



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**CONSECUENCIAS DE UNA MITOSIS PROLONGADA: PERSISTENCIA DE  
BUB1 Y SURVIVINA EN CÉLULAS QUE SOBREVIVEN AL ARRESTO  
MITÓTICO.**

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

PRESENTA:  
**MARCO ALONSO ANDONEGUI ELGUERA**

TUTOR: DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR: DR. JORGE MELÉNDEZ ZAJGLA  
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA  
DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

MARZO 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

*El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Carcinogénesis de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto de Investigaciones Biomédicas y el Instituto Nacional de Cancerología bajo la Tutela del Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo, con el financiamiento del proyecto IN208815 de PAPIIT / UNAM y la beca 256184/215784 otorgada por CONACYT.*

*¡Estamos al filo del agua!*

Agradecimientos:

El soporte continuo de mi familia es el que me ha motivado a intentarlo cada vez. Silvia ha sido mi principal apoyo. David, Misael y Sergio son mis compañeros de viaje. El tiempo no nos dejó que pudieras estar conmigo ahora Felipa, pero esto también va por ti.

El trabajo realizado en esta tesis se llevó a cabo gracias al apoyo total del Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo. La confianza que él me otorgó me ha permitido seguir en el camino a pesar de los tropiezos y crecer. ¡Gracias Luis!

La mayor parte de este estudio fue un trabajo en equipo junto con mis colegas Rodrigo Cáceres y Fernando Luna.

Mis camaradas del escuadrón han estado en un sinfín de alegrías y anécdotas. Gracias Jose, Lisandro, Miguel, Cáceres, Luna, Armando y a todo el escuadrón. Aún nos faltan algunas aventuras por vivir.

El apoyo de Fernanda durante estos años merece una especial mención. ¡Buena suerte en tu nuevo camino Cisneros!

Mi amiga Clementina ha visto como he crecido y envejecido. Siempre he contado con su apoyo y ella siempre contará con mi cariño.

La familia del laboratorio hace que el trabajo sea en gran medida diversión y alegría. Espero que el ambiente del laboratorio se mantenga fraterno. Agradezco a todos mis compañeros del laboratorio: Diddier, Alejandro, Julia, Eunice, Diego y a todos los que conforman el grupo de Carcinogénesis, incluso los temporales. ¡Te mandó un abrazo Hesselbart! Siempre te recordamos.

Un especial agradecimiento a mi querida UNAM de la que soy parte desde hace ya muchos años. El Instituto de Investigaciones Biomédicas me otorgó su gran riqueza académica. El Instituto Nacional de Cancerología ha sido mi casa y mi apoyo en los últimos años.

Gracias a la vida y a varios miles de millones de años de evolución que nos han permitido llegar hasta aquí. A seguir el camino y ¡que el rock sea!

## Contenido

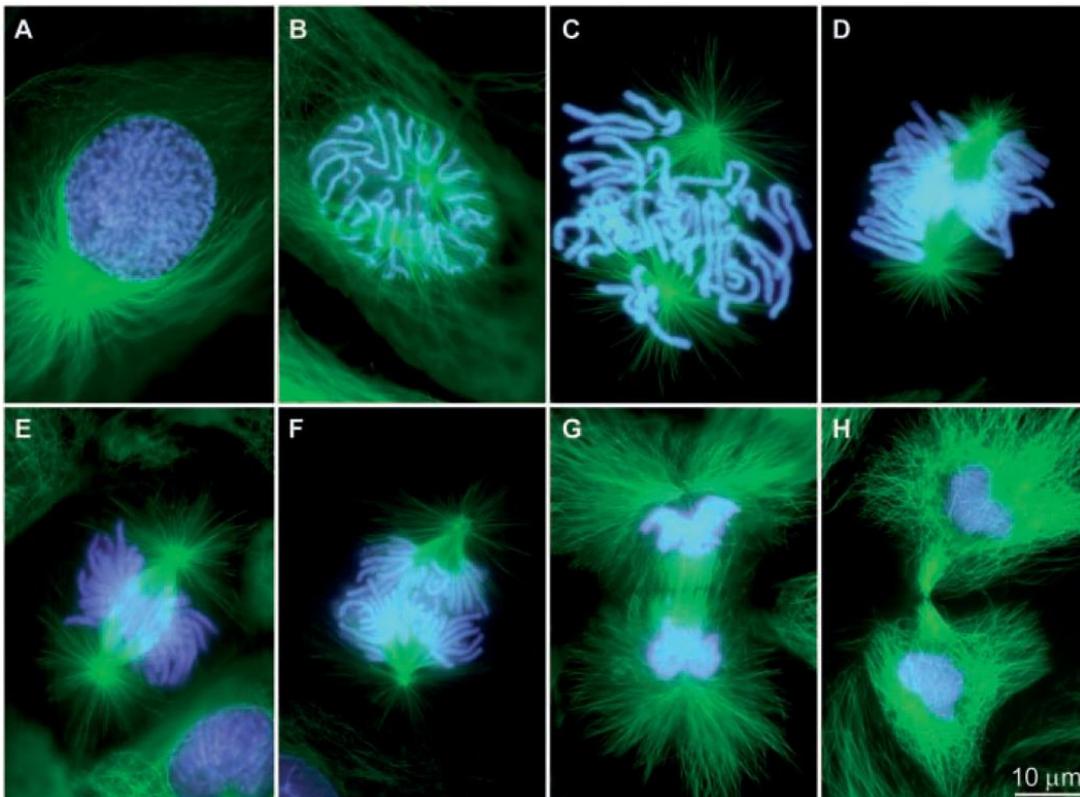
ANTECEDENTES .....	7
Mitosis.....	7
La actividad de la cinasa CDK1 regula los principales procesos mitóticos. ....	10
El papel de la cinasa PLK1 .....	11
El complejo pasajero cromosómico (CPC) regula aspectos clave de la mitosis. ....	13
No solo una pasajera: SURVIVINA inhibe la muerte celular.....	16
La transición de Metafase hacia Anafase es un proceso irreversible controlado por el complejo APC/C. ....	17
El Punto de Monitoreo Mitótico evita defectos durante la segregación cromosómica al inhibir a APC/C .....	19
La cinasa BUB1 participa en funciones independientes a la segregación cromosómica. ....	21
La activación continua del PMM es una estrategia terapéutica contra el cáncer.....	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS. ....	25
MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
Líneas celulares y condiciones de cultivo .....	26
Tratamiento con Paclitaxel .....	26
Índice Mitótico .....	27
Citometría de Flujo .....	27
Western Blotting.....	28
Inmunofluorescencia .....	29
Microscopía en time-lapse .....	30
SOLUCIONES Y REACTIVOS.....	32
RESULTADOS .....	33
Obtención de la dosis mínima efectiva del paclitaxel.....	33
La duración del arresto en mitosis es diferente en las células HCT116 y HT29. ....	33
La liberación del arresto mitótico coincide con la aparición de células muertas y poliploides.....	34

Los niveles de las proteínas BUB1 y SURVIVINA disminuyen gradualmente durante una mitosis prolongada sin relación con la liberación del arresto. ....	36
BUB1 y SURVIVINA se localizan en el núcleo en células HCT116 que se liberan de un arresto mitótico. ....	37
La heterogeneidad celular después de un arresto mitótico está relacionada con el “escape” de la mitosis .....	41
DISCUSIÓN.....	44
REFERENCIAS.....	48

## ANTECEDENTES

### Mitosis

El material genético de los organismos eucariontes se diferencia de los procariontes en varios aspectos: en primer lugar, se encuentra contenido en un organelo rodeado por una doble membrana (envoltura) denominado núcleo; el DNA de los organismos eucariontes se asocia a proteínas llamadas histonas en el nucleosoma, un octámero de histonas alrededor del cual se enrolla la doble cadena de DNA; los eucariontes poseen más de un cromosoma y generalmente tienen una mayor cantidad de DNA. Estas diferencias provocan que la división celular de los eucariontes sea más compleja que la



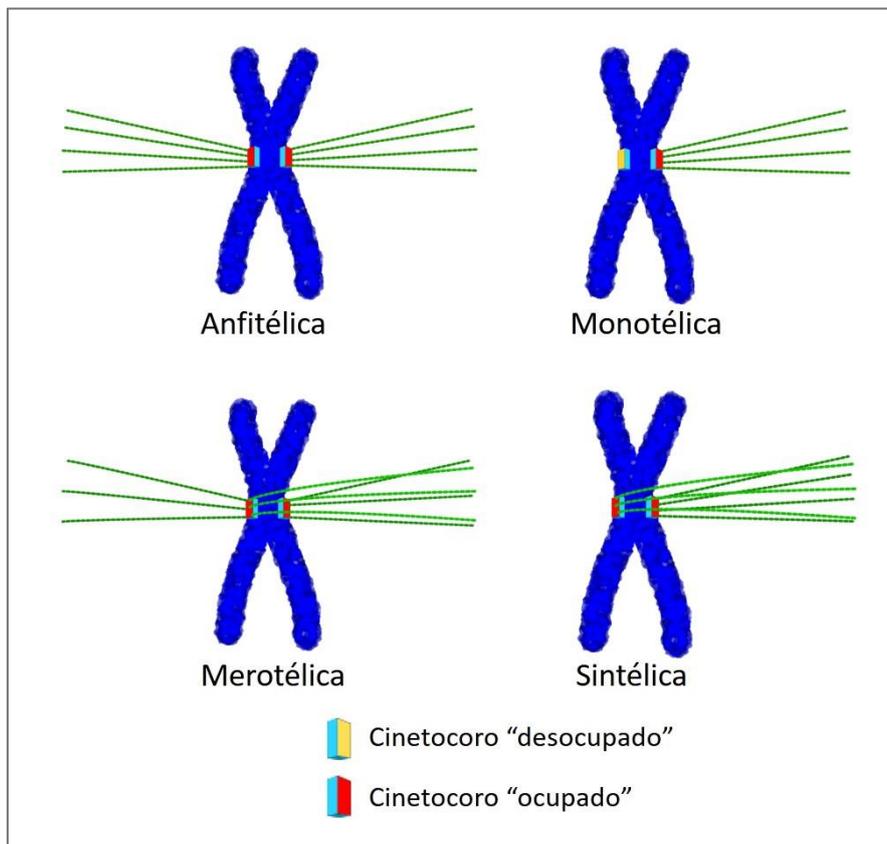
*Figura 1. Aspecto de la cromatina (azul) y los microtúbulos (verde) durante las fases de la mitosis. A) Profase, B-D) Prometáfase, E) Metafase, F) Anafase temprana; G) Anafase tardía; H) Telofase. Tomado de [1].*

Durante la fase S (síntesis) del ciclo celular eucarionte, el DNA de cada cromosoma es duplicado y ambas copias resultantes se mantienen unidas por las cohesinas, complejos formados por un tetrámero que consiste de dos proteínas SMC (Structural Maintenance of Chromosomes) denominadas SMC1 y SMC3, y por las proteínas SCC1 y SCC3 [2]. En esta fase también se duplican los centrosomas, organelos que dirigen la polimerización

de microtúbulos. Durante la fase G1 se presenta solo un centrosoma, después de la fase S los centrosomas duplicados se mantienen unidos hasta la mitosis [3]. Después de la culminación de la síntesis en la fase S, la célula inicia la fase G2 en la que se prepara para la segregación cromosómica que se lleva a cabo durante la mitosis.

La mitosis, del griego “mitos” = hilos, es un proceso en el que los cromosomas duplicados se separan de manera equitativa hacia dos núcleos hijos que heredan la misma información genética. Para lograr este objetivo se presentan cambios importantes en la célula a nivel nuclear y citoplásmico (**Figura 1**). La mitosis se inicia con la condensación de la cromatina formando cromosomas mitóticos, mientras que en el citoplasma los dos centrosomas formados durante la fase S comienzan a separarse mediante la polimerización de microtúbulos entre ambos y la participación de proteínas motoras como la cinesina Eg5. A este punto de la mitosis se le ha definido como la **profase**. En células con una mitosis “abierta”, el inicio de la **prometafase** se presenta cuando la envoltura nuclear se disgrega en pequeñas vacuolas y desaparece el compartimento nuclear. Los centrosomas continúan separándose hacia polos opuestos y a partir de ellos se polimerizan microtúbulos que se extienden hacia la corteza celular y hacia el centro de la célula dando origen al **huso mitótico**. En la región centromérica de los cromosomas se ensambla un enorme complejo proteico conocido como **cinetocoro**. Algunos de los microtúbulos que crecen a partir de los centrosomas se unen al cinetocoro de los cromosomas. En este momento cada cromosoma consta de dos copias denominadas cromátidas hermanas. Los cinetocoros de las cromátidas hermanas se unen a microtúbulos de polos opuestos y la tensión que éstos generan sobre los cromosomas provoca que se alineen en la mitad o ecuador de la célula, en este punto la célula se encuentra en **metafase**. Una vez que todos los cinetocoros se encuentran unidos a microtúbulos del huso, las cromátidas hermanas se separan debido a la degradación de las cohesinas durante la **anafase**. La separación de las cromátidas (que en este punto se denominan cromosomas) está mediada por la acción de proteínas motoras y la despolimerización de microtúbulos de los polos en lo que se denomina **anafase A**, mientras que los polos mismos se separan entre sí aumentando la distancia entre los cromosomas (**anafase B**). Mientras los cromosomas viajan hacia polos opuestos, en la región donde se encontraban alineados los cromosomas, un grupo de microtúbulos

antiparalelos estructuran el **huso central**, una estructura que define la región en dónde se llevará a cabo la división del citoplasma. Finalmente, una vez que los cromosomas se agrupan en polos opuestos, éstos se descondensan y se reestructura la envoltura nuclear alrededor de ellos dando origen a dos núcleos. Generalmente, la división mitótica se acopla a una división citoplásmica conocida como **citocinesis** en la que el citoesqueleto de actina forma un anillo contráctil en el sitio definido por el huso central, constriñendo ésta región hasta separar completamente a la célula en un proceso conocido como **abscisión** [4].



*Figura 2. Diferentes uniones de las cromátidas al huso mitótico. Las uniones de microtúbulos al cinetocoro se pueden clasificar en: anfitélicas (los cinetocoros de ambas cromátidas unidos solo a polos opuesto); monotélicas (sólo el cinetocoro de una cromátida se une a microtúbulos del huso); merotélicas (ambos cinetocoros se unen a polos opuestos, pero alguno de ellos se une a ambos polos); sintélica (Ambos cinetocoros se unen a un solo polo).*

Durante una mitosis normal, las cromátidas hermanas se unen a microtúbulos de polos opuestos formando un huso bipolar. A esta unión se le denomina **anfitélica**. Sin embargo, también se pueden presentar uniones entre las cromátidas y el huso que pueden ocasionar errores durante la segregación cromosómica. En una unión

**monotélica**, solo una cromátida se encuentra unida a un polo del huso, mientras que en una unión **sintélica**, ambas cromátidas se unen al mismo polo. Una de las uniones más comunes en células cancerosas que poseen inestabilidad cromosómica es la **merotélica**, en la cual el cinetocoro de una cromátida se une a ambos polos del huso (**Figura 2**) [5].

