



Universidad Nacional Autónoma De México



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

FACULTAD DE MEDICINA

**Las variantes de Survivina y su relación con la
muerte en células mitóticas**

T E S I S

Que para obtener el título de:

Licenciado en Investigación Biomédica Básica

P R E S E N T A:

RODRIGO ENRIQUE CÁCERES GUTIÉRREZ

TUTOR:

DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO

MÉXICO D.F. DICIEMBRE DE 2012



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 de la UNAM, en el Instituto Nacional de Cancerología, bajo la asesoría del Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo y fue financiado por los proyectos CONACYT 83959 Y PAPIIT IN213311.

El autor recibió una beca del programa Probei durante la realización de este trabajo y agradece a las todas las instituciones mencionadas, que lo hicieron posible.

A las cuatro paredes de mi Hogar,
El apoyo más firme,
El amor incondicional...
A Papá, Maman, Odette y Brandon

A mis abuelitos Enrique, Manuel, Irma, Lucero y Elsa
¡Cabalga, Quijote! ¡Cabalga! ¡Cabalga siempre junto a mí!

AGRADECIMIENTOS

A mi padre académico, el Dr. Luis A. Herrera, cuya excelencia académica sólo puede ser superada por sus cualidades personales.

A la M. en C. Clementina Castro, quien a pesar de su carga de trabajo, siempre ha tenido un espacio para apoyarme en la realización de múltiples aspectos experimentales de este trabajo. Sus consejos y enseñanzas han sido fundamentales para este proyecto.

A mi *sensei*, el Biól. Marco Andonegui, quien me ha adoptado como alumno, orientado y acompañado a diario en mi formación en investigación biomédica y en mi tránsito por los misteriosos caminos de la segregación cromosómica... ¡Que el Rock sea!

A mi *sensei*, el M. en C. Alejandro López, maestro de infinita paciencia que me enseñó a realizar diversas técnicas indispensables para este trabajo y quien me abrió los ojos a los maravillosos colores de la biología celular y molecular.

A todos los miembros del laboratorio de Carcinogénesis y los que se han ido, de quienes, de cada uno he aprendido algo y más que compañeros, considero una segunda familia.

A la Coordinación de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica, específicamente al Dr. Alejandro Zentella y a la Lic. Cynthia Lima, así como a Lucy y a Gris del INCan por todo su apoyo.

A toda mi familia, lo más importante que existe para mí, que me apoya en cada paso que doy y que siempre me alienta a dar el siguiente, pero sobre todo, por todo su amor.

A mi siempre fiel perro, Draco, quien pasó la mayor parte del tiempo de escritura de esta tesis acompañándome.

RESUMEN

Antecedentes: En organismos eucariontes existe un mecanismo que controla el inicio de la anafase conocido como el *Punto de Monitoreo Mitótico* (PMM). Su función consiste en detener la progresión de la mitosis hasta que todos los cinetocoros de la cromátidas se encuentren unidos a microtúbulos que generen tensión que pueda segregar a las mismas hacia polos opuestos del huso mitótico. El arresto mitótico prolongado promueve la muerte celular y puede ser inducido mediante el tratamiento con fármacos que alteran la dinámica de los microtúbulos. Sin embargo, el mecanismo que causa la muerte celular como consecuencia del arresto mitótico aún no ha sido elucidado. Se ha propuesto que el antagonismo entre las señales pro y anti-apoptóticas y un umbral de degradación de ciclina B definen el desenlace del arresto mitótico: la muerte celular o la entrada a la fase G1 del ciclo. Dentro de las proteínas antiapoptóticas, Survivina destaca como candidato entre las que podrían participar en el desenlace del arresto mitótico, ya que además de participar en la segregación cromosómica y la citocinesis, se ha encontrado sobre-expresada en la mayoría de los tipos de cáncer conocidos y ha sido relacionada con un pronóstico desfavorable en la enfermedad, baja supervivencia de los pacientes, recurrencia y resistencia a fármacos. Adicionalmente, el gen de Survivina da origen a 4 isoformas por empalme alternativo: 2B, Δ ex3, 3B y 2 α . Dos de ellas, 2B y Δ ex3, participan en la regulación de la muerte celular. Sin embargo ninguna de estas variantes ha demostrado tener funciones en la segregación cromosómica.

El objetivo de este trabajo fue determinar la relación de la Survivina y de sus variantes 2B y Δ ex3 con la muerte celular inducida por arresto mitótico en células HCT116.

Resultados: El análisis de la mitosis de células HCT116 tratadas con taxol y vinblastina mostró que existen diferentes desenlaces del arresto mitótico: algunas células mueren, mientras que otras adquieren una morfología multinucleada. Al observar las células tratadas con taxol en video, se distinguieron algunas que al morir muestran morfología apoptótica, otras que muestran morfología necrótica, otras que mueren al intentar llevar a cabo la citocinesis y algunas células que muestran una mezcla de más de una de las morfologías mencionadas. Por otro lado, al examinar la localización intracelular de Survivina y sus variantes 2B y Δ ex3 a lo largo del ciclo celular, se observó que durante la mitosis, Survivina muestra una localización característica del Complejo Pasajero Cromosómico- que se localiza inicialmente en los centrómeros y después migra al cuerpo medio y al anillo contráctil en la citocinesis. El arresto mitótico no modifica la localización centromérica de Survivina. Durante la interfase, Survivina se encuentra difusa en toda la célula. Por otro lado, Survivina 2B se localiza principalmente en el núcleo durante la interfase y muestra una localización dinámica durante la mitosis: en los centrosomas de

profase a metafase y después en el anillo contráctil durante la citocinesis. El arresto mitótico induce la acumulación de Survivina 2B en centrosomas no separados. En cuanto a la Survivina $\Delta\text{ex}3$, se observó en el nucleolo durante la interfase y difusa en la célula durante la mitosis. Sin embargo, esta proteína es indetectable durante la anafase. El arresto mitótico inhibe la degradación de Survivina $\Delta\text{ex}3$ al impedir el inicio de la anafase. Así mismo, se observó que ni Survivina 2B ni Survivina $\Delta\text{ex}3$ colocalizan con las mitocondrias en mitosis ni en interfase en células tratadas con taxol ni en células control.

Conclusiones: La muerte inducida por arresto mitótico es más heterogénea de lo que se ha considerado previamente. La muerte celular asociada a la citocinesis fallida podría constituir un nuevo tipo de muerte celular característico del arresto mitótico.

Por otro lado, Survivina 2B podría participar en la división celular al interactuar con los centrosomas y localizarse en el anillo contráctil durante la citocinesis. Esta localización también puede relacionarse con la muerte observada durante la citocinesis que mostraron algunas células tratadas con taxol.

Igualmente, Survivina $\Delta\text{ex}3$ podría ser objeto de la degradación inducida por el Complejo Promotor de la Anafase, ya que es indetectable durante la anafase. Su degradación podría ser necesaria para la sobrevivencia de las células durante la mitosis tal como se ha demostrado en células interfásicas. De esta manera, el arresto mitótico podría inducir la muerte de las células al bloquear la degradación de Survivina $\Delta\text{ex}3$.

ABSTRACT

Background: Eukaryotic organisms possess a mechanism that controls anaphase onset known as the *Mitotic Checkpoint Complex* (MCC). The MCC stops mitosis progression in response to kinetochores unattached from the mitotic spindle or in response to lack of tension that can pull sister chromatids towards the spindle poles. This “stop signal” can be experimentally achieved through the use of anti-microtubule agents. Prolonged mitotic arrest induces cell death in a yet non-elucidated mechanism. It has been hypothesized that the antagonism between pro and anti-apoptotic signals and a cyclin B degradation threshold define cell fate after mitotic arrest: death in mitosis or entry into the G1 cell cycle phase. Survivin is an outstanding member of the IAP family member that could have a determinant role in mitotic arrest outcome. In addition to its functions as a chromosome segregation regulator, Survivin is over-expressed in most human cancers and has been correlated to poor prognosis, poor patient survival, disease recurrence and drug resistance.

The Survivin gene produces 4 splice variants in addition to wild type Survivin: 2B, Δ ex3, 3B and 2 α . Survivin 2B and Survivin Δ ex3 participate in cell death regulation. Nonetheless, none of Survivin variants has been shown to participate in chromosome segregation.

The aim of this project was to determine the relation of Survivin and of its splice variants 2B and Δ ex3 to the mitotic arrest-induced cell death in HCT116 cells.

Results: Analysis of taxol and vinblastine treated HCT116 cells showed that there are two main mitotic arrest outcomes: some cells die while others become multinucleated. Time-lapse microscopy of taxol-treated cells revealed that different morphologies can be distinguished among dying cells: some cells display apoptotic characteristics, some others display necrotic characteristics, some die while trying to complete an irregular cytokinesis and yet some cells display a combination of these features. On the other hand, the Survivin and its variants' subcellular localizations were assessed throughout the cell cycle. Survivin is found diffuse in the cell during interphase. However it shows a typical Chromosomal Passenger Complex localization during mitosis: it first localizes to centromeres from prophase to metaphase and is then re-located to the mid-body and the contractile ring during cytokinesis. Survivin's localization to metaphase centromeres remains unchanged during mitotic arrest. In interphase cells, Survivin 2B is mainly localized to non-heterochromatin regions in the nucleus. In mitosis, Survivin 2B is confined to centrosomes in prophase, metaphase and anaphase cells and later re-localizes to the contractile ring during cytokinesis. Mitotic arrest induces Survivin 2B accumulation in non-

separated centrosomes. Besides, during interphase Survivin Δ ex3 is mainly accumulated at the nucleolus. During mitosis, Survivin Δ ex3 is found diffuse throughout the cell and shows a sharp decrease in anaphase. Mitotic arrest inhibits Survivin Δ ex3 degradation.

Staining with MitoTracker revealed that neither Survivin 2B nor Survivin Δ ex3 co-localize with mitochondria at any phase of the cell cycle in taxol treated or control cells.

Conclusions: Mitotic arrest-induced cell death is more heterogeneous than previously recognized. Cytokinesis failure-related cell death could constitute a novel type of cell death triggered by mitotic arrest.

On the other hand, Survivin 2B could participate in cell division by interacting with centrosomes and localizing to the contractile ring during cytokinesis. This localization could be related to the cytokinesis-related cell death.

Furthermore, Survivin Δ ex3 could be object of the Anaphase Promoting Complex-induced degradation, since it is undetectable during anaphase and the mitotic arrest inhibits its degradation. Survivin Δ ex3 degradation during mitosis might be necessary for cell survival as it has been previously demonstrated for interphase cells. Thus, inhibiting the degradation of Survivin Δ ex3 could promote mitotic arrest-induced cell death.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
<u>EL CICLO CELULAR</u>	1
CINASAS DEPENDIENTES DE CICLINA	2
FASE G1	2
CONTROL DE LA TRANSICIÓN G1-S	3
SÍNTESIS	3
FASE G2	3
CONTROL DE LA TRANSICIÓN G2-M	3
FASE M	4
ANCLAJE DE LOS CROMOSOMAS AL HUSO MITÓTICO	5
EL COMPLEJO PASAJERO CROMOSÓMICO	6
EL PUNTO DE MONITOREO MITÓTICO	8
MUERTE CELULAR INDUCIDA POR ARRESTO MITÓTICO	8
MUERTE CELULAR	10
<u>CÁNCER: ENFERMEDAD DEL CICLO CELULAR</u>	11
<u>SURVIVINA</u>	13
EXPRESIÓN Y ESTABILIDAD DE SURVIVINA	13
SURVIVINA EN LA MITOSIS	14
SURVIVINA EN LA INHIBICIÓN DE LA MUERTE	15
ISOFORMAS DE SURVIVINA	15
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
PREGUNTA	19
HIPÓTESIS	19
MATERIALES Y MÉTODOS	19
CULTIVO CELULAR	19
SINCRONIZACIÓN DE LOS CULTIVOS	19
DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE MITÓTICO	19
WESTERN BLOT	20
RT-PCR	20

<i>VIDEOMICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA</i>	21
<i>INMUNOFLUORESCENCIA</i>	21
RESULTADOS	23
<i>EXPRESIÓN Y ABUNDANCIA DE LAS VARIANTES DE SURVIVINA</i>	23
<i>LOCALIZACIÓN DE LAS VARIANTES DE SURVIVINA</i>	26
<i>ANÁLISIS DEL ÍNDICE MITÓTICO INDUCIDO POR TAXOL Y VINBLASTINA</i>	27
<i>ANÁLISIS DE LA MITOSIS EN TIEMPO REAL</i>	32
<i>LAS VARIANTES DE SURVIVINA DURANTE EL ARRESTO MITÓTICO</i>	37
DISCUSIÓN	42
<i>OSCILACIÓN DEL ÍNDICE MITÓTICO EN RESPUESTA A VINBLASTINA</i>	42
<i>TRATAMIENTO CON TAXOL</i>	43
<i>VARIACIÓN EN LA ACTIVACIÓN DEL ARRESTO MITÓTICO</i>	44
<i>VARIACIÓN EN EL TIEMPO DE ARRESTO Y TIPO DE MUERTE</i>	46
<i>LAS VARIANTES DE SURVIVINA Y SU RELACIÓN CON LA MUERTE EN CÉLULAS MITÓTICAS</i>	47
<i>DINÁMICA NOVEDOSA DE LOCALIZACIÓN/DEGRADACIÓN DE SURVIVINA 2B Y ΔEX3</i>	50
CONCLUSIONES	51
PERSPECTIVAS	51
REFERENCIAS	53
ABREVIATURAS	59
ABREVIATURAS DE MEDIDAS	60

ÍNDICE DE IMÁGENES Y TABLAS

<i>IMAGEN 1: ACTIVIDAD DE LOS DISTINTOS COMPLEJOS CICLINA-CINASA A LO LARGO DEL CICLO CELULAR</i>	1
<i>IMAGEN 2: MODELO DE LOS UMBRALES DE ABUNDANCIA DE CICLINA B Y SEÑALES PORAPOPÓTICAS PROPUESTO POR GASCOIGNE Y TAYLOR</i>	10
<i>IMAGEN 3: ESTRUCTURA PROTÉICA DE LAS VARIANTES DE SURVIVINA</i>	16
<i>IMAGEN 4: EXPRESIÓN DE LAS VARIANTES DE SURVIVINA EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER COLO-RECTAL</i>	24
<i>IMAGEN 5: EXPRESIÓN DE LAS VARIANTES DE SURVIVINA EN CÉLULAS HCT116</i>	25

