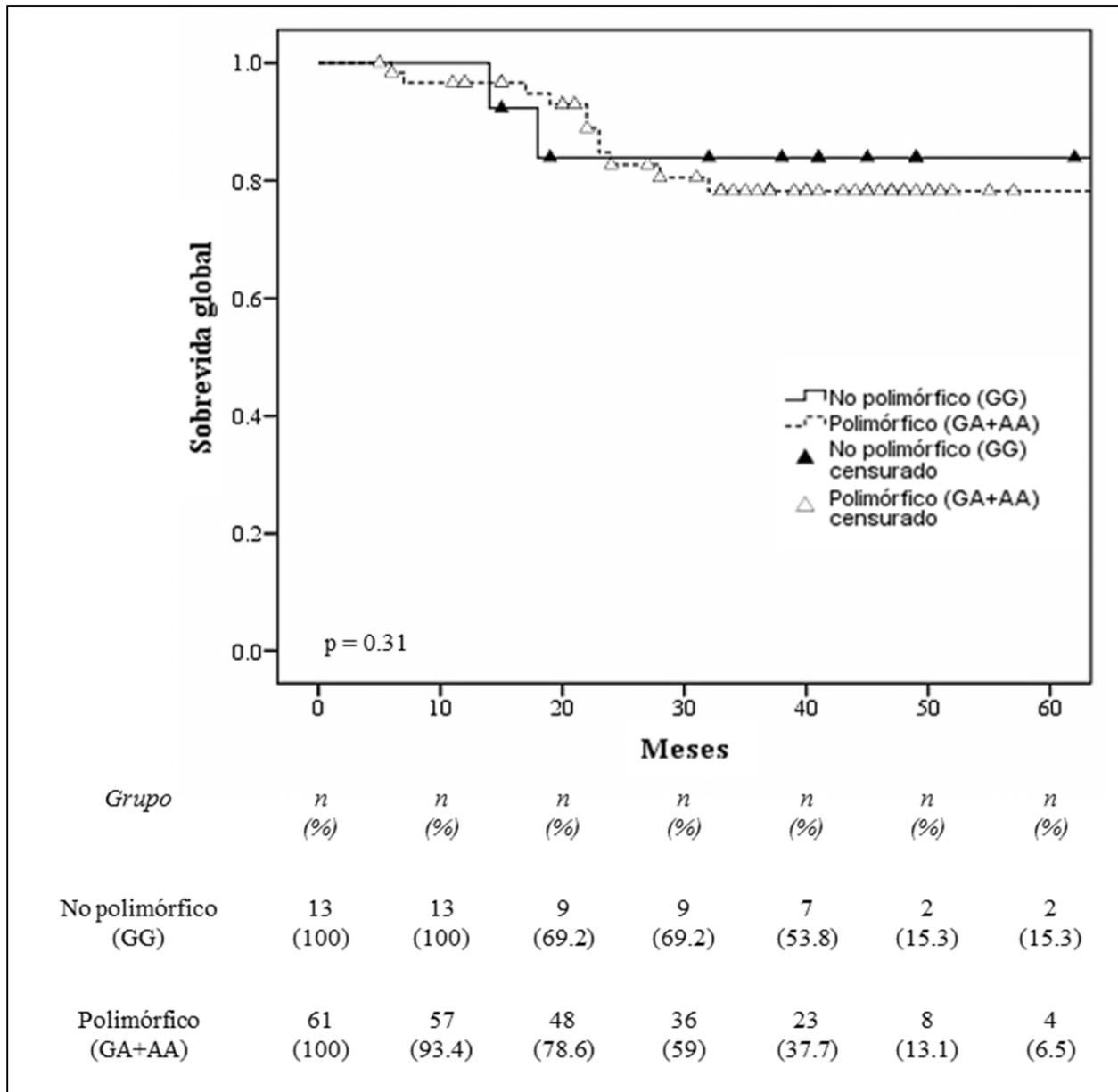


Figura 21. Curva de supervivencia global en pacientes con cáncer de ovario avanzado en función del polimorfismo *MAD1* 1673 G→A. Las pacientes fueron divididas en dos grupos: polimórfico y no polimórfico. El grupo polimórfico incluyó pacientes portadoras de al menos un alelo polimórfico (GA y AA), mientras que el grupo no polimórfico incluyó a las pacientes homocigotas para el alelo silvestre (GG). La tabla abajo indica el número de casos que se mantienen con vida hasta el final del seguimiento.

Sin embargo, estas alteraciones no se han asociado a mutaciones puntuales en genes que controlan la segregación. Existen múltiples estudios que han propuesto a las mutaciones como un factor importante en la generación de aneuploidías e inestabilidad cromosómica [92]. El caso de las mutaciones en el dominio cinasa de *BUB1B* y la generación del síndrome de inestabilidad cromosómica conocido como aneuploidía de mosaico variegado es la asociación de mayor impacto descrita en este rubro [91].

Un fenómeno ampliamente abordado en el estudio del origen de las aneuploidías, es la expresión en genes que controlan la segregación [182]. El PMHM es sensible a cambios de expresión en sus componentes. Múltiples estudios reportan que tanto la sub-expresión como la sobre-expresión alteran la capacidad de arresto en metafase en la célula. Un ejemplo de lo anterior es el caso de *MAD2*, proteína efectora de la señal de arresto del PMHM. En estudios *in vitro*, se ha sobre-expresado *MAD2* con la finalidad de evaluar el papel de este cambio en el control de la segregación. Contrario a lo que se suponía, las células que sobre-expresaban *MAD2* tuvieron un alto índice de aneuploidías. Sin embargo, la sobre-expresión de *MAD2* no fue un factor suficiente para inducir tumores en ratones. Al asociar la sobre expresión de *MAD2* con una mutación puntual ampliamente caracterizada como activadora de un oncogén, se promovía un crecimiento tumoral mayor que con cualquier factor por sí solo. Estos hallazgos describen a la aneuploidía como un factor promotor, más no iniciador del desarrollo tumoral [99-100].

Las alteraciones en el número de cromosomas tienen repercusión en el fenotipo celular, contribuyendo a la transformación maligna. El análisis de cariotipos muestra marcadas

diferencias entre etapas clínicas tempranas y tumores metastásicos [109-110]. Se ha descrito que los defectos en componentes del huso mitótico, así como en proteínas del PMHM se asocian a la generación de inestabilidad cromosómica, tanto en muestras de pacientes con cáncer como en líneas celulares [183].

El PMHM es un mecanismo sumamente sensible, capaz de detectar la presencia de hasta un solo cromosoma sin unión bipolar al huso mitótico y retrasar el inicio de la anafase. El tiempo de duración del arresto depende de la magnitud del daño en la formación de la placa metafásica. Existen dos consecuencias cuando las células permanecen arrestadas por tiempos prolongados. La primera consecuencia es la inducción de apoptosis, ya sea durante el arresto mitótico o por evasión de la división, seguido de activación en G1 de la apoptosis en células tetraploides.

En células normales, la mitosis tiene un tiempo de duración de aproximadamente una hora. Las células hijas resultantes de este proceso de división ingresan rápidamente al siguiente ciclo. Cuando las células sufren alteraciones en la mitosis (por ejemplo, cuando son tratadas con agentes anti microtúbulos), la división puede extenderse por más de dos horas. En líneas celulares sensibles a apoptosis, el uso de NDZ ocasiona una activación de la muerte celular durante el arresto mitótico prolongado. En líneas no sensibles, las células evaden la división y reingresan a la fase G1 en condición tetraploide. Después de esta evasión, las células pueden sufrir un arresto del ciclo dependiente de P53, se pueden activar los mecanismos de muerte, o pueden seguir avanzando en el ciclo para ingresar nuevamente a mitosis [170, 184-185].

Se ha propuesto que las células arrestadas en mitosis por largos periodos de tiempo mueren mediante un mecanismo de muerte celular denominado 'catástrofe mitótica' controlado principalmente por cinasas específicas del ciclo celular (CDK1 y AURORA A, por ejemplo) [186]. Este mecanismo se basa en estudios en los que se ha detectado que la muerte en mitosis no depende de factores pro-apoptóticos, y aun así se manifiesta. En células HeLa, por ejemplo, el tratamiento con etopósido puede ocasionar muerte en mitosis bajo condiciones de sobre-expresión de *BCL-2*, un factor anti-apoptótico. También se han realizado experimentos en líneas celulares, utilizando inhibidores de caspasas. Aun inhibiendo las proteínas efectoras de la vía apoptótica, se detectan células multinucleadas cuando los cultivos son tratados con agentes anti-microtúbulos [187]. Con estos reportes podemos concluir que la prevención de aneuploidías depende de la activación de mecanismos de muerte durante o después de la división. Sin embargo, en casos en los que no es posible, las células tetraploides resultantes de la evasión de la mitosis, reinician el ciclo celular, promoviendo la generación de aneuploidías debido principalmente a la presencia de husos multipolares.

MAD1 es una proteína necesaria para el control de la segregación cromosómica en células eucariontes. Niveles bajos de esta proteína impiden el arresto del ciclo celular en mitosis cuando las células son tratadas con agentes tanto estabilizadores, como desestabilizadores de microtúbulos [188-189]. Aunque la frecuencia de mutaciones en genes del punto de monitoreo del huso mitótico es baja, en diversos tipos de cáncer se han caracterizado polimorfismos en genes como *MAD1*, *MAD2* Y *BUB1B*, los principales componentes que modulan el arresto [93, 96, 190-191].

Cuando las células tienen defectos en el funcionamiento del PMHM, el arresto en metafase no se lleva a cabo, ocasionando resistencia al tratamiento [159, 192-193]. Tanto el paclitaxel como los alcaloides de la vinca (agentes utilizados en la práctica clínica para el tratamiento de diversos tipos de cáncer) promueven este arresto, dependiente de la constante división en las células tumorales [170]. Nuestro modelo utiliza el nocodazol, un agente desestabilizador de microtúbulos, como un activador del PMHM.

El efecto del polimorfismo *MAD1* 1673 G→A fue caracterizado por primera vez por Iwanaga y colaboradores en muestras de tumores sólidos, células transformadas por HTLV-1 y líneas celulares de cáncer de colon [129]. Analizando únicamente 14 muestras, no se reportaron individuos sanos homocigotos para la variante polimórfica (AA). Lo anterior llevó a suponer que esta condición se manifestaba exclusivamente en células malignas, resultado de la pérdida de heterocigocidad. A diferencia de este estudio, los resultados del presente trabajo detectaron individuos sanos AA en una proporción similar al número de individuos GG, demostrando que este genotipo está ampliamente representado en la población sana. Es importante señalar que este es el primer estudio en población abierta en el que se evalúa este polimorfismo.

El alto porcentaje de células con genotipo silvestre GG que se mantuvo en la fase G2-M en presencia de nocodazol indica una mayor funcionalidad del mecanismo en estas células en comparación con las células GA o AA. La proporción observada de células arrestadas en metafase mediante la determinación del índice mitótico confirma este comportamiento. Si bien la presencia del polimorfismo no desactiva el PMHM por

completo, un menor arresto en los grupos polimórficos puede involucrar una salida prematura de la mitosis, probablemente acompañada de la generación de aneuploidías.

La principal consecuencia biológica ante un mal funcionamiento del PMHM es la generación de aneuploidías [194], un factor importante en el desarrollo del cáncer. Cuando el PMHM no funciona adecuadamente, las células adquieren y propagan la inestabilidad cromosómica a su descendencia. El análisis de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis permite evaluar el daño a nivel de segregación que puede ocurrir en un ciclo de división. El hecho de que las células con genotipo AA tengan un mayor número de micronúcleos puede estar relacionado con la salida prematura de las células en mitosis. Nuestros resultados muestran además que la diferencia en el número de células con micronúcleos entre células GG y AA disminuye a medida que aumenta el tiempo de tratamiento. Esto puede ser resultado del efecto tanto del nocodazol como del paclitaxel en el rezago del ciclo celular, ya que las células portadoras del genotipo GG se liberan de manera tardía del arresto en mitosis, y la detección de micronúcleos depende de que la célula complete un ciclo de división después del tratamiento. A pesar de esta diferencia, más del 80% de los micronúcleos detectados contienen cromosomas completos, un hallazgo que es consistente con el mecanismo por el cual actúa el nocodazol.

El análisis de eventos de no disyunción en función del polimorfismo *MAD1* 1673 G→A mostró que las células portadoras del genotipo AA manifiestan un mayor número de eventos de este tipo en todos los tiempos de exposición al nocodazol o paclitaxel. Estos

resultados indican que la frecuencia de eventos de no disyunción se asocia al efecto del polimorfismo, y no depende del mecanismo de acción de los fármacos utilizados.

La unión de MAD2 a MAD1 ocasiona un cambio conformacional en el extremo C-terminal de MAD2. Este cambio se describe en la literatura como MAD2 cerrada (c-MAD2) y es la forma activa que interactúa con CDC20 para impedir la activación de APC/C y promover el arresto en metafase [54]. Dado que el polimorfismo no impide el arresto en metafase por completo, proponemos que el polimorfismo disminuye en MAD1 la capacidad para reclutar y activar a MAD2.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que el polimorfismo *MAD1* 1673 G→A afecta el PMHM, probablemente por un efecto dominante-negativo. En las células polimórficas, el complejo MAD1-MAD2 puede perder estabilidad debido a la modificación en un zipper de leucina (557-571). Nuestros datos en células normales establecen las bases para, en un futuro, diseñar una estrategia experimental que nos permita determinar el efecto del polimorfismo en la estructura o estabilidad de MAD1 utilizando modelos de estudio similares.