### **La actividad de la cinasa CDK1 regula los principales procesos mitóticos.**

El ciclo celular eucarionte se regula por la actividad de las cinasas dependientes de CICLINAS (**CDKs**). Estas cinasas fosforilan proteínas importantes para la transición entre distintas fases del ciclo celular. Su actividad depende de la unión de proteínas conocidas como CICLINAS llamadas así debido a la variación de sus niveles durante el ciclo celular. Ciertas CDKs se unen a distintas CICLINAS en fases específicas del ciclo celular. De manera particular, la mitosis se inicia por la actividad de la CDK1 unida a la CICLINA B. La actividad de éste complejo depende de varios factores:

- La formación del complejo entre ambas proteínas. La expresión de la CICLINA B aumenta hacia la fase G2, lo que regula temporalmente la formación del complejo CDK1-CICLINA B.
- La activación mediada por la cinasa CAK (*CDK activating kinase*).
- Su localización celular. CDK1 se encuentra continuamente exportada del núcleo al citoplasma. Al inicio de la mitosis el complejo CDK1-CICLINA B se acumula en el núcleo en dónde se encuentran proteínas blanco que requieren ser fosforiladas para llevar a cabo la mitosis.
- La eliminación de una fosforilación inhibitoria. La cinasa Wee1 fosforila al complejo CDK1-CICLINA B inhibiendo su actividad. La actividad de la fosfatasa CDC25 es necesaria para que CDK1-CICLINA B puedan realizar su función de cinasa.

El complejo CDK1-CICLINA B fosforila a una gran cantidad de sustratos que participan en procesos necesarios para llevar a cabo la mitosis, entre ellos se encuentran:

La desaparición de la envoltura nuclear. CDK1 fosforila a nucleoporinas tales como NUP98 permitiendo la desaparición de los poros nucleares. Las laminas son filamentos intermedios que se encuentran formando una red subyacente a la membrana interna

del núcleo, la fosforilación de las mismas por parte de CDK1 promueve su despolimerización y la desaparición de la envoltura nuclear [6].

La reorganización de los organelos. Los diferentes organelos membranosos de la células sufren cambios durante la mitosis que permiten su segregación hacia las células hijas. Por ejemplo, la fosforilación de la proteína DRP1 en la mitocondria aumenta los eventos de fisión que son necesarios para su segregación en mitosis. Por otra parte, CDK1 participa en la reorganización del Retículo Endoplásmico y el Aparato de Golgi durante mitosis [7].

Aunque no se conocen todos los blancos del complejo CDK1-CICLINA B, se sabe que su actividad es necesaria para que se lleven a cabo diversos procesos en mitosis, entre ellos: la separación de los centrosomas para formar un huso bipolar; el cambio en la dinámica de polimerización de microtúbulos que participan en la formación del huso mitótico, la condensación de cromosomas, la formación del cinetocoro sobre la región centromérica de las cromátidas hermanas; entre otras [8].

### **El papel de la cinasa PLK1**

Aunque la actividad del complejo CDK1-CICLINA B es fundamental para el inicio de la mitosis, no es la única cinasa necesaria para activar los diferentes procesos que se llevan a cabo en la mitosis, la cinasa PLK1 es otra proteína fundamental durante la mitosis. PLK1 pertenece a una familia de cinasas de serina y treonina conocidas como Polo like kinases. La actividad de esta cinasa depende de manera importante de su localización. En la región carboxilo-terminal, PLK1 posee un dominio de unión a fosfopeptidos conocido como PBD (Polo-box domain), este dominio le permite interactuar con proteínas fosforiladas y situarse en diferentes regiones celulares durante la mitosis. De acuerdo a su localización, las funciones descritas de la PLK1 son:

- Centrosomas. PLK1 se encuentra asociada a los centrosomas desde el inicio de la mitosis, cuando se inhibe su actividad se forman husos mitóticos monopolares y las células se arrestan en prometáfase. PLK1 es necesaria para la maduración del centrosoma, un proceso en el que el centrosoma genera la nucleación de microtúbulos a través de la formación de complejos de  $\gamma$ -tubulina. Se han

propuesto diversos mecanismos por los cuales PLK1 podría participar en la maduración del centrosoma: mediante la fosforilación de la proteína Nlp1 lo que promueve su disociación del centrosoma y favorece la nucleación de microtúbulos; a través de la fosforilación de la proteína kizuna que mantiene la estructura del centrosoma; al fosforilar a la proteína Asp, la cual se asocia a al extremo “menos” de los microtúbulos. En los centrosomas, PLK1 fosforila a la proteína Emi, y al complejo APC/C (Anaphase Promoting Complex – Cyclosome). Emi es un inhibidor de APC/C y su fosforilación la marca para degradación, mientras que la fosforilación de APC/C por PLK1 activa su función. Ambos fenómenos favorecen la actividad de APC/C. La función de PLK1 en centrosoma se encuentra contrarrestada por la actividad de la fosfatasa PP1C.

- **Cinetocoro.** En el cinetocoro, PLK1 se une a proteínas que han sido previamente fosforiladas por CDK1, tales como BUB1 e INCENP, aunque el reclutamiento de PLK1 también depende de la proteína PBIP1. La función más conocida de PLK1 en el cinetocoro es la activación de BubR1, esta proteína es fundamental en un mecanismo conocido como Punto de Monitoreo Mitótico (PMM), sin embargo, la fosforilación mediada por PLK1 es importante en otra función de BubR1: el establecimiento de la unión entre los microtúbulos del huso mitótico y el cinetocoro. Esta puede ser la razón por la que la inhibición de PLK1 provoca un arresto mitótico, ya que la falta de unión de los microtúbulos al cinetocoro generan una “pausa” en la mitosis que permite la corrección de dicha unión. Se ha propuesto que la fosforilación de PLK1 en BubR1 es la causante de la aparición del fosfoepítipo 3F3/2, el cual es reconocido por un anticuerpo específico durante mitosis y se ha asociado a la falta de tensión. Aunque este epítipo ha sido descrito desde hace varios años, no se ha podido definir exactamente la identidad de la proteína o proteínas a las que pertenece.
- **Huso central.** PLK1 se asocia al huso central a través de la interacción con la proteína Prc1, la cual es fosforilada por la misma PLK1 generando una retroalimentación positiva. PLK1 es fundamental en la formación del surco de división durante la citocinesis. En la región sobre la corteza celular donde se formó el huso central, se organiza un anillo contráctil mediante la polimerización de actina y la actividad de la miosina II. Este anillo constriñe la membrana celular

hasta que separa a las dos células hijas en un proceso conocido como abscisión. La formación del anillo contráctil está regulada por la actividad de RHOA una GTPasa que favorece la polimerización de actina. RHOA es activada en la región de la corteza celular que se encuentra adyacente al huso central a través de la proteína ECT2 una proteína GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor). PLK1 es necesaria para que ECT2 se localice correctamente en el huso central y active a RHOA. ECT2 es fosforilada también por CDK1, aunque en este caso la fosforilación evita la unión de ECT2 en el huso central, de esta manera se asegura que la citocinesis se inicie hasta que la actividad de CDK1 disminuya justo en la anafase [9].

### **El complejo pasajero cromosómico (CPC) regula aspectos clave de la mitosis.**

La tercer cinasa fundamental para la mitosis es AURORA B. Esta proteína es miembro de una familia de cinasas que se encuentra conservada desde levaduras hasta metazoarios. La actividad de AURORA B depende del complejo que forma con las proteínas INCENP, SURVIVINA y BOREALINA. Este complejo es conocido como el Complejo Pasajero Cromosómico. El descubrimiento de la proteína INCENP, la cual cambia de ubicación durante la mitosis, llevó a la propuesta de que la regulación de diferentes procesos mitóticos estaba mediada por el cambio de ubicación de las proteínas involucradas en dichos mecanismos. Una vez que se demostró que INCENP participaba en un complejo junto a otras proteínas, se denominó a este complejo “pasajero cromosómico” (**Figura 3**).

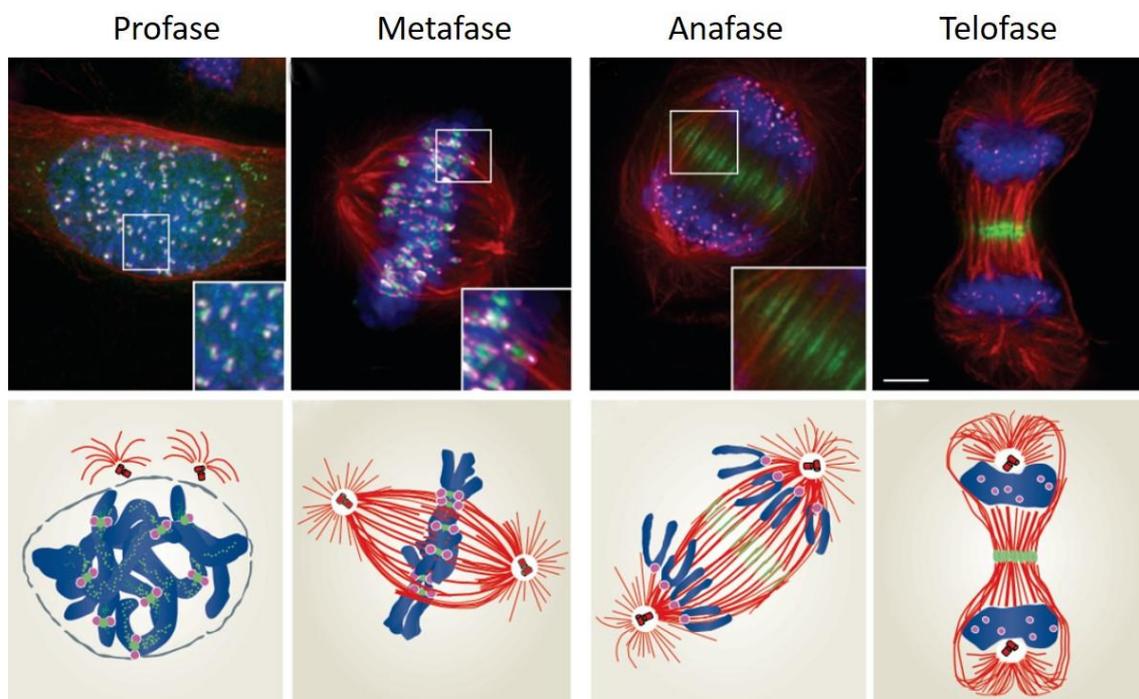
AURORA B es una cinasa de serinas y treoninas cuya actividad depende de las proteínas del CPC. Por una parte, INCENP favorece la actividad cinasa de AURORA B lo que conlleva a una fosforilación en el llamado “T-loop” en la misma AURORA B que permite la activación completa del dominio de cinasa en una retroalimentación positiva. Por otra parte, las proteínas SURVIVINA y BOREALINA son las responsables de localizar al complejo en distintas estructuras durante la mitosis. La actividad de AURORA B se encuentra contrarrestada por las fosfatasas PP1 y PP2.

AURORA B se encuentra asociada a las regiones pericentroméricas desde la fase G2 mediante la interacción entre INCENP y la proteína de heterocromatina HP1. La

inhibición de AURORA B durante esta fase afecta la segregación cromosómica, por lo que se cree que la unión a esta región es importante desde interfase para la actividad del CPC en mitosis. Al inicio de la mitosis, el CPC se localiza transitoriamente en todo el cromosoma, en este momento AURORA B fosforila a la histona H3 en la serina 10 y la serina 28 (H3S10p y H3S28p). Ambas fosforilaciones se han asociado a la condensación cromosómica ya que coinciden temporalmente con la compactación de la cromatina en la formación del cromosoma mitótico. Sin embargo, diversos estudios han puesto en duda el papel de estas marcas en la condensación cromosómica. Las mutaciones en las serinas 10 y 28 de H3 en levaduras no afectan la condensación de los cromosomas [10]. Además, la inhibición de AURORA B no altera la condensación de manera evidente [11, 12]. Un estudio reciente ha propuesto un modelo que concilia ambas posturas. La H3S10p inicia una cascada de marcas de histona que promueven la compactación del cromosoma. Esta marca es necesaria para el reclutamiento de una desacetilasa de histonas que desacetila la lisina 16 en la histona H4, este cambio permite que la región N-terminal de H4 haga contacto con la interfaz del dímero H2A y H2B, de esta manera se promueve la compactación [13]. Se ha propuesto un modelo en el que la formación del cromosoma mitótico requiere de dos procesos: el acortamiento axial, que dependen principalmente de la acción de las condensinas; y la compactación local que esta mediada por marcas de histona tales como H3S10p [14]. Por otra parte, la marca H3S10p participa en un mecanismo denominado *fosfo/metil switch*. La proteína HP1 se une a la histona H3 trimetilada en la lisina 9 (H3K9me3) en los brazos de los cromosomas durante interfase, la marca H3S10p provoca que la proteína HP1 se desplace de la lisina contigua durante mitosis por lo que esta proteína se encuentra disociada de los brazos de los cromosomas durante la segregación cromosómica [15].

Hacia la profase y prometafase, el CPC se encuentra enriquecido en el centrómero interno. Esta localización depende de dos marcas de histonas, la fosforilación de la treonina 3 de la histona H3 (H3T3p) y la fosforilación de la histona H2A en la serina 120 (H2AS120p). La cinasa Haspina genera la H3T3p a lo largo de los cromosomas en la región en donde se encuentran unidas las cromátidas hermanas. Por otra parte, la cinasa BUB1 fosforila a la H2A en la serina 120, las proteínas Sgo1 y Sgo2 son reclutadas hacia esta marca y a su vez interaccionan con BOREALINA, promoviendo el reclutamiento del

CPC mediante dos mecanismos. Se ha propuesto que el CPC puede participar en el reclutamiento del complejo condensina I, sin embargo, el papel más conocido para este complejo es el de regular la unión entre los microtúbulos y el cinetocoro. Los microtúbulos del huso se unen al cinetocoro a través de la red KMN que consta de los complejos: KNL1, MIS12 y NDC80. La fosforilación de NDC80 por parte de AURORA B disminuye la afinidad de este complejo por la tubulina, de esta manera el CPC desestabiliza la unión de los microtúbulos al cinetocoro. La participación del CPC es fundamental para la formación correcta de uniones entre el cinetocoro y los microtúbulos. Se ha propuesto que el CPC monitorea la tensión que se genera en el cinetocoro cuando éste se une a los microtúbulos. La tensión se genera cuando las cromátidas se unen a polos opuestos y son jaladas por los microtúbulos hacia el polo respectivo. No todas las uniones cinetocoro-microtúbulos generan dicha tensión, por ejemplo, las uniones sintéticas y merotéticas no permiten que los microtúbulos se organicen de manera correcta para ejercer fuerza sobre el cromosoma, de esta manera el CPC debilita este tipo de uniones y reinicia el proceso de búsqueda y captura de los cinetocoros por parte de los microtúbulos.