<i>IMAGEN 6: DETECCIÓN POR WESTERN BLOT DE LAS VARIANTES DE SURVIVINA</i>	26
<i>IMAGEN 7: LOCALIZACIÓN DE SURVIVINA A LO LARGO DEL CICLO CELULAR</i>	27
<i>IMAGEN 8: LOCALIZACIÓN DE LAS VARIANTES DE SURVIVINA 2B Y ΔEX3</i>	28
<i>IMAGEN 9: DINÁMICA DE LOCALIZACIÓN DE SURVIVIN ΔEX3 A LO LARGO DEL CICLO CELULAR</i>	29
<i>IMAGEN 10: CURSO TEMPORAL DEL TRATAMIENTO CON TAXOL</i>	30
<i>IMAGEN 11: CURSO TEMPORAL DEL ÍNDICE MITÓTICO EN RESPUESTA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE VINBLASTINA</i>	31
<i>IMAGEN 12: ANÁLISIS DE LA DIVISIÓN MITÓTICA DE CÉLULAS HCT116 EN TIEMPO REAL</i>	33
<i>IMAGEN 13: ANÁLISIS DE LA MITOSIS DE CÉLULAS HCT116 TRATADAS CON TAXOL EN TIEMPO REAL</i>	34
<i>IMAGEN 14: GRÁFICA DE SOBREVIVENCIA EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON TAXOL</i>	35
<i>IMAGEN 15: MORFOLOGÍAS OBSERVADAS EN LAS CÉLULAS TRATADAS CON TAXOL EN VIDEO</i>	37
<i>IMAGEN 16: EL TRATAMIENTO CON TAXOL NO AFECTA LA LOCALIZACIÓN DE SURVIVINA DURANTE EL ARRESTO MITÓTICO</i>	38
<i>IMAGEN 17: EL TRATAMIENTO CON VINBLASTINA NO AFECTA LA LOCALIZACIÓN DE SURVIVINA DURANTE EL ARRESTO MITÓTICO</i>	39
<i>IMAGEN 18: LOCALIZACIÓN DE SURVIVINA 2B Y ΔEX3 EN CÉLULAS TRATADAS CON TAXOL</i>	40
<i>IMAGEN 19: LAS VARIANTES DE SURVIVINA 2B Y ΔEX3 NO COLOCALIZAN CON LAS MITOCONDRIAS</i>	41
<i>IMAGEN 20: COMPARACIÓN DE LA DINÁMICA DE ARRESTO MITÓTICO OBSERVADA EN LAS LAMINILLAS CONTRA LA OBSERVADA EN EL VIDEO</i>	45
<i>TABLA 1: REACCIÓN DE PCR</i>	20
<i>TABLA 2: ANÁLISIS DEL VIDEO DE TRATAMIENTO CON TAXOL</i>	36

MATERIAL ADICIONAL (CD)

El material adicional incluye los siguientes videos (referidos en la Tabla 2):

Células control plano 2

Taxol 100 nM video completo plano 2

Célula 6 plano 3

Célula 2 plano 3

Célula 7 plano 2

Célula 27 plano 2

Célula 31 plano 2

Células 32 y 36 plano 3

Célula control plano 3

INTRODUCCIÓN

La continuidad de la vida se deriva directamente del desarrollo y división de células individuales (Rudolph Virchow)

1.- El ciclo celular

La reproducción celular es fundamental para la continuidad de la vida. Consiste en el crecimiento y duplicación de las células y consta de una secuencia de eventos conocida como el **ciclo celular**, el cual es objeto de una fina regulación que sincroniza sus fases y determina el contexto en que cada una de éstas ocurre.

En los metazoarios, la regulación del ciclo celular establece un equilibrio entre la muerte, la proliferación y la quiescencia que resulta esencial para el funcionamiento correcto de los tejidos. Este equilibrio está regulado por la

comunicación intercelular: todas las células normales requieren de señales externas para poder dividirse ¹. De esta manera, la coordinación de la reproducción celular les permite a los organismos mantener la homeostasis o bien, crecer y reparar daño cuando así lo requieren.

El ciclo celular ha sido organizado en cuatro fases a fin de facilitar su estudio (**G1**, **S**, **G2** y **M**). El paso por cada fase es regulado mediante cambios en la abundancia, modificaciones post-traduccionales y formación o disociación de complejos de proteínas clave. La familia de las cinasas dependientes de ciclina (**CDKs**) orquesta muchos de los eventos que dirigen el ciclo celular por medio de la fosforilación de cinasas cuya expresión es constante a lo largo del ciclo pero que sólo son activas cuando se encuentran unidas a ciclinas. Las ciclinas, a su vez son proteínas cuyos niveles varían en las distintas fases del ciclo celular ².

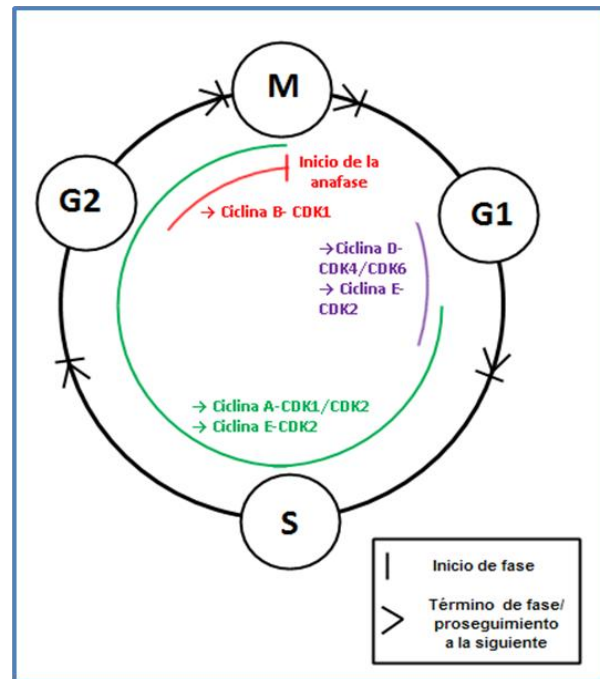


Imagen 1: Actividad de los distintos complejos ciclina-cinasa a lo largo del ciclo celular.

De esta forma, se distinguen complejos característicos de cada fase del ciclo celular (Imagen 1) ³:

- Ciclina D en complejo con la CDK4 o CDK6 durante G1
- Ciclina E en complejo con la CDK2 en la transición G1/S y durante S
- Ciclina A en complejo con la CDK1 o CDK2 durante S y G2
- Ciclina B en complejo con la CDK1 durante M

A continuación, se presentan brevemente los eventos del ciclo celular eucarionte y se abordan algunos aspectos de su regulación, con referencia especial a lo que ocurre en células humanas.

CINASAS DEPENDIENTES DE CICLINA

En mamíferos existen 20 CDKs distintas, de las cuales sólo 4 están relacionadas directamente con el ciclo celular: CDK1, CDK2, CDK4, CDK6 y CDK7. Esta última funciona como activador de las demás ciclinas ⁴.

La actividad de las CDKs es regulada por cambios en su conformación tridimensional: la unión con ciclinas aumenta ligeramente la actividad de la cinasa y expone un sitio de fosforilación activadora. Esta última (mediada por CDK7-ciclinaH/CAK) aumenta aproximadamente 100 veces la actividad del complejo ciclina-CDK ⁵.

También existen proteínas de unión que disminuyen la actividad de los complejos de las cinasas en cuestión: las proteínas de la familia Cip se unen al complejo ciclina-CDK de tal forma que impiden la acción del sitio catalítico y del sitio de unión al ATP. Por otra parte, las proteínas de la familia INK4 se unen a las CDKs y les provocan un cambio conformacional que impide su unión con ciclinas ⁵. Así mismo, las fosforilaciones de la treonina 14 y de la tirosina 16, mediadas por WEE1 y MYT1 respectivamente, inhiben la función de CDK1. Sin embargo, esta inhibición puede ser librada por la fosfatasa CDC25 ⁶.

FASE G1

La fase G1 (*gap 1*) es la etapa del ciclo celular que sigue a la mitosis. En ella, la célula comienza a sintetizar ciclinas de G1, particularmente ciclina D ⁷. El **Complejo Promotor de la Anafase/Ciclosoma** (de aquí en adelante referido como APC), al estar asociado con CDH1, promueve la destrucción de la ciclina B residual (su destrucción es mediada al final de la anafase por la asociación con CDC20).

CONTROL DE LA TRANSICIÓN G1-S

A fin de dar inicio a la fase S, la CDK4 fosforila a retinoblastoma (Rb), un inhibidor de E2F. Una vez fosforilada, Rb se disocia de E2F y al hacerlo permite su actividad como factor transcripcional: E2F estimula la transcripción de genes necesarios para la replicación del DNA, entre los cuales destacan la DNA polimerasa II, la ciclina E, CDK1, (que también fosforila a Rb ⁴) y la topoisomerasa 2, necesaria para la remodelación de la cromatina durante la replicación del DNA ⁸.

El control de la transición G1-S está acoplado a la detección de factores extracelulares. Existen algunas vías de señalización que permiten detectar si las condiciones del ambiente y de la célula son favorables para que ésta se pueda dividir (*e.g.* nutrientes, oxígeno, señales proliferativas y antiproliferativas, etc.). Estas vías están principalmente acopladas a p53, que al ser activada promueve la transcripción de p21. A su vez, p21 inhibe la fosforilación de Rb, impidiendo así la progresión del ciclo celular y el inicio de la fase S ⁹.

SÍNTESIS

La fase S (síntesis del DNA) es considerada el inicio del ciclo celular: durante ésta, la célula se ve comprometida a replicarse, ya que la mayoría de los eventos del ciclo que ocurren a partir de ese momento son irreversibles. En la fase S ocurren la replicación del genoma y del centrosoma. La replicación del genoma en eucariontes tarda entre 10 y 12h, aproximadamente la mitad del tiempo que dura el ciclo ⁷.

FASE G2

Durante la fase G2, la célula da inicio a la producción de proteínas necesarias para la división celular (*e.g.* tubulina), así como a algunos cambios epigenéticos necesarios para la condensación del DNA en cromosomas. Al final de la fase G2, la CDK1 es activada por algunas modificaciones post-traduccionales: CDC25 la libera de dos fosforilaciones inhibitorias y CDK7 le agrega una fosforilación activadora. Estas modificaciones, así como su asociación con la ciclina B le permiten a la CDK1 estimular el inicio de la mitosis ⁶.

CONTROL DE LA TRANSICIÓN G2-M

El punto de monitoreo de G2 (o punto de monitoreo de la replicación) es una vía de señalización que resguarda la fidelidad del genoma. Funciona como un mecanismo de

freno que detiene la progresión del ciclo celular antes de la mitosis en respuesta a daño al DNA (e.g. por radiación ionizante). Éste daño es detectado por las proteínas ATM y ATR, que entonces activan a las cinasas CHK1 y CHK2. Éstas fosforilan a p53 y disminuyen su afinidad por MDM2, una ubiquitin ligasa que provoca la degradación de p53 ¹⁰. De esta manera, se favorece la actividad transcripcional de p53, que da lugar a la expresión de genes proapoptóticos (Smac/DIABLO, Puma) y de p21, un inhibidor de la CDK1 y CDK4, entre otros ⁹.

De manera paralela, CHK1 y CHK2 inhiben mediante fosforilación a CDC25: la fosforilación de CDC25 crea un sitio de reconocimiento para proteínas de la familia 14-3-3, que la secuestra y mantiene fuera del núcleo celular, impidiendo así su funcionamiento ¹⁰. Las proteínas 14-3-3 constituyen una familia de proteínas que se unen a serinas y treoninas fosforiladas y así regulan la actividad de diversas vías de señalización ^{11,12}.

El punto de control de G1 también actúa en respuesta al atasco de horquillas de replicación por medio de la activación de las mismas proteínas (ATM y ATR). Así, esta vía de señalización impide la entrada en mitosis mientras el material genético no ha sido completamente replicado y controla que la célula repare errores en el DNA antes de proseguir con el ciclo celular. Sin embargo, cuando el daño es demasiado severo para ser reparado, inicia un programa de muerte celular ¹⁰.

FASE M

La fase M da lugar a la división celular. Esta última ocurre en dos etapas: la mitosis, momento en el cual el material genético duplicado es repartido de manera equitativa a los polos de la célula y la citocinesis, proceso mediante el cual el citoplasma es repartido. A fin de facilitar su estudio, la mitosis está dividida en cinco fases ^{7,13}:

- Profase: los cromosomas se condensan dando lugar a la estructura más compacta que pueden formar; las cromátidas hermanas están unidas por anillos de cohesina y cuentan con cinetocoros, complejos proteicos que forman la interfase entre los centrómeros y la maquinaria de replicación. Da inicio la formación del huso mitótico, organizado por los centrosomas, que se desplazan hacia polos opuestos de la célula.
- Prometáfase: Se desensambla la envoltura nuclear; a partir de este momento los cinetocoros de cada cromosoma pueden interactuar con los microtúbulos del huso mitótico.

- Metafase: El cinetocoros de cada cromátida hermana se une a microtúbulos provenientes de polos opuestos del huso. Los cromosomas son alineados en el ecuador de la célula.
- Anafase: Las cromátidas hermanas son segregadas hacia polos opuestos del huso mitótico mediante dos fuerzas mecánicas independientes:
 - Anafase A, que consiste en el acortamiento de los microtúbulos
 - Anafase B, que consiste en el alejamiento de los polos del huso.
- Telofase: Los cromosomas llegan a los polos del huso y da inicio el ensamblaje de la envoltura nuclear alrededor de cada juego diploide de cromosomas.

Finalmente, el citoplasma es repartido entre las dos células hijas en la citocinesis. Este proceso consiste en el estrechamiento del ecuador de la célula mediado por el anillo contráctil, una estructura formada principalmente por actina y miosina. La contracción del ecuador de la célula es acompañada de la fusión de vesículas de membrana citoplasmática a cada lado del anillo contráctil para completar la superficie necesaria para sellar ambas células hijas. De esta manera, la citocinesis da como resultado dos células con citoplasmas totalmente independientes.

ANCLAJE DE LOS CROMOSOMAS AL HUSO MITÓTICO

Cada cromosoma cuenta con una plataforma donde se ensamblan los complejos proteicos que interaccionan directamente con los microtúbulos del huso mitótico: el centrómero. Consiste en una secuencia de repetidos de DNA llamados α -satélites, usualmente localizada en el centro de cada cromosoma. Una característica epigenética distintiva del centrómero es la prevalencia de la variante de histona 3, CENP-A. Ésta inicia el reclutamiento de los componentes del cinetocoro al inicio de la mitosis, con la ayuda de un complejo proteico conocido como CCAN (*Constitutive Centromere Associated Network*)¹⁴.