Las diferencias observadas en las frecuencias genotípicas de *MAD1* 1673 G→A al comparar la población sana con la población de pacientes, sugieren que el polimorfismo podría ser un factor de susceptibilidad para el desarrollo de cáncer de ovario. Este es el primer reporte sobre la frecuencia del polimorfismo en población mexicana mestiza. La base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI, SNP MapViewer) reporta la frecuencia del polimorfismo *MAD1* 1673 G→A en algunas

poblaciones, incluyendo japonesa, áfrico-americana, caucásica, europea y una población mixta (caucásica y áfrico-americana). La frecuencia alélica menor reportada por el SNP MapViewer es 0.2862. Todos los casos enlistados se encuentran por debajo del valor obtenido en nuestra población de estudio con respecto al alelo A. Estudios posteriores pueden enfocarse a determinar si los individuos AA son más susceptibles al desarrollo de cáncer de ovario.

Nuestros resultados muestran una asociación del polimorfismo de *MAD1* 1673 G→A con una menor respuesta bioquímica, un menor porcentaje de pacientes con citorreducción óptima y una menor sensibilidad al tratamiento con carboplatino-paclitaxel. Aunque las pacientes no polimórficas muestran una mayor recurrencia, la respuesta bioquímica es mayor, comparada con la del grupo polimórfico. Estos resultados sugieren que el polimorfismo *MAD1* 1673 G→A podría ser utilizado como un factor pronóstico asociado a la sensibilidad para al tratamiento con carboplatino-paclitaxel. La detección del polimorfismo, asociado a las características clínicas, los subtipos histológicos y los niveles de CA125, ofrece nuevas posibilidades de marcadores pronósticos, estableciendo grupos favorables y desfavorables ante el tratamiento en etapas clínicas avanzadas. Dado que el cáncer de ovario es una enfermedad heterogénea, y que ningún marcador es independiente, se necesitan más estudios prospectivos para la evaluación de posibles marcadores biológicos capaces de identificar grupos de riesgo.

CONCLUSIONES

El polimorfismo *MAD1* 1673 G→A está ampliamente representado en población abierta, encontrándose también en condición homociga (AA). Si bien este genotipo no es resultado del proceso de transformación maligna, tiene un efecto en la respuesta celular al tratamiento con agentes que alteran la segregación cromosómica, disminuyendo la funcionalidad del punto de monitoreo del huso mitótico. La consecuencia biológica del polimorfismo (producto de la falla en el arresto del ciclo celular en metafase) es la presencia de errores en el mecanismo de segregación cromosómica, evidenciados por la generación de células aneuploides. Su elevada frecuencia en pacientes con cáncer de ovario avanzado sugiere la necesidad de estudios más exhaustivos que permitan catalogarlo como posible factor de susceptibilidad al desarrollo de esta neoplasia.

Aunque el cáncer de ovario epitelial avanzado sigue siendo un reto a nivel terapéutico, nuestros resultados proveen información que sugiere la existencia un sub-grupo que tendrá una mejor respuesta al tratamiento antineoplásico estándar. La recurrencia es mayor en este grupo, situación que puede deberse a un reducido tamaño de muestra para el caso de las pacientes no polimórficas. Por consiguiente, estos hallazgos resaltan la necesidad de estudios prospectivos que incluyan un mayor número de pacientes bajo las condiciones aquí descritas.

LITERATURA CITADA

1. Passarge E. Color Atlas of Genetics (Thieme, Stuttgart, Germany, 2001).
2. Koshland D. Mitosis. Back to the basics. *Cell* **77**, 951-954 (1994).
3. Mardin BR, Agircan FG, Lange C, Schiebel E. Plk1 controls the Nek2A-PP1gamma antagonism in centrosome disjunction. *Curr Biol* **21**, 1145-1151 (2011).
4. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the Cell (Garland Science, New York, 2002).
5. Zheng Y, Wong ML, Alberts B, Mitchison T. Nucleation of microtubule assembly by a γ -tubulin-containing ring complex. *Nature* **378**, 578-583 (1995).
6. DeLuca JG. Kinetochore-microtubule dynamics and attachment stability. *Methods Cell Biol* **97**, 53-79 (2010).
7. Lewin B. Genes VIII (ed. Education, P.) (Pearson Education, USA, 2004).
8. Nurse P. The incredible life and times of biological cells. *Science* **289**, 1711-1716 (2000).
9. Asimov I. Introducción a la Ciencia (Plaza & Janés, S.A., México, 1985).
10. Kornberg RD, Lorch Y. Twenty five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* **98**, 285-294 (1999).
11. Cleveland DW, Mao Y, Sullivan KF. Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell* **112**, 407-421 (2003).
12. Prendergast L, van Vuuren C, Kaczmarczyk A, Doering V, Hellwig D, Quinn N. Premitotic Assembly of Human CENPs -T and -W Switches Centromeric Chromatin to a Mitotic State. *PLoS Biol* **9**, e1001082 (2011).
13. Dunleavy EM, Almouzni G, Karpen GH. H3.3 is deposited at centromeres in S phase as a placeholder for newly assembled CENP-A in G1 phase. *Nucleus* **2**, 146-157 (2011).
14. Tachiwana H, Kagawa W, Shiga T, Osakabe A, Miya Y, Saito K, *et al.* Crystal structure of the human centromeric nucleosome containing CENP-A. *Nature* **476**, 232-235 (2011).
15. Nasmyth K. Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation. *Science* **297**, 559-565 (2002).
16. 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).
17. Michaelis C, Ciosk R, Nasmyth K. Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell* **91**, 35-45 (1997).
18. Losada A, Hirano M, Hirano T. Identification of *Xenopus* SMC protein complexes required for sister chromatid cohesion. *Genes Dev* **12** (1998).
19. Uhlmann, F., Nasmyth, K. Cohesion between sister chromatids must be established during DNA replication. *Curr Biol* **8**, 1095-1101 (1998).

20. Zou H, McGarry TJ, Bernal T, Kirschner MW. Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. *Science* **285**, 418-422 (1999).
21. Nasmyth K, Peters JM, Uhlmann F. Splitting the chromosome: cutting the ties that bind sister chromatids. *Science* **288**, 1379-1384 (2000).
22. Gestaut DR, Cooper J, Asbury CL, Davis TN, Wordeman L. Reconstitution and functional analysis of kinetochore subcomplexes. *Methods Cell Biol* **95**, 641-656 (2010).
23. Ohta S, Wood L, Bukowski-Wills JC, Rappsilber J, Earnshaw WC. The protein composition of mitotic chromosomes determined using multiclassifier combinatorial proteomics. *Cell* **142**, 810-821 (2010).
24. Brinkley BR, Stubblefield E. The fine structure of the kinetochore of a mammalian cell *in vitro*. *Chromosoma* **19**, 28-43 (1966).
25. Ris H, Witt PL. Structure of the mammalian kinetochore. *Chromosoma* **82**, 153-170 (1981).
26. Cooke CA, Schaar B., Yen TJ, Earnshaw WC. Localization of CENP-E in the fibrous corona and outer plate of mammalian kinetochores from prometaphase through anaphase. *Chromosoma* **106**, 446-455 (1997).
27. Jablonski SA, Chan GK, Cooke CA, Earnshaw WC, Yen TJ. The hBUB1 and hBUBR1 kinases sequentially assemble onto kinetochores during prophase with hBUBR1 concentrating at the kinetochore plates in mitosis. *Chromosoma* **107**, 386-396 (1998).
28. Mellone B, Erhardt S, Karpen G. The ABCs of centromeres. *Nature Cell Biol* **8**, 427-429 (2006).
29. Warburton PE, Cooke CA, Bourassa S, Vafa O, Sullivan BA, Stetten G, *et al.* Immunolocalization of CENP-A suggests a distinct nucleosome structure at the inner kinetochore plate of active centromeres. *Curr Biol* **7**, 901-904 (1997).
30. Chan GK, Liu ST, Yen TJ. Kinetochore structure and function. *Trends Cell Biol* **15**, 589-598 (2005).
31. Musacchio A, Salmon ED. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 379-393 (2007).
32. Nicklas RB. How cells get the right chromosomes. *Science* **275**, 632-637 (1997).
33. Boveri T. Über mehrpolige mitosen als mittel zur analyse des zellkerns. *Verh d phys med Ges Würzburg NF.* **35**, 67-90 (1902).
34. Hoyt MA, Totis L, Roberts BT. *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell* **66**, 507-517 (1991).
35. Li R, Murray A. Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* **66**, 519-531 (1991).
36. Taylor SS, 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).
37. Taylor SS, Scott MI, Holland AJ. The spindle checkpoint: a quality control mechanism which ensures accurate chromosome segregation. *Chromosome Res* **12**, 599-616 (2004).
38. Jin DY, Spencer F, Jeang KT. Human T cell leukemia virus type 1 oncoprotein Tax targets the human mitotic checkpoint protein Mad1. *Cell* **93**, 81-91 (1998).

39. Musacchio A, Hardwick KG. The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 731–741 (2002).
40. Shin HJ, Baek KH, Jeon AH, Park MT, Lee SJ, Kang CM, *et al.* Dual roles of human BubR1, a mitotic checkpoint kinase, in the monitoring of chromosomal instability. *Cancer Cell* **4**, 483–497 (2003).
41. Chan GK, Jablonski SA, Sudakin V, Hittle JC, Yen TJ. 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).
42. Chan GK, Jablonski SA, Starr DA., Goldberg ML, Yen TJ. Human Zw10 and ROD are mitotic checkpoint proteins that bind to kinetochores. *Nat Cell Biol* **2**, 944–947 (2000).
43. Abrieu A, Kahana JA, Wood KW, Cleveland DW. CENP-E as an essential component of the mitotic checkpoint *in vitro*. *Cell* **102**, 817–826 (2000).
44. Abrieu A, Magnaghi-Jaulin L, Kahana JA, Peter M, Castro A, Vigneron S, *et al.* Mps1 is a kinetochore-associated kinase essential for the vertebrate mitotic checkpoint. *Cell* **106**, 83–93 (2001).
45. Mao Y, Abrieu A, Cleveland DW. Activating and silencing the mitotic checkpoint through CENP-E dependent activation/inactivation of BubR1. *Cell* **114**, 87–98 (2003).
46. Taylor SS, Scott MI, Holland AJ. The spindle checkpoint: a quality control mechanism which ensures accurate chromosome segregation. *Chromosome Res* **12**, 599–616 (2004).
47. Peters JM. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell* **9**, 931–943 (2002).
48. Kops GJ, Weaver BA, Cleveland DW. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer* **5**, 773–785 (2005).
49. Peters JM. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 644–656 (2006).
50. Sudakin V, Chan GK, Yen TJ. 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).
51. Tang Z, Bharadwaj R, Li B, Yu H. Mad2-Independent inhibition of APCCdc20 by the mitotic checkpoint protein BubR1. *Dev Cell* **1**, 227–237 (2001).
52. Fang G. Checkpoint protein BubR1 acts synergistically with Mad2 to inhibit anaphase-promoting complex. *Mol Biol Cell* **13**, 755–766 (2002).
53. Wei Y, Multi S, Yang CR, Ma J, Zhang QH, Wang ZB, *et al.* Spindle Assembly Checkpoint Regulates Mitotic Cell Cycle Progression during Preimplantation Embryo Development. *PLoS One* **6**, e21557 (2011).
54. Sironi L, Mapelli M, Knapp S, De Antoni A, Jeang KT, 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).

55. Reddy S, Raoer M, Margansky W, Kirschnen M. Ubiquitination by the anaphase-promoting complex drives spindle checkpoint inactivation. *Nature* **446**, 921-925 (2007).
56. Mao Y, Desai A, Cleveland DW. Microtubule capture by CENP-E silences BubR1-dependent mitotic checkpoint signalling. *J Cell Biol* **170**, 873-880 (2005).
57. Weaver B, Cleveland DW. Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: the mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. *Cancer Cell* **8**, 7-12 (2005).
58. Bharadwaj R, Yu H. The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. *Oncogene* **23**, 2016-2027 (2004).
59. Herrera LA, Prada D, Andonegui MA, Duenas-Gonzalez A. The epigenetic origin of aneuploidy. *Curr Genomics* **9**, 43-50 (2008).
60. Nigg EA. Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nat Rev Cancer* **2**, 815-825 (2002).
61. Storchova Z, Pellman D. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 45-54 (2004).
62. Zhang X, Horwitz GA, Prezant TR., Valentini A, Nakashima M, Bronstein MD, *et al.* Structure, expression, and function of human pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol Endocrinol* **13**, 156-166 (1999).
63. Jallepalli PV, Waizenegger IC, Bunz F, Langer S, Speicher MR, Peters JM, *et al.* Securin is required for chromosomal stability in human cells. *Cell* **105**, 445-457 (2001).
64. Nagaishi M, Yamamoto T, Iinuma K, Shimomura K, Berend SA, Knops J.. Chromosome abnormalities identified in 347 spontaneous abortions collected in Japan. *J Obstet Gynaecol Res* **30**, 237-241 (2004).
65. Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Valent A, Raslova H, Yakushijin K, *et al.* Mitotic catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entails aneuploidy. *Oncogene* **23**, 4362-4370 (2004).
66. Siavoshian S, Boesch S, Pondaven P, More MT, Riou D, Dabouis G, *et al.* Cloning of a human cancer cell line (NSCLC-N6) and comparative study of the clones in vitro. *Anticancer Res* **18**, 193-200 (1998).
67. Nicklas RB, Ward SC, Gorbsky GJ. Kinetochore chemistry is sensitive to tension and may link mitotic forces to a cell cycle checkpoint. *J Cell Biol* **130**, 929-939 (1995).
68. Rieder CL, Cole RW, 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).
69. Cimini D, Degraffi F. Aneuploidy: a matter of bad connections. *Trends Cell Biol* **15**, 442-451 (2005).
70. Lampson MA, Renduchitala K, Khodjakov A, Kapoor T. M. Correcting improper chromosome spindle attachments during cell division. *Nat Cell Biol* **6**, 232-237 (2004).