*Figura 3. Localización de AURORA B durante la mitosis. Inmunofluorescencia contra AURORA B (en verde), en dónde se observa su localización en el centrómero (profase y metafase), huso central (anafase) y cuerpo medio (telofase) Tomado de [16].*

Una vez que las cromátidas hermanas se separan y comienzan a viajar hacia polos opuestos en la anafase, el CPC se relocaliza al huso central. La desfosforilación de la H3T3p y la ubiquitinación de AURORA B permiten que el CPC se separe de los cromosomas. Por otra parte, AURORA B e INCENP interaccionan con la cinesina Mklp2 que se encuentra asociada a los microtúbulos del huso central, de esta manera el CPC se localiza en esta estructura. Una de las funciones del CPC durante anafase es la estabilización del huso central. El complejo centalespindilina se une a los microtúbulos del huso central y lo estabiliza. AURORA B fosforila a una de las subunidades de la centalespindilina aumentando su capacidad para unirse a microtúbulos y generar grupos de éstos en el huso central.

Finalmente, durante la citocinesis, un anillo contráctil de actina y miosina permiten la constricción de la célula al final de la mitosis. La fosforilación de la centalespindilina, mediada por AURORA B, promueve su localización en el huso central, ésta a su vez, recluta a la proteína ECT2. Como se mencionó anteriormente, la proteína ECT2 activa a la GTPasa RHOA y permite la formación del anillo contráctil durante la citocinesis [17].

### **No solo una pasajera: SURVIVINA inhibe la muerte celular.**

La SURVIVINA es una proteína que pertenece a la familia de las IAPs (*Inhibitor of Apoptosis*) un grupo de proteínas que, como su nombre lo indica, se han asociado a la inhibición de la muerte celular. Las IAPs se caracterizan por poseer al menos un dominio BIR (*Baculovirus IAP Repeat*), y en el extremo carboxilo-terminal un dominio RING, el cual funciona como una enzima ubiquitin-ligasa E3. La SURVIVINA solo posee un dominio BIR y su región carboxilo-terminal no posee un dominio RING, sino que está formada por una hélice alfa. A partir del gen que codifica para la proteína SURVIVINA, se pueden originar diferentes isoformas mediante splicing alternativo, entre ellas se encuentran la survivina  $\Delta$ Ex3, SURVIVINA 2B, SURVIVINA 2 $\alpha$ , SURVIVINA 3 $\alpha$  y SURVIVINA 3B. Algunas de estas proteínas actúan de manera similar a la SURVIVINA, mientras que otras, al parecer, la antagonizan.

En una gran cantidad de tumores humanos se ha descrito un aumento en los niveles de la SURVIVINA, lo que se ha asociado a marcadores clínicos negativos tales como una

menor supervivencia libre de enfermedad, mayor recurrencia y menor supervivencia global. Estos estudios se han realizado en pacientes con cánceres colo-rectales, de vejiga, melanoma, de pulmón, de mama, entre otros.

Aunque se sabe que la SURVIVINA inhibe la muerte celular, el mecanismo por el cual lleva a cabo este efecto no está completamente dilucidado. Un aspecto importante para la actividad de SURVIVINA es su localización intracelular. Se ha observado que la SURVIVINA se puede encontrar en el núcleo de la célula o en el citoplasma, en donde se puede localizar de manera específica en la mitocondria. La localización mitocondrial es clave para su función antiapoptótica al inhibir la función de la proteína AIF. Al liberarse de la mitocondria AIF se moviliza al núcleo en donde participa en la reorganización de la cromatina para su condensación y la degradación del DNA [18]. La función de las IAPs puede ser bloqueada por la proteína SMAC/DIABLO, SURVIVINA es capaz de inhibir a SMAC/DIABLO permitiendo la actividad de las IAPs, tales como XIAP. Además, SURVIVINA puede formar dímeros con XIAP aumentando su estabilidad y capacidad para inhibir caspasas. El dímero de SURVIVINA y XIAP aumenta la actividad del factor NFκB y en consecuencia favorece la expresión de genes relacionados con la invasión celular, la migración y la capacidad metastásica. Por otra parte, se ha observado que la SURVIVINA se expresa en células endoteliales durante la angiogénesis probablemente favoreciendo la supervivencia de estas células durante el proceso de formación de vasos sanguíneos.

Por lo tanto, la SURVIVINA es una proteína fundamental para la mitosis como parte del CPC, pero también lleva a cabo funciones importantes en la biología de las células tumorales que les permite la supervivencia y la adquisición de características malignas [19-21].

### **La transición de Metafase hacia Anafase es un proceso irreversible controlado por el complejo APC/C.**

La metafase se ha descrito como la fase en la que las cromátidas se alinean en el ecuador antes de su separación y movimiento hacia los polos. Durante la prometafase los microtúbulos que se polimerizan a partir de los centrosomas se acercan a la región donde se encontraba el núcleo y en donde la cromatina se condensa formando a los cromosomas. En un mecanismo denominado de “búsqueda y captura” algunos

microtúbulos hacen contacto con los cinetocoros que se han formado en la profase y prometafase sobre la región centromérica [22]. Una vez que todos los cromosomas se unen a microtúbulos del huso se inicia la anafase, las cohesinas que mantienen unidas a las cromátidas hermanas en el centrómero son escindidas por la acción de la SEPARASA. Los cromosomas viajan hacia polos opuestos, mientras que la actividad del complejo CDK1-CICLINA B comienza a disminuir permitiendo la descondensación de los cromosomas en la telofase, la reaparición de la envoltura nuclear y el progreso de la citocinesis. La transición hacia la anafase es irreversible debido a que consiste en la degradación de ciertas proteínas, entre ellas la Securina y la CICLINA B. La Securina se encuentra unida a la SEPARASA e inhibe su actividad, una vez que la Securina es degradada la SEPARASA puede escindir a las cohesinas y permitir la separación de las cromátidas. Por otra parte, la degradación de la CICLINA B inactiva la función de CDK1, lo que permite que la actividad de fosfatasa elimine los grupos fosfato de los blancos del complejo CDK1-CICLINA B.

La degradación de Securina y CICLINA B esta mediada por su ubiquitinación. El complejo APC/C ubiquitina a ambas proteínas (entre muchas otras) en metafase y permite el inicio de la anafase. APC/C es un enorme complejo compuesto por al menos doce proteínas, que funciona como una enzima E3 ubiquitin ligasa. Durante la ubiquitinación, la enzima E1 (activadora) une la ubiquitina a la enzima E2 (conjugadora) que trasfiere la ubiquitina a la proteína blanco. Sin embargo, para llevar a cabo el último paso se requiere a una enzima E3 (ligasa) que une al sustrato con la enzima E2 y determina la especificidad de la ubiquitinación [23].

La función de APC/C depende de dos cofactores que se unen temporalmente al complejo: CDH1 y CDC20. El inicio de la anafase está regulado por la actividad de APC/C unido a CDC20, que ubiquitina a Securina y CICLINA B. Durante la anafase y telofase, CDC20 mismo es ubiquitinado y degradado por APC/C y el cofactor predominante comienza a ser CDH1, el cual será el principal cofactor de APC/C durante interfase. Aunque no se conoce exactamente el mecanismo por el cual APC/C reconoce a sus sustratos de manera diferencial durante el ciclo celular, se sabe que CDC20 y CDH1 son fundamentales para lograr la ubiquitinación de los mismos (**Figura 4**). Se han descrito dos secuencias que se presentan en algunas proteínas ubiquitinadas por APC/C: el D-

Box que consiste en la secuencia RXXL y el KEN-box que, como su nombre lo indica, consta de la secuencia KEN. Las proteínas que poseen la secuencia D-Box son reconocidas por APC/C unido a CDC20, mientras que APC/C-CDH1 puede reconocer tanto la secuencia D-Box como la secuencia KEN-box [24].

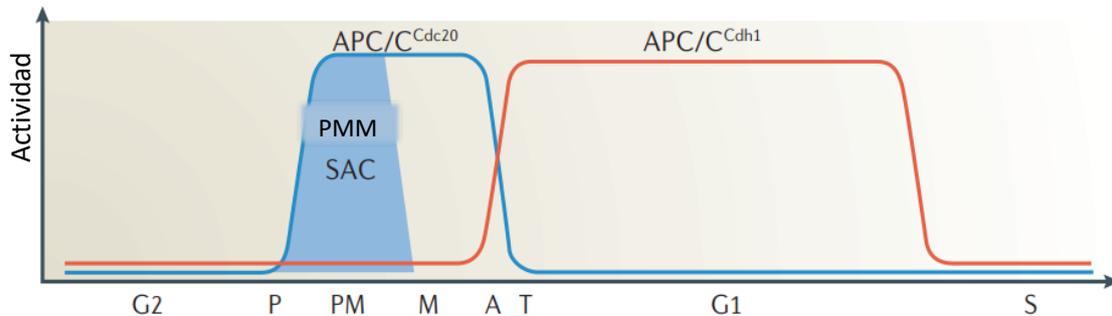


Figura 4. Actividad de APC/C durante el ciclo celular. Esquema de la actividad de APC/C unido a su cofactor CDC20 durante mitosis y APC/C unido a CDH1 durante interfase. En Profase y Prometafase, el Punto de Monitoreo Mitótico (PMM) inhibe a APC/C-CDC20 hasta que este mecanismo se inactiva justo antes del inicio de anafase. P (Profase); PM (Prometafase); M (Metafase); A (Anafase); T (Telofase) Tomado de [23].

Además de Securina y CICLINA B, APC/C ubiquitina a una gran cantidad de proteínas mediando su degradación. En algunos casos, la degradación de ciertas proteínas es importante para llevar a cabo ciertos procesos mitóticos, tal es el caso de la degradación de CICLINA B para la descondensación de los cromosomas. Sin embargo, la importancia de la degradación de todas las proteínas ubiquitinadas por APC/C no está definida, y posiblemente la función principal sea regular los niveles de las mismas durante interfase.

### **El Punto de Monitoreo Mitótico evita defectos durante la segregación cromosómica al inhibir a APC/C**

Aunque la metafase es un período en el que no existen cambios evidentes en estructuras mitóticas, es una fase fundamental para la regulación de la segregación cromosómica en la que hay una intensa actividad bioquímica en el cinetocoro. La segregación de un juego completo de cromosomas hacia las células hijas depende de que las cromátidas logren llevar a cabo una unión anfitélica, es decir que cada una de las cromátidas

hermanas se una, mediante el cinetocoro, a microtúbulos de polos opuestos. Por lo tanto, es fundamental asegurar que todos los cinetocoros de las distintas cromátidas se encuentren unidos a microtúbulos antes de iniciar la anafase. El mecanismo que asegura dicha unión es conocido como Punto de Monitoreo Mitótico (PMM).

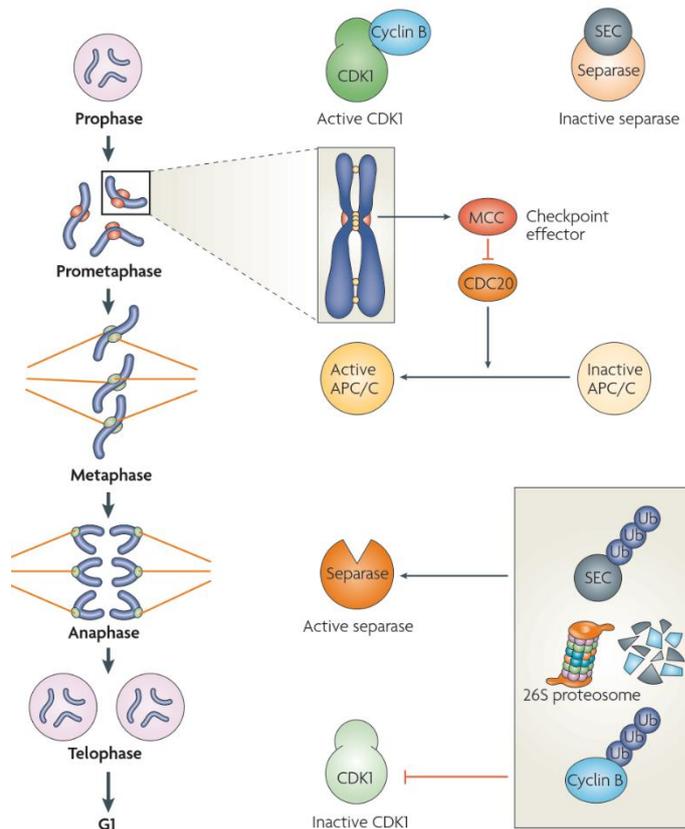


Figura 5. El Punto de Monitoreo Mitótico (PMM). El PMM evita la activación del complejo APC/C y por ende, el inicio de la anafase hasta que todos los cinetocoros se unen a microtúbulos. La inhibición de APC/C esta mediada por el Complejo del Punto de Monitoreo Mitótico (MCC). Tomado de [25].

El PMM evita la activación de APC/C hasta que todos los cinetocoros de las cromátidas se encuentren unidos a microtúbulos del huso (**Figura 5**). En este mecanismo participan una gran cantidad de proteínas, entre las que se encuentran BUB1, BUB3 y BUBR1 (*Budding uninhibited by benzimidazoles*), MAD1 y MAD2 (Mitotic Arrest Deficient), MPS1, ROD, ZWILCH, ZW10, entre otras. La mayoría de estas proteínas se localiza en los cinetocoros desde la prometafase. Existe cierta dependencia en la unión de las proteínas del PMM, por ejemplo, la unión de BUB1 es necesaria para la localización posterior de

MAD1 y MAD2 al cinetocoro. MAD2 es una proteína fundamental en la actividad del PMM. Se han descrito dos conformaciones alternativas de MAD2, denominadas abierta (MAD2-A) y cerrada (MAD2-C). De acuerdo a un modelo propuesto a partir de los datos de conformación de MAD2, MAD1 se une a los cinetocoros que no han sido “ocupados” por microtúbulos y recluta a MAD2, modificando su conformación de MAD2-A hacia MAD2-C. Esta molécula de MAD2-C sirve como templado para que otras moléculas citoplásmicas de MAD2-A se unan, cambien de conformación y se unan a CDC20. Finalmente, el dímero soluble (no unido al cinetocoro) de MAD2-C y CDC20 sirven como “semilla” para conformar al Complejo del Punto de Monitoreo Mitótico (MCC por sus siglas en inglés) [25].

El MCC está compuesto por MAD2, CDC20, BUBR1 y BUB3. MAD2 es un inhibidor de CDC20, no obstante, BUBR1 es un inhibidor más eficiente, por lo que se propone que la función fundamental de MAD2 es iniciar la formación del MCC. No se conoce la manera exacta mediante la cual el MCC inhibe a APC/C cuando se activa el PMM, es posible que lo haga al “secuestrar” a CDC20 e impedir su unión a APC/C o al servir como un pseudosustrato [26].