Si bien estos factores son necesarios para el funcionamiento correcto de los cinetocoros, el que sujeta directamente los microtúbulos al cinetocoro es el complejo KMN (constituido por KNL-1, Mis12 y HEC1/Ndc80)^{15,16}. Sin embargo, recientemente ha sido descubierto que RNAs no codificantes (ncRNAs) forman parte estructural de los cinetocoros y son transcritos durante la mitosis e incluso son esenciales para la segregación cromosómica¹⁷. Estos ncRNAs son codificados en los repetidos centroméricos. Uno de los mecanismos de acción propuestos para estos transcritos es la

interacción con la proteína CENP-C, que facilita la localización de esta última en el cinetocoro¹⁸.

EL COMPLEJO PASAJERO CROMOSÓMICO

El **Complejo Pasajero Cromosómico** (CPC) es otro elemento clave en la división celular: se trata de un complejo proteico formado por Survivina, INCENP, Borealina y Aurora B y que muestra una localización dinámica a lo largo de la fase M. Las funciones del CPC son atribuidas principalmente a la cinasa Aurora B, aunque las otras subunidades son importantes en la regulación del mismo: Survivina determina la localización del CPC, mientras que INCENP es necesaria para la activación de Aurora B¹⁹ y Borealina parece fungir como adaptador para la unión de Survivina e INCENP²⁰.

Las funciones del CPC aún no han sido totalmente elucidadas, pero existe evidencia de que participa en al menos 5 aspectos de la división celular:

- Estructura de la cromatina: Aurora B fosforila la histona 3 en los residuos de serina 10 y 28 (referidas como H3S10ph y H3S28ph, respectivamente) en células de mamíferos y está asociada a la condensación de los cromosomas²¹. La H3S28ph comienza a aparecer en las células en profase, mientras que la H3S10 en G2²², por lo que aún no se sabe si alguna otra subunidad del CPC esté involucrada en llevar a cabo esta fosforilación o es producto de la interacción de Aurora B con algún otro factor. También fosforila algunas subunidades de la condensina y se cree que estas fosforilaciones pueden facilitar su ensamblaje, aunque esta vía aún es controversial²⁰.
- Punto de Monitoreo Mitótico: El CPC podría mediar directamente la activación del Punto de Monitoreo Mitótico (PMM), ya que ha sido demostrado que tanto INCENP como Survivina son necesarias para el arresto mitótico inducido por taxol, al facilitar el reclutamiento de BUBR1 al cinetocoro^{20,23}.
- Formación del huso mitótico: En humanos, la participación del CPC en la formación de huso mitótico fue evidenciada por células carentes de Borealina, cuyo huso mitótico se desarma en metafase. Por otro lado, se ha observado en extractos de huevos de *Xenopus laevis* que Aurora B inhibe mediante fosforilación la actividad de MCAK (que despolimeriza microtúbulos) y de Estatmina (que inhibe la polimerización de microtúbulos)²⁰.
- Unión de microtúbulos al cinetocoro y segregación cromosómica: el CPC es necesario para la bi-orientación correcta de los cromosomas en una amplia gama

de organismos eucariontes ²⁰. Se cree que Aurora B es la encargada de detectar la falta de tensión en el centrómero y en respuesta, desestabilizar las uniones incorrectas del cinetocoro a los microtúbulos ¹⁹. Un modelo propuesto para esta función plantea que existe un gradiente de fosforilación de Aurora B para sus sustratos. Algunos de estos se encuentran en la placa exterior del cinetocoro y mientras más alejados están de Aurora B, su interacción con la cinasa es menos probable. Dicho de otra forma, cuando se genera tensión que aleja al cinetocoro del centrómero, existe una menor probabilidad de que Aurora B pueda fosforilar a sus sustratos. La mayoría de las fosforilaciones que ejerce Aurora B sobre sus blancos son inhibitorias. Entre éstas, destacan las fosforilaciones de HEC1/Ndc80 y de KNL1, proteínas indispensables para sujetar el cinetocoro a los microtúbulos del huso ¹⁹.

Cabe destacar que la bi-orientación de los cromosomas es necesaria para que pueda haber tensión en el centrómero al someter los cinetocoros de cromátidas hermanas a fuerzas que los atraigan hacia polos opuestos del huso. Aurora B desestabiliza todas las uniones que no cumplen con estos requisitos ¹⁹.

- Citocinesis: el CPC es indispensable para llevar a cabo la citocinesis. Se sabe que la inhibición de sus componentes impide la compleción de este proceso. Sin embargo, no se conocen los mecanismos en los cuales interviene durante la citocinesis ²⁰.

Las funciones del CPC rigen su localización a lo largo de la división celular: éste se concentra en el centrómero interno desde el inicio de la profase y permanece allí hasta la anafase, momento en el cual se relocaliza al cuerpo medio, donde se mantiene hasta el término del estrechamiento del anillo contráctil. Sin embargo, no se sabe con qué factores se asocia durante la citocinesis.

El CPC es incorporado al centrómero interno por dos marcas epigenéticas clave: la fosforilación de la treonina 3 de la histona 3 (H3T3ph), realizada por Haspina y la fosforilación de la treonina 120 de la histona 2A (H2AT120ph), llevada a cabo por BUBR1 ²⁴. Así, el reclutamiento del CPC al centrómero interno es facilitado por el reconocimiento y asociación de la H3T3ph con un sitio de unión que se encuentra en el dominio BIR de Survivina. En el caso de la H2AT120ph, la proteína Shugoshina actúa como adaptador entre la serina fosforilada y Survivina, anclando así el CPC mediante un mecanismo indirecto ²⁴.

EL PUNTO DE MONITOREO MITÓTICO

En células eucariontes existe un mecanismo que controla el inicio de la anafase: el **Punto de Monitoreo Mitótico** (PMM). Su función consiste en detener la progresión de la mitosis antes de la anafase, hasta que todos los cinetocoros de la cromátidas se encuentren unidos a microtúbulos que generen tensión a fin de segregar a las mismas hacia polos opuestos del huso mitótico. El PMM actúa mediante la inhibición del APC y la concomitante inhibición de la degradación de securina y ciclina B. La degradación de estas proteínas es necesaria para el avance de la mitosis ya que securina es un inhibidor de la proteasa separasa, quien a su vez, se encarga de cortar la subunidad Rad21 de la cohesina²⁰, permitiendo así la separación de las cromátidas hermanas. Por su parte, la degradación de la ciclina B permite la pérdida de fosforilación de los sustratos de CDK1, marcando así el fin de la mitosis. En contraste con lo que ocurre con los puntos de monitoreo de G1 y de G2, el PMM se activa en cada ciclo celular. Se puede ver más bien como un sistema que está encendido desde el inicio de la profase y que se inactiva para permitir la progresión del ciclo.

Los principales efectores del PMM son las proteínas MAD2, BUBR1 y BUB3, que secuestran a CDC20, un cofactor del APC. La pausa resultante en el ciclo es conocida como arresto mitótico²⁵.

MUERTE CELULAR INDUCIDA POR ARRESTO MITÓTICO

El arresto mitótico se puede lograr experimentalmente mediante el uso de fármacos que perturban la dinámica de los microtúbulos. Estos compuestos han tenido excelentes resultados en la terapia contra ciertos tipos de cáncer²⁶⁻²⁸; inducen la detención en mitosis prolongada que, se ha demostrado ocasiona la muerte celular²⁹. Sin embargo, los mecanismos detrás de este tipo de muerte aún no han sido elucidados²⁶.

Por otra parte, no se ha definido un umbral de tiempo para determinar que una célula está arrestada en mitosis ya que el desenlace del arresto mitótico es altamente heterogéneo. Los distintos desenlaces del arresto mitótico que se han observado hasta el momento son^{26,30}:

- Células que logran excluir la droga que causa el arresto mitótico y se dividen, formando dos células hijas con contenido diploide de DNA (ocurre con dosis muy bajas de las drogas).
- Células que sobreviven al arresto mitótico pero no logran repartir su citoplasma y dan como resultado células tetraploides. En esta clasificación, se distinguen tres desenlaces distintos:
 - Las que continúan ciclando.
 - Las que mueren en G1.
 - Las que se vuelven senescentes.
 - Células que mueren en mitosis.

Los factores que determinan los distintos desenlaces del arresto mitótico incluyen: el organismo del que proviene la célula, el tejido de origen, la droga usada y su concentración, el tiempo de tratamiento y la temperatura de incubación ³¹. Las células humanas son particularmente susceptibles al arresto mitótico y tienden a morir a consecuencia de éste más que células de otras especies. Una posible causa para esta susceptibilidad es que acumulan una mayor concentración intracelular de las drogas ³¹. Sin embargo, incluso dos células humanas cancerosas que provienen de la misma célula madre no necesariamente sufren el mismo desenlace. Esto ha llevado a buscar otros determinantes que puedan variar en células de la misma línea (e incluso provenientes de la misma célula madre) que puedan explicar las distintas susceptibilidades al arresto mitótico. Un modelo de lo que puede estar ocurriendo plantea que, mientras que un umbral de degradación de la ciclina B marca el inicio de la anafase, existe otro umbral de acumulación de señales pro-apoptóticas. De esta manera, las células que logran cruzar el umbral de degradación de ciclina B antes que el de apoptosis salen de mitosis y entran a G1. Algunas de estas células mueren a causa del punto de monitoreo de G1 (que se cree puede detectar la tetraploidía como un daño al DNA ³²). Por su parte, las células que cruzan el umbral apoptótico antes que el de degradación de ciclina B mueren en mitosis ³⁰ (Imagen 2). Sin embargo, este modelo no ofrece una explicación de la generación de células senescentes y aún falta definir los factores que determinan el desenlace del arresto mitótico *i.e.* cambios en concentración, conformación o localización de moléculas clave (proteínas, RNAs, etc.) a lo largo del mismo.

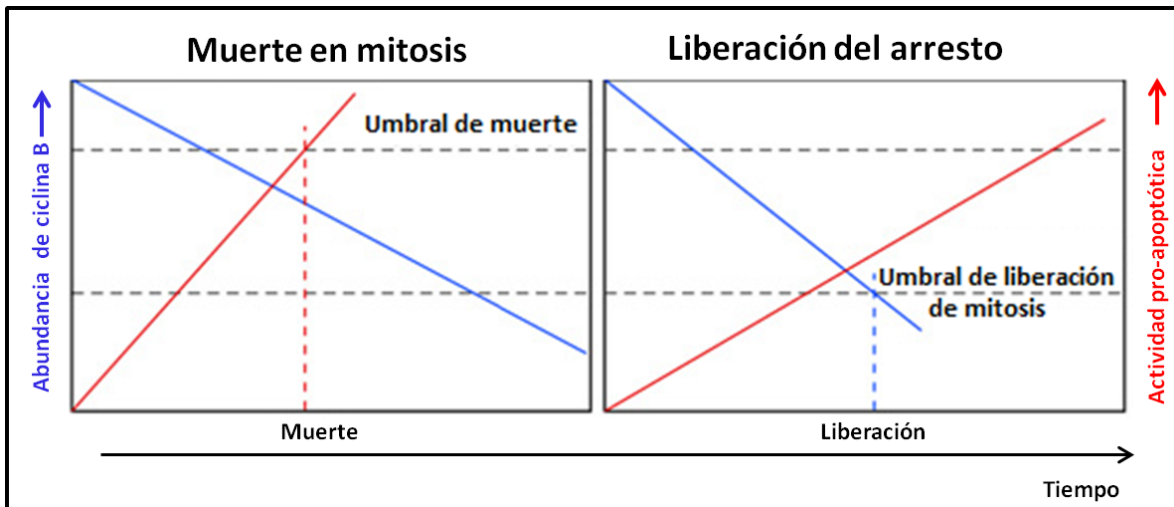


Imagen 2. Modelo de los umbrales de abundancia de ciclina B y de señales proapoptóticas propuesto por Gascoigne y Taylor. Este modelo plantea que el desenlace del arresto mitótico (muerte en mitosis o liberación del arresto mitótico) es definido por los cambios en dos parámetros de la célula: 1) abundancia de ciclina B y 2) actividad proapoptótica. Gascoigne y Taylor sugieren que para cada uno de estos parámetros existe un umbral. De esta manera, el primer parámetro que cruce su umbral correspondiente definirá el desenlace del arresto mitótico: si la acumulación de señales proapoptóticas cruza su umbral correspondiente antes que la disminución en los niveles de ciclina B, la célula morirá; de lo contrario, ésta logrará liberarse del arresto mitótico. Imagen adaptada de [22].

MUERTE CELULAR

La muerte celular ocurre de manera regulada o accidental, la primera constituye un elemento indispensable para el desarrollo embrionario correcto y el funcionamiento de tejidos adultos, mientras que en la segunda, la célula es sometida a condiciones extremas, generalmente externas al organismo, que la destruyen sin que esta lo pueda impedir ni programar. A continuación se describen algunos aspectos de estos dos tipos de muerte ^{7,33,34}.

- Muerte celular regulada o apoptosis. Ésta se caracteriza por una serie de cambios bioquímicos y morfológicos que permiten, en organismos pluricelulares, la fagocitosis de las células muertas sin provocar inflamación. La apoptosis ocurre mediante la lisis específica de proteínas clave en la célula y cortes de doble cadena en el DNA en diversos sitios. Los fragmentos de DNA son empacados, junto con el citoplasma en vacuolas de la membrana citoplasmática llamadas cuerpos apoptóticos. En estos, la fosfatidil-serina se encuentra del lado exterior de la

membrana (lípidos de la membrana que normalmente encara hacia el citoplasma), como una señal para el sistema inmune que induce su fagocitosis.

La apoptosis puede ser iniciada por una señal intrínseca o extrínseca. En el primer caso, la célula detecta daño (e.g. radiación, toxinas, hipoxia) y en respuesta, promueve la activación de la caspasa 9 en un mecanismo dependiente de la mitocondria. La caspasa 9, a su vez, activa a las caspasa 3 (también referida como caspasa ejecutora), que lisa los sustratos necesarios para desencadenar la muerte celular apoptótica.

La apoptosis por vía extrínseca se da por la activación de receptores de la familia de TNF- α . Estos activan una vía de señalización que converge con la apoptosis intrínseca en la activación de la caspasa 3.

- Muerte celular accidental: necrosis. Esta se distingue de la apoptosis porque no implica gasto de ATP ni activación de caspasas. Algunas de sus características son la hinchazón de la célula, hinchazón y destrucción de las mitocondrias, disfunción en general de los organelos, pérdida de la integridad de la membrana citoplasmática y como consecuencia, liberación del citoplasma al medio externo. La necrosis es generalmente acompañada de inflamación de los tejidos en los que ocurre.

La sección “El ciclo celular” fue inspirada en los capítulos “El ciclo celular” y “Mitosis”, provenientes de ⁷ y ¹³ respectivamente, y en el capítulo “Apoptosis” proveniente de ⁷, así como en ³³, ³⁴ y ³⁵ para lo referente a la muerte celular.