71. Pinsky BA, Biggins S. The spindle checkpoint: tension versus attachment. *Trends Cell Biol* **15**, 486-493 (2005).
72. Cimini D, Howell B, Maddox P, Khodjakov A, Degrossi F, Salmon ED. Merotelic kinetochore orientation is a major mechanism of aneuploidy in mitotic mammalian tissue cells. *J Cell Biol* **153**, 517-527 (2001).
73. Gassmann R, Carvalho A, Henzing AJ, Ruchaud S, Hudson DF, Honda R, *et al.* Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. *J Cell Biol* **166**, 179-191 (2004).
74. Zhou H, Kuang J, Zhong L, Kuo WL, Gray JW, Sahin A, *et al.* Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet* **20**, 189-193 (1998).
75. Fukasawa K, Choi T, Kuriyama R, Rulong S, Vande Woude GF. Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science* **271**, 1744-1747 (1996).
76. Deng CX. Roles of BRCA1 in centrosome duplication. *Oncogene* **21**, 6222-6227 (2002).
77. McGrew JT, Goetsch L, Byers B, Baum P. Requirement for ESP1 in the nuclear division of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **3**, 1443-1454 (1992).
78. Yamamoto A, Guacci V, Koshland D. Pds1p is required for faithful execution of anaphase in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **133**, 85-97 (1996).
79. Kaplan KB, Burds AA, Swedlow JR, Bekir SS, Sorger PK, Näthke IS. A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation. *Nat Cell Biol* **3**, 429-432 (2001).
80. Fodde R, Kuipers J, Rosenberg C, Smits R, Kielman M, Gaspar C, *et al.* Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol* **3**, 433-438 (2001).
81. Fodde R, Smits R, Clevers H. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* **1**, 55-67 (2001).
82. Green RA, Kaplan KB. Chromosome instability in colorectal tumor cells is associated with defects in microtubule plus-end attachments caused by a dominant mutation in APC. *J Cell Biol* **163**, 949-961 (2003).
83. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* **386**, 623-627 (1997).
84. Manning AL, Longworth MS, Dyson NJ. Loss of pRB causes centromere dysfunction and chromosomal instability. *Genes Dev* **24**, 1364-1376 (2010).
85. Amato A, Lentini L, Schillaci T, Lovino, F, Di Leonardo A. RNAi mediated acute depletion of retinoblastoma protein (pRb) promotes aneuploidy in human primary cells via micronuclei formation. *BMC Cell Biol* **10**, 79 (2009).
86. Carter SL, Eklund AC, Kohane IS, Harris LN, Szallasi ZA. signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers. *Nat Genet* **38**, 1043-1048 (2006).
87. van Harn T, Fojter F, van Vugt M, Banerjee R, Yang F, Oostra A, *et al.* Loss of Rb proteins causes

- genomic instability in the absence of mitogenic signaling. *Genes Dev* **24**, 1377-1388 (2010).
88. Anand S, Penrhyn-Lowe S, Venkitaraman AR. AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell* **3**, 51-62 (2003).
89. der-Sarkissian H, Bacchetti S, Cazes L, Londono-Vallejo JA. The shortest telomeres drive karyotype evolution in transformed cells. *Oncogene* **23**, 1221-1228 (2004).
90. Martinez AC, van Wely KH. Centromere fission, not telomere erosion, triggers chromosomal instability in human carcinomas. *Carcinogenesis* **32**, 796-803 (2011).
91. Hanks S, Coleman K, Reid S, Plaja A, Firth H, Fitzpatrick D, *et al.* Constitutional aneuploidy and cancer predisposition caused by biallelic mutations in BUB1B. *Nat Genet* **36**, 1159–1161 (2004).
92. Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, *et al.* Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* **392**, 300–303 (1998).
93. Nomoto S, Haruki N, Takahashi T, Masuda A, Koshikawa T, Takahashi T, *et al.* Search for *in vivo* somatic mutations in the mitotic checkpoint gene, *hMAD1*, in human lung cancers. *Oncogene* **18**, 7180-7183 (1999).
94. Gemma A, Seike M, Seike Y, Uematsu K, Hibino S, Kurimoto F, *et al.* Somatic mutation of the hBUB1 mitotic checkpoint gene in primary lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **29**, 213–218 (2000).
95. Hernando E, Orlow I, Liberal V, Nohales G, Benezra R, Cordon-Cardo C. Molecular analyses of the mitotic checkpoint components hsMAD2, hBUB1 and hBUB3 in human cancer. *Int J Cancer* **95**, 223–227 (2001).
96. Tsukasaki K, Miller CW, Greenspun E, Eshaghian S, Kawabata H, Fujimoto T, *et al.* Mutations in the mitotic check point gene, MAD1L1, in human cancers. *Oncogene* **20**, 3301-3305 (2001).
97. Wang Z, Cummins JM, Shen D, Cahill DP, Jallepalli PV, Wang TL, *et al.* Three classes of genes mutated in colorectal cancers with chromosomal instability. *Cancer Res* **64**, 2998–3001 (2004).
98. Ricke RM, Jeganathan KB, van Deursen JM. Bub1 overexpression induces aneuploidy and tumor formation through Aurora B kinase hyperactivation. *J Cell Biol* **193**, 1049-1064 (2011).
99. Sotillo R, Hernando E, Díaz-Rodríguez E, Teruya-Feldstein J, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Benezra R. Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice. *Cancer Cell* **11**,9-23 (2007)
100. Sotillo R, Schvartzman JM, Socci ND, Benezra R. Mad2-induced chromosome instability leads to lung tumour relapse after oncogene withdrawal. *Nature* **464**, 436-40 (2010).
101. Weaver BA, Bonday ZQ, Putkey FR, Kops GJ, Silk AD, Cleveland DW. Centromere-associated protein-E is essential for the mammalian mitotic checkpoint to prevent aneuploidy due to single chromosome loss. *J Cell Biol* **162**, 551–563 (2003).
102. Michel LS, Liberal V, Chatterjee A, Kirchwegger R, Pasche B, Gerald W, *et al.* MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nature* **409**, 355–359 (2001).

103. Dai W, Wang Q, Liu T, Swamy M, Fang Y, Xie S, *et al.* Slippage of mitotic arrest and enhanced tumor development in mice with BubR1 haploinsufficiency. *Cancer Res* **64**, 440–445 (2004).
104. Varmus H, Weinberg RA. *Genes: the Biology of Cancer* (Scientific American Library, New York, 1993).
105. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* **9**, 138-41 (1993).
106. Heim S, Mitelman F. *Cancer Cytogenetics* (Wiley Liss Inc., New York, 1995).
107. Gollin SM. Mechanisms leading to chromosomal instability. *Semin Cancer Biol* **15**, 33-42 (2005).
108. Thompson SL, Compton DA. Examining the link between chromosomal instability and aneuploidy in human cells. *J Cell Biol* **180**, 665-672 (2008).
109. Gao C, Furge K, Koeman J, Dykema K, Su Y, Cutler ML, *et al.* Chromosome instability, chromosome transcriptome, and clonal evolution of tumor cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 8995-9000 (2007).
110. Kuukasjärvi T, Karhu R, Tanner M, Kähkönen M, Schäffer A, Nupponen N, *et al.* Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer. *Cancer Res* **57**, 1597-1604 (1997).
111. Pihan GA, Wallace J, Zhou Y, Doxsey SJ. Centrosome abnormalities and chromosome instability occur together in pre-invasive carcinomas. *Cancer Res* **63**, 1398-1404 (2003).
112. Lo Iacono M, Monica V, Saviozzi S, Ceppi P, Bracco E, Papotti M, *et al.* Aurora Kinase A expression is associated with lung cancer histological-subtypes and with tumor de-differentiation. *J Transl Med* **9**, 100 (2011).
113. Kelly KR, Ecsedy J, Mahalingam D, Nawrocki ST, Padmanabhan S, Giles FJ, *et al.* Targeting Aurora Kinases in Cancer Treatment. *Curr Drug Targets* (2011).
114. Ayala FJ. Mechanisms of evolution. *Scientific American* **329**, 48-61 (1978).
115. Lewontin R. Adaptation. *Scientific American* **239**, 156-169 (1978).
116. Brown TA. *Genomes* (Bios Scientific Publications, Oxford, 1999).
117. Schafer AJ, Hawkins JR. DNA variation and the future of human genetics. *Nat Biotechnol* **16**, 33-39 (1998).
118. International-Human-Genome-Sequencing-Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921 (2001).
119. Collins FS, Guyer MS, Charkravarti A. Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation, *Science* **278**, 1580–1581 (1997).
120. Salisbury BA, Pungliya M, Choi JY, Jiang R, Sun XJ, Stephens JC. SNP and haplotype variation in the human genome. *Mutat Res* **526**, 53-61 (2003).
121. Stephens JC, Schneider JA, Tanguay DA, Choi J, Acharya T, Stanley SE, *et al.* Haplotype variation and linkage disequilibrium in 313 human genes. *Science* **293**, 489-93 (2001).
122. Kruglyak L, Nickerson DA. Variation is the spice of life. *Nat Genet* **27**, 234–236 (2001).
123. Deloukas P, Schuler G, Gyapay G. A physical map of 30,000 human genes. *Science* **282**, 744-746 (1998).

124. 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).
125. The International HapMap Consortium. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* **449**, 851-861 (2007).
126. Shastry BS. SNPs: impact on gene function and phenotype. *Methods Mol Biol* **578**, 3-22 (2009).
127. Jin DY, Spencer F, Jeang KT. Human T cell leukemia virus type 1 oncoprotein Tax targets the human mitotic checkpoint protein Mad1. *Cell* **93**, 81-91 (1998).
128. Jin DY, Kozak CA, Pangilian F, Spencer F, Green ED, Jeang KT. Mitotic checkpoint locus MAD1L1 maps to human chromosome 7p22 and mouse chromosome 5. *Genomics* **55**, 363-364 (1999).
129. Iwanaga Y, Kasai T, Kibler K, Jeang KT. Characterization of regions in hsMAD1 needed for binding hsMAD2. A polymorphic change in an hsMAD1 leucine zipper affects MAD1-MAD2 interaction and spindle checkpoint function. *J Biol Chem* **277**, 31005-31013 (2002).
130. Chung E, Chen RH. Spindle checkpoint requires Mad1-bound and Mad1-free Mad2. *Mol Biol Cell* **13**, 1501-1511 (2002).
131. Chen RH, Shevchenko A, Mann M, Murray AW. Spindle checkpoint protein Xmad1 recruits Xmad2 to unattached kinetochores. *J Cell Biol* **143**, 283-295 (1998).
132. Hardwick KG, Johnston RC, Smith DL, Murray AW. MAD3 encodes a novel component of the spindle checkpoint which interacts with Bub3p, Cdc20p, and Mad2p. *J Cell Biol* **148**, 871-882 (2000).
133. 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).
134. Howell BJ, Moree B, Farrar EM, Stewart S, Salmon ED. Spindle checkpoint protein dynamics at kinetochores in living cells. *Curr Biol* **14**, 953-964 (2004).
135. 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).
136. De Antoni A, Pearson CG, Cimini D, Canman JC, Sala V, Nezi L, *et al.* The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint. *Curr Biol* **15**, 214-225 (2005).
137. Chen RH, Waters JC, Salmon ED, Murray AW. Association of spindle assembly checkpoint component XMAD2 with unattached kinetochores. *Science* **274**, 242-246 (1996).
138. Waters JC, Chen RH, Murray AW, Salmon ED. Localization of Mad2 to kinetochores depends on microtubule attachment, not tension. *J Cell Biol* **141**, 1181-1191 (1998).
139. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* **61**, 69-90 (2011).
140. Reporte Histopatológico de Neoplasias Malignas. Dirección General de Epidemiología; SSA. México (2003).