#### **La cinasa BUB1 participa en funciones independientes a la segregación cromosómica.**

BUB1 es una de las proteínas que participan en el PMM. Su incorporación al cinetocoro es necesaria para el reclutamiento de las proteínas efectoras MAD1 y MAD2. Mediante su actividad de cinasa fosforila a la histona H2A en el residuo 120 (H2A120p). La fosforilación H2A120p permite la unión de la SHUGOSHINA, una proteína que protege a las cohesinas en el centrómero de su remoción durante la profase [27]. Esta marca también es necesaria para el reclutamiento del CPC [21, 25]. Además, BUB1 fosforila a CDC20 y permite su inhibición [25]. Finalmente, BUB1 es ubiquitinada por el complejo APC/C y se degrada hacia el final de la mitosis [28].

Además de sus funciones durante la segregación cromosómica, se ha asociado a BUB1 con otros procesos celulares. Niikura y colaboradores han propuesto un tipo de muerte celular llamada Muerte Mitótica Independiente de CASPASAS (CIMD por sus siglas en inglés). Este tipo de muerte se presenta cuando las células son tratadas con agentes que afectan el huso mitótico y los niveles de BUB1 disminuyen. La muerte se presenta en

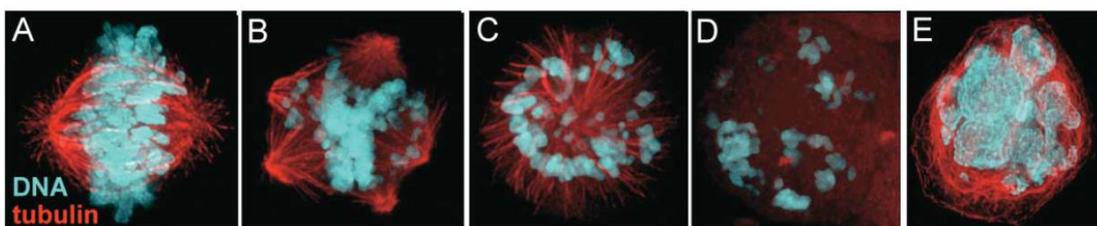
mitosis y la inhibición de caspasas no afecta su progresión. Según el mecanismo propuesto, BUB1 inhibe este tipo de muerte al secuestrar a BUB3. Cuando los niveles de BUB1 son bajos, BUB3 se libera y activa a la proteína p73, la cual inicia la CIMD [29, 30]. Por otra parte, recientemente se ha descrito que BUB1 participa en la Respuesta al Daño al DNA (DDR por sus siglas en inglés). En respuesta al rompimiento de doble cadena del DNA, BUB1 es reclutado a los sitios de daño y es fosforilado por la cinasa ATM. En estos sitios BUB1 fosforila a la histona H2A en el residuo 120. A pesar de que no se conoce el papel específico que lleva a cabo BUB1 frente al daño al DNA, la inhibición de esta proteína promueve que el daño se mantenga y afecta la reparación por Unión de Extremos no Homólogos (NHEJ por sus siglas en inglés) [31, 32]. Adicionalmente, BUB1 ha sido asociada a la señalización mediada por TGF-BETA [33].

#### **La activación continua del PMM es una estrategia terapéutica contra el cáncer.**

Algunos fármacos usados en la quimioterapia contra el cáncer tienen como blanco molecular a los microtúbulos. El paclitaxel y sus derivados (llamados taxanos en conjunto) son un grupo de compuestos que se unen a la  $\beta$ -tubulina preferencialmente en microtúbulos polimerizados. La unión del paclitaxel a los microtúbulos estabiliza a los mismos afectando la unión de éstos con los cinetocoros y provocando un arresto en mitosis mediado por el PMM. Otros fármacos, tales como la vinblastina y otros alcaloides de la vinca, se unen a los extremos de los microtúbulos promoviendo su despolimerización. De esta manera, los cinetocoros de los cromosomas no se unen a microtúbulos, se activa el PMM y de manera similar a los taxanos provocan una detención en mitosis (**Figura 6**) [34]. Debido a que estos compuestos interfieren con la división celular, tienen como blanco a las células cancerosas. Sin embargo, también generan una toxicidad en las células del cuerpo que proliferan continuamente.

No obstante las diferencias entre los compuestos mencionados, todos promueven un arresto en mitosis que puede tener diferentes consecuencias: las células pueden morir en mitosis después de mantenerse detenidas en esta fase, algunas células pueden liberarse del arresto y sobrevivir y otras pueden liberarse del arresto y morir en la siguiente fase G1 [35, 36]. La liberación del arresto depende de la degradación gradual de la CICLINA B. A pesar de que la activación prolongada del PMM mantiene inactivo al

APC/C, existe una actividad basal del complejo que favorece la degradación del CICLINA B [37]. Si el APC/C se inhibe completamente (al eliminar al cofactor CDC20) la degradación de la CICLINA B se inhibe completamente y todas las células mueren en mitosis [38]. Debido a la heterogeneidad en las consecuencias de una mitosis prolongada, se han realizado estudios que analizan de manera individual el destino de las células después de una mitosis prolongada. En estos estudios se ha demostrado que existen diferencias entre distintas líneas celulares y dentro de una misma línea ante la respuesta a diferentes fármacos. No obstante, algunas líneas presentan características más homogéneas en la respuesta a ciertos fármacos [39, 40]. A partir de estos datos, se ha propuesto un modelo en el que se busca explicar la heterogeneidad en la respuesta a los fármacos, en este sentido, la liberación o muerte celular se presentaría de acuerdo a dos factores: la velocidad con la que se degrada la CICLINA B (que determina la liberación del arresto) y la acumulación de factores de muerte (que determinaría el inicio de la muerte celular) (**Figura 7**).



*Figura 6. Morfología de células tratadas con agentes que alteran el huso mitótico. A) Mitosis normal. B) Célula tratada con paclitaxel. Se observa la formación de husos multipolares y se mantiene la polimerización de microtúbulos. C) Célula tratada con un inhibidor de la cinesina Eg5, la cual promueve la separación de centrosomas. La célula forma un huso monopolar. D) Célula tratada con vinblastina. No se observa la polimerización de microtúbulos. E) Morfología de una célula que se liberó de una detención prolongada en mitosis. Estas células no llevan a cabo la citocinesis y presentan múltiples núcleos.*

Se han descrito diversos factores que pueden promover la muerte celular después de una mitosis prolongada. Sin embargo, el factor más determinante en la regulación de este tipo de muerte es la proteína Mcl1 [41]. Mcl1 es una proteína antiapoptótica de la familia de Bcl2. Durante mitosis es fosforilada por CDK1 y esto promueve su degradación. La disminución de Mcl1 durante el arresto mitótico favorece la muerte celular al liberar a la proteína proapoptótica Bak [42, 43].

Otro aspecto importante de este fenómeno es el estudio de las células que sobreviven al arresto. Se sabe que dichas células no llevan a cabo la citocinesis y se mantienen poliploides [35, 36]. Sin embargo, fármacos como el paclitaxel han demostrado mayor citotoxicidad en células que se han liberado de un arresto mitótico en comparación con compuestos que no promueven la polimerización de microtúbulos [44]. Por lo tanto, la sensibilidad a los agentes que se unen a microtúbulos no depende solamente del balance entre la degradación de CICLINA B y la degradación de Mcl1, sino también de los factores pro y antiapoptóticos presentes en las células que ya se liberaron del arresto.

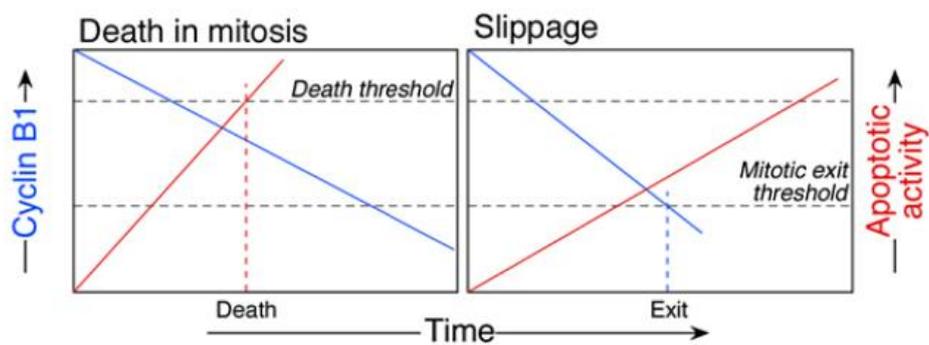


Figura 7. Modelo propuesto para explicar la muerte o supervivencia celular después de una mitosis prolongada. El destino celular dependerá del umbral que se alcance primero: la acumulación de señales de muerte antes de la liberación (izquierda) o la degradación de la CICLINA B y la liberación del arresto (slippage) (derecha) tomado de [39].

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS.**

El paclitaxel es un fármaco muy utilizado en quimioterapia. Sin embargo, no se conoce el mecanismo exacto por el cual provoca la muerte de las células tumorales y cuáles son las características de las células que sobreviven al tratamiento y que finalmente puedan repoblar el tumor. Experimentalmente, las células que son tratadas con paclitaxel activan el Punto de Monitoreo Mitótico, prolongando la mitosis hasta que la célula muere o se libera del arresto. La liberación del arresto depende de una degradación gradual de la CICLINA B que es dependiente de APC/C. Sin embargo, no se sabe si otras proteínas que son ubiquitinadas por APC/C también son degradadas gradualmente durante una mitosis prolongada.

BUB1 y SURVIVINA son blancos de APC/C, ambas participan en actividades mitóticas importantes para la segregación cromosómica. No obstante, también poseen funciones independientes en interfase asociadas a la reparación del DNA y la resistencia a la muerte celular. Es importante definir si proteínas, tales como BUB1 y SURVIVINA se acumulan aberrantemente después de un arresto mitótico o son degradadas durante el mismo debido a que su presencia en interfase puede afectar el fenotipo celular. En la quimioterapia contra el cáncer se utilizan combinaciones de fármacos. En el caso del paclitaxel, si las células que se liberan del arresto acumulan aberrantemente proteínas que regulen negativamente la muerte celular, entonces dichas células serán menos sensibles al tratamiento con otros fármacos independientemente de su mecanismo de acción.

Como hipótesis, nosotros proponemos que una mitosis prolongada tiene como consecuencia la acumulación aberrante de las proteínas BUB1 y SURVIVINA, que puede promover la resistencia a la muerte celular en las células que sobreviven a un arresto mitótico.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Líneas celulares y condiciones de cultivo

Se utilizaron las siguientes líneas celulares:

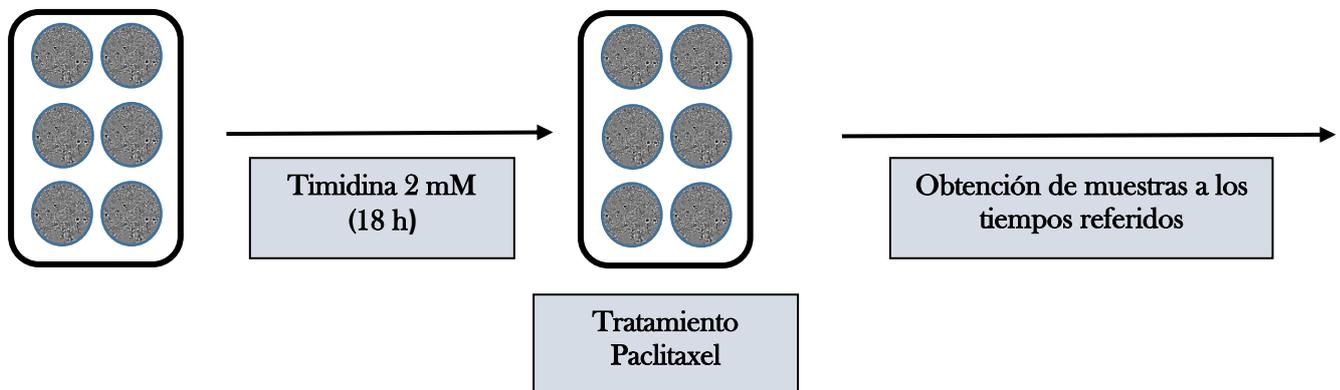
HCT116, la cual es derivada de un carcinoma colorrectal, con un número de cromosomas cercano al diploide y que presenta inestabilidad microsatelital (ATCC).

HT29. Derivada de un adenocarcinoma colorrectal con un número modal de cromosomas de 71 y una variación entre 68 y 72. HT29 presenta inestabilidad cromosómica (ATCC).

Ambas líneas celulares se cultivaron utilizando medio McCoy's 5A (GIBCO, 16600) suplementado con suero fetal bovino al 10% (GIBCO) y antibiótico-antimicótico al 1% (GIBCO) en una incubadora humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> a una temperatura de 37 °C.

### Tratamiento con Paclitaxel

Todos los experimentos se realizaron siguiendo el siguiente esquema:



- Las células fueron sincronizadas en la fase G1-S mediante el tratamiento con timidina 2 mM (Sigma) durante 18 h. (Anexo)
- Posteriormente las células fueron lavadas dos veces con PBS.
- Se adicionó Paclitaxel (Sigma, T7191) a las concentraciones señaladas en medio McCoy's 5A. (Anexo) El paclitaxel fue diluido en una solución 1:1 DMSO - PBS. A las células control se les adicionó un volumen similar de la solución DMSO - PBS.
- Se obtuvieron muestras para las diferentes técnicas en los tiempos señalados.

## **Índice Mitótico**

El índice mitótico se obtuvo de acuerdo a un protocolo publicado con anterioridad [45].

Los pasos son resumidos brevemente a continuación:

- Después del tratamiento se eliminó el medio de cultivo y se adicionó solución hipotónica HEPES-EGTA durante 30 min a 37°C. (Anexo) El volumen agregado fue el doble que se tenía de medio de cultivo.
- Las células fueron despegadas utilizando un raspador y recolectadas en tubos de 15 mL. Se adicionó 1 mL de solución fijadora (Metanol - Ácido Acético 3:1). (Anexo)
- La suspensión se centrifugó durante 5 min a 1200 rpm.
- Se eliminó el sobrenadante y las células se suspendieron en solución fijadora fría.
- La suspensión se incubó a -20°C por al menos 20 min.
- Posteriormente se realizaron dos lavados con solución fijadora.
- Finalmente, las células suspendidas en solución fijadora fueron goteadas en laminillas de vidrio (sigma) y teñidas con eosina y azul de metileno.
- Al menos 1000 células fueron contadas y se determinó el porcentaje de células mitóticas.