2.- Cáncer: enfermedad del ciclo celular

“Twisted by the Dark side young Skywalker has become.” (Yoda, La Guerra de las Galaxias, episodio III; George Lucas)

El cáncer es un conjunto de enfermedades cuya característica principal es la proliferación anormal de las células. Su desarrollo se da a través de una transformación de éstas que como resultado, les permite pasar por alto los controles del ciclo celular que rigen el equilibrio entre proliferación y muerte. De esta manera, las células cancerosas perturban el funcionamiento correcto de los tejidos.

El cáncer es la tercera causa de muerte en el mundo. Se estima que en 2008 causó 7.6 millones de muertes a nivel mundial (13% del total) y se pronostica que este número

seguirá en aumento y alcanzará 13.1 millones de defunciones en 2030 (GLOBOCAN 2008). Bajo esta premisa, es necesario entender los principios moleculares del cáncer a fin de implementar su prevención y tratamiento con mayor eficiencia.

A pesar de que existe una gran variedad de tipos de cáncer, estos comparten ciertas características fundamentales que fueron descritas originalmente por Hanahan y Weinberg en el año 2000. La lista incluye: producción de señales proliferativas, insensibilidad a señales anti-proliferativas, evasión de la muerte celular, inducción de la angiogénesis, potencial replicativo ilimitado e invasión de tejidos y metástasis ¹.

Múltiples factores de riesgo, tanto ambientales como hereditarios, inciden en el desarrollo del cáncer. Se calcula que en Estados-Unidos, entre el 75 y el 80% de los casos de cáncer están asociados a factores ambientales (American Cancer Society 2012). Dichos factores pueden pertenecer a una de tres subclasificaciones: químicos, físicos y biológicos. La concepción inicial del desarrollo del cáncer se basó en experimentación en animales expuestos a agentes carcinogénicos y postulaba que este proceso consta de tres pasos: iniciación, promoción y progresión ³⁶. Más adelante, se descubrió que muchos de los carcinógenos actúan a través de la generación de mutaciones ³⁷. Sin embargo, los carcinógenos también pueden contribuir a la tumorigénesis mediante la promoción de la proliferación celular ³⁷.

Por su parte, los factores de riesgo hereditarios se han asociado con la predisposición al cáncer de ciertos individuos o con la acumulación de mutaciones necesaria para dar lugar al inicio y progresión de esta enfermedad. Algunas de estas alteraciones pueden ocurrir de manera esporádica ³⁸.

Ahora sabemos que muchos de los cambios moleculares que permiten la transformación maligna de las células caen en dos clasificaciones de genes: oncogenes y genes supresores de tumores. El primer grupo está constituido por genes cuya ganancia de función tiene repercusiones en la proliferación celular, mientras que el segundo grupo se refiere a genes cuya pérdida de función debilita los mecanismos que resguardan la fidelidad del genoma o impiden la proliferación celular. Estas alteraciones pueden ocurrir a varios niveles: control transcripcional, duplicación de un gen, remodelaciones epigenéticas, etc ⁷.

Una característica esencial para la transformación celular maligna es la inestabilidad genómica. Esta se refiere a la propensión que muestran ciertas células a sufrir cambios en el genoma, ya sea a nivel genético o en el cariotipo celular. Esta propensión les permite a las células adquirir las alteraciones que conducen la carcinogénesis, que pueden ir desde mutaciones puntuales hasta pérdidas o ganancias de cromosomas enteros. Incluso, recientemente Hanahan y Weinberg publicaron una segunda versión del artículo "The

Hallmarks of Cancer” que en el año 2000 delineaba las características universales de las células cancerosas; en dicho escrito agregaron la inestabilidad genómica como una propiedad de las células cancerosas que permite el desarrollo de los demás rasgos tumorigénicos³⁹. Sin embargo, en el caso particular de la inestabilidad cromosómica, aún no se ha podido demostrar de manera concluyente si juega un papel en la carcinogénesis²⁶.

3.-Survivina

Survivina es un multifacético miembro de la familia de las IAPs (proteínas inhibidoras de la apoptosis). Además de inhibir la muerte celular mediante distintos mecanismos, tiene importantes funciones en la segregación cromosómica como proteína pasajera de los cromosomas y como reguladora de los microtúbulos en mitosis.

Survivina se ha visto sobre-expresada en una gran variedad de tipos de cáncer⁴⁰. Incluso ocupa el cuarto lugar dentro de los transcritos que se expresan en cáncer y en no células normales⁴¹. La expresión de Survivina en cáncer ha sido correlacionada con un pronóstico desfavorable, baja sobrevida de los pacientes, recurrencia y resistencia a fármacos⁴². Dada su especificidad y aparente contribución a la patología del cáncer, Survivina constituye un atractivo blanco terapéutico.

EXPRESIÓN Y ESTABILIDAD DE SURVIVINA

El gen de Survivina se localiza en la región 25 del brazo largo del cromosoma 17 y consta de 14796nt.

La expresión de Survivina muestra un claro aumento en la transición G2/M del ciclo celular tanto en células tumorales como en células no transformadas⁴³⁻⁴⁷. El promotor de Survivina carece de caja TATA y cuenta con una isla CpG desmetilada tanto en tejido normal como en células cancerosas⁴⁸. Sin embargo, contiene tres elementos CDE (*Cycle Dependent Element*) y un elemento CHR (*Cell Cycle Homology Region*), ambos implicados en la represión de sus genes asociados durante la fase G1 del ciclo celular. Jiang *et al* demostraron que la mutación de estos dominios permite la expresión de Survivina en fibroblastos embrionarios humanos quiescentes⁴³, estableciendo una importante asociación entre el funcionamiento correcto de los mismos y la regulación transcripcional de Survivina dependiente del ciclo celular.

La región promotora de Survivina también cuenta con múltiples sitios Sp1 que facilitan la transcripción mediada por las proteínas DEC1 y Sp1^{46,48}. Otros factores transcripcionales

responsables de la expresión de Survivina identificados hasta el momento son: β -catenina, NF-kB, proteínas de la familia E2F y STAT3. De manera concordante con la abundancia de Survivina en cáncer, la actividad de estos factores transcripcionales está exacerbada en múltiples tumores ⁴⁶. Así mismo, la sobre-expresión de E2F1 en fibroblastos embrionarios humanos permite la expresión de Survivina independiente del ciclo celular, aunque este fenómeno sólo ha sido descrito en escasos modelos de células no transformadas ⁴⁹.

La poliubiquitinación de Survivina en diversos residuos de lisina facilita su degradación vía proteosoma durante las fases G1/S del ciclo celular, aunque la asociación con HSP90 aumenta su estabilidad ⁵⁰. Este mecanismo ocurre de manera totalmente independiente a su regulación transcripcional, ya que la transfección de Survivina marcada con una cola de histidinas codificada por un promotor independiente del ciclo (citomegalovirus) muestra una dinámica de degradación similar a la de la Survivina silvestre ⁴³. Estos datos contradicen la observación de Jiang *et al* que la mutación de los dominios CDE y CHR del promotor de Survivina y la sobre-expresión de E2F1 impide la degradación dependiente del ciclo celular de Survivina. Por lo tanto, aún falta definir si la sobre-expresión de Survivina en células cancerosas se debe a la actividad exacerbada de factores transcripcionales durante la fase G2 del ciclo celular, a una degradación ineficiente o, incluso, a la actividad asincrónica del promotor.

SURVIVINA EN LA MITOSIS

A partir del inicio de la mitosis, la fosforilación de la treonina 34 de Survivina a cargo de CDK1, aumenta la estabilidad de Survivina a fin de evitar su degradación y permitir la formación de dímeros (Imagen 3) ^{51,52}. Esta última característica contribuye al potencial antiapoptótico de la proteína y facilita su unión a los microtúbulos, donde organiza el huso mitótico.

Por otra parte, Survivina es esencial para el reclutamiento del CPC al centrómero interno mediante el reconocimiento de la fosforilación de la treonina 3 de la histona H3 (las funciones del CPC son revisadas a detalle en la sección “El ciclo celular”). Así mismo, Survivina regula la dinámica de los microtúbulos tanto en mitosis como en interfase ^{23,53} mediante la unión directa a éstos; incluso se ha demostrado que su presencia es necesaria para el arresto mitótico inducido por taxol o nocodazol ^{23,54}, pero no se ha explorado precisamente cómo regula su dinámica.

También existe evidencia de que Survivina puede inhibir la muerte dependiente de arresto mitótico ⁵⁵, mas no se ha demostrado el mecanismo específico de protección en este contexto. Incluso, su participación en este tipo de muerte (y de las IAPs en general) es aún controversial ⁵⁶.

La depleción experimental de Survivina causa un aumento en la apoptosis, así como errores en la localización del CPC, en la activación del PMM y en la citocinesis (que inducen poliploidía) ^{23,24,40,44,53,54,57-61}.

SURVIVINA EN LA INHIBICIÓN DE LA MUERTE

El mecanismo de inhibición de la muerte celular por parte de Survivina no es el mismo que en las demás IAPs, ya que Survivina no cuenta con el dominio de “anzuelo y plomada” (similar a las cañas de pescar) que caracteriza a esta familia de proteínas ⁶². Sin embargo, se ha demostrado que Survivina puede interactuar con las proteínas XIAP y HBXIP a fin de actuar de manera sinérgica sobre la inhibición de la caspasa 9 ^{63,64}.

La localización de Survivina en la membrana interna de la mitocondria antes del estímulo apoptótico es un prerrequisito para su actividad anti-apoptótica. Incluso, se sabe que existen algunas líneas en las que no hay poza de Survivina mitocondrial y como consecuencia el potencial anti-apoptótico de Survivina es menor ⁶⁵.

Smac/DIABLO, a su vez, promueve la degradación de Survivina vía proteosoma. Por su parte, Survivina no ejerce ningún tipo de actividad inhibitoria sobre Smac/DIABLO ⁶⁶.

ISOFORMAS DE SURVIVINA

El gen de Survivina consta de cuatro exones “dominantes” y tres exones “ocultos” en los intrones (2B, 2 α y 3 α). El procesamiento del transcrito primario por *splicing* alternativo da lugar a cuatro isoformas distintas además de Survivina:

- Survivina Δ ex3: carece del exón 3 y consta de un cambio en el marco de lectura que impone un codón de paro prematuro.
- Survivina 2B: sufre la inserción del exón críptico 2B entre los exones dominantes E2 y E3.
- Survivina 2 α : consiste únicamente de los exones 1 y 2, así como de 197 pb del intrón 2.
- Survivina 3B: sufre la inserción del exón críptico 3B entre los exones dominantes E3 y E4. Todas estas isoformas son traducidas a proteína y, en contraste con Survivina,

parecen no participar en la segregación cromosómica ^{59,60}. La actividad y localización intracelular de cada una de ellas es distinta a la de Survivina.

Las isoformas más estudiadas de Survivina son Survivina 2B y Survivina Δex3. Esta última retiene el potencial antiapoptótico de Survivina: la asociación con Bcl-2 a través de su dominio BH2 y con la caspasa 3 a través de su dominio BIR le permiten a Survivina Δex3 inhibir la apoptosis inducida por TNF-α ⁶⁷ (Imagen 3).

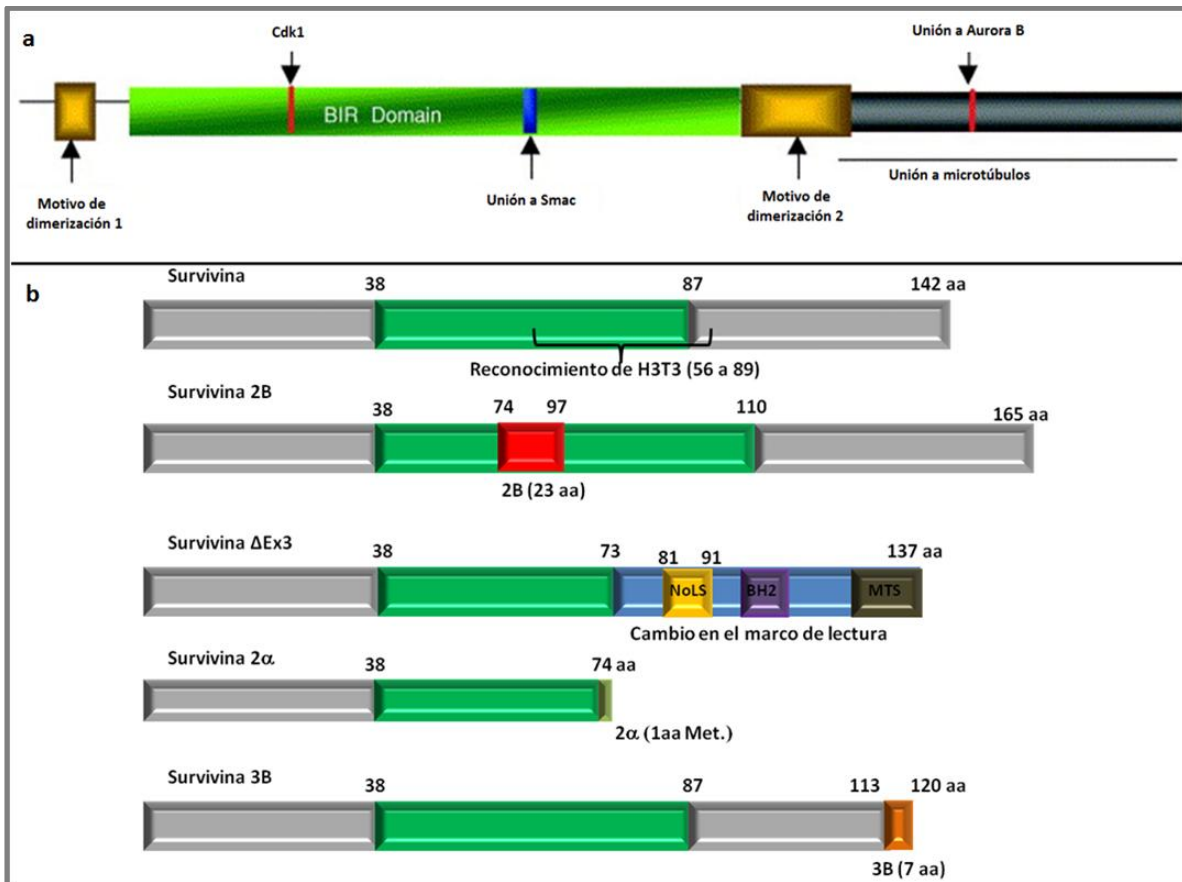


Imagen 3. Estructura proteica de las variantes de Survivina. a) Dominios de Survivina. Imagen adaptada de [44]. b) Comparación de Survivina con las demás variantes a nivel proteína. Imagen adaptada de [34]. NoLS: señal de localización nucleolar. MTS: Señal de localización mitocondrial.