141. Rizo P, Sierra M, Vázquez G, Cano M, Meneses A, Mohar A. Registro hospitalario de cáncer: compendio de cáncer 2000-2004. *Cancerología* 2007; 2: 203-87.
142. Cannistra S. Cancer of the ovary. *N Engl J Med* **351**, 2519-2529 (2004).
143. NIH consensus conference. Ovarian cancer: screening, treatment, and follow-up. *JAMA* **273**, 491-497 (1995).
144. Rustin GJ, Bast RC Jr, Kelloff GJ, Barrett JC, Carter SK, Nisen PD, *et al.* Use of CA 125 in clinical trial evaluation of new therapeutic drugs in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **10**, 3919-3926 (2004).
145. Mironov S, Akin O, Pandit-Taskar N, Hann LE. Ovarian Cancer. *Radiol Clin North Am* **45**, 149-65 (2007).
146. Nelson BE, Rosenfield AT, Schwartz PE. Preoperative abdominopelvic computed tomographic prediction of optimal cytoreduction in epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* **11**, 166-172 (1993).
147. Marlon B, Markman M, Eifel P. Ovarian cancer, peritoneal carcinoma, and fallopian tube carcinoma. En *DeVita Cancer Principles and Practice of Oncology*. LWW 7th Edition. USA, 2005. 1364-1397.
148. Chi DS, Franklin CC, Levine DA, Akselrod F, Sabbatini P, Jarnagin WR, *et al.* Improved optimal cytoreduction rates for stages III and IV epithelial ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer: a change in surgical approach. *Gynecol Oncol* **94**, 650-654 (2004).
149. Hoskins WJ, Bundy BN, Thigpen JT, Omura GA. The influence of cytoreductive surgery on recurrence-free interval and survival in small volume stage III epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* **47**, 159-166 (1992).
150. Bristow RE, Tomacruz RS, Armstrong DK, Trimble EL, Montz FJ. Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis. *J Clin Oncol* **20**, 1248-1259 (2002).
151. Suh-Burgmann E, Powell CB. Cytoreductive surgery for gynecologic malignancies- new standards of care. *Surg Oncol Clin N Am* **16**, 667-682 (2007).
152. Bristow RE, Eisenhauer EL, Santillan A, Chi DS. Delaying the primary surgical effort for advanced ovarian cancer. A systematic review of neoadjuvant chemotherapy and interval cytoreduction. *Gynecol Oncol* **104**, 480-490 (2007).
153. Ozols RF, Bundy BN, Greer BE, Fowler JM, Clarke-Pearson D, Burger RA, *et al.* Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol* **21**, 3194-3200 (2003).
154. Armstrong DK, Bundy B, Wenzel L, Huang HQ, Baergen R, Lele S, *et al.* Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. *N Eng J Med* **354**, 34-43 (2006).
155. Hess LM, Benham-Hutchins M, Herzog TJ, Hsu CH, Malone DC, Skrepnek GH, *et al.* A meta-analysis of the efficacy of intraperitoneal cisplatin for the front-line treatment of ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* **17**, 561-570 (2007).
156. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* **7**, 573-584 (2007).

157. Rowinsky EK. Antimicrotubule agents. En *Chabner Cancer chemotherapy and biotherapy: principles and practice*. LWW 4th Edition. USA, 2005. 237.
158. Horwitz SB. Mechanism of action of taxol. *Trends Pharmacol Sci* **13**, 134-136 (1992).
159. Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* **4**, 253-265 (2004).
160. Goff BA, Mandel L, Muntz HG, Melancon CH. Ovarian carcinoma diagnosis: results of a national ovarian cancer survey. *Cancer* **89**, 2068-2075 (2000).
161. Omura GA, Brady MF, Homesley HD, Yordan E, Major FJ, Buchsbaum HJ, *et al.* Long-term follow-up and prognostic factor analysis in advanced ovarian carcinoma: the Gynecologic Oncology Group experience. *J Clin Oncol* **9**, 1138-1150 (1991).
162. Jaffe CC. Measures of response: RECIST, WHO and new alternatives. *J Clin Oncol* **24**, 3245-3251 (2006).
163. Fayers PM, Rustin G, Wood R, Nelstrop A, Leonard RC, Wilkinson P, *et al.* The prognostic value of serum CA 125 in patients with advanced ovarian carcinoma: an analysis of 573 patients by the Medical Research Council Working Party on Gynaecological Cancer. *Int J Gynecol Cancer* **3**, 285-292 (1993).
164. Riedinger JM, Wafflart J, Ricolleau G, Eche N, Larbre H, Basuyau JP, *et al.* CA 125 half-life and CA 125 nadir during induction chemotherapy are independent predictors of epithelial ovarian cancer outcome: results of a French multicentric study. *Ann Oncol* **17**, 1234-1238 (2006).
165. Riedinger JM, Bonnetain F, Basuyau JP, Eche N, Larbre H, Dalifard I, *et al.* Change in CA 125 levels after the first cycle of induction chemotherapy is an independent predictor of epithelial ovarian cancer outcome. *Ann Oncol* **18**, 881-885 (2007).
166. Duesberg P, Rasnick D. Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own. *Cell Motil Cytoskeleton* **47**, 81-107 (2000).
167. Kaern J, Tropé CG, Kristensen GB, Tveit KM, Pettersen EO. Evaluation of DNA ploidy and S-phase fraction as prognostic parameters in advanced ovarian epithelial carcinoma: a prospective study. *Am J Obstet Gynecol* **170**, 479-487 (1994).
168. Matei D, Graeber TG, Baldwin RL, Karlan BY, Rao J, Chang DD. Gene expression in epithelial ovarian cancer. *Oncogene* **21**, 6289-6298 (2002).
169. Legge F, Ferrandina G, Salutari V, Scambia G. Biological characterization of ovarian cancer: prognostic and therapeutic implications. *Ann Oncol* **16 (suppl 4)**, 95-101 (2005).
170. Rieder CL, Maiato H. Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint. *Dev Cell* **7**, 637-651 (2004).
171. Efferth T, Volm M. Pharmacogenetics for individualized cancer chemotherapy. *Pharmacol Ther* **107**, 155-176 (2005).
172. Chen JG, Horwitz SB. Differential mitotic responses to microtubule-stabilizing and -destabilizing drugs. *Cancer Res* **62**, 1935-1938 (2002).
173. Lacey, E. Mode of action of benzimidazoles. *Parasitol Today* **6**, 112-115 (1990).

174. Campbell WC. Benzimidazoles: veterinary uses. *Parasitol Today* **6**, 130-133 (1990).
175. Rieseberg M, Kasper C, Reardon KF, Scheper T. Flow cytometry in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**, 350-360 (2001).
176. Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M, *et al.* Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutat Res* **540**, 153-163 (2003).
177. Fenech M, Morley AA. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. *Mutat Res* **161**, 193–198 (1986).
178. Clare MG, Lorenzon G, Akhurst LC, Marzin D, Van Delft J, Montero R, *et al.* SFTG international collaborative study on in vitro micronucleus test II using human lymphocytes. *Mutat Res* **607**, 37-60 (2006).
179. Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* **277**, 665-667 (1979).
180. eroukhim R, Mermel CH, Porter D, Wei G, Raychaudhuri S, Donovan J, *et al.* The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* **463**, 899-905 (2010).
181. Holland AJ, Cleveland DW. Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 478-487 (2009).
182. Yuan B, Xu Y, Woo JH, Wang Y, Bae YK, Yoon DS, *et al.* Increased expression of mitotic checkpoint genes in breast cancer cells with chromosomal instability. *Clin Cancer Res* **12**, 405-410 (2006).
183. Lingle WL, Barrett SL, Negron VC, D'Assoro AB, Boeneman K, Liu W, *et al.* Centrosome amplification drives chromosomal instability in breast tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1978-1983 (2002).
184. Gascoigne KE, Taylor SS. Cancer cells display profound intra- and interline variation following prolonged exposure to antimetabolic drugs. *Cancer Cell* **14**, 111–122 (2008).
185. Orth JD, Tang Y, Shi J, Loy CT, Amendt C, Wilm C, *et al.* Quantitative live imaging of cancer and normal cells treated with kinesin-5 inhibitors indicates significant differences in phenotypic responses and cell fate. *Mol Cancer Ther* **7**, 3480–3489 (2008).
186. Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* **23**, 2825-2837 (2004).
187. Uetake Y, Sluder G. Prolonged prometaphase blocks daughter cell proliferation despite normal completion of mitosis. *Curr Biol* **20**, 1666-1671 (2010).
188. Meraldi P, Draviam VM, Sorger PK. Timing and checkpoints in the regulation of mitotic progression. *Dev Cell* **7**, 45-60 (2004).
189. Kienitz A, Vogel C, Morales I, Müller R, Bastians H. Partial downregulation of MAD1 causes spindle checkpoint inactivation and aneuploidy, but does not confer resistance towards taxol. *Oncogene* **24**, 4301-4310 (2005).

190. Cahill DP, da Costa LT, Carson-Walter EB, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. Characterization of MAD2B and other mitotic spindle checkpoint genes. *Genomics* **58**, 181-187 (1999).
191. Percy MJ, Myrie KA, Neeley CK, Azim JN, Ethier SP, Petty EM. Expression and mutational analyses of the human MAD2L1 gene in breast cancer cells. *Genes Chromosomes Cancer* **29**, 356-362 (2000).
192. Jordan MA, Wendell K, Gardiner S, Derry WB, Copp H, Wilson L. Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Res* **56**, 816-825 (1996).
193. Tao W. The mitotic checkpoint in cancer therapy. *Cell Cycle* **4**, 1495-1499 (2005).
194. Gordon DJ, Resio B, Pellman D. Causes and consequences of aneuploidy in cancer. *Nat Rev Genet* **13**, 189-203 (2012).

ANEXOS

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TEXTO

A	<u>A</u> denina
aa	<u>a</u> mino <u>á</u> cido
ABC1	<u>A</u> denosine triphosphate <u>B</u> inding <u>C</u> assette <u>1</u>
APC	<u>A</u> denomatous polyposis <u>c</u> oli
APC/C	<u>A</u> naphase <u>P</u> romoting <u>C</u> omplex/ <u>C</u> yclosome
AUC	<u>A</u> rea <u>u</u> nder the <u>c</u> urve
BCL2	<u>B</u> -Cell CLL/ <u>L</u> ymphoma <u>2</u>
BRCA1	<u>B</u> reast <u>C</u> ancer <u>1</u>
BUBR1	<u>B</u> UB1-Related protein
BUB1	<u>B</u> udding <u>U</u> ninhibited by <u>B</u> enzimidazole <u>1</u>
BUB3	<u>B</u> udding <u>U</u> ninhibited by <u>B</u> enzimidazole <u>3</u>
C-MAD2	<u>C</u> losed- <u>MAD2</u>
C-NAP1	<u>C</u> entrosome <u>A</u> ssociated <u>P</u> rotein <u>1</u>
C-terminal	<u>C</u> arboxilo-terminal
CA125	<u>C</u> arbohydrate <u>A</u> ntigen <u>125</u>
CBP	<u>C</u> arboplatino
CDC20	<u>C</u> ell <u>D</u> ivision <u>C</u> ycle homologue <u>20</u>
CDDP	<u>C</u> is-diamino-dicloroplatino
CDK1	<u>C</u> yclin <u>D</u> ependent <u>K</u> inase <u>1</u>
CDK2	<u>C</u> yclin <u>D</u> ependent <u>K</u> inase <u>2</u>
CENP-A	<u>C</u> ENtrome <u>r</u> e <u>P</u> rotein <u>A</u>
CENP-C	<u>C</u> ENtrome <u>r</u> e <u>P</u> rotein <u>C</u>
CENP-E	<u>C</u> ENtrome <u>r</u> e <u>P</u> rotein <u>E</u>
CENP-H	<u>C</u> ENtrome <u>r</u> e <u>P</u> rotein <u>H</u>
CENP-M	<u>C</u> ENtrome <u>r</u> e <u>P</u> rotein <u>M</u>
CENP-N	<u>C</u> ENtrome <u>r</u> e <u>P</u> rotein <u>N</u>
CENP-T	<u>C</u> ENtrome <u>r</u> e <u>P</u> rotein <u>T</u>
CEO	<u>C</u> áncer epitelial de <u>o</u> vario
COMT	<u>C</u> entro <u>o</u> rganizador de <u>m</u> icrotúbulos
DNA	<u>D</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid
FIGO	<u>F</u> ederation of <u>G</u> ynecology and <u>O</u> bstetrics
FISH	<u>F</u> luorescence <u>i</u> n situ hibridization
G	<u>G</u> uanina
GOG	<u>G</u> ynecologic <u>O</u> ncology <u>G</u> roup
H	<u>H</u> istidina
HTLV-1	<u>H</u> uman <u>T</u> - <u>L</u> ymphotropic <u>V</u> irus <u>1</u>
IC	<u>I</u> nestabilidad <u>c</u> romosómica
INCENP-1	<u>I</u> nn <u>e</u> r <u>C</u> ENtrome <u>r</u> e <u>P</u> rotein- <u>1</u>
iRNA	<u>i</u> nterference <u>R</u> ibo <u>N</u> ucleic <u>A</u> cid
MAD1	<u>M</u> itotic <u>A</u> rrest <u>D</u> eficient <u>1</u>
MAD2	<u>M</u> itotic <u>A</u> rrest <u>D</u> eficient <u>2</u>
MAD3	<u>M</u> itotic <u>A</u> rrest <u>D</u> eficient <u>3</u>
MCC	<u>M</u> itotic <u>C</u> heckpoint <u>C</u> omplex
MPS1	<u>M</u> ono <u>P</u> olar <u>S</u> pinde <u>1</u>
MST2	<u>M</u> ammalian <u>S</u> TE20-Like Protein Kinase <u>2</u>
N-terminal	<u>A</u> mino-terminal
NDZ	<u>N</u> ocodazol
NEK2A	<u>N</u> IMA-r <u>E</u> lated <u>K</u> inase <u>2A</u>
NIMA	<u>N</u> ever <u>I</u> n <u>M</u> itosis <u>A</u>
O-MAD2	<u>O</u> pen- <u>MAD2</u>
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
PCOA	<u>P</u> acientes con <u>c</u> áncer de <u>o</u> vario <u>a</u> vanzado
PLK1	<u>P</u> olo- <u>L</u> ike <u>K</u> inase <u>1</u>