## **Citometría de Flujo**

El análisis del ciclo celular se realizó mediante la cuantificación del DNA teñido con yoduro de propidio (Sigma). Las células fueron evaluadas de la siguiente manera:

- En los tiempos definidos se tripsinizaron las células
- Las células suspendidas fueron centrifugadas por 5 min a 1200 rpm.
- Se eliminó el sobrenadante y las células fueron lavadas una vez con PBS.
- La fijación celular se llevó a cabo utilizando etanol frío al 70%.
- Las células fijadas fueron incubadas por al menos 12 h antes de su tinción con yoduro de propidio.
- Posteriormente, las células fueron centrifugadas durante 5 min a 1200 rpm.

- Se eliminó el sobrenadante y las células fueron lavadas una vez con PBS.
- Las células fueron teñidas con una solución de tinción con yoduro de propidio. (Anexo)
- La suspensión se incubó durante 2 h a 37°C.
- Las células fueron analizadas en un citómetro FACSCanto II (Becton Dickinson). Los dobletes y otros agregados fueron descartados utilizando una gráfica Forward A vs Forward H, tomando en cuenta solo las células que presentaban una relación directamente proporcional entre ambos parámetros. A partir de las células individuales, se definió una población que no contuviera detritos de acuerdo al tamaño y granularidad. Finalmente se determinó la cantidad de fluorescencia del yoduro de propidio en una escala lineal definiendo los picos de G1 y G2-M utilizando células asincrónicas.
- Las células muertas fueron definidas como aquellas que poseían una cantidad de DNA menor a 2n (G1), mientras que las células poliploides fueron aquellas que poseían una cantidad de DNA superior a 4n.

Para determinar el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular, se utilizó el software Modfit.

### **Western Blotting**

Para el análisis de los niveles de proteína se llevó a cabo la técnica de Western Blotting.

- Las células fueron cultivadas en cajas Petri de 10 cm de diámetro.
- Después de los diferentes tratamientos, se retiró el medio y se realizaron dos lavados con PBS. Durante éste procedimiento y la lisis celular, la caja de Petri se colocó sobre hielo.
- Se eliminó el PBS y se incubó a las células con 400 µL de amortiguador de lisis (Cell Signaling, #9803) suplementado con PMSF 100 µM durante 5 min.
- El lisado fue recolectado utilizando un raspador y colocado en un tubo de 1.5 mL.
- El lisado fue centrifugado durante 20 min a 14 000 rpm a una temperatura de 4°C.
- Se obtuvo el sobrenadante y se guardó a -70°C.

- La cuantificación de la proteína se realizó utilizando el *DC Protein Assay* (BIO-RAD, 500-0116).
- Las muestras fueron disueltas en el amortiguador Laemmli 1X y hervidas por cinco minutos antes de ser colocadas en el gel de acrilamida.
- Se utilizaron geles de acrilamida al 10% y 12% de acuerdo a las proteínas de interés. Los geles se prepararon con amortiguador de TRIS y se corrieron a 100 V.
- Posteriormente, la proteína fue transferida del gel a una membrana de PVDF utilizando una cámara húmeda.
- La membrana con la proteína transferida fue incubada en una solución de leche Svelty al 5% en TBS-tween durante 1 h.
- Se realizaron tres lavados de 10 min utilizando TBS-tween.
- Las membranas fueron incubadas con los diferentes anticuerpos en albúmina al 1% toda la noche a 4°C.
- Posteriormente, se realizaron cuatro lavados de 15 min con TBS-tween.
- Las membranas fueron incubadas durante 1 h con el anticuerpo secundario acoplado a HRP y disuelto en leche Svelty al 5% con TBS-tween.
- El exceso de anticuerpo secundario fue eliminado mediante cuatro lavados de 15 min con TBS-tween.
- Las membranas fueron incubadas con luminol y peróxido (Millipore, WBKLS0500) y reveladas utilizando placas para autoradiografía.
- Los anticuerpos utilizados fueron: anti-BUB1 (1 : 400; NBP1-88518, Novus), anti-SURVIVIN (1 : 500; sc-17779, Santa Cruz), anti-MAD2 (sc-47747, Santa Cruz), anti-GAPDH (sc-25778, Santa Cruz). Secundarios: peroxidase-conjugated goat anti-rabbit (1 : 20 000; NB7187, Novus) y rabbit anti-mouse (1 : 15 000; 61-6520, Sigma, St Louis, MO, USA)

### **Inmunofluorescencia**

Las inmunofluorescencias se realizaron utilizando el siguiente protocolo:

- Las células se sembraron sobre cubreobjetos estériles en cajas de 6 pozos.
- Antes de la fijación, las células se lavaron 2 veces con PBS.

- Se llevó a cabo una fijación utilizando metanol y acetona:
  - 10 min en metanol frío a (-20°C).
  - 1 min en acetona fría (-20°C).
- 3 lavados de 5 min con PBS, en agitación.
- Bloqueo con albúmina al 1% en PBS.
- Incubación con anticuerpo primario. Toda la noche a 4 °C.
- 3 lavados 5 min con PBS, en agitación.
- Incubación con anticuerpo secundario. 1 h a temperatura ambiente.
- 4 lavados de 5 min con PBS, en agitación.
- Montaje en portaobjetos utilizando medio para montaje VECTASHIELD (Vector Laboratories, H-1200).
- Las imágenes de epifluorescencia fueron obtenidas en un microscopio AxioImager A1 (Carl Zeiss) y analizadas utilizando el software AxioVision LE (Carl Zeiss).
- Las imágenes de microscopía confocal fueron obtenidas en un microscopio LSM710-DUO (Carl Zeiss) y analizadas utilizando el software ZEN 2011 (Carl Zeiss).
- Los anticuerpos utilizados fueron: anti-BUB1 (MAB3610, Millipore, 1 : 10), anti-Centromere FITC-conjugate (15-235-F, Antibodies Incorporated, 1 : 100), anti-CENP-E (sc-22790, Santa Cruz, 1 : 50), and anti-SURVIVIN (ab469, Abcam, 1 : 100). Secundarios: anti-mouse Cy3-conjugate (AP124C, Millipore, 1 : 200), anti-rabbit Cy3 conjugate (AP132C, Millipore, 1 : 200). El DNA fue teñido con DAPI.

### **Microscopía en *time-lapse***

Para el análisis del arresto mitótico en células vivas se utilizaron células HCT116 que expresaban establemente el transgén para la proteína H2B-DsRed.

Las células fueron sembradas en una cámara POC-R2 (PECON). Las células fueron sincronizadas y tratadas en la misma cámara, la cual se utilizó para la incubación de las células en el microscopio confocal LSM710-DUO (Carl Zeiss). Se colectaron imágenes cada 8 min durante 50 h en tres diferentes planos para poder definir mejor la dinámica

del arresto en mitosis. Se evaluaron células individuales para el análisis utilizando el software ZEN 2011 (Carl Zeiss).

## **Soluciones y Reactivos**

**Paclitaxel.** El paclitaxel fue disuelto en DMSO a una concentración  $10^{-2}$  M, a partir de la cual se realizaron diluciones para el tratamiento de las líneas celulares. Se realizaron diluciones 1:1000 para obtener la concentración de paclitaxel deseada en el medio de cultivo celular.

**Timidina.** La timidina fue disuelta en PBS a una concentración de 200 mM. La solución fue filtrada utilizando filtros de  $\mu\text{m}$ . Finalmente, se realizó una dilución 1:100 en el medio de cultivo para obtener una concentración final de timidina de 2 mM.

**Solución Hipotónica.** La solución hipotónica se preparó con HEPES-EGTA. Se disolvieron 4.8 g de HEPES (Sigma), 0.2 g de EGTA (Sigma) y 3g de KCL (Sigma). Se aforó a 1 L ajustando el pH a 7.4.

**Solución Fijadora.** Se preparó utilizando Ácido acético (sigma) y Metanol (sigma) en una relación 3:1. Se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La solución se preparó en fresco antes de su uso.

**Solución de Tinción con yoduro de propidio.** La solución de tinción consistió en RNAsa A (sigma) 0.25 mg/mL, yoduro de propidio (sigma) 1 mg/mL en amortiguador de citrato de sodio al 1.1%.

## RESULTADOS

### Obtención de la dosis mínima efectiva del paclitaxel

Para definir la dosis de paclitaxel que utilizaríamos en los diferentes experimentos, se realizó una curva de dosis-respuesta en células HCT116 y HT29. Para obtener un mayor porcentaje de células en mitosis, las líneas celulares fueron sincronizadas con un bloqueo con timidina 2 mM antes de la adición del paclitaxel. La dosis elegida fue la menor concentración de fármaco que lograra arrestar a la mayoría de las células en mitosis, que para ambas líneas celulares fue de 100 nM (**Figura 8**). Ésta dosis se utilizó en todos los experimentos subsecuentes.

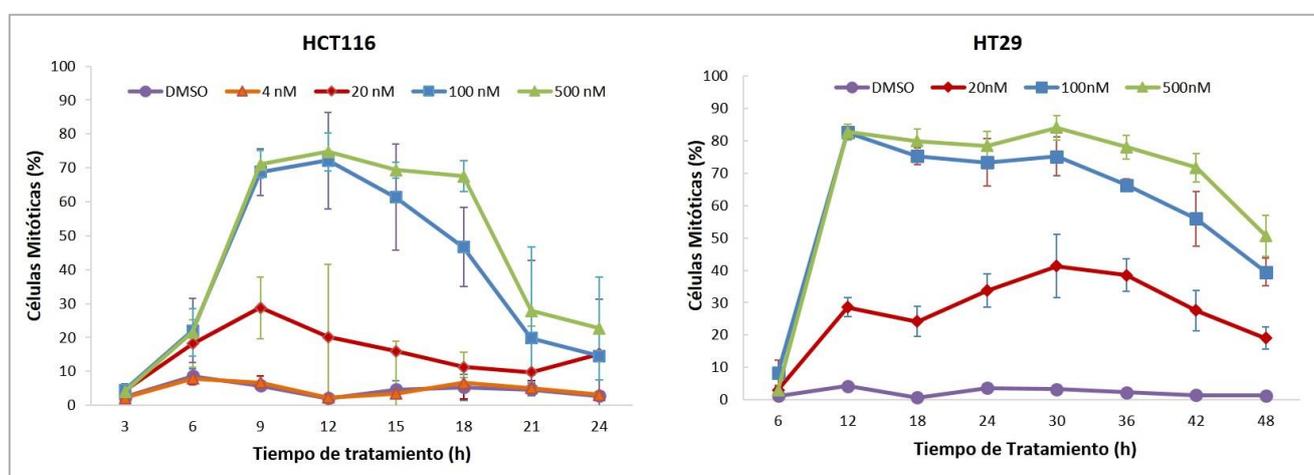


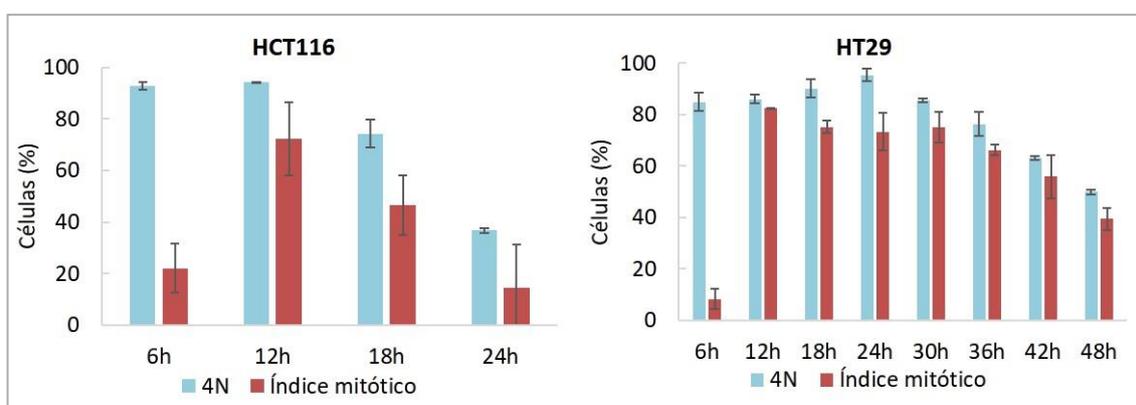
Figura 8. Curva dosis-respuesta de paclitaxel en células HCT116 y HT29. Las células fueron arrestadas en G1-S mediante un bloqueo con timidina 2 mM (18 h) antes de la adición de paclitaxel a las concentraciones referidas. Después del tratamiento con paclitaxel se tomaron muestras en los tiempos mencionados. El índice mitótico fue determinado mediante el análisis por microscopía óptica.

### La duración del arresto en mitosis es diferente en las células HCT116 y HT29.

En la curva de dosis de paclitaxel observamos que la mayoría de las células de la línea HCT116 se arrestaban hacia las 12 h después de la adición de paclitaxel. Sin embargo, cerca de las 15 h las células comenzaban a salir de mitosis, es decir, el arresto en esta línea celular es relativamente corto. Por otra parte, al evaluar a las células HT29 observamos que el arresto se mantenía por más tiempo. En estas células continuamos la curva hasta las 48 h para determinar el tiempo en el que las células “escapaban” del

arresto. A partir de las 36 h se observa una disminución gradual del porcentaje de células HT29 que aún se encuentran en mitosis (**Figura 9**).

El arresto celular también fue determinado mediante citometría de flujo, cuantificando el DNA teñido con yoduro de propidio y determinando el porcentaje de células que se encontraban en cada fase del ciclo celular. Mediante ésta técnica se observó un aumento en las células que se encuentran en G2/M (4N) desde las 6 h, antes del aumento del índice mitótico en ambas líneas celulares. El aumento en células 4N se debe al ingreso de células en la fase G2 pero que aún no han iniciado la mitosis (**Figura 9**). De manera similar al índice mitótico, el análisis por citometría de flujo demuestra un arresto más prolongado en las células HT29 en comparación con las células HCT116 (**Figura 9**).