Adicionalmente, Survivina Δex3 puede impedir la salida del citocromo C de la mitocondria, en células cancerosas que sobre-expresan Bax (una proteína pro-apoptótica de la familia de Bcl-2) ⁶⁷. Survivina Δex3 se localiza en el nucleolo en interfase ⁶⁸. En respuesta a la activación del receptor de linfotoxina-β, un receptor de la familia de TNF que induce apoptosis mediante la activación de la caspasa 3, Survivina Δex3 sale del núcleo y se relocaliza en mitocondrias, donde inhibe la translocación de Smac/DIABLO y la reversión

del potencial de membrana. Bajo estas mismas condiciones, Survivina Δ ex3 también interacciona con Bcl-2 e inhibe a la caspasa 3⁶⁹. De igual forma, Survivina Δ ex3 impide la activación de la caspasa 3 por un mecanismo indirecto: la inhibición de la proteína ASK1⁶⁹. Incluso, Survivina Δ ex3 puede proteger a las células de la apoptosis inducida de manera independiente de la caspasa 3 (en células MCF7 que son deficientes en esta proteína)⁶⁹.

De manera interesante, Survivina 2B tiene actividad proapoptótica. La transfección de esta proteína en células cancerosas induce la translocación de la proteína Smac/DIABLO hacia afuera de la mitocondria, así como la activación de las caspasas 3 y 9 y la reversión del potencial de mitocondria⁷⁰. Así mismo, la sobre-expresión de Survivina 2B causa una disminución en los niveles de Bcl-2 y un aumento en los de Bax⁷⁰

La proporción entre las variantes de Survivina puede regular el balance entre la muerte y la proliferación de células cancerosas⁶¹. Se cree que un factor importante que modula la actividad de Survivina es la asociación con sus isoformas. Esta interacción entre isoformas se ha demostrado mediante experimentos de inmunoprecipitación^{59,61}. También se ha demostrado que las variantes 2B y Δ ex3, particularmente 2B, pueden inmunoprecipitar a Aurora B. Incluso muestran una ligera afinidad por Borealina. Sin embargo, evidencia cristalográfica indica que la poza de Survivina que hace parte del CPC es monomérica, en contraste con la poza soluble y las que interaccionan con microtúbulos y mitocondrias^{50,71}. Adicionalmente, las isoformas de Survivina no muestran la misma localización intracelular que el CPC en mitosis. Por lo tanto, los heterodímeros de las variantes de Survivina existen en la poza soluble, en los microtúbulos o en las mitocondrias⁶¹.

La proporción entre las variantes de Survivina también está asociada con la progresión de varios tipos de cáncer⁷²⁻⁷⁷.

El control de la proporción de la expresión de las isoformas de Survivina es regulado por al menos dos factores endógenos: 1) p53 disminuye la expresión de Survivina, mientras que aumenta la de Survivina 2B^{78,79} y 2) la activación del receptor de IGF-1 estimula la degradación vía proteosoma del factor de *splicing* WTAP, a través de la vía de señalización de PI3K-Akt. La degradación de WTAP favorece la expresión de Survivina, a expensas de Survivina 2B, promoviendo así la supervivencia celular⁸⁰. También se sabe que el tratamiento con taxol aumenta la expresión de Survivina, al mismo tiempo que disminuye la de Survivina 2B⁷⁰, aunque no se ha reportado si esta modulación implica algún mecanismo de regulación del *splicing* alternativo de los transcritos de Survivina.

Las diferentes actividades de las isoformas de Survivina sitúan la regulación de este gen en una posición central en la red de interacciones que definen la muerte o sobrevida de las células en mitosis. Por ejemplo, la modulación del *splicing* alternativo de los transcritos de este gen podría actuar de manera sinérgica, favoreciendo la sobrevida o muerte celular; recordemos que al favorecer la producción de transcritos de una u otra variante, disminuye la producción de las otras. Así, el estudio detallado de los mecanismos de acción de las variantes de Survivina podría traer consigo el esclarecimiento de zonas de oportunidad para terapias antitumorales.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las células que permanecen arrestadas en mitosis de manera prolongada mueren por medio de un mecanismo que aún no ha sido elucidado. Este mecanismo es ampliamente explotado por las quimioterapias que interfieren con la dinámica de los microtúbulos. En este proceso, se ha propuesto que el antagonismo entre las señales pro y anti-apoptóticas y un umbral de degradación de ciclina B definen el desenlace del arresto mitótico: la muerte celular o la entrada a la fase G1 del ciclo. Las dos familias más importantes de proteínas anti-apoptóticas son la de Bcl2 y las de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs).

Dentro de la familia de las IAP, Survivina destaca como candidato entre las proteínas que podrían participar en el desenlace del arresto mitótico ya que:

- Junto con Livina, es la única proteína de la familia de las IAPs que está sobre-expresada en la mayoría de los tipos de cáncer conocidos ⁴² y que ha sido relacionada con un pronóstico desfavorable en la enfermedad, baja sobrevida de los pacientes, recurrencia y resistencia a fármacos ⁸¹
- El punto máximo de expresión de Survivina se ubica en la fase G2/M del ciclo celular ⁴⁰.
- Survivina está involucrada en el arresto mitótico, ya que forma parte del CPC.
- Survivina se une a los microtúbulos y contribuye a la organización del huso mitótico.

PREGUNTA

¿Qué relación hay entre la localización y/o abundancia de Survivina, Survivina 2B y Survivina Δ Ex3, con la muerte de células arrestadas en mitosis?

HIPÓTESIS

Los cambios en la localización y/o abundancia de las variantes de Survivina definen la muerte o sobrevivencia de células después de un arresto mitótico prolongado.

MATERIALES Y MÉTODOS

CULTIVO CELULAR

Las células fueron cultivadas en monocapa en medio McCoy's suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% (v/v) de antibiótico/antimicótico (Gibco, no. catálogo 15240-062). Las concentraciones finales de antibiótico/antimicótico fueron de 10 unidades/ml de penicilina, 10 μ g/ml de estreptomycin y 25 μ g/ml de anfotericina B. Se incubaron las células a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ (v/v). En este trabajo se usó como modelo principalmente la línea celular HCT116, ya que tiene un PMM eficiente y bien estudiado.

SINCRONIZACIÓN DE LOS CULTIVOS

Los cultivos celulares fueron sincronizados mediante un doble bloqueo con timidina: al llegar a una confluencia de aproximadamente 30-40%, las células fueron incubadas con timidina 2mM durante 12h, fueron liberadas del bloqueo con medio libre de timidina durante 12h y nuevamente incubadas con timidina durante otras 12h⁸². Inmediatamente después de la segunda liberación, las células fueron tratadas con taxol o vinblastina.

DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE MITÓTICO

Al término del tiempo de tratamiento, las células fueron incubadas con una solución hipotónica (HEPES 10mM, EGTA 262nM, KCl 40mM) durante 20min. Posteriormente, fueron recolectadas con una espátula y fijadas con una solución de metanol con ácido acético (3:1) durante 20 min a -20°C. Después de 3 lavados por centrifugación en solución fijadora, las células fueron goteadas sobre laminillas frías con etanol. Una vez secas, fueron teñidas con eosina y azul de metileno. A fin de determinar el índice mitótico, se

contaron 1000 células por condición (laminilla), determinando el número de células mitóticas, interfásicas, apoptóticas y poliploides. Protocolo extraído de ⁸³.

WESTERN BLOT

Para lisar las células (en hielo): al obtener una confluencia del 80-100%, se les retiró el medio de cultivo y fueron lavadas con PBS. Se les retiró el PBS completamente y se les agregó RIPA (con ortovanadato de sodio, PMSF y un coctel de inhibidores de proteasas) 1 ml/caja de 100 cm². Más adelante, fueron recolectadas con una espátula y centrifugadas a 14000 rpm durante 30 min a 4°C. Las proteínas fueron separadas por electroforesis en un gel de acrilamida al 12% y transferidas a una membrana de pvdf. Para la detección de las bandas, se usaron los mismos anticuerpos que para las inmunofluorescencias.

RT-PCR

La extracción de RNA se realizó con el kit de Qiagen RNeasy Mini kit[®] (Qiagen, no. catálogo 74160), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El cDNA se sintetizó con el kit de Invitrogen SuperScript II Reverse Transcriptase kit[®] (Invitrogen, no. catálogo 1806), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Con base en un reporte externo ⁷³, se usó el mismo oligonucleótido sentido para amplificar las tres isoformas estudiadas: 5'-CCA CCG CAT CTC TAC ATT CA-3'; los oligonucleótidos antisentido fueron: 5'-TAT GTT CCT CTA TGG GGT CG-3' para Survivina, 5'- AGT GCT GGT ATT ACA GGCGT-3' para Survivina 2B y 5'- TTT CCT TTG CAT GGG GTC-3' para Survivina Δ ex3. La tabla 1 muestra cómo se realizó la mezcla de las reacciones de PCR.

Tabla 1: Reacción de PCR			
	C. inicial	C. final	μ L
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.5 μ L
MgCl	50 mM	1.5 mM	0.75 μ L
Buffer 10x	10x	1x	2.5 μ L
Primer F	10 μ M	0.5 μ M	1.25 μ L
Primer R	10 μ M	0.5 μ M	1.25 μ L
cDNA			0.5 μ L
H2O			18 μ L
Taq			0.25 μ L
Total			25 μ L

VIDEOMICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA

A fin de poder analizar la dinámica del arresto mitótico en tiempo real, se clonó la histona H2B en el plásmido pDsRed-Express Vector® (Clontech, no. catálogo 632412), para poder expresar en las células una quimera entre dicha histona y la proteína fluorescente DsRed. La mínima variación en la incorporación de esta histona permite visualizar la estructura de la cromatina a lo largo del ciclo celular en microscopios de fluorescencia. Este plásmido fue transfectado en células HCT-116, mismas que fueron seleccionadas con el antibiótico G418 durante un mes y medio. Más adelante, la población de células transfectadas fue enriquecida en un citómetro FacsAria (Becton Dickinson, San Jose, California) en función de la intensidad de fluorescencia. Los cultivos fueron grabados en un microscopio confocal LSM7 DUO (Zeiss; Göttingen, Germany) que cuenta con una cámara de incubación que permite mantener las condiciones de cultivo anteriormente mencionadas. Las fotos correspondientes a cada cuadro del video fueron tomadas cada 8 min, en tres planos (eje z), con un láser de 532 nm a una potencia del 2% con un objetivo de inmersión 40x, usando el filtro de emisión 559 – 630 nm y con una apertura del *pinhole* de una unidad aérea (UA).

INMUNOFLUORESCENCIA

Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos estériles en cajas Petri de 6 pozos. Después del tratamiento, las células fueron lavadas con PBS y (en algunos casos) teñidas para localizar las mitocondrias. Dicha tinción consiste en incubar las células 20min. en medio con MitoTracker Far Red® 200nM (Invitrogen, no. catálogo 998474) y enjuagarlas con PBS nuevamente (MitoTracker® es un fluorocromo comercial que permite visualizar las mitocondrias; en este trabajo, usamos la variante “Far Red” de dicho fluoróforo, cuyas longitudes de excitación y emisión no interfieren con las longitudes de los demás fluorocromos rojos usados i.e. Cy3, DsRed y Alexa Fluor® 568). Después, las células fueron incubadas a -20°C primero con metanol durante 10min. e inmediatamente después, con acetona durante 1min. Más adelante, las células fueron lavadas con PBS. El bloqueo se efectuó con albúmina al 1% en PBS durante 1h a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fueron incubadas toda la noche con el anticuerpo primario a 4°C en una cámara húmeda. Se usaron las siguientes concentraciones de anticuerpo: IgG ratón anti-Survivina 1: 10 (Santa Cruz Biotechnology, no. catálogo sc17779); IgG conejo anti-Survivina 2B 1:20

(Abcam, no. catálogo ab3729); IgG conejo anti-Survivina Δ ex3 1:100 (Abcam, no. catálogo ab3731) IgG ratón anti- β -tubulina 1:10 (Sigma-Aldrich no. de catálogo F2043). Después de lavar las células con PBS, éstas fueron incubadas 1h a temperatura ambiente en oscuridad con el anticuerpo secundario correspondiente, diluido en albúmina al 1% en PBS, (anti ratón o anti-conejo) acoplado a Cy3 1:100, Alexa Fluor® 488 conejo anti-ratón 1:200 (Invitrogen, Molecular Probes no. catálogo A11059), Alexa Fluor® 568 conejo anti-ratón 1:200 (Invitrogen, Molecular Probes no. catálogo A11004). Finalmente, los cubreobjetos fueron lavados con PBS y montados sobre laminillas con Vectaschield con DAPI (Vector Laboratories, Burlingame CA; no. catálogo H-1200). Las fotos de las inmunofluorescencias fueron tomadas en un microscopio confocal LSM 7 DUO (Zeiss; Göttingen, Germany) o en un microscopio ELYRA (Zeiss; Göttingen, Germany). Todas las imágenes de microscopía confocal fueron tomadas con una apertura del *pinhole* de 1 UA. En el microscopio confocal, se usaron las siguientes longitudes de onda de excitación y filtros para los distintos fluorocromos: FITC/Alexa Fluor® 488: longitud de onda de 488 nm con un filtro de emisión de 492-579 nm, Cy3: longitud de onda de 514 nm con un filtro de emisión de 538-644 nm, Alexa Fluor® 568: longitud de onda de 561 nm con un filtro de emisión de 568-712 nm, MitoTracker Far Red®: longitud de onda de 633 nm con un filtro de emisión de 634 - 714 nm y para DAPI se usó un láser multifotónico ajustado a 710 nm. Para las fotografías tomadas en el microscopio ELYRA, se usaron las siguientes longitudes de onda de excitación y filtros de emisión: FITC: longitud de onda de 488 nm con un filtro de emisión de 495- 550 nm, DAPI: longitud de onda de 405 nm con un filtro de emisión de 420-480 nm, Cy3: longitud de onda de 561 nm con un filtro de emisión de 570-620 nm y MitoTracker Far Red®: longitud de onda de 642 nm con un filtro de emisión de 655 nm.