PMHM	<u>P</u> unto de <u>m</u> onitoreo del <u>h</u> uso <u>m</u> itótico
PP1γ	<u>P</u> rotein <u>P</u> hosphatase <u>1</u> <u>γ</u>
PTX	<u>P</u> acli <u>t</u> axel
R	<u>A</u> rginina
RB	<u>R</u> etino <u>B</u> lastoma
RECIST	<u>R</u> esponse <u>e</u> valuation <u>c</u> riteria in <u>s</u> olid <u>t</u> umors
RFLP	<u>R</u> estriction <u>F</u> ragment <u>L</u> ength <u>P</u> olymorphism
RNA	<u>R</u> ibon <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid
ROD	<u>R</u> O <u>u</u> gh <u>D</u> eal
SCC1	<u>S</u> ub-unit <u>C</u> ohesin <u>C</u> omplex <u>1</u>
SCC3	<u>S</u> ub-unit <u>C</u> ohesin <u>C</u> omplex <u>3</u>
SG	<u>S</u> obrevida global
SLP	<u>S</u> obrevida libre de <u>p</u> rogresión
SMC1	<u>S</u> tructural <u>M</u> aintenance of <u>C</u> hromosomes <u>1</u>
SMC3	<u>S</u> tructural <u>M</u> aintenance of <u>C</u> hromosomes <u>3</u>
SMC3P	<u>S</u> tructural <u>M</u> aintenance of <u>C</u> hromosomes <u>3P</u>
SNP	<u>S</u> ingle <u>N</u> ucleotide <u>P</u> olymorphism
SSLP	<u>S</u> imple <u>S</u> equence <u>L</u> ength <u>P</u> olymorphism
STR	<u>S</u> hort <u>T</u> andem <u>R</u> epeats
TRF1	<u>T</u> elomeric <u>R</u> epeat <u>B</u> inding <u>F</u> actor <u>1</u>
TXBP181	<u>T</u> A <u>X</u> <u>B</u> inding <u>P</u> rotein <u>181</u>
VNTR	<u>V</u> ariable <u>N</u> umber of <u>T</u> andem <u>R</u> epeats
ZWINT-1	<u>Z</u> W <u>I</u> N <u>T</u> eractor- <u>1</u>
ZW10	<u>Z</u> este <u>W</u> hite <u>10</u>

ABREVIATURAS DE MEDIDAS Y REACTIVOS

ANE	<u>A</u> minoácidos <u>N</u> o <u>E</u> enciales
cm³	centímetros cúbicos
CO₂	dióxido de carbono
dl	decilitro
DMSO	<u>D</u> i <u>M</u> etil <u>S</u> ulf <u>Ó</u> xido
DNTPs	del inglés <u>D</u> eoxi-ribo <u>N</u> ucleotide <u>T</u> ri <u>P</u> hosphate, deoxi-ribonucleótidos trifosfatados
EDTA	del inglés <u>E</u> thylene <u>D</u> iamine <u>T</u> etra- <u>a</u> cetic <u>A</u> cid, ácido etileno-diamino-tetra-acético
h	horas
HCl	ácido clorhídrico
kb	kilobases
KCl	cloruro de potasio
kDa	kilodaltones
l	litro
L-glut	<u>L</u> - <u>g</u> lutamina
M	molar
mg	miligramos
ml	mililitros
min	minutos
N	normal (concentración)
NaCl	cloruro de sodio
ng	nanogramos
nM	nanomolar
nm	nanómetros
pb	pares de bases
PBS	del inglés <u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline, <i>buffer</i> salino de fosfatos
pmoles	picomoles
RPMI 1640	medio de cultivo desarrollado en el <u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute
SBF	<u>S</u> uero <u>B</u> ovino <u>F</u> etal
SDS	del inglés <u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate, dodecil sulfato de sodio
seg	segundos
SSC	del inglés <u>S</u> aline <u>S</u> odium <u>C</u> itrate, citrato de sodio salino
Taq polimerasa	enzima utilizada en la PCR proveniente de la bacteria <i>Termophilus aquaticus</i>
TBE	<u>T</u> ris- <u>B</u> orato- <u>E</u> DTA
TE	<i>buffer</i> compuesto por Tris y EDTA
U	unidades
x G	unidades de fuerza centrífuga relativa (del inglés <i>relative centrifuge force</i> , rcf)
°C	grados Celsius
µg	microgramos
µl	microlitros
µM	micromolar
µm	micras (micrómetros)

ARTÍCULO

The *MAD1 1673 G → A* polymorphism alters the function of the mitotic spindle assembly checkpoint and is associated with a worse response to induction chemotherapy and sensitivity to treatment in patients with advanced epithelial ovarian cancer

Miguel Santibáñez^a, Dolores Gallardo^b, Flavia Morales^b, Alejandro López^a, Diddier Prada^a, Julia Mendoza^a, Clementina Castro^a, David Cantú de León^c, Luis F. Oñate^c, Delia Perez^d, Alejandro Mohar^a and Luis A. Herrera^a

Background Mitotic arrest deficient 1 (*MAD1*), a protein of the mitotic spindle assembly checkpoint (*SAC*), recognizes *MAD2* through two leucine zippers, transporting and activating *MAD2*, which promotes a metaphase arrest signal. A single nucleotide polymorphism of *MAD1* was found to affect the *SAC* function that could be involved in a poor response to therapeutic agents that alter the dynamics of microtubules.

Objective The aim of this study was to examine the relationship of the polymorphism *MAD1 1673 G → A* (*rs1801368*) with the efficiency of the *SAC* and the generation of aneuploidies and with the therapeutic response of patients with ovarian cancer.

Methods The polymorphism was evaluated in 144 healthy individuals and 91 patients. Mitotic arrest and the presence of errors in segregation were analyzed in cultured human lymphocytes treated with nocodazole and paclitaxel. Errors in segregation were also evaluated in 27 biopsies of patients.

Results Allele frequencies in healthy individuals were G: 50%, A: 50%, whereas in the patients they were G: 38%, A: 62% ($P < 0.05$). The percentage of cells with mitotic arrest was higher among GG cells ($P < 0.05$). The frequency of micronuclei and nondisjunction events increased in AA cells ($P < 0.05$). Tumors from polymorphic patients had

a higher percentage of aneuploid cells ($P < 0.05$). The GG patients showed a higher biochemical response, optimal cytoreduction, and sensitivity to the treatment. There were no differences in progression-free or overall survival between both groups.

Conclusion The polymorphism *MAD1 1673 G → A* affects *SAC* functionality, increasing the frequency of aneuploid cells. This polymorphism modifies the response to agents that alter the dynamics of microtubules in patients with ovarian cancer. *Pharmacogenetics and Genomics* 23:190–199 © 2013 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

Pharmacogenetics and Genomics 2013, 23:190–199

Keywords: aneuploidy, chromosomal instability, gynecological cancer, nondisjunction, ovary, treatment response

^aUnidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología (INCan); Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), ^bDepartamento de Oncología Médica, INCan, ^cSubdirección de Investigación Clínica, INCan and ^dSubdirección de Patología, INCan, México, D.F., México

Correspondence to Luis A. Herrera, PhD, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, PO Box 70–228, Ciudad Universitaria, 04510 México, D.F., México
Tel: + 52 55 562 804 25; fax: + 52 55 562 804 32;
e-mail: herreram@biomedicas.unam.mx

Received 20 April 2012 Accepted 4 January 2013

Introduction

The treatment of ovarian cancer presents a major challenge. Although more than 60% of patients are sensitive to chemotherapy, this gynecological neoplasia nevertheless is difficult to manage [1]. Treatment with standard chemotherapy and cytoreductive surgery has achieved a global response and initial control of the disease in ~80% of cases [2]. However, the 5-year survival rate in these patients does not exceed 50% [3]. Although they respond to chemotherapy, the majority of patients will still develop a recurrence of the cancer that proves fatal, with relapse rates as high as 50% after 2 years [4–5]. In this scenario, an

understanding of the tumor biology and development of the disease is very important for its management.

To date, the prognostic factors and biochemical response markers for advanced ovarian cancer are limited [6]. The induction treatment, as well as the adjuvant treatment following primary optimal cytoreduction, involves regimens that are based on platinum salts and taxanes: three cycles before surgery and then another three afterward or six cycles of adjuvant after cytoreduction, depending on the case [7]. Studies on predictive response factors for induction chemotherapy have reported the importance of the serum levels of the tumor marker CA125 in the biochemical response and as a predictive factor for recurrence [8–9].

In loving memory of Carlos Hesselbart, 'Carlitos'.

Mitotic arrest deficient 1 (MAD1) and MAD2 form a part of the mitotic spindle assembly checkpoint (SAC), a group of proteins that insure proper chromosomal segregation during mitosis of eukaryotic cells [10–12]. Any alteration of this checkpoint predisposes a cell to chromosomal instability and results in the presence of aneuploid cells [13–15]. MAD1 has two leucine zippers in its sequence (aa 501, 522, and 557–571) that allow it to recognize, activate, and transport MAD2 to the kinetochore [13].

Previous reports have described the presence of a polymorphism in nucleotide 1673 of the *MAD1* gene, a G→A (rs1801368) transition that causes the replacement of an arginine by a histidine in codon 558. This change modifies the sequence of amino acids in the second leucine zipper. The relative frequency reported in cancer cell lines is 0.67 for allele A and 0.33 for allele G, and a homozygous polymorphic genotype was suggested as being exclusive to transformed cells [13]. As SAC activation depends on the recruitment of MAD2 to the kinetochore, the AA genotype could cause a deficient metaphase arrest in normal cells exposed to compounds that alter chromosome segregation. For this reason, the polymorphism *MAD1 1673 G→A* may be an important factor in the control of mitosis, a negative influence during the process of chromosomal segregation, and in creating a predisposition to the generation of aneuploid cells. Although it has been determined that the phenotype generated by the change in the amino acid sequence alters the dynamic of mitosis, there has been no study to evaluate the effect of this polymorphism on the generation of chromosomal instability.

Given that the first line of treatment for ovarian cancer involves the use of antimicrotubule agents, the study of this polymorphism could provide important insights into new strategies to treat ovarian cancer, allowing the incorporation of useful new markers to individualize and optimize therapeutic interventions in cancer patients. The aim of this study was to analyze the effects of the polymorphism *MAD1 1673 G→A* on the control of chromosomal segregation as well as its influence on the response to treatment using the carboplatin-paclitaxel (CBP-PTX) regime and progression-free and overall survival in patients with advanced epithelial ovarian cancer.

Methods

DNA isolation, genotype analysis, and sequencing

To determine the incidence of the polymorphism *MAD1 1673 G→A*, 144 healthy individuals were enrolled in the study. All healthy individuals were recruited from Mexico City, were born in Mexico, with Mexican parents and grandparents, and were between 20 and 30 years of age; they were nonsmokers, nondrinkers, and were not receiving medical treatment at the time of sampling.

The DNA was isolated from peripheral blood samples by extraction using phenol/chloroform and precipitation in ethanol. Exon 17 of *MAD1* was amplified by PCR using the following primers:

5'-GTGTGAGAATTCCTGCAGGGTGACTATGACCAG-3' and 5'-GAGTCTGGATCCCTGCCACCTCCTTGACGATGGCAGAC-3'.

The detection of the polymorphism *MAD1 1673 G→A* in the 241-bp product was carried out by restriction fragment length polymorphism using the enzyme *Bst*UI. Three samples were sequenced to confirm the results from the restriction fragment length polymorphism assay.

Flow cytometry and mitotic index

Peripheral blood lymphocytes were isolated from 18 healthy men (six GG, six GA, six AA) and cultured in triplicate. The cells were cultured in RPMI 1640 media (10% fetal bovine serum, 1% L-glutamine) and stimulated with phytohemagglutinin (2%). After 48 h, the cells were treated with 0.2 µg/ml (663 nmol/l) nocodazole for 2, 6, and 12 h. For flow cytometry, cells were fixed with 70% ethanol, and propidium iodide was added for DNA content analysis. For each sample, 20 000 events were analyzed. The proportion of cells undergoing apoptosis (sub-G1 fraction) was measured to exclude differences in cell viability. For the mitotic index, cells were fixed in Carnoy's solution, dropped onto cold slides, and stained with Wright's stain. The mitotic index was determined per 1000 cells/slide using bright-field microscopy.