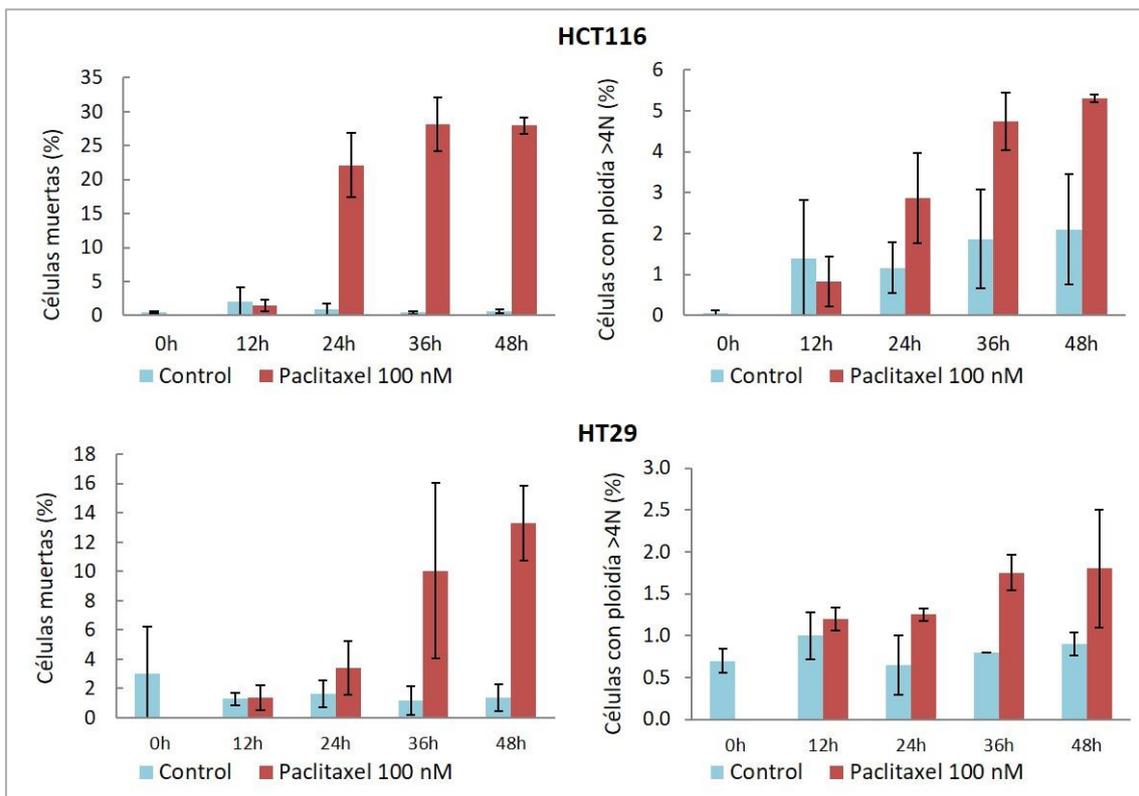
*Figura 9. Arresto y liberación de células HCT116 y HT29 tratadas con paclitaxel. Después de la sincronización con timidina, las células fueron tratadas con paclitaxel 100 nM. Las células fueron fijadas en los tiempos indicados para su análisis por citometría de flujo (contenido de DNA = 4N) o índice mitótico. Se recuperaron las células del sobrenadante para cada fijación. El porcentaje de células en G1, S o G2-M fue determinado utilizando el software ModFit. En el análisis del ciclo celular no se incluyeron las células muertas (contenido de DNA <2N).*

### **La liberación del arresto mitótico coincide con la aparición de células muertas y poliploides**

El análisis de citometría de flujo tiene como ventaja el poder cuantificar un mayor número de células en comparación con el análisis por microscopía y permite analizar, además del arresto, el porcentaje de células que mueren (aquellas con una cantidad de DNA menor a 2N) y aquellas que son poliploides y continúan con el ciclo celular (células con una cantidad de DNA mayor a 4N).

A partir de éste análisis observamos que en las células HCT116 es evidente la muerte celular a partir de las 24 h, en este mismo tiempo comienza a aumentar el porcentaje de células poliploides con una ploidía mayor a 4N, es decir células poliploides que entraron a una nueva fase de replicación S (**Figura 10**). Por otra parte, en la línea celular HT29 la muerte celular es notoria hasta las 36 h de tratamiento, lo cual concuerda con la disminución del índice mitótico en este tipo celular. Aunque también se observa un pequeño aumento en las células poliploides >4N, éste no es tan evidente como sucede en la línea celular HCT116 (**Figura 10**).

En conclusión, el tratamiento con paclitaxel provoca un arresto en mitosis durante más tiempo en las células HT29 en comparación con las células HCT116. Además, la liberación del arresto coincide con el inicio de la muerte celular en ambas líneas, y en el caso de las células HCT116, también coincide con la aparición de células poliploides que inician un nuevo ciclo de replicación del DNA. Lo anterior sugiere que las células que se liberan del arresto pueden ser viables, al menos durante la siguiente división celular.



*Figura 10. Análisis de muerte celular y células poliploides mediante citometría de flujo. Las células fueron sincronizadas como se describe previamente y después cultivadas con medio de cultivo adicionado con paclitaxel 100 nM. Se obtuvieron muestras en los tiempos señalados. La*

determinación de células con un contenido de DNA <2N y >4N se llevó a cabo utilizando el software FACSDiva.

**Los niveles de las proteínas BUB1 y SURVIVINA disminuyen gradualmente durante una mitosis prolongada sin relación con la liberación del arresto.**

Como se mencionó anteriormente, a partir de la anafase y hacia el final de la mitosis una gran cantidad de proteínas son marcadas mediante ubiquitinación para su degradación en el proteosoma. El complejo APC/C es una ubiquitin ligasa E3 que tiene un papel fundamental en la ubiquitinación de proteínas en anafase y el final de la mitosis. Sin embargo, durante el tratamiento con paclitaxel la mitosis es prolongada por una activación continua del PMM, el cual inhibe a APC/C, mientras que la liberación del arresto depende de la degradación basal de CICLINA B. En este contexto, nosotros buscamos evaluar si otras proteínas que se degradan normalmente al final de la mitosis eran disminuidas en las células que se liberaban del arresto mitótico inducido por paclitaxel. Específicamente, analizamos los niveles de BUB1 y SURVIVINA (ambas proteínas son blanco de APC/C) en las células HCT116 y HT29. MAD2 es una proteína mitótica que no disminuye durante el ciclo celular, por lo que la utilizamos como control para determinar si las diferencias en los niveles de proteínas no se debían a cambios generales en proteínas mitóticas.

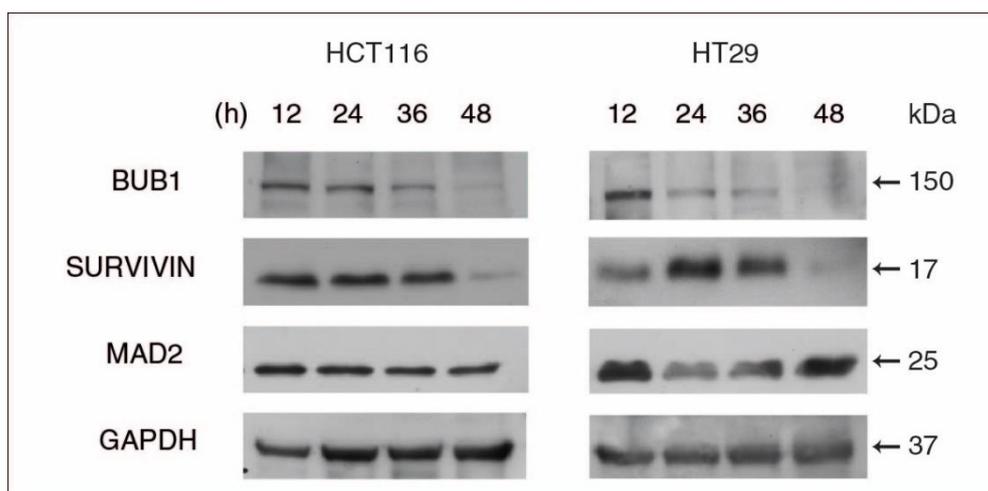


Figura 11. Niveles de BUB1 y SURVIVINA durante el arresto mitótico en células HCT116 y HT29. Las células fueron sincronizadas y liberadas en medio adicionado con paclitaxel 100 nM. Se obtuvieron muestras en los tiempos señalados. Se recuperaron las células del sobrenadante para la lisis.

Los niveles de MAD2 y GAPDH fueron constantes durante el arresto mitótico en ambas líneas celulares. En el caso de BUB1, los niveles de la proteína disminuyeron durante el arresto mitótico en ambos tipos celulares con un patrón similar. A partir de las 36 h se observó una disminución de BUB1 y hacia las 48 h los niveles de la proteína fueron apenas detectables. Por otra parte, SURVIVINA presentó niveles constantes hasta las 36 h de tratamiento en ambas líneas celulares. A las 48 h de tratamiento se observó una disminución drástica de SURVIVINA tanto en las células HCT116 como en HT29 (**Figura 11**).

A pesar de que las células HCT116 se mantienen en mitosis por más tiempo que las HT29, la disminución de las proteínas BUB1 y SURVIVINA no fue distinta entre estas líneas, lo que indica que la degradación de ambas proteínas no depende de la liberación del arresto en mitosis. Después de 24 h de tratamiento con paclitaxel la mayoría de las células HCT116 se han liberado del arresto y se encuentran en la fase G1 (**Figura 9**). Sin embargo, los niveles de las proteínas BUB1 y SURVIVINA se mantienen elevados, demostrando que dichas proteínas no se encuentran disminuidas en la subsecuente fase G1 como sucede en una mitosis normal (**Figura 11**).

Por lo tanto, las células HCT116 tratadas con paclitaxel se arrestan por un periodo breve, pero al liberarse del arresto, no disminuyen los niveles de las proteínas BUB1 y SURVIVINA. Por otra parte, de acuerdo al análisis del ciclo celular, algunas proteínas mueren después del arresto, pero otras sobreviven y son capaces de iniciar un nuevo ciclo celular.

#### **BUB1 y SURVIVINA se localizan en el núcleo en células HCT116 que se liberan de un arresto mitótico.**

Debido a que BUB1 y SURVIVINA se mantienen en las células HCT116 que se liberan de una mitosis prolongada, decidimos investigar cuál era la localización de ambas proteínas en las células que sobrevivían al tratamiento con paclitaxel. Aunque los niveles de BUB1 y SURVIVINA disminuyen durante la interfase en un ciclo celular normal, estas proteínas no desaparecen por completo y su localización en esta parte del ciclo es principalmente citoplásmica (**Figura 12 y 13**).

Después de 12 h de tratamiento con paclitaxel, la mayor parte de las células se encuentran en mitosis. En este punto, la localización de BUB1 fue principalmente centromérica, mientras que SURVIVINA se localizó en el centrómero y centrosoma.

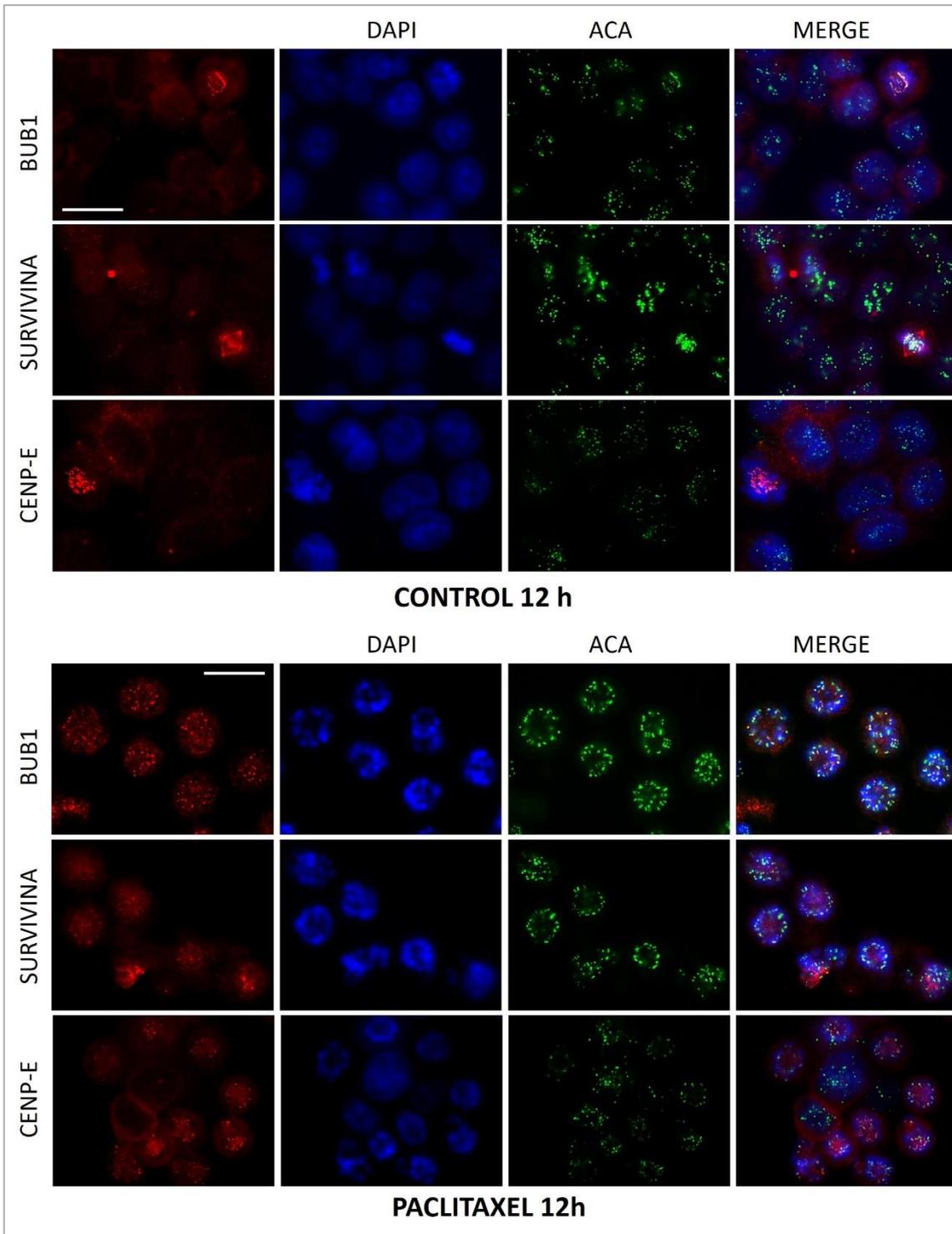


Figura 12. Localización de BUB1 y SURVIVINA en células HCT116 tratadas con paclitaxel. Imágenes representativas de células HCT116 después de 12 h de tratamiento con paclitaxel. Las células control muestran una localización típica para BUB1 (Centrómero) y SURVIVINA

*(Centrómero, centrosoma y cuerpo medio). Se utilizó DAPI para la tinción del núcleo. La barra de escala equivale a 20  $\mu$ m.*

Después de 24 h de tratamiento con paclitaxel, la mayoría de las células tratadas se encontraban en interfase, coincidiendo con los datos de citometría de flujo e índice mitótico (**Figura 13**). Las células que se liberaron del arresto presentaron diferentes morfologías, el tamaño era variable, la mayoría era multinucleadas y también se encontraron fragmentos celulares. Algunas de éstas células presentaban un mayor tamaño, con múltiples núcleos y un límite redondeado. Debido a la gran variedad en la morfología y la dificultad para definir células completas de fragmentos celulares, no fue posible cuantificar el porcentaje celular de alguna morfología específica (**Figura 13**).