RESULTADOS

“Si el río suena, es que la orquesta se cayó al agua.” (Dicho popular)

EXPRESIÓN Y ABUNDANCIA DE LAS VARIANTES DE SURVIVINA

El PMM previene la generación de aneuploidías porque al detener la progresión de la mitosis, da una pauta para corregir las uniones incorrectas o la falta de unión de microtúbulos a los cinetocoros. En este sentido, Survivina podría participar en la prevención o en la generación de aneuploidías ya que:

- Mediante su interacción con los microtúbulos y el reclutamiento del CPC al centrómero interno, permite la activación del PMM.
- Al inhibir la muerte, podría promover la supervivencia de células con errores en la segregación que no hayan podido corregir durante el arresto mitótico

A fin de asociar la expresión de las tres isoformas de Survivina con la inestabilidad cromosómica en cáncer, se comparó, por RT-PCR, la amplificación de sus transcritos en distintas líneas celulares de cáncer colo-rectal, dos cromosómicamente estables: HCT116 y SW48; y dos cromosómicamente inestables: HT29 y SW480. GAPDH fue usado como control de expresión. El análisis reveló que las tres isoformas se expresan de manera endógena en las cuatro líneas estudiadas y su expresión es comparable en las líneas HCT116, SW480 y HT29, pero más abundante en SW48 (Imagen 4). Cabe destacar que en todos los experimentos se observó que las células HCT116 muestran un menor nivel de expresión de GAPDH, lo que sugiere una menor actividad transcripcional en general. Estos resultados sugieren de manera preliminar que no existe ninguna asociación de las isoformas de Survivina con la inestabilidad cromosómica en líneas celulares de cáncer colo-rectal. Sin embargo, se decidió continuar el estudio en la línea HCT116, ya que tiene un PMM eficiente y bien caracterizado, además de ser, como previamente se ha mencionado, cromosómicamente estable.

Más adelante, para ahondar un poco más en la expresión de las variantes de Survivina en células HCT116, se realizó un RT-PCR a 12, 15, 18, 21 y 24 ciclos de amplificación. De acuerdo con reportes previos tanto de pacientes como de líneas celulares, este PCR reveló que Survivina y Survivina 2B se expresan abundantemente.

Esto se puede apreciar al comparar las bandas de 24 ciclos con las de GAPDH. En cambio, el transcrito de Survivina Δ ex3 muestra una amplificación muy débil ⁵⁹, apenas detectable a partir del ciclo 21 (Imagen 5).



Imagen 4. Expresión de las variantes de Survivina en líneas celulares de cáncer colo-rectal. Los productos esperados son de 184pb GAPDH, 185pb Survivina y Survivina Δ ex3, y 214pb Survivina 2B. SRV: Survivina. Neg: controles negativos (sin cDNA) de cada reacción. Ambos páneles forman parte del mismo gel de agarosa al 1.5% en TBE, teñido con bromuro de etidio 500 ng/ml. Marcador de 50pb.

Una vez explorada la expresión de las variantes de Survivina en células HCT116, se evaluó su abundancia a nivel proteína. Con este fin, se realizó un *Western blot* a partir de extractos de células HCT116. Éstos fueron comparados con extractos de células HeLa, ya que en esta línea celular se ha realizado una gran proporción de los estudios sobre las isoformas de Survivina. Sin embargo, las isoformas de Survivina endógenas se producen a niveles prácticamente indetectables. Incluso, la detección de estas proteínas endógenas sólo ha sido reportada en un artículo ⁶¹. Debido a la escasez de las variantes de Survivina 2B y Δ ex3, se cargaron entre 50 o 100 μ g de proteína en cada pozo del gel de electroforesis.

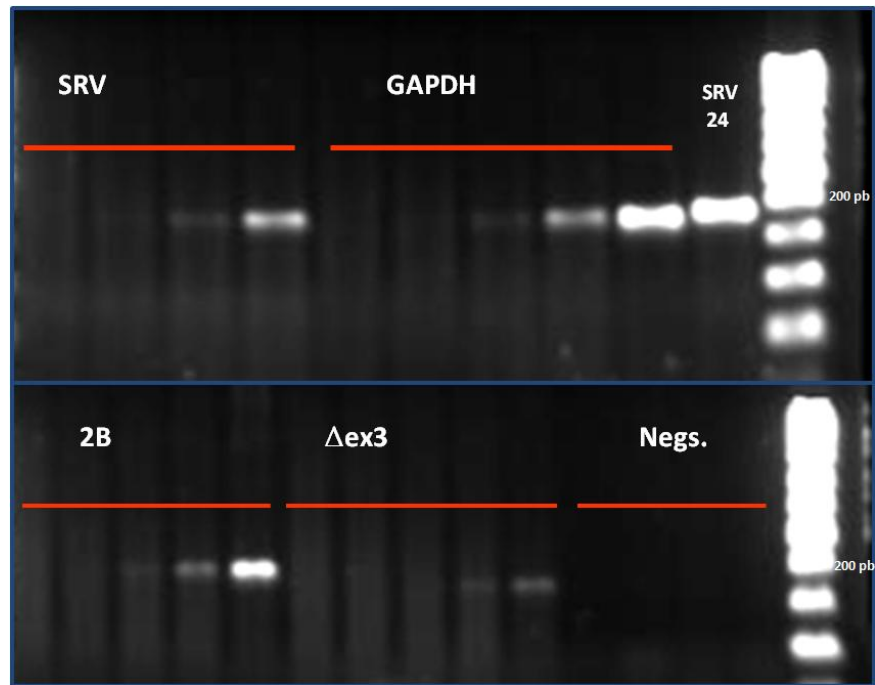
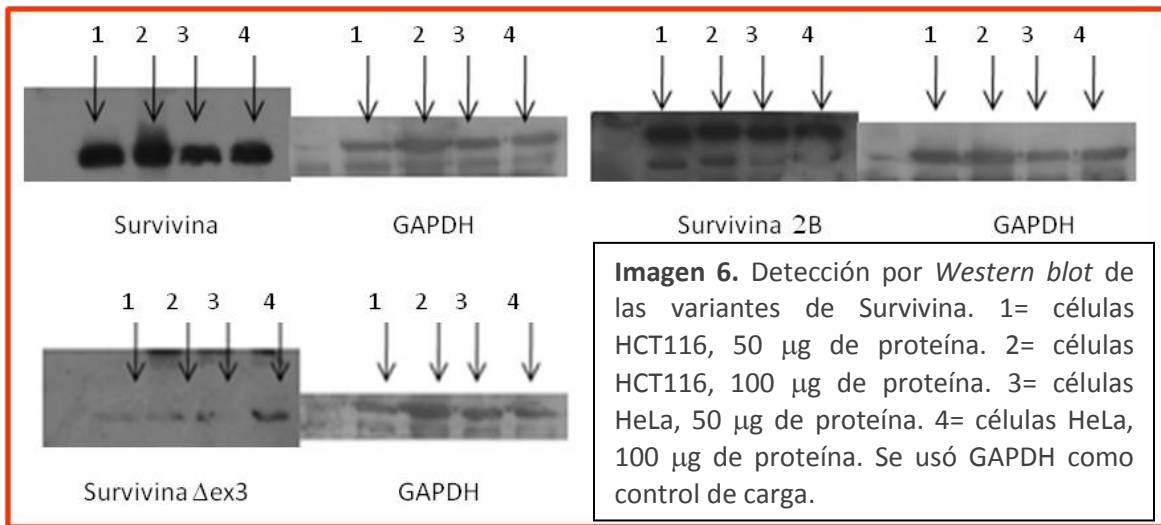


Imagen 5. Expresión de las variantes de Survivina en células HCT116. Amplificación de las isoformas por PCR a los 12; 15; 18; 21 y 24 ciclos. Los productos esperados son de 184pb GAPDH; 185pb Survivina y Survivina Δ ex3 y 214pb Survivina 2B. SRV: Survivina. Neg: controles negativos (sin cDNA) de cada reacción. Ambos p aneles forman parte del mismo gel de agarosa al 1.5% en TBE, teñido con bromuro de etidio 500 ng/ml. Marcador de 50pb.

La detecci3n del control de carga (GAPDH) se realiz3 sobre la misma membrana que las proteínas de interés, de tal forma que, a causa de la abundancia de proteína cargada en los pozos del gel, al revelar la banda de GAPDH, aparecieron diversas bandas, posiblemente producto de la detecci3n de variantes de esta proteína. Por otro lado, a pesar de usar anticuerpos específicos contra cada una de las isoformas de Survivina, el tamaño pequeño de estas proteínas dificult3 su separaci3n en el gel con respecto a otras bandas. Así mismo, en algunos experimentos los anticuerpos de las isoformas reconocían más de una banda. No obstante, la abundancia de las bandas señaladas en la Imagen 6 corresponde con la abundancia de los transcritos observada en el PCR. Debido a las complicaciones técnicas de la detecci3n de las variantes de Survivina 2B y Δ ex3 por *Western blot* no se prosigui3 con este tipo de análisis.



LOCALIZACIÓN DE LAS VARIANTES DE SURVIVINA

Posteriormente, se determinó la localización de las variantes de Survivina en células HCT116. Se realizaron inmunofluorescencias para detectar cada una de las isoformas y β -tubulina.

En primer lugar, se exploró la localización intracelular de Survivina: ésta se encuentra difusa en el citoplasma durante la interfase. Sin embargo, de acuerdo con la literatura ^{20,24,44,57,58}, durante la mitosis se observa en centrómero (donde recluta al CPC) y más adelante en el anillo contráctil durante la citocinesis (Imagen 7).

Como se puede observar en la Imagen 8a, Survivina 2B se localiza preferentemente en el núcleo de células interfásicas, pero también se observa difusa en el citoplasma. Sorprendentemente, durante la mitosis, Survivina 2B se confina a los centrosomas en profase, metafase y anafase. Posteriormente, se relocaliza al anillo contráctil durante la citocinesis (Imagen 8b). Sin embargo, la Survivina 2B no fue observada en ninguna otra estructura del huso mitótico. Esta localización no había nunca antes sido descrita para Survivina 2B y abre la puerta a preguntas sobre las funciones que podría ejercer en la mitosis.

Por otro lado, Survivina Δ ex3 se sitúa principalmente en las regiones de cromatina relajada del núcleo. Se ha demostrado que Survivina Δ ex3 se acumula en el nucleolo mediante una señal de localización para este organelo ⁶⁸. Durante la mitosis, Survivina Δ ex3 se observa difusa en el citoplasma. De manera interesante, es súbitamente degradada al inicio de la anafase. Esto podría significar que Survivina Δ ex3 es objeto de la degradación de la vía APC-proteosoma (Imágenes 8c y 9).

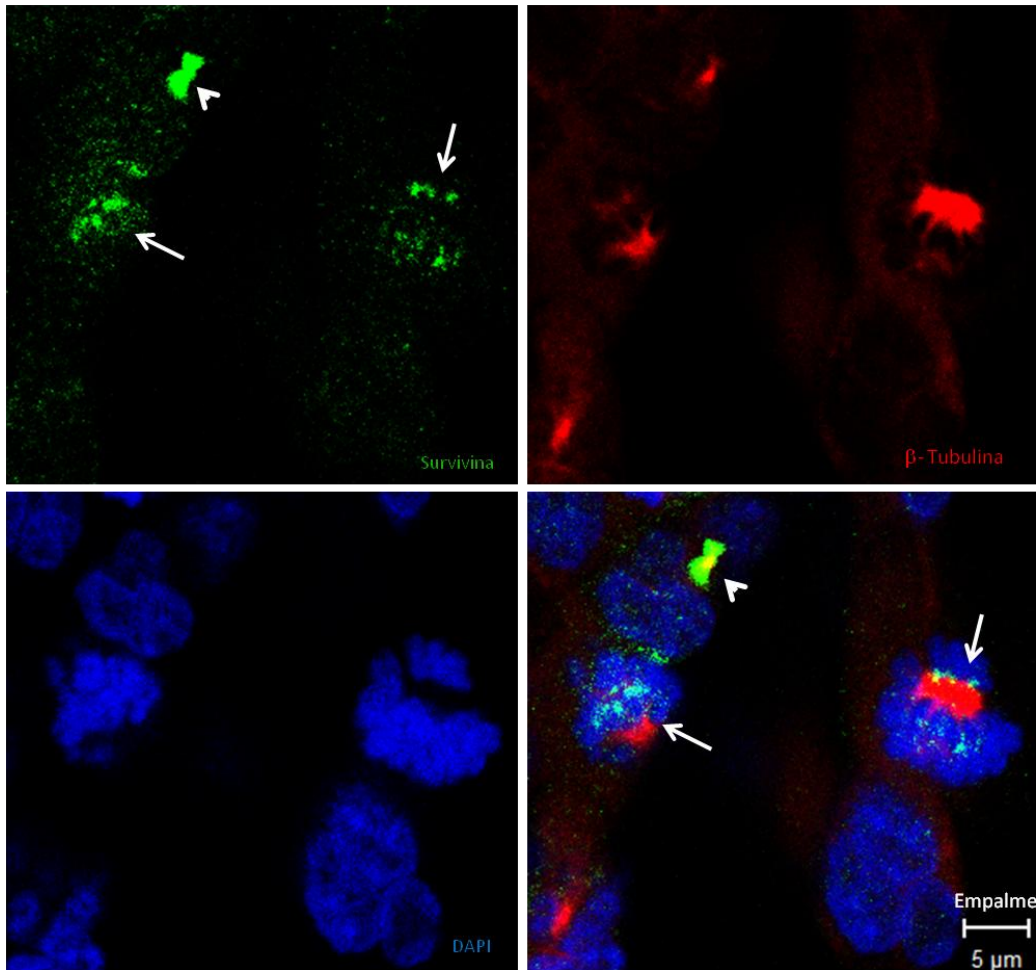


Imagen 7. Localización intracelular de Survivina a lo largo del ciclo celular. Las flechas indican células profásicas, en las cuales se puede apreciar Survivina en el centrómero. La cabeza de flecha muestra el anillo contráctil de la citocinesis, donde también se encuentra Survivina. Survivina en verde (Alexa Fluor® 568 nm), β -tubulina en rojo (FITC, 488nm) y DNA en azul (DAPI 710 nm, láser multifotónico). La barra de escala representa 5 μ m. Imágenes tomadas en un microscopio confocal LSM 7 DUO (Zeiss) con una apertura del *pinhole* de 1UA.

ANÁLISIS DEL ÍNDICE MITÓTICO INDUCIDO POR TAXOL Y VINBLASTINA

Dado que el contexto del ciclo celular en que se centra este estudio es la mitosis, se procedió a analizar el curso temporal de la mitosis en respuesta al tratamiento con las drogas de interés. A fin de establecer la condición que arrestara en mitosis a la mayor proporción de células durante más tiempo, se determinó el índice mitótico de cultivos tratados con taxol o vinblastina cada tres horas, durante 24h. Las células fueron sincronizadas antes del tratamiento por un doble bloqueo con timidina 2 mM. Los controles para ambos tratamientos son distintos ya que, el taxol se disuelve en DMSO (dilución final 1:1000 en el medio de cultivo), mientras que el vector usado para vinblastina es PBS.