Cytokinesis-block micronucleus assay

Lymphocytes were isolated from eight healthy men (four GG and four AA) and cultured in triplicate. The cells were cultured in supplemented RPMI media. After 48 h, the cells were treated with 0.2 µg/ml (663 nmol/l) nocodazole or 0.085 µg/ml (100 nmol/l) paclitaxel for 24, 30, 36, 42, and 48 h. Cytochalasin B (6 µg/ml) was added 24 h before the cells were fixed in Carnoy's solution. The cell suspension was then dropped onto cold slides and stained with Wright's stain. The micronucleus frequency per 1000 binucleated cells/slide (9000 cells/treatment/individual) was determined by bright-field microscopy. In addition to the sub-G1 fraction in flow cytometry, we also collected morphological data to determine the number of apoptotic cells observed to exclude differences in cell viability [16,17]. The cytokinesis-block cells treated with nocodazole were also used to detect centromere-positive micronuclei using a pancentromeric probe (Kreatech Biotechnology, Amsterdam, the Netherlands). Centromeric probes specific to chromosomes 1, 9, 16, and Y (VYSIS; Abbot Molecular, Des Plaines, Illinois, USA) were used for analysis of nondisjunction in binucleated cells. Denaturation was performed at 75°C, and hybridizations were carried out at 37°C overnight in a humid chamber; slides were counterstained with DAPI (Vectashield H-1200;

Vector Laboratories Inc., Burlingame, California, USA). Binucleated cells were analyzed for nondisjunction in three independent experiments using a UV Carl Zeiss microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). A minimum of 500 binucleated cells were analyzed on coded slides.

Fluorescent in-situ hybridization assays for the detection of aneuploidies in patient tumor samples

Paraffin-embedded tumor tissues available from 27 of the study patients (three GG, 15 GA, and nine AA) were used to determine whether there was a difference in the frequency of aneuploidies associated with the polymorphism *MAD1 1673 G→A* in the tumor cells of patients with advanced ovarian cancer. Paraffin was removed from the samples; thereafter, they were mounted onto charged slides, permeabilized, and hybridized with centromeric probes specific to chromosomes 1, 9, and 16 according to the manufacturer's instructions (VYSIS; Abbot Molecular). The percentage of aneuploidy (detection of errors in the distribution of chromosomes 1, 9, and 16) was determined by fluorescence microscopy. Fifty cells were analyzed per sample.

To determine the effects of the polymorphism *MAD1 1673 G→A* on the response to treatment with agents that alter chromosomal segregation, the parameters of response and progression were analyzed in patients with advanced epithelial ovarian cancer according to the genotypes determined from peripheral blood DNA.

Population

The study population included patients with an initial diagnosis of advanced epithelial ovarian cancer who were evaluated from 1 June 2002 to 1 February 2009. The protocol was approved by the scientific and ethics committees of our institution. Patients included in the study received three cycles of first-line CBP-PTX induction chemotherapy; their ages ranged between 18 and 75 years. The patients had a Karnofsky performance status of at least 70%, adequate bone marrow function, and the following test levels: leukocytes, $3.5 \times 10^9/l$; platelets, $100 \times 10^9/l$; hemoglobin, 10 g/dl; creatinine clearance, at least 40 ml/min; bilirubin, less than 2.0 $\mu\text{mol/l}$; and transaminase level less than twice the normal upper limit. The total number of genotyped patients was 91, of whom 74 were included in the analysis; 17 patients were excluded because of several reasons such as previous treatment, values beyond the range with respect to the inclusion criteria (Karnofsky performance status and test levels), or refusal by the patient to participate in the study.

The patient group included those individuals who were treated initially with induction chemotherapy (three cycles of intravenous carboplatin AUC 6 and paclitaxel 175 mg/m²) and interval debulking surgery, followed by three consolidated cycles of the same regime. There were

monthly or bimonthly follow-ups with determination of CA125 and clinical evaluation until biochemical or clinical evidence showed recurrence of the disease. The follow-up started after the last consolidation cycle and it continued for 5 years in each patient (60 months).

Patients were divided according to the genotype *MAD1 1673 G→A* into polymorphic and nonpolymorphic groups. The polymorphic group included patients who were carriers of at least one variant allele (AA and GA), whereas the nonpolymorphic group included homozygous patients with the wild-type allele (GG). Data were recorded in terms of chemotherapeutic response (CA125 < 35 U/ml) after three cycles of induction chemotherapy, optimal cytoreduction (residual disease under 1 cm after interval debulking surgery), treatment sensitivity (disease-free period of more than 6 months after systemic therapy), progression-free survival period, and overall survival. To obtain the odds ratio in patients with at least one polymorphic allele, the biochemical response was analyzed by logistic regression, adjusted for age and clinical stage.

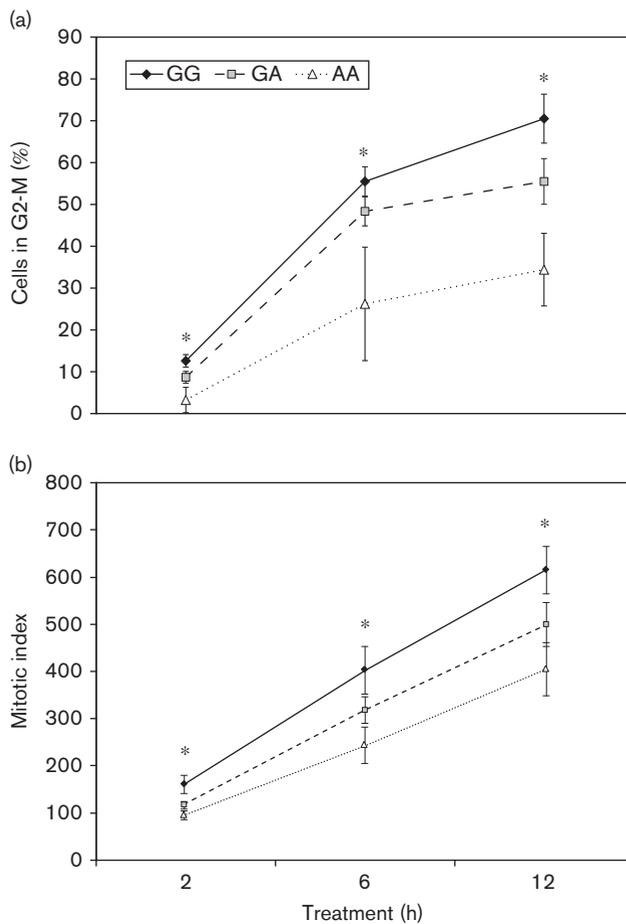
Statistical analysis for all experiments was carried out using SPSS v. 20.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) with a significance level of α equal to 0.05. The χ^2 -test of independence was applied for nonparametric data and one-way analysis of variance was applied for average values. A χ^2 -test was used to compare the response criteria according to the *MAD1* genotype. The progression-free survival period and global survival were analyzed using the Kaplan–Meier estimator and the log-rank test.

Results

The polymorphic homozygous genotype (GG) is found in healthy individuals but is more prevalent in patients with advanced epithelial ovarian cancer. Of the 144 samples evaluated from healthy participants, the distribution of genotypes was 35 (24%) GG, 74 (52%) GA, and 35 (24%) AA. This distribution maintains Hardy–Weinberg equilibrium. In the 91 blood samples from patients, the distribution was 15 (16%) GG, 40 (44%) GA, and 36 (40%) AA. Comparison of populations showed a higher frequency of the A allele in samples from patients with advanced epithelial ovarian cancer ($P = 0.014$) and a larger frequency of individuals with the AA genotype in that group ($P = 0.013$). Compared with healthy participants, the distribution of ovarian cancer patients did not maintain Hardy–Weinberg equilibrium.

The polymorphism *MAD1 1673 G→A* affects the efficiency of the SAC. The results of flow cytometric analysis on the basis of DNA content showed that the proportion of cells treated with nocodazole that remained arrested in the G2/M transition was larger in the GG genotype carriers than in GA and AA cells for different exposure times ($P < 0.05$; Fig. 1a). However, the mitotic index showed a lower number of metaphases in cells harboring the polymorphic allele (GA and AA)

Fig. 1

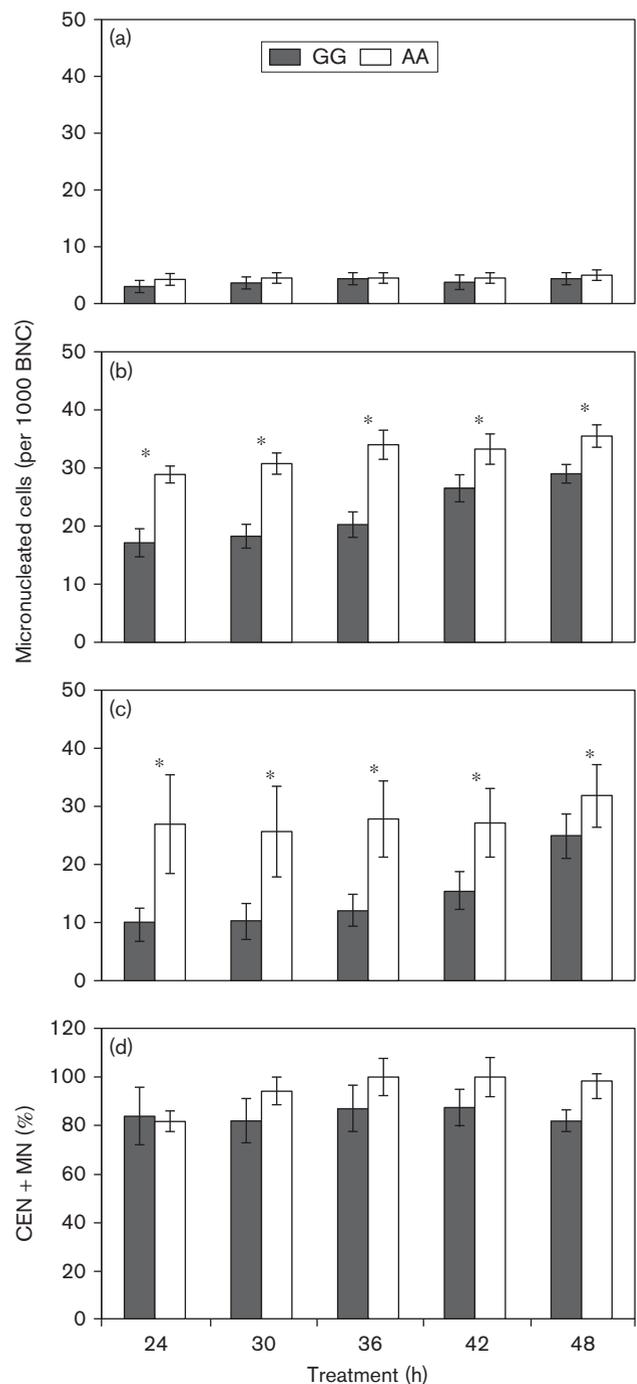


Analysis of cell-cycle arrest as a function of the *MAD1* 1673 G→A polymorphism. (a) Flow cytometric analysis on the basis of the DNA content in lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin and treated with nocodazole (0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 2, 6, and 12 h. Points on the line indicate the percentage of cells in the M phase. (b) Mitotic indices in lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin and treated with nocodazole (0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 2, 6, and 12 h. Points on the line indicate the number of cells arrested in metaphase. All results are the average of three independent experiments. G: wild-type allele; A: polymorphic allele. * $P < 0.05$.

($P < 0.05$; Fig. 1b). These results indicate that, in the presence of both an agent that destabilizes the microtubule–kinetochore attachment and at least one polymorphic allele, the SAC loses functionality. The proportion of cells undergoing apoptosis (sub-G1 fraction) was the same for all three genotypes ($\sim 4\%$ for all genotypes for different times of exposure).

The polymorphism *MAD1* 1673 G→A is associated with a higher frequency of aneuploid cells. The data obtained from the cytokinesis-block micronucleus assay show a higher frequency of cells with micronuclei in lymphocytes from AA individuals who were treated *in vitro* with nocodazole and paclitaxel than in those from GG individuals ($P < 0.05$; Fig. 2b and c). The frequency of micronuclei increased in GG cells as a function of

Fig. 2



Frequency of cells containing micronuclei (MN) per 1000 binucleate cells (BNC) as a function of the polymorphism *MAD1* 1673 G→A. (a) Controls without treatment; cells treated with (b) nocodazole (0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or (c) paclitaxel (0.085 $\mu\text{g}/\text{ml}$). (d) Percentage of MN containing centromeres determined using a pan-centromeric probe. All results are the average of three independent experiments. * $P < 0.05$. CEN, centromere.

treatment time. No differences were found between the *MAD1* 1673 G→A polymorphism genotypes with respect to the number of apoptotic cells observed (2% in

controls, up to 5% in treated cells). The results from the fluorescent in-situ hybridization assay in cells treated with nocodazole, using a pan-centromeric probe, confirmed the presence of complete chromosomes in the micronuclei. The percentage of centromere-positive micronuclei showed a distribution from 80 to 100%, with no differences between treatment times or between the cells of GG and AA individuals (Fig. 2d). However, the fluorescent in-situ hybridization assay performed with specific centromeric probes showed a larger number of nondisjunction events in AA cells compared with GG cells after treatment with nocodazole or paclitaxel, independent of the duration of treatment ($P < 0.05$; Fig. 3b and c).