Aunque la localización de las proteínas BUB1 y SURVIVINA no fue clara en la mayoría de las células, aquellas con mayor tamaño presentaron un patrón de localización nuclear para ambas proteínas. BUB1 se observó en el núcleo de estas células formando foci que no colocalizaban con la señal del centrómero (ACA). Por otra parte, SURVIVINA también se observó en el núcleo de éstas células, aunque de una manera más uniforme sin formar foci (**Figura 13**). Para determinar si este patrón era común en proteínas del cinetocoro que son blanco de APC/C, se determinó la localización de la cinesina CENP-E, la cual se localiza en el cinetocoro de las células hasta la anafase durante una mitosis normal (**Figura 12**). CENP-E no mostró una localización nuclear en células tratadas con paclitaxel durante 24 h (**Figura 13**).

En consecuencia, las células HCT116 que se liberan del arresto mantienen los niveles de BUB1 y SURVIVINA en una localización nuclear, que contrasta con la localización preferencialmente citoplásmica en células control. Además, esta localización no coincide con la ubicación del centrómero, lo que sugiere que ambas proteínas no se encuentran formando complejos con proteínas del cinetocoro. Por otra parte, el tamaño de las células que presentan la localización nuclear de BUB1 y SURVIVINA coincide con las células poliploides que logran ingresar a un nuevo ciclo celular, por lo que pueden representar a células viables que sobrevivieron al arresto y se mantienen dividiéndose.

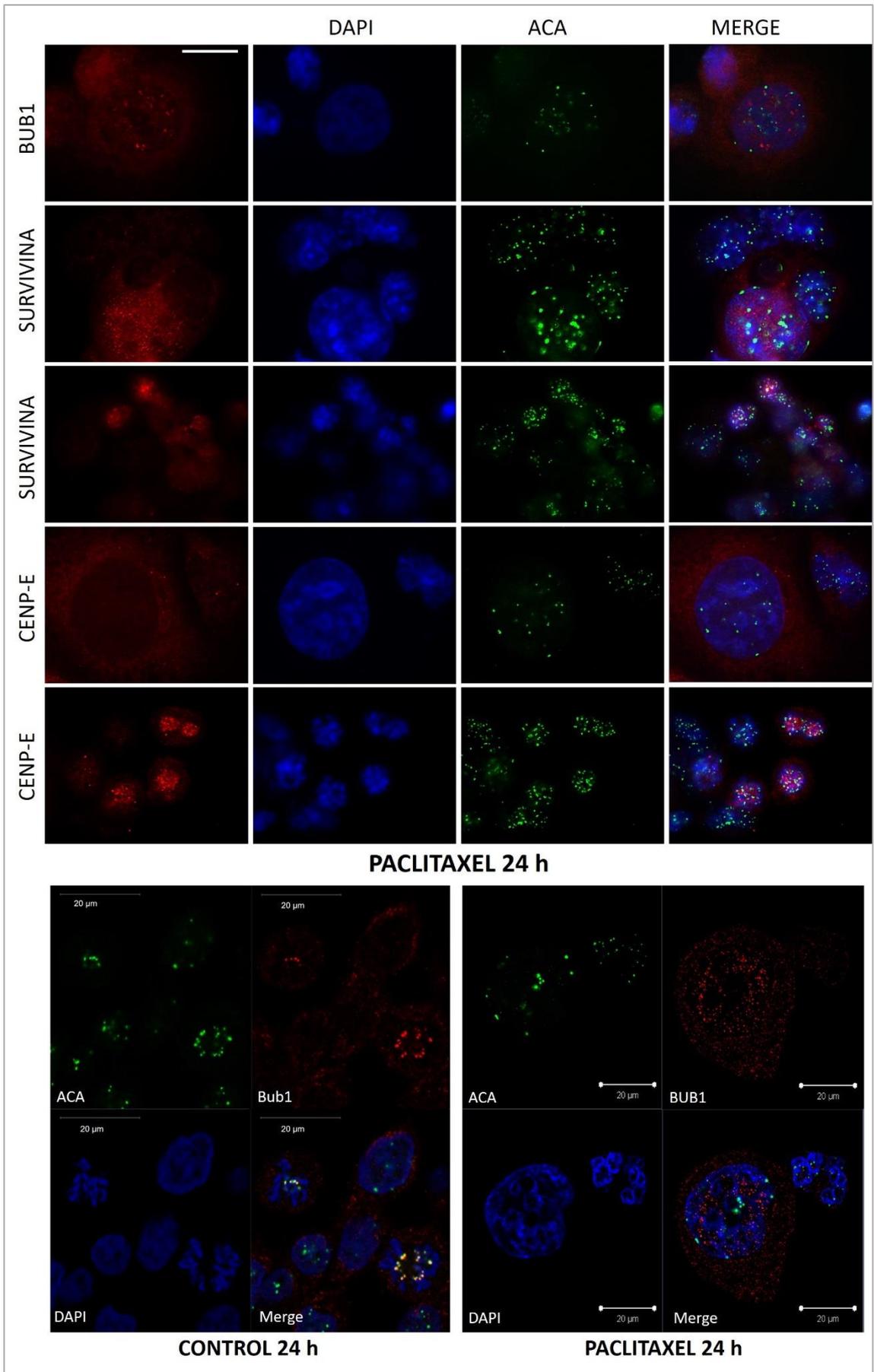


Figura 13. Localización de BUB1 y SURVIVINA en células HCT116 tratadas con paclitaxel. Imágenes representativas de células HCT116 después de 24 h de tratamiento con paclitaxel. Las células tratadas muestran una localización nuclear para BUB1 (foci) y SURVIVINA (dispersa). Se utilizó DAPI para la tinción del núcleo. La barra de escala equivale a 20  $\mu\text{m}$ .

### La heterogeneidad celular después de un arresto mitótico está relacionada con el “escape” de la mitosis

La heterogeneidad morfológica que observamos en las células que lograron liberarse del arresto nos motivó a estudiar la dinámica del arresto mitótico en células individuales a través del tiempo. Para este efecto, se transfectaron de manera estable células HCT116 con el transgén H2A-H2BDsRed que permite observar la mitosis al incorporarse a los nucleosomas en la cromatina. Mediante este modelo evaluamos el comportamiento de las células HCT116 durante 50 h de tratamiento con paclitaxel.

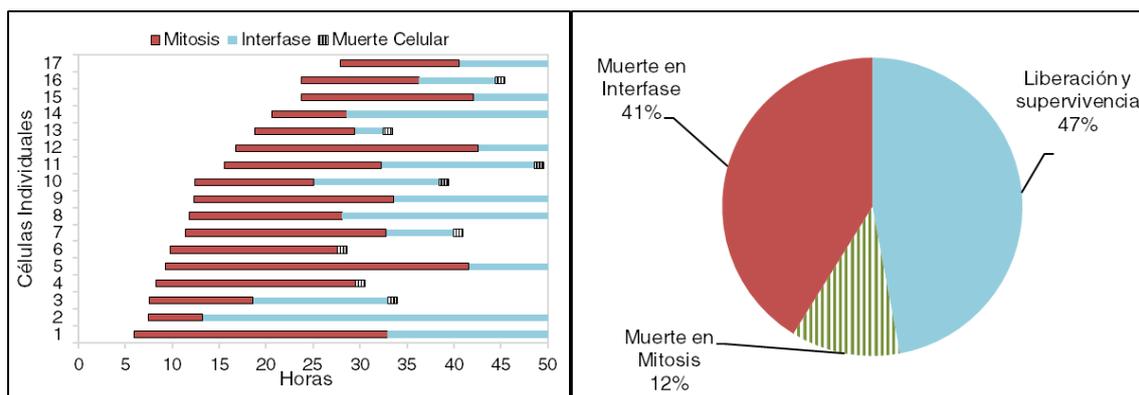
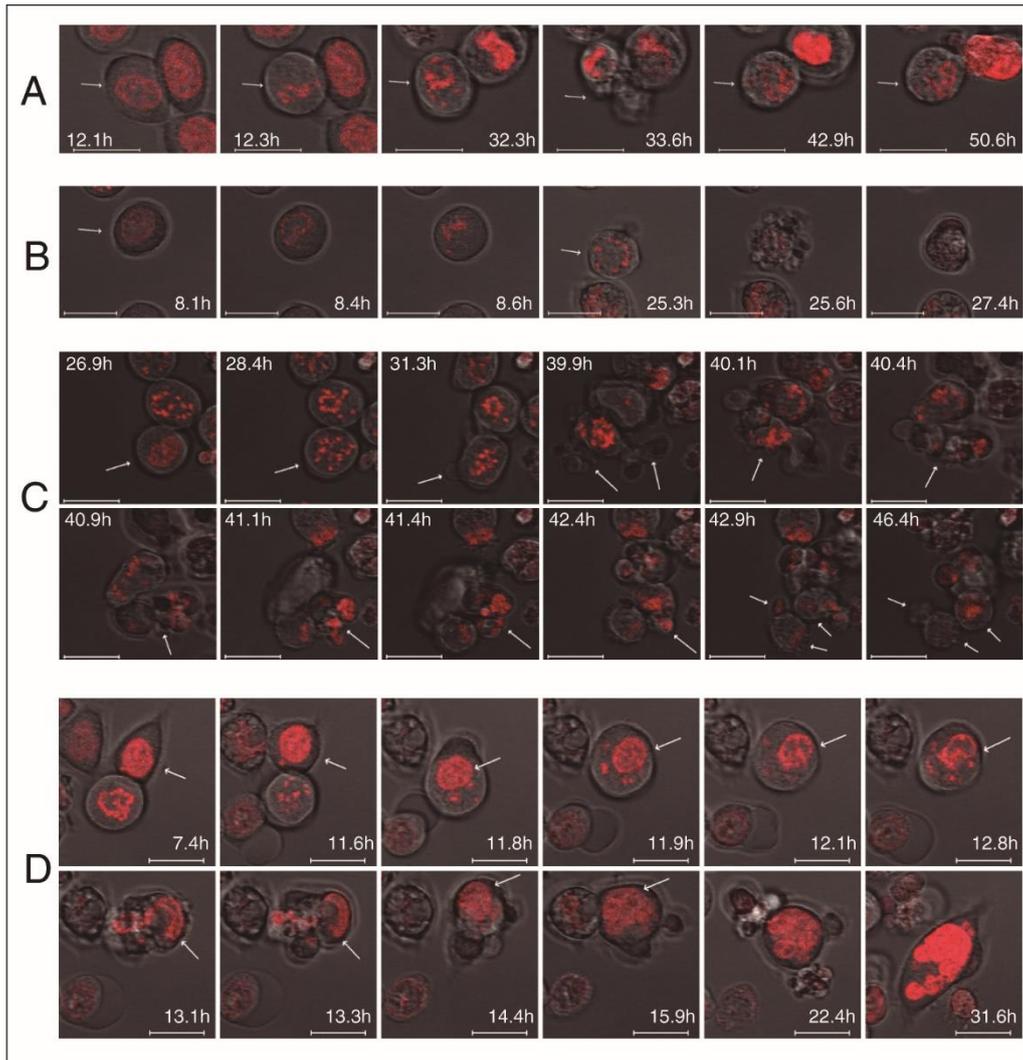


Figura 14. Consecuencias de una mitosis prolongada. Células HCT116 tratadas con paclitaxel 100 nM. En la gráfica de la izquierda se observa la dinámica del arresto. Cada línea corresponde a una célula. En rojo se encuentra el tiempo que la célula estuvo en mitosis, en azul, en interfase. La caja rayada indica el momento en que la célula inició la muerte. Las células están ordenadas de acuerdo al tiempo en que ingresaron en mitosis (La primera línea de abajo corresponde a la primer célula que inició la mitosis). En la gráfica de la derecha se observa el resumen del destino de las células.



*Figura 15. Heterogeneidad celular después de un arresto mitótico. Las células HCT116-H2BDsRed fueron sincronizadas y tratadas con paclitaxel 100 nM. Se obtuvieron micrografías cada 8 min durante 50 h. A) Una célula entre en mitosis a las 12.3 h (Flecha), sale de mitosis a las 33.6 h (cambios en membrana) y se reorganiza a las 42.9 h. La célula permanece viva hasta el final de la mitosis (Video suplementario 1). B) Célula muerta en mitosis (flecha). La condensación cromosómica es evidente a las 25.3 h; a las 25.6 h se inicia la apoptosis (membrane blebbing) cuando aún son evidentes los cromosomas mitóticos (Video suplementario 2). C) División de una célula en fragmentos después de liberarse del arresto mitótico (Video Suplementario 3). D) Formación de una células de gran tamaño después del arresto mitótico (Video Suplementario 4).*

De manera similar a otros trabajos [39], observamos que la duración del arresto es muy variable entre las células de un mismo cultivo (**Figura 14**). El destino final de las células fue también variable, algunas células murieron en mitosis, otras después de liberarse

del arresto y algunas sobrevivieron al tratamiento (**Figura 14**). Un aspecto interesante fue la forma en que las células “escapaban del arresto”. Hacia el final de la mitosis fue evidente el cambio drástico en la membrana de una manera similar a la citocinesis, aunque en este caso la mayoría de las células no lograron separarse (algunas células lograron separarse en fragmentos, **Figura 15**). Después de estos cambios drásticos en la membrana, las células se reagruparon o formaron fragmentos. Esta heterogeneidad coincide con la observada en células fijadas por lo que se puede concluir que la alteración en la morfología depende, al menos en parte, de los cambios drásticos similares a la citocinesis hacia el final de un arresto prolongado. Por otra parte, fue evidente que mediante este mecanismo se pueden formar también, células de gran tamaño como aquellas en las que se observó una localización nuclear de BUB1 y SURVIVINA (**Figura 15**).

## DISCUSIÓN

En este estudio comparamos dos líneas celulares que difieren en la duración del arresto mitótico al ser tratadas con paclitaxel. La duración del arresto en mitosis fue mayor en las células HT29 en relación con las células HCT116, aunque se encontraron diferencias en la duración de la detención mitótica dentro de una misma línea celular. Estos resultados concuerdan con datos similares en otros trabajos [39, 40, 46]. Sin embargo, no es claro por qué existen diferencias en la duración del arresto mitótico entre distintas líneas celulares, e incluso entre las células de una misma línea. El paclitaxel provoca la prolongación de la mitosis al activar al PMM, que inhibe al complejo APC/C evitando el inicio de la anafase. No obstante, la detención en mitosis no es indefinida y algunas células logran liberarse del arresto e ingresar a interfase. Brito y Rieder han demostrado que la degradación de la CICLINA B debajo de cierto umbral promueve la salida de un arresto mitótico al disminuir la actividad de la CDK1 [37, 38]. Esta degradación depende de la actividad de APC/C unido al cofactor CDC20 y la disminución experimental de este cofactor mediante siRNAs evita que las células se liberen del arresto provocando la muerte de las células en mitosis [38]. Se ha propuesto que la terminación de la mitosis en estas circunstancias no se debe a una “adaptación”, es decir no implica un mecanismo específico que inhiba la actividad de la CDK1 [36] sino que depende de la degradación gradual de la CICLINA B, la cual es mediada por APC/C. Este fenómeno es paradójico debido a que el arresto en mitosis depende de la inhibición de APC/, mientras que la liberación del arresto esta mediada por la actividad del mismo APC/C. Es probable que la inhibición de APC/C durante un arresto mitótico no sea completa y que su actividad residual permita la ubiquitinación gradual de la CICLINA B. En este sentido será importante definir qué es lo que causa la diferencia en el arresto entre las células HCT116 y las HT29. Una posibilidad es que en las células HT29 la inhibición de APC/C sea más eficiente durante el tratamiento con paclitaxel, por lo que la degradación gradual de CICLINA B es más lenta. Alternativamente, podría ser que el umbral de degradación de CICLINA B necesario para “escapar” del arresto mitótico sea menor en las células HCT116. Si la última opción fuera correcta, entonces la sobreexpresión de CICLINA B aumentaría la duración del arresto en las células HCT116. Otro factor importante a evaluar es la proteína CDC20, el cofactor de APC/C necesario para la ubiquitinación de

CICLINA B. Nosotros pretendemos evaluar en un proyecto futuro, los niveles de la CICLINA B y la proteína CDC20 durante el arresto mitótico para determinar si existe una asociación entre sus niveles y la duración de la mitosis en ambas líneas celulares.