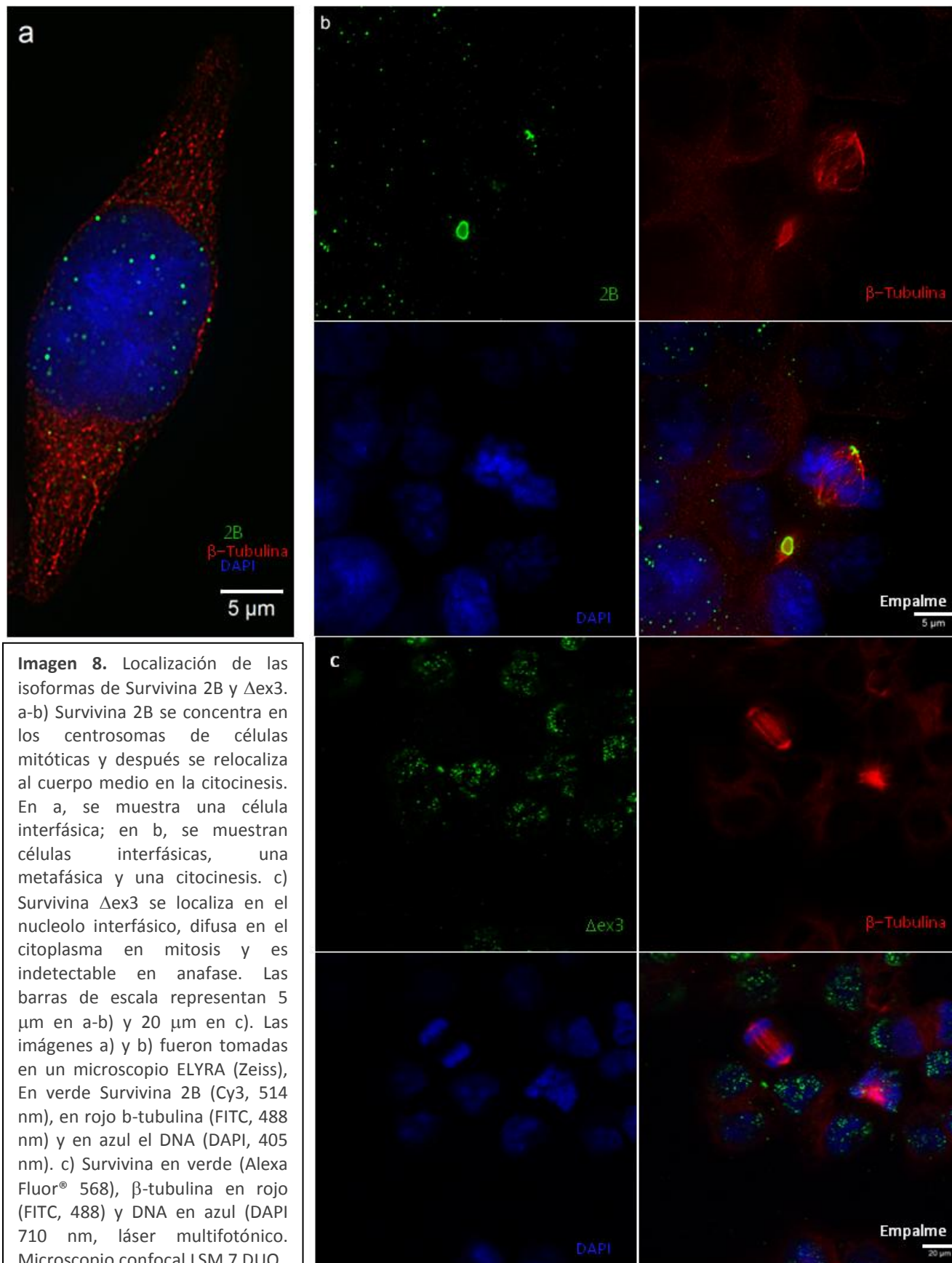


Imagen 8. Localización de las isoformas de Survivina 2B y Δ ex3. a-b) Survivina 2B se concentra en los centrosomas de células mitóticas y después se relocaliza al cuerpo medio en la citocinesis. En a, se muestra una célula interfásica; en b, se muestran células interfásicas, una metafásica y una citocinesis. c) Survivina Δ ex3 se localiza en el nucleolo interfásico, difusa en el citoplasma en mitosis y es indetectable en anafase. Las barras de escala representan 5 μ m en a-b) y 20 μ m en c). Las imágenes a) y b) fueron tomadas en un microscopio ELYRA (Zeiss), En verde Survivina 2B (Cy3, 514 nm), en rojo β -tubulina (FITC, 488 nm) y en azul el DNA (DAPI, 405 nm). c) Survivina en verde (Alexa Fluor® 568), β -tubulina en rojo (FITC, 488) y DNA en azul (DAPI 710 nm, láser multifotónico. Microscopio confocal LSM 7 DUO.

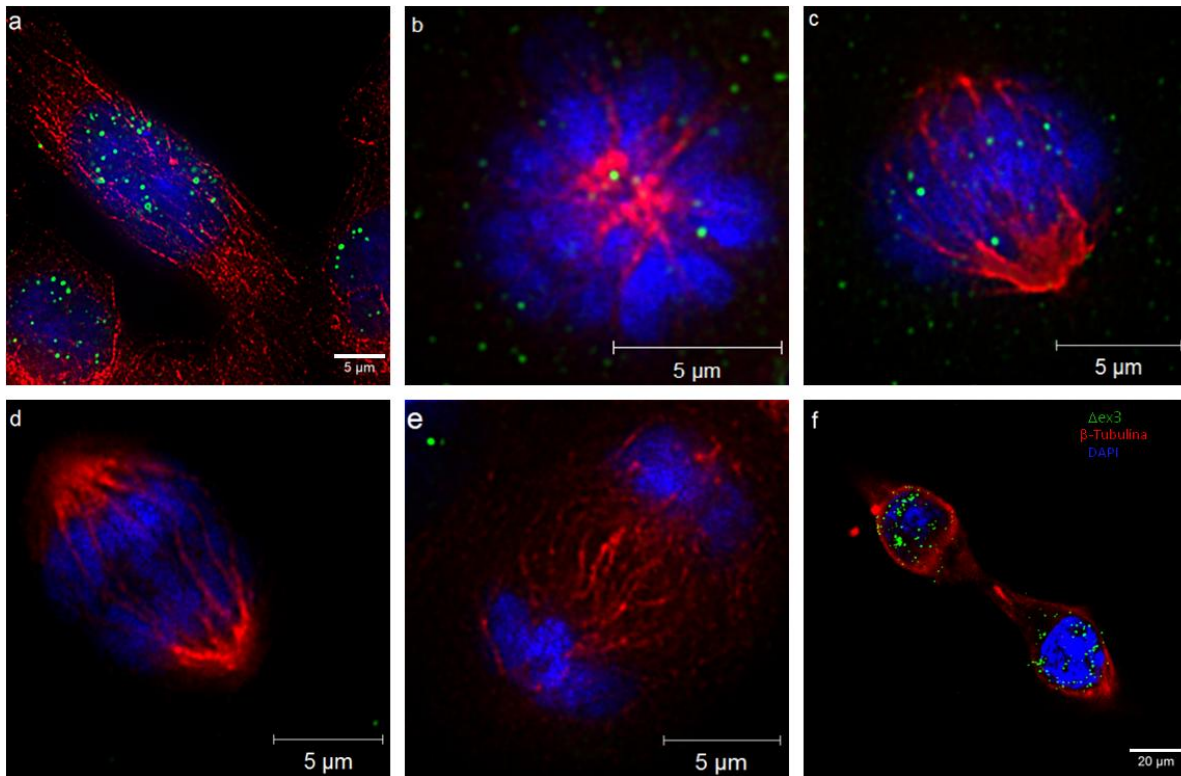


Imagen 9. Dinámica de localización de Survivina $\Delta ex3$ a lo largo del ciclo celular. Los paneles muestran: a) interfase, b) profase, c) metafase, d) anafase A, e) anafase B, f) citocinesis. La señal de Survivina $\Delta ex3$ es indetectable durante la anafase. a-e) En verde Survivina $\Delta ex3$ (Cy3, 514 nm), en rojo β -tubulina (FITC, 488 nm) y en azul el DNA (DAPI, 405 nm). Las barras de escala representan 5 μm , imágenes tomadas en un microscopio ELYRA (Zeiss), f) Survivina en verde (Alexa Fluor[®] 568), β -tubulina en rojo (FITC, 488) y DNA en azul (DAPI 710 nm, láser multifotónico). La barra de escala representa 20 μm , imagen tomada en un microscopio confocal LSM 7 DUO (Zeiss) con una apertura del *pinhole* de 1 UA.

Sin embargo, las curvas control de ambos tratamientos y las curvas de tratamiento 4 nM de ambas drogas muestran un comportamiento prácticamente idéntico.

Esto sugiere que ni el DMSO ni los tratamientos con taxol o vinblastina 4nM causan variaciones en el ciclo celular de las poblaciones de células HCT116. Más bien, las ligeras oscilaciones del índice mitótico en los cursos temporales de estos tratamientos se deben a la sincronización con timidina (Ver las curvas control y 4nM de las Imágenes 10 y 11).

A las 6h, los tratamientos de taxol 20, 100 y 500 nM muestran un leve aumento en el índice mitótico con respecto al control, lo cual sugiere que a partir de este punto comienzan a acumularse las células arrestadas en mitosis por la droga. Sin embargo, de las

9h en adelante, la dinámica de arresto y liberación o muerte es diferente para cada tratamiento.

A las 9h, el tratamiento con taxol 20 nM induce una acumulación de células mitóticas del 28.72% que cae a partir de las 12h. A las 24h, la población muestra una ligera tendencia a volver a entrar a mitosis. No obstante, ningún punto de la curva de tratamiento con taxol 20 nM muestra diferencias estadísticamente significativas con respecto al control.

El tratamiento con taxol 100 nM indujo el máximo porcentaje de células mitóticas a las 12h (72 ± 8.19). La población de células se mantuvo arrestada entre las 9 y las 18h. El índice mitótico disminuye en un 36% entre las 12h y las 18h. A las 21h, el índice mitótico cae al 19%.

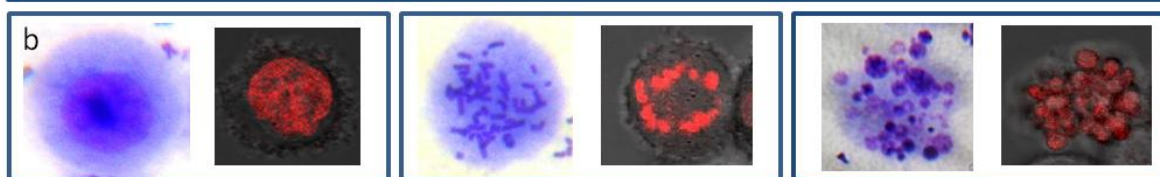
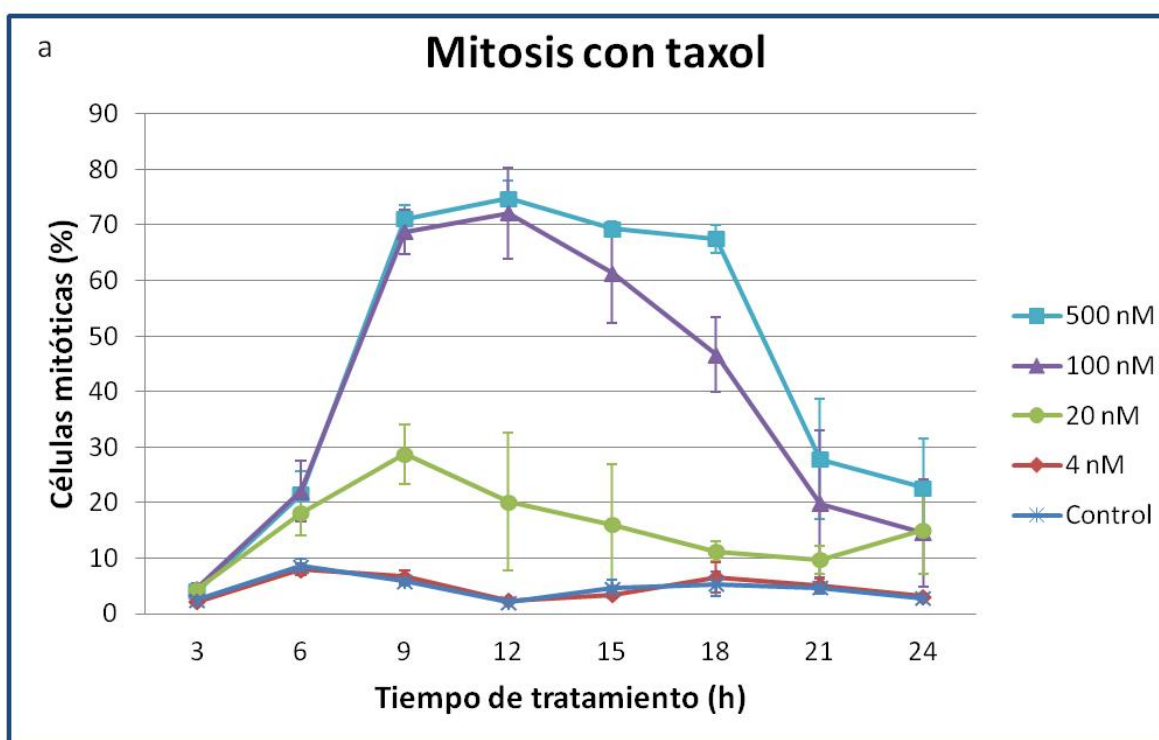


Imagen 10. Curso temporal del tratamiento con taxol. a) Índice mitótico en respuesta a distintas concentraciones de taxol. Resultados de tres experimentos independientes. Las barras horizontales representan el error estándar. Se utilizó una prueba de ANOVA de una vía para definir las diferencias estadísticas entre las distintas condiciones, $p < 0.05$. b) Fotos de una célula interfásica, una mitótica y una muerta, tal como se aprecian con la tinción de eosina/azul de metileno y en el microscopio de fluorescencia con la histona H2B unida a la proteína fluorescente DsRed (532 nm).

Por otra parte, el tratamiento con taxol 500nM induce una importante proporción de células mitóticas que se mantiene constante, sin cambios significativos entre las 9 y las 18h y con un máximo a las 12h (74.73 ± 3.24). El arresto mitótico inducido por taxol 500nM parece ser más difícil de eludir para las células (comparar con la curva de 100 nM), ya que la pendiente de disminución del índice mitótico de las células en esta condición es menos pronunciada que las que son tratadas con taxol 100 nM. Entre las 12h y las 18h, el índice mitótico disminuye únicamente en un 10% y cae al 27% a las 21h (Imagen 10).

El tratamiento con taxol 100 nM fue definido como la dosis mínima efectiva⁸⁴ para estudiar el arresto mitótico, ya que induce prácticamente el mismo punto máximo de índice mitótico que el tratamiento 500 nM.