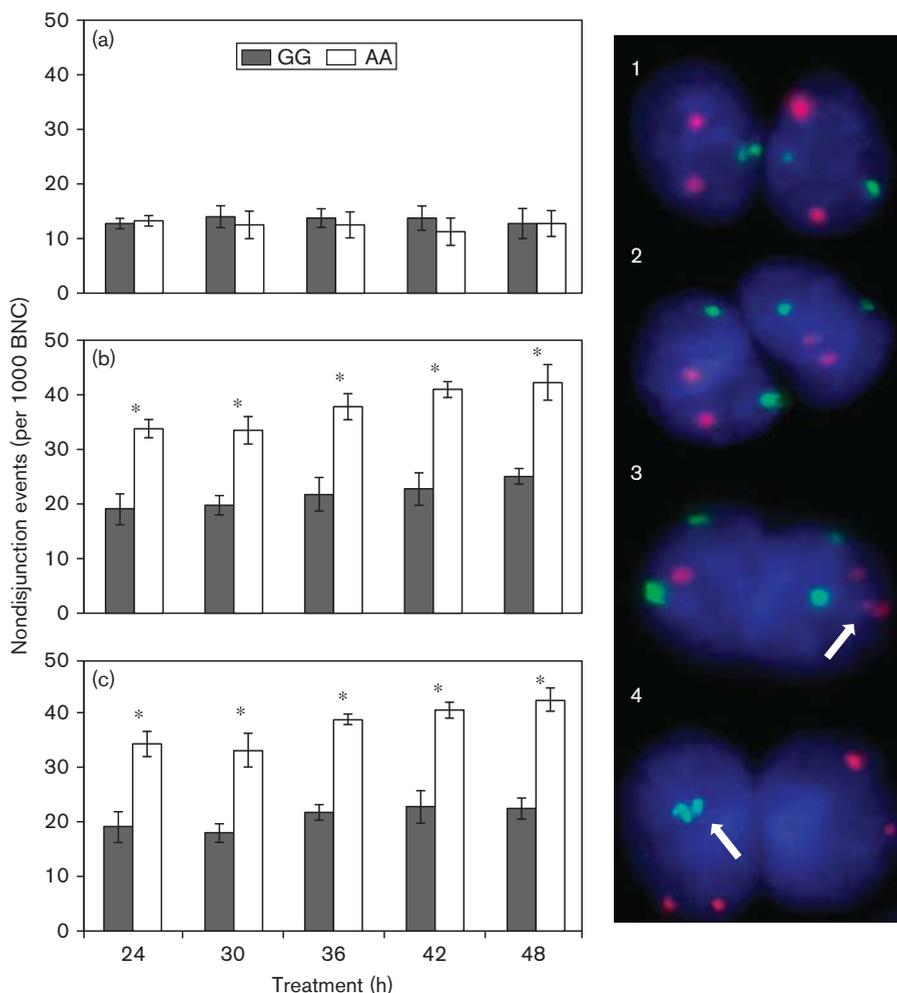
The tumors of patients carrying at least one polymorphic allele (GA and AA) showed a higher percentage of aneuploid cells compared with those of patients with nonpolymorphic cells (GG). The percentage of aneuploid

cells in samples from AA and GA individuals (71 and 64%, respectively) is higher than that in samples from GG patients (38%, $P < 0.05$; Fig. 4).

The polymorphism *MAD1 1673 G→A* is associated with a worse response to induction chemotherapy, optimal cytoreduction, and sensitivity to treatment in patients with advanced epithelial ovarian cancer. Of the 91 patients for whom the polymorphism was determined, 74 were included in the analysis of treatment response (13 GG, 30 GA, and 31 AA) according to our selection criteria. The patients with at least one polymorphic allele (AA and GA) were included in the polymorphic group. Thus, 61 polymorphic patients and 13 nonpolymorphic patients were included.

The median age of the patients was 55 years ($n = 74$; range 36–83 years), and 74% of the patients were younger

Fig. 3



Analysis of nondisjunction events in lymphocytes in relation to the *MAD1 1673 G→A* polymorphism. (a) Controls without treatment. Cells treated with (b) nocodazole (0.2 µg/ml) or with (c) paclitaxel (0.085 µg/ml). (d) Cells with normal (1–2) chromosome segregation or with nondisjunction events (3–4; white arrows). The bars show the average nondisjunction events in chromosomes 1, 9, 16, and Y in untreated binucleate cells (BNC) at different treatment times. All results are the average of three independent experiments. * $P < 0.05$.

than 65 years of age (55/74). With respect to clinical stage, 54 patients (73%) were diagnosed with stage III cancer and 20 (27%) had stage IV cancer. The initial diagnosis was made through exploratory laparotomy in 48 patients (65%); in the remaining cases, the diagnosis was made by guided biopsy of the pelvic lesion and/or assessing the cytology of the ascitic fluid. The predominant histological type was high-grade serous papillary ($n = 44$, 59%). Other histological types were endometrioid ($n = 3$), clear cell ($n = 3$), mucinous ($n = 1$), and mixed ($n = 23$). Table 1 summarizes the clinical features of the patients analyzed.

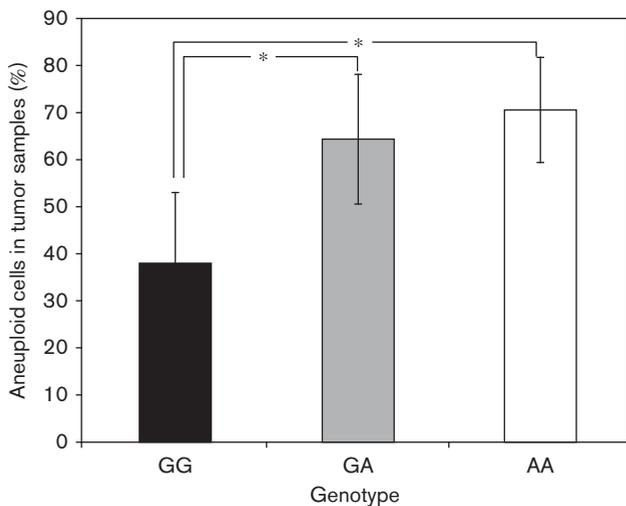
The serum level of the tumor marker CA125 at the time of diagnosis ranged from 28.6 to 38 219 U/ml, with an average basal level of 4594.5 U/ml. The average basal level of CA125 was higher in the nonpolymorphic patients than in the polymorphic patients (5.075 vs. 4.492 U/ml), although the difference was not statistically significant ($P = 0.86$). The global treatment response after three cycles of induction chemotherapy was determined by periodic determination of the serum level of CA125. Levels of up to 35 U/ml were considered to be a biochemical response and were observed in 36% (27/74) of the total patients, 77% (10/13) of the nonpolymorphic patients, and 31% (19/61) of the polymorphic patients. Data analyzed by logistic regression, adjusted for age and clinical stage, indicated that the presence of at least one polymorphic allele was associated with a lower biochemical response, with an odds ratio of 3.99 [95% confidence interval (CI) 1.01–15.83; Table 2]. Even when

the basal value was higher in the nonpolymorphic patients, the level of CA125 before surgery was lower in this group (170.1 vs. 231.6 U/ml).

Optimal cytoreduction was successful in 74% (55/74) of the total patients. All of the nonpolymorphic patients (13/13) had optimal cytoreduction as opposed to 69% (42/61) of the polymorphic patients.

Among the patients, 53% (39/74) were considered responsive to chemotherapy, whereas the remaining 47% (35/74) experienced progression of the disease. Of the nonpolymorphic patients, 69% (9/13) were responsive to treatment in contrast to 49% (30/61) of the polymorphic

Fig. 4



Percentage of aneuploid cells in biopsies from patients with advanced epithelial ovarian cancer as a function of the genotype *MAD1 1673 G→A*. Percentages obtained from a count of 100 cells in a double-blind experiment using samples from three GG individuals, 15 GA individuals, and nine AA individuals. *Statistically significant differences between the genotypes ($P < 0.05$).

Table 1 Clinical features of advanced ovarian cancer patients evaluated

Clinical features	Median (range) or n (%)
Age	55 (36–83)
CA125 basal	4594.48 (28.60–38219.00)
Clinical feature ($n = 74$)	
Clinical stage	
III	54 (73)
IV	20 (27)
Histology	
Papillary serous	44 (59.5)
Endometrioid	3 (4.1)
Clear cell	3 (4.1)
Mucinous	1 (1.4)
Other	23 (31.1)
Differentiation grade	
Well	7 (9.5)
Moderate	3 (4.1)
Poor	64 (86.5)
<i>MAD1 1673 G→A</i> genotype	
GG	13 (17.6)
GA	30 (40.5)
AA	31 (41.9)
CA125 before surgery (U/ml)	
< 35	27 (36.5)
> 35	47 (63.5)
Optimal cytoreduction	
Yes	55 (74.3)
No	19 (25.7)
Recurrence	
Yes	30 (12.2)
No	9 (40.5)
No data (because of progression)	35 (47.3)

Table 2 Logistic regression analysis of the biochemical response to carboplatin-paclitaxel as a function of *MAD1 1673 G→A*.

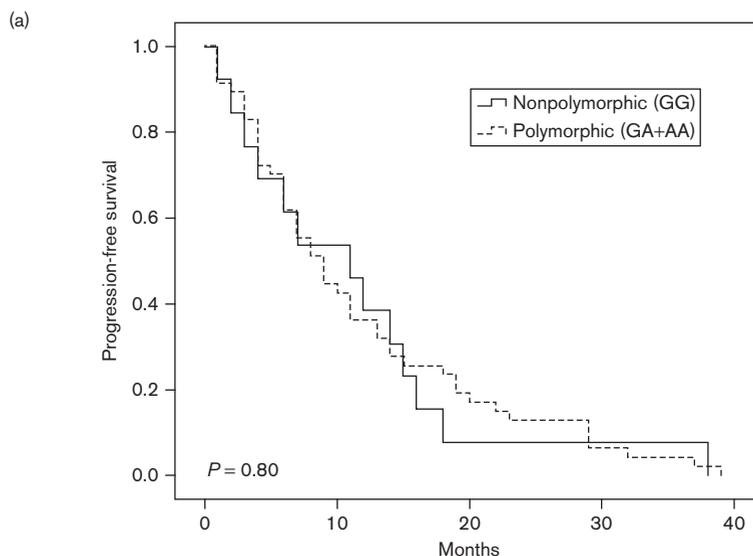
Variables	<i>B</i>	SE	Wald	<i>d.f.</i>	Sig.	Exp (<i>B</i>)	95% CI for Exp (<i>B</i>)	
							Lower	Upper
<i>MAD1</i>	1.385	0.703	3.885	1	0.049	3.994	1.008	15.826
polymorphic								
Age	-0.054	0.023	5.375	1	0.020	0.948	0.906	0.992
Clinical stage	0.712	0.661	1.159	1	0.282	2.037	0.558	7.444
Constant	2.280	1.333	2.926	1	0.087	9.779		

The presence of at least one polymorphic allele increases the relative risk of nonresponding to induction chemotherapy in patients with advanced ovarian cancer (CA125 > 35 U/ml, $P < 0.05$).

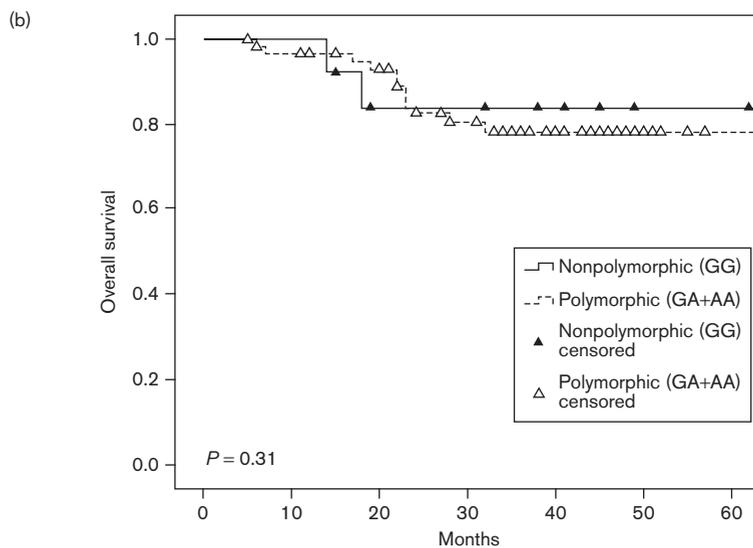
The results were adjusted for age and clinical stage.

B, estimated odds ratio; CI, confidence interval; *d.f.*, degrees of freedom; Sig., significance; Wald, Wald test statistic.

Fig. 5



Group	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Nonpolymorphic (GG)	13 (100)	7 (53.8)	1 (7.6)	1 (7.6)	0 (0)
Polymorphic (GA+AA)	47 (100)	20 (42.6)	8 (17.1)	3 (6.3)	0 (0)



Group	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Nonpolymorphic (GG)	13 (100)	13 (100)	9 (69.2)	9 (69.2)	7 (53.8)	2 (15.3)	2 (15.3)
Polymorphic (GA+AA)	61 (100)	57 (93.4)	48 (78.6)	36 (59)	23 (37.7)	8 (13.1)	4 (6.5)

Survival curves in patients with advanced epithelial ovarian cancer according to the polymorphism *MAD1* 1673 G→A. Patients were divided according to the genotype *MAD1* 1673 G→A into polymorphic and nonpolymorphic groups. The polymorphic group included patients who were carriers of at least one variant allele (AA + GA), whereas the nonpolymorphic group included homozygous patients with the wild-type allele (GG). (a) Progression-free survival, (b) Overall survival.

patients. In the nonpolymorphic group, 89% (8/9) of the patients experienced recurrence of the disease, whereas in the polymorphic group, 73% of the patients (22/30)

showed recurrence. The mean progression-free survival period for all the patients was 6.5 months, with a range of 0–39 months ($P = 0.8$; Fig. 5a). Although no statistically

significant difference was observed, the nonpolymorphic patients tended to show delayed progression, with a progression-free period of 11.3 months (95% CI 2.8–37) compared with 9.11 months (95% CI 7.9–14, $P = 0.3$) in the polymorphic patient group. The patients' average overall survival was 35.5 months, with a range of 5–85 months. On comparing the overall survival with polymorphic status, it was observed that 85% (11/13) of the nonpolymorphic patients survived during follow-up compared with 82% (50/61) of the polymorphic patients ($P = 0.316$; Fig. 5b).