Al evaluar los niveles de las proteínas BUB1 y SURVIVINA, observamos que, independientemente de la duración del arresto, ambas proteínas disminuyen. En una mitosis normal, BUB1 y SURVIVINA son ubiquitinadas por APC/C-CDH1 y degradadas hacia el final de la mitosis [20, 28]. Debido a que CDK1 fosforila e inhibe al complejo APC/C-CDH1, es probable que los blancos de APC/C-CDH1 no sean ubiquitinados durante un arresto mitótico. De hecho, nosotros observamos que las proteínas BUB1 y SURVIVINA se mantenían en las células HCT116 que escapaban del arresto. Sin embargo, los niveles de ambas proteínas disminuyeron también en las células HT29, las cuáles se mantuvieron arrestadas por más tiempo. Alternativamente, es posible que exista una actividad basal de APC/C-CDH1 durante la mitosis extendida, en este caso, las células con un arresto más prolongado (HT29) tendrían tiempo suficiente para disminuir los niveles de BUB1 y SURVIVINA, y las células que se liberarían del arresto presentarían niveles bajos de ambas proteínas. En contraste, las células que se liberan más rápido del arresto (HCT116) no lograrían degradar a BUB1 y SURVIVINA y mantendrías niveles elevados de ambas proteínas en la siguiente interfase.

Se ha reportado que la proteína TPX2 (un blanco de APC/C-CDH1) se mantiene en los centrómeros en las células que se liberan de un arresto mitótico [37]. Aunque nosotros encontramos un comportamiento similar para las proteínas BUB1 y SURVIVINA, ninguna de ellas se localizó en la región centromérica después de la liberación del arresto. BUB1 se encontró en foci en el núcleo de las células de mayor tamaño sin que esta localización coincidiera con el centrómero, mientras que SURVIVINA se encontró en el núcleo en un patrón difuso (Figura 10). Se ha reportado que durante una mitosis prolongada el DNA puede sufrir daño y acumular foci del marcador  $\gamma$ H2AX [47]. Debido a que BUB1 participa en el DDR [31], es posible que la localización de BUB1 después de la detención mitótica coincida con las regiones en donde se está llevando a cabo la reparación del DNA. Por otra parte, SURVIVINA también se acumuló en células HCT116 que se liberaron del arresto mitótico. Aunque la localización nuclear de SURVIVINA no se ha asociado a la resistencia a la muerte celular [20], el aumento en los niveles generales de SURVIVINA y

BUB1 se asocian a una mayor resistencia ante diferentes agentes quimioterapéuticos. [29, 30]. Por lo tanto, la persistencia de ambas proteínas puede promover mecanismos de resistencia celular. Consistente con estos resultados, nosotros observamos que las células que se liberaron del arresto fueron capaces de iniciar un nuevo ciclo celular.

La mitosis prolongada puede tener como consecuencia la muerte en mitosis o la liberación del arresto. Las células que escapan de la detención mitótica pueden sobrevivir o morir en la siguiente interfase. Se han descrito algunos factores que determinan la muerte celular en un arresto mitótico [41, 48, 49], pero se han realizado pocos estudios que evalúen las características de las células que logran sobrevivir al arresto y que en un tumor son las responsables de su repoblación. Nuestros resultados demuestran que los mecanismos de degradación proteica dependientes de APC/C no son eficientes durante una mitosis prolongada y algunas proteínas que son normalmente degradadas al final de la mitosis, persisten. Por esta razón, es importante determinar cuál es la consecuencia de la presencia de estas proteínas durante interfase y si afectan el fenotipo celular, principalmente con respecto a la regulación de la muerte celular.

Por otra parte, es necesario estudiar con más detalle las causas y consecuencias de la heterogeneidad morfológica después de una mitosis prolongada. Nosotros observamos que la heterogeneidad se relaciona con el fin de la mitosis y la reorganización celular. Las células que salían de mitosis presentaron movimientos drásticos de la membrana celular que eran similares a la citocinesis y que en algunos casos generaron fragmentos celulares. En un análisis de células que sobreviven al arresto celular ocasionado por paclitaxel, se concluyó que la liberación del arresto estaba acompañada de la aparición de daño al DNA y la formación de células multinucleadas. Además, un mayor número de núcleos se asoció a un mayor porcentaje de muerte celular después de la mitosis [44]. Sin embargo, en este estudio no se analizó cuál puede ser el factor que causa la formación de células multinucleadas. Por otra parte, se ha demostrado que la estabilización de microtúbulos mediada por paclitaxel es suficiente para organizar el surco de división de la citocinesis [50]. Los cambios en la membrana celular que observamos pueden ser debidos a la organización de estructuras similares al anillo contráctil sobre grupos de microtúbulos estabilizados por el paclitaxel. En este sentido,

se puede hipotetizar que la inhibición de los mecanismos de citocinesis evitará la formación de células multinucleadas que presenten daño al DNA después del arresto en mitosis y se disminuirá la toxicidad asociada al paclitaxel en estas células. El estudio de este fenómeno es importante para determinar si el tratamiento conjunto de agentes que alteren la dinámica de microtúbulos y aquellos que promuevan la constricción del anillo contráctil puede ser una mejor alternativa para la eliminación de las células tumorales.

## REFERENCIAS

1. Rieder, C.L. and A. Khodjakov, *Mitosis through the microscope: advances in seeing inside live dividing cells*. Science, 2003. **300**(5616): p. 91-6.
2. Wong, R.W., *An update on cohesin function as a 'molecular glue' on chromosomes and spindles*. Cell Cycle, 2010. **9**(9): p. 1754-8.
3. Schatten, H., *The mammalian centrosome and its functional significance*. Histochem Cell Biol, 2008. **129**(6): p. 667-86.
4. Hirano, T., *Chromosome Dynamics during Mitosis*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. **7**(6).
5. Thompson, S.L., S.F. Bakhoun, and D.A. Compton, *Mechanisms of chromosomal instability*. Curr Biol, 2010. **20**(6): p. R285-95.
6. Guttinger, S., E. Laurell, and U. Kutay, *Orchestrating nuclear envelope disassembly and reassembly during mitosis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(3): p. 178-91.
7. Champion, L., M.I. Linder, and U. Kutay, *Cellular Reorganization during Mitotic Entry*. Trends Cell Biol, 2017. **27**(1): p. 26-41.
8. Enserink, J.M. and R.D. Kolodner, *An overview of CDK1-controlled targets and processes*. Cell Div, 2010. **5**: p. 11.
9. Petronczki, M., P. Lenart, and J.M. Peters, *Polo on the Rise-from Mitotic Entry to Cytokinesis with PLK1*. Dev Cell, 2008. **14**(5): p. 646-59.
10. Hsu, J.Y., et al., *Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes*. Cell, 2000. **102**(3): p. 279-91.
11. Adams, R.R., et al., *Essential roles of Drosophila inner centromere protein (INCENP) and aurora B in histone H3 phosphorylation, metaphase chromosome alignment, kinetochore disjunction, and chromosome segregation*. J Cell Biol, 2001. **153**(4): p. 865-80.

12. Ditchfield, C., et al., *AURORA B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, MAD2, and Cenp-E to kinetochores*. J Cell Biol, 2003. **161**(2): p. 267-80.
13. Wilkins, B.J., et al., *A cascade of histone modifications induces chromatin condensation in mitosis*. Science, 2014. **343**(6166): p. 77-80.
14. Kruitwagen, T., et al., *Axial contraction and short-range compaction of chromatin synergistically promote mitotic chromosome condensation*. Elife, 2015. **4**: p. e1039.
15. Wang, F. and J.M. Higgins, *Histone modifications and mitosis: countermarks, landmarks, and bookmarks*. Trends Cell Biol, 2013. **23**(4): p. 175-84.
16. Ruchaud, S., M. Carmena, and W.C. Earnshaw, *Chromosomal passengers: conducting cell division*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(10): p. 798-812.
17. Carmena, M., et al., *The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(12): p. 789-803.
18. Norberg, E., S. Orrenius, and B. Zhivotovsky, *Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF)*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **396**(1): p. 95-100.
19. Li, F., et al., *Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin*. Nature, 1998. **396**(6711): p. 580-4.
20. Connell, C.M., R. Colnaghi, and S.P. Wheatley, *Nuclear survivin has reduced stability and is not cytoprotective*. J Biol Chem, 2008. **283**(6): p. 3289-96.
21. Altieri, D.C., *Survivin - The inconvenient IAP*. Semin Cell Dev Biol, 2015. **39**: p. 91-96.
22. Heald, R. and A. Khodjakov, *Thirty years of search and capture: The complex simplicity of mitotic spindle assembly*. J Cell Biol, 2015. **211**(6): p. 1103-11.
23. Peters, J.M., *The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(9): p. 644-56.
24. Manchado, E., M. Eguren, and M. Malumbres, *The anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C): cell-cycle-dependent and -independent functions*. Biochem Soc Trans, 2010. **38**(Pt 1): p. 65-71.
25. Musacchio, A. and E.D. Salmon, *The spindle-assembly checkpoint in space and time*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(5): p. 379-93.

26. Lara-Gonzalez, P., F.G. Westhorpe, and S.S. Taylor, *The spindle assembly checkpoint*. *Curr Biol*, 2012. **22**(22): p. R966-80.
27. Kawashima, S.A., et al., *Phosphorylation of H2A by BUB1 prevents chromosomal instability through localizing shugoshin*. *Science*, 2010. **327**(5962): p. 172-7.
28. Qi, W. and H. Yu, *KEN-box-dependent degradation of the BUB1 spindle checkpoint kinase by the anaphase-promoting complex/cyclosome*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(6): p. 3672-9.
29. Niikura, Y., et al., *BUB1 mediation of caspase-independent mitotic death determines cell fate*. *J Cell Biol*, 2007. **178**(2): p. 283-96.
30. Niikura, Y., et al., *BUB3 that dissociates from BUB1 activates caspase-independent mitotic death (CIMD)*. *Cell Death Differ*, 2010. **17**(6): p. 1011-24.
31. Yang, C., et al., *The kinetochore protein BUB1 participates in the DNA damage response*. *DNA Repair (Amst)*, 2012. **11**(2): p. 185-91.
32. Jessulat, M., et al., *Spindle Checkpoint Factors BUB1 and Bub2 Promote DNA Double-Strand Break Repair by Nonhomologous End Joining*. *Mol Cell Biol*, 2015. **35**(14): p. 2448-63.
33. Nyati, S., et al., *The kinase activity of the Ser/Thr kinase BUB1 promotes TGF-beta signaling*. *Sci Signal*, 2015. **8**(358): p. ra1.
34. Mollinedo, F. and C. Gajate, *Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis*. *Apoptosis*, 2003. **8**(5): p. 413-50.
35. Weaver, B.A. and D.W. Cleveland, *Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death*. *Cancer Cell*, 2005. **8**(1): p. 7-12.
36. Rieder, C.L. and H. Maiato, *Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint*. *Dev Cell*, 2004. **7**(5): p. 637-51.
37. Brito, D.A. and C.L. Rieder, *Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint*. *Curr Biol*, 2006. **16**(12): p. 1194-200.
38. Huang, H.C., et al., *Evidence that mitotic exit is a better cancer therapeutic target than spindle assembly*. *Cancer Cell*, 2009. **16**(4): p. 347-58.

39. Gascoigne, K.E. and S.S. Taylor, *Cancer cells display profound intra- and interline variation following prolonged exposure to antimetabolic drugs*. *Cancer Cell*, 2008. **14**(2): p. 111-22.
40. Shi, J., J.D. Orth, and T. Mitchison, *Cell type variation in responses to antimetabolic drugs that target microtubules and kinesin-5*. *Cancer Res*, 2008. **68**(9): p. 3269-76.
41. Wertz, I.E., et al., *Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7*. *Nature*, 2011. **471**(7336): p. 110-4.
42. Chu, R., D.T. Terrano, and T.C. Chambers, *CDK1/cyclin B plays a key role in mitotic arrest-induced apoptosis by phosphorylation of Mcl-1, promoting its degradation and freeing Bak from sequestration*. *Biochem Pharmacol*, 2012. **83**(2): p. 199-206.
43. Harley, M.E., et al., *Phosphorylation of Mcl-1 by CDK1-cyclin B1 initiates its CDC20-dependent destruction during mitotic arrest*. *EMBO J*, 2010. **29**(14): p. 2407-20.
44. Zhu, Y., Y. Zhou, and J. Shi, *Post-slippage multinucleation renders cytotoxic variation in anti-mitotic drugs that target the microtubules or mitotic spindle*. *Cell Cycle*, 2014. **13**(11): p. 1756-64.
45. Polito, P., et al., *Human solid tumors: cytogenetic techniques*. *Methods Mol Biol*, 2003. **220**: p. 135-50.
46. Tao, W., et al., *Induction of apoptosis by an inhibitor of the mitotic kinesin KSP requires both activation of the spindle assembly checkpoint and mitotic slippage*. *Cancer Cell*, 2005. **8**(1): p. 49-59.
47. Hayashi, M.T. and J. Karlseder, *DNA damage associated with mitosis and cytokinesis failure*. *Oncogene*, 2013. **32**(39): p. 4593-601.
48. Haschka, M.D., et al., *The NOXA-MCL1-BIM axis defines lifespan on extended mitotic arrest*. *Nat Commun*, 2015. **6**: p. 6891.
49. Topham, C.H. and S.S. Taylor, *Mitosis and apoptosis: how is the balance set?* *Curr Opin Cell Biol*, 2013. **25**(6): p. 780-5.
50. Shannon, K.B., et al., *Taxol-stabilized microtubules can position the cytokinetic furrow in mammalian cells*. *Mol Biol Cell*, 2005. **16**(9): p. 4423-36.