Discussion

MAD1 is a protein necessary for the control of chromosomal segregation in eukaryotic cells. Low levels of this protein impede cell-cycle arrest in mitosis when cells are treated with microtubule-stabilizing and microtubule-destabilizing agents [18–19]. Although the mutation frequency of SAC genes is low, polymorphisms in genes, such as *MAD1L1*, *MAD2L1*, and *BUB1b*, have been identified in various types of cancer as the main components modulating the arrest [20–23].

The SAC is an extremely sensitive mechanism that is capable of detecting the presence of a single chromosome without a bipolar attachment to the mitotic spindle and then delaying anaphase initiation. There are two consequences when cells remain in prolonged mitotic arrest: induction of apoptosis, either during mitotic arrest or by mitosis slippage, followed by apoptosis activation in G1 tetraploid cells [24–27]. However, if there are defects in the function of the SAC, arrest does not take place, resulting in aneuploidy and resistance to treatment [28–30]. Paclitaxel, as well as Vinca alkaloids (agents used in clinical practice for the treatment of various types of cancer), promote this arrest, which is dependent on the constant division of tumor cells [25]. Our experiments used either nocodazole or paclitaxel (a microtubule-destabilizing and a microtubule-stabilizing agent, respectively) as activators of the SAC.

The effect of the polymorphism *MAD1 1673 G→A* was characterized for the first time by Iwanaga *et al.* [13] in solid tumor samples, cells transformed by human T-lymphotropic virus type 1, and colon cancer cell lines. In a small screening of 14 samples, there were no healthy AA individuals, which led to the assumption that this condition resulted from loss of heterozygosity in cancer cells. By contrast, the present study detected healthy AA individuals, showing that this genotype is also represented in the healthy population. It is important to note that this is the first study on a healthy population in which this polymorphism was evaluated.

The high percentage of cells with the wild-type genotype maintained in the G2/M transition in the presence of nocodazole indicates a greater functionality of the mechanism in these cells than in those with the GA or the AA genotype. Metaphase-arrested cells observed by

mitotic index determination confirmed this behavior. Our results indicate that cells harboring at least one polymorphic allele (GA + AA) may have a less efficient SAC. However, the polymorphism does not activate metaphase arrest completely.

The biological consequence of a malfunction in the SAC is the generation of aneuploidy [31], an important factor in the development of cancer. This malfunction of the SAC allows cells to acquire and propagate chromosomal instability to their descendants. The cytokinesis-block micronucleus assay allows for the evaluation of cell damage at the level of chromosomal segregation. The fact that cells with the genotype AA have a larger number of micronuclei may be related to the premature end of mitosis. Our results also show that the difference in the frequency of cells with micronuclei between GG and AA individuals after treatment decreased with time. This may be a result of the effect of both nocodazole and paclitaxel on the retardation of the cell cycle because carrier cells of the GG genotype are late to emerge from arrest in mitosis, and the detection of micronuclei depends on the cell passing through a cycle of division after treatment. Despite this difference, more than 80% of the micronuclei detected in both groups (control and treated) contained complete chromosomes, a finding that is consistent with the mechanism by which these compounds act.

The analysis of nondisjunction resulting from the polymorphism *MAD1 1673 G→A* showed that the carrier cells of the AA genotype presented a larger number of nondisjunction events for all nocodazole or paclitaxel exposure times analyzed.

The binding of MAD1–MAD2 causes a conformational change in the MAD2 C-terminal tail. This change is described in the literature as closed MAD2, and it is the active form that binds cell-division cycle protein 20 to inhibit anaphase-promoting complex/cyclosome activation and promote metaphase arrest [32]. Because of the fact that the polymorphism does not activate the metaphase arrest completely, we hypothesize that polymorphic MAD1 reduces its capability to recruit and activate MAD2.

Taken together, these results suggest that the *MAD1 1673 G→A* polymorphism affects the SAC, probably through a dominant negative effect. In polymorphic cells, the MAD1–MAD2 complex could be less stable because of a modification in one leucine zipper (557–571). Our data on normal cells provide the basis for future studies that address the effect of polymorphisms on the MAD1 structure or stability in similar models.

The differences observed in the genotypic frequencies of *MAD1 1673 G→A* between healthy individuals and patients may suggest that the polymorphism could be a risk factor for ovarian cancer. This is the first report on the frequency of the *MAD1 1673 G→A* polymorphism in a

Mexican Mestizo population. Data from SNP MapViewer report the *MAD1 1673 G→A* polymorphism frequency in populations (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=1801368) including Japanese, African-American, Caucasian, European, and a mixed population (Caucasian and African-American). The minor allele frequency reported by SNP MapViewer is 0.2862. All populations enlisted in the study showed values lower than those obtained in our study population with respect to the A allele. More studies should be conducted to determine whether AA individuals are more susceptible to developing ovarian cancer. We decided to group patients with at least one polymorphic allele (GA + AA) because our in-vitro results suggested loss of functionality during metaphase arrest in cells with these genotypes compared with the homozygous wild-type genotype.

Our results show an association of the *MAD1* polymorphism with a lower biochemical response, a smaller percentage of patients with optimal cytoreduction, and a reduced sensitivity to treatment with CBP-PTX. In addition, nonpolymorphic patients showed a better biochemical response, although the recurrence was higher compared with that among polymorphic patients. These results suggest that the polymorphism *MAD1 1673 G→A* could be used as a prognostic factor for CBP-PTX sensitivity. The diagnosis of this polymorphism, together with clinical characteristics, histological subtypes, and CA125 levels, offers new possibilities for the identification of favorable and unfavorable criteria for the treatment of ovarian cancer in advanced clinical stages. Given that ovarian cancer is a heterogeneous disease and that none of these markers are independent, further prospective studies are required for the evaluation of possible biological markers to identify risk groups.

Conclusion

The polymorphism *MAD1 1673 G→A* is well represented in the general population. Its high frequency in patients with advanced ovarian cancer points to the need for further study on its possible use as a marker of risk for this neoplasia. The polymorphism alters the function of the SAC, predisposing cells to the generation of aneuploidies. Although advanced epithelial ovarian cancer continues to be a therapeutic challenge, our results provide information suggesting that, within the group of patients with this neoplasia, there exists a subgroup that will show a better response to standard antineoplastic treatment. However, although this group shows a more favorable response to an initial treatment, it shows a greater rate of recurrence. In our analysis, overall and progression-free survival did not achieve statistical significance between the different groups, which could possibly be explained by the reduced sample size in the group of nonpolymorphic patients. Therefore, these findings indicate the need for a study on a larger number of patients with these genotypic characteristics.

Acknowledgements

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT: 83959) and the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica of the Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT, UNAM: IN213311). Miguel Santibañez was a fellow of the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM, and received a grant from CONACyT.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

References

- Nelson BE, Rosenfield AT, Schwartz PE. Preoperative abdominopelvic computed tomographic prediction of optimal cytoreduction in epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 1993; **11**:166–172.
- Berek J, Trope C, Vergote I. Surgery during chemotherapy and at relapse of ovarian cancer. *Ann Oncol* 1999; **10** (Suppl 1):3–7.
- American Cancer Society. *Cancer Facts and Figures 2012*. Atlanta: American Cancer Society; 2012.
- Chi DS, Franklin CC, Levine DA, Akselrod F, Sabbatini P, Jarnagin WR, et al. Improved optimal cytoreduction rates for stages IIIC and IV epithelial ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer: a change in surgical approach. *Gynecol Oncol* 2004; **94**:650–654.
- Bristow RE, Tomacruz RS, Armstrong DK, Trimble EL, Montz FJ. Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis. *J Clin Oncol* 2002; **20**:1248–1259.
- Omura GA, Brady MF, Homesley HD, Yordan E, Major FJ, Buchsbaum HJ, et al. Long-term follow-up and prognostic factor analysis in advanced ovarian carcinoma: the Gynecologic Oncology Group experience. *J Clin Oncol* 1991; **9**:1138–1150.
- Bristow RE, Eisenhauer EL, Santillan A, Chi DS. Delaying the primary surgical effort for advanced ovarian cancer: a systematic review of neoadjuvant chemotherapy and interval cytoreduction. *Gynecol Oncol* 2007; **104**:480–490.
- Fayers PM, Rustin G, Wood R, Nelstrop A, Leonard RC, Wilkinson P, et al. The prognostic value of serum CA 125 in patients with advanced ovarian carcinoma: an analysis of 573 patients by the Medical Research Council Working Party on Gynaecological Cancer. *Int J Gynecol Cancer* 1993; **3**:285–292.
- Riedinger J, Wafflard J, Ricolleau G, Eche N, Larbre H, Basuyau JP, et al. CA 125 half-life and CA 125 nadir during induction chemotherapy are independent predictors of epithelial ovarian cancer outcome: results of a French multicentric study. *Ann Oncol* 2006; **17**:1234–1238.
- Duesberg P, Rasnick D. Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own. *Cell Motil Cytoskeleton* 2000; **47**:81–107.
- Musacchio A, Salmon ED. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**:379–393.
- Bharadwaj R, Yu H. The spindle checkpoint, aneuploidy and cancer. *Oncogene* 2004; **23**:2016–2027.
- Iwanaga Y, Kasai T, Kibler K, Jeang KT. Characterization of regions in hSMAD1 needed for binding HsMAD2. A polymorphic change in an hSMAD1 leucine zipper affects MAD1-MAD2 interaction and spindle checkpoint function. *J Biol Chem* 2002; **277**:31005–31013.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 1997; **386**:623–627.
- Kops GJ, Weaver BA, Cleveland DW. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer* 2005; **5**:773–785.
- Fenech M, Crott J, Turner J, Brown S. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. *Mutagenesis* 1999; **14**:605–612.
- Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat Res* 2006; **600**:58–66.
- Meraldi P, Draviam VM, Sorger PK. Timing and checkpoints in the regulation of mitotic progression. *Dev Cell* 2004; **7**:45–60.
- Kienitz A, Vogel C, Morales I, Müller R, Bastians H. Partial downregulation of MAD1 causes spindle checkpoint inactivation and aneuploidy,

- but does not confer resistance towards taxol. *Oncogene* 2005; **24**: 4301–4310.
- 20 Cahill DP, da Costa LT, Carson-Walter EB, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. Characterization of MAD2B and other mitotic spindle checkpoint genes. *Genomics* 1999; **58**:181–187.
 - 21 Percy MJ, Myrie KA, Neeley CK, Azim JN, Ethier SP, Petty EM. Expression and mutational analyses of the human MAD2L1 gene in breast cancer cells. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; **29**:356–362.
 - 22 Nomoto S, Haruki N, Takahashi T, Masuda A, Koshikawa T, Takahashi T, *et al.* Search for in vivo somatic mutations in the mitotic checkpoint gene, hMAD1, in human lung cancers. *Oncogene* 1999; **18**:7180–7183.
 - 23 Tsukasaki K, Miller CW, Greenspun E, Eshaghian S, Kawabata H, Fujimoto T, *et al.* Mutations in the mitotic check point gene, MAD1L1, in human cancers. *Oncogene* 2001; **20**:3301–3305.
 - 24 Uetake Y, Sluder G. Prolonged prometaphase blocks daughter cell proliferation despite normal completion of mitosis. *Curr Biol* 2010; **20**:1666–1671.
 - 25 Rieder CL, Maiato H. Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint. *Dev Cell* 2004; **7**:637–651.
 - 26 Gascoigne KE, Taylor SS. Cancer cells display profound intra- and interline variation following prolonged exposure to antimitotic drugs. *Cancer Cell* 2008; **14**:111–122.
 - 27 Orth JD, Tang Y, Shi J, Loy CT, Amendt C, Wilm C, *et al.* Quantitative live imaging of cancer and normal cells treated with kinesin-5 inhibitors indicates significant differences in phenotypic responses and cell fate. *Mol Cancer Ther* 2008; **7**:3480–3489.
 - 28 Jordan MA, Wendell K, Gardiner S, Dery WB, Copp H, Wilson L. Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Res* 1996; **56**:816–825.
 - 29 Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 2004; **4**:253–265.
 - 30 Tao W. The mitotic checkpoint in cancer therapy. *Cell Cycle* 2005; **4**: 1495–1499.
 - 31 Gordon DJ, Resio B, Pellman D. Causes and consequences of aneuploidy in cancer. *Nat Rev Genet* 2012; **13**:189–203.
 - 32 Sironi L, Mapelli M, Knapp S, De Antoni A, Jeang K, Musacchio A. Crystal structure of the tetrameric MAD1-MAD2 complex: implications of a 'safety belt' binding mechanism for the spindle checkpoint. *EMBO J* 2002; **21**:2496–2506.