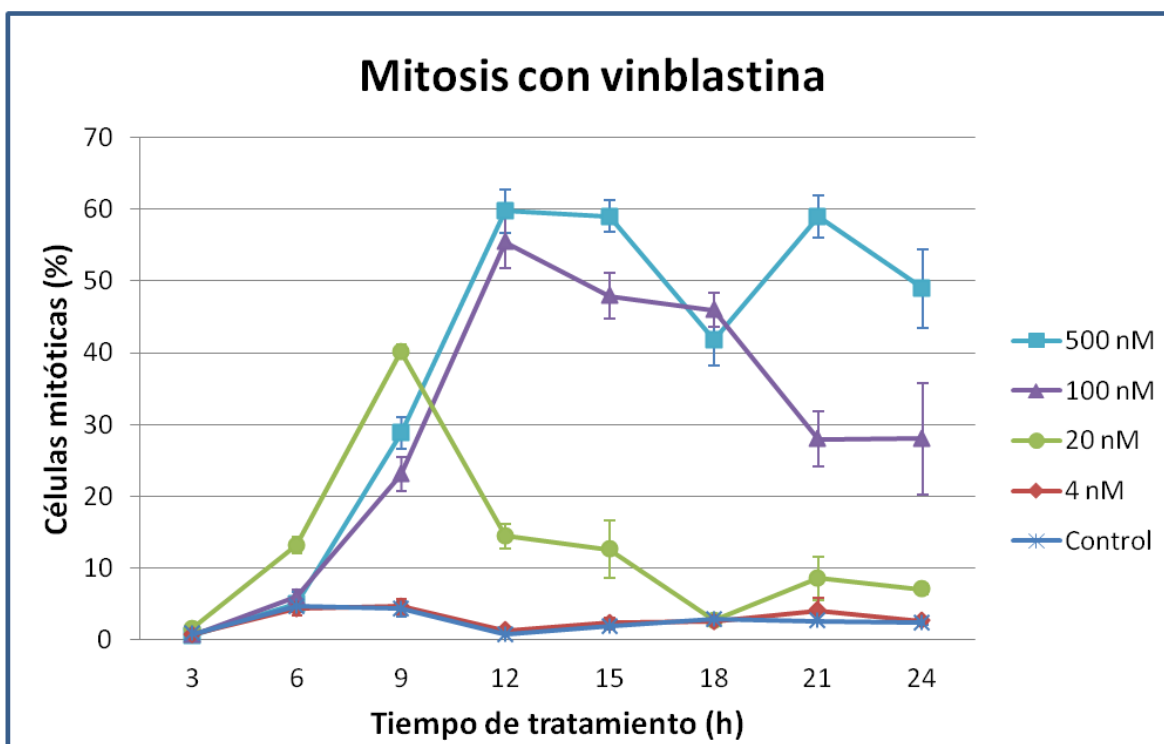


Imagen 11. Curso temporal del índice mitótico en respuesta a diferentes concentraciones de vinblastina. Resultados de tres experimentos independientes. Las barras horizontales representan el error estándar. Se utilizó una prueba de ANOVA de una vía para definir las diferencias estadísticas entre las distintas condiciones, $p < 0.05$.

En contraste con lo que ocurre con taxol, a las 6h de tratamiento con vinblastina, el único índice mitótico que muestra un claro aumento con respecto al control es el de los cultivos tratados con vinblastina 20 nM. De manera interesante, el índice mitótico alcanza el 40% a las 9h y sufre una abrupta disminución del 25% a las 12h. Esto sugiere dos posibilidades: 1) La baja concentración de la droga permite que las células arrestadas puedan expulsarla y regresar a G1; 2) Una alta proporción de las células arrestadas en mitosis por el tratamiento con vinblastina 20 nM muere entre las 9h y las 12h. Cualquiera de estas dos opciones presupone que la vinblastina muestra un mecanismo distinto de acción en esta concentración que al usarla a 100 nM o 500 nM.

Al tratar a las células con vinblastina 100nM, se observa la máxima proporción de células mitóticas (55.43%) a las 12h. El 51% de estas células se libera de la mitosis entre las 12h y las 18h. Sin embargo, entre las 21h y las 24h, la población muestra una tendencia a entrar nuevamente en mitosis. El tratamiento con vinblastina 500nM arroja resultados similares. A las 12h, el índice mitótico alcanza su máximo pico ($59.75 \pm EE 2.99$), que se mantiene sin cambios significativos hasta las 15h. Sin embargo, a las 18h, el 30% de las células se libera del arresto. A las 21h, la proporción de células en mitosis se eleva nuevamente al 58% (Imagen 11).

ANÁLISIS DE LA MITOSIS EN TIEMPO REAL

Los resultados del análisis del índice mitótico reflejan el comportamiento de la población de células sometida a tratamiento con taxol o vinblastina. Sin embargo, esta aproximación, no permite distinguir lo que ocurre en cada célula. Se procedió entonces a determinar la duración de la división de células HCT116 mediante videomicroscopía de fluorescencia.

Con este fin, se utilizaron células HCT116 transfectadas de manera estable con un plásmido que codifica para una quimera entre la histona H2B y la proteína fluorescente DsRed. Las células fueron cultivadas sin tratamiento y grabadas durante 66h. El análisis del video reveló que la mitosis promedio de las células HCT116 dura $66.5 \text{ min} \pm \text{error estándar (EE) } 5.09$. El inicio de la anafase se da en promedio $40.8 \text{ min} \pm EE3.28$ después del inicio de la profase (Video Células control plano 2 e Imagen 12). De manera sorprendente, una de las células analizadas detuvo su progresión en el ciclo, después de haber segregado sus cromosomas, sin lograr concluir la citocinesis durante 2h 24 min y murió. Dicha célula fue excluida del análisis de duración de mitosis y anafase.

Más adelante, a fin de evaluar cuánto tiempo dura el arresto mitótico en células individuales, las células HCT116-H2BDsRed fueron sincronizadas, tratadas con taxol

100nM y grabadas en un microscopio de confocal durante 50h, empezando a partir de las 8h de tratamiento. Esta aproximación demostró que el tratamiento con taxol induce un arresto mitótico muy prolongado: las células tratadas pasan mucho más tiempo en mitosis que las células control, es decir $830.2 \text{ min} \pm \text{EE } 81.78$ (aproximadamente 12h) contra $66.5 \text{ min} \pm \text{EE } 5.09$ (Video Taxol 100 nM video completo plano 2 e Imagen 13). Así, el 75% de las células analizadas murió entre las 24h 30 min y las 51h 40min. El 50% de la población murió antes de las 39h de tratamiento (Imagen 14).

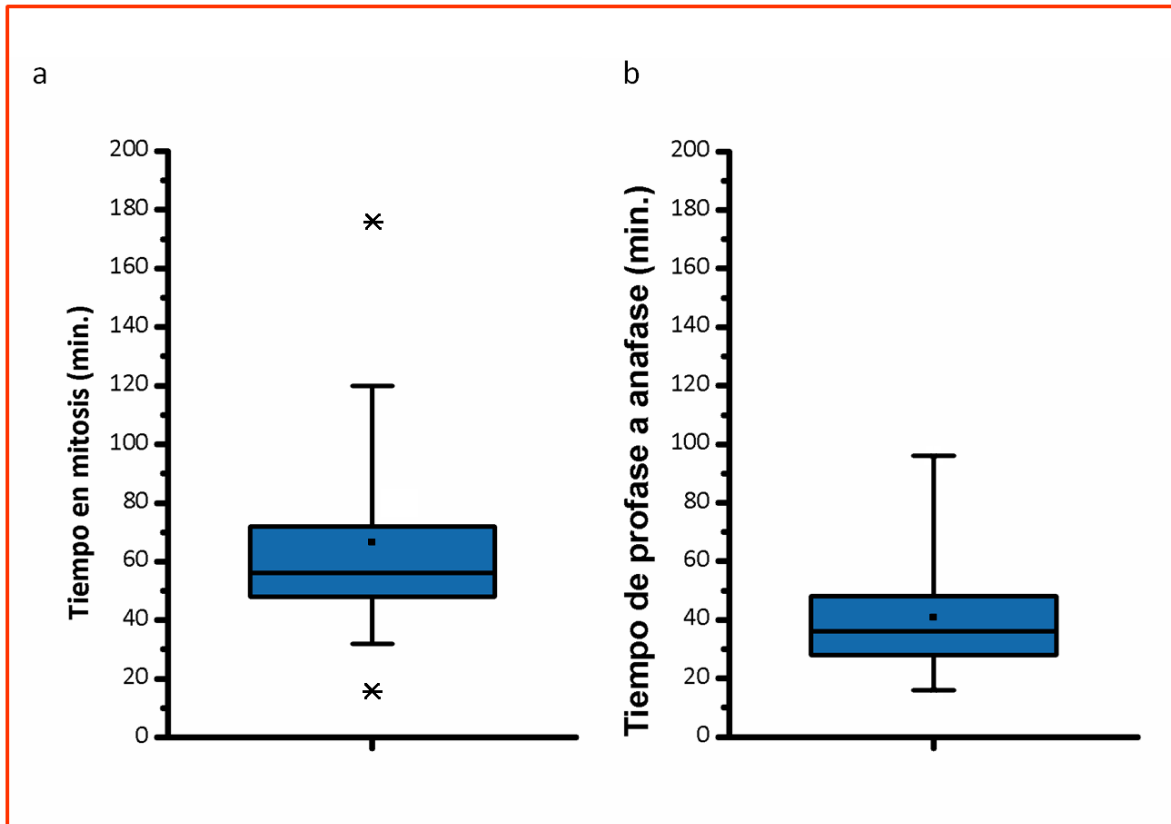


Imagen 12. Análisis de la división mitótica de células HCT116 en tiempo real. Células HCT116 que expresan la histona H2B unida a la proteína fluorescente DsRed fueron cultivadas en una cámara de cultivo para microscopía de fluorescencia y analizadas en tiempo real en un microscopio confocal LSM 7 DUO (Zeiss). a) Tiempo que las células tardan en completar la mitosis, n=35. b) Tiempo que las células tardan en iniciar la anafase a partir del inicio de la mitosis, n=34. ■ Promedio. ✖ Observaciones atípicas.

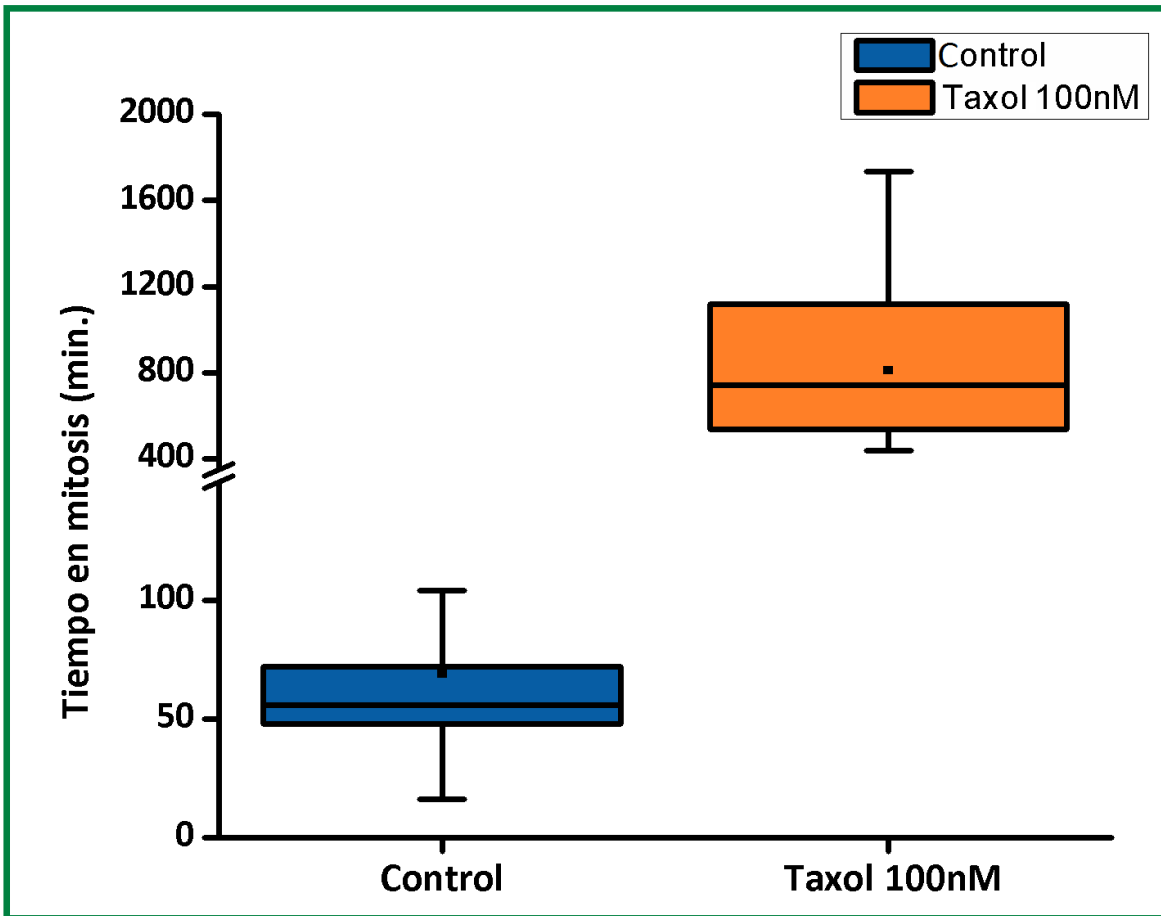


Imagen 13. Análisis de la mitosis de células HCT116 tratadas con taxol. Células HCT116 que expresan la histona H2B unida a la proteína fluorescente DsRed fueron cultivadas en una cámara de cultivo para microscopía de fluorescencia y analizadas en tiempo real en un microscopio confocal LSM 7 (Zeiss). Células control n=35, células tratadas n=19. ■ Promedio. Las dos poblaciones muestran diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con una prueba de ANOVA de una vía, $p < 0.0001$.

De manera sorprendente, estos resultados no coinciden con el conteo de células en las laminillas teñidas con eosina y azul de metileno en células fijadas. Aparentemente las células grabadas en video tardaron más tiempo en morir a partir del inicio del tratamiento (ver Discusión).

Al analizar el video, se distinguieron cuatro fenómenos asociados al arresto mitótico, que no mostraron ser mutuamente excluyentes (Tabla 2 e Imagen 15):

- Formación de vacuolas en la membrana citoplasmática: Algunas células, después de pasar cierto tiempo en mitosis sufrieron un “abultamiento de la membrana” (*membrane blebbing*), similar a lo que ocurre típicamente en la muerte apoptótica.

Estas vacuolas muestran marca fluorescente, lo que indica que contienen cromatina (o al menos histona H2-DsRed). Ocurrió en el 66% de las células analizadas sin que estas hubieran necesariamente entrado a G1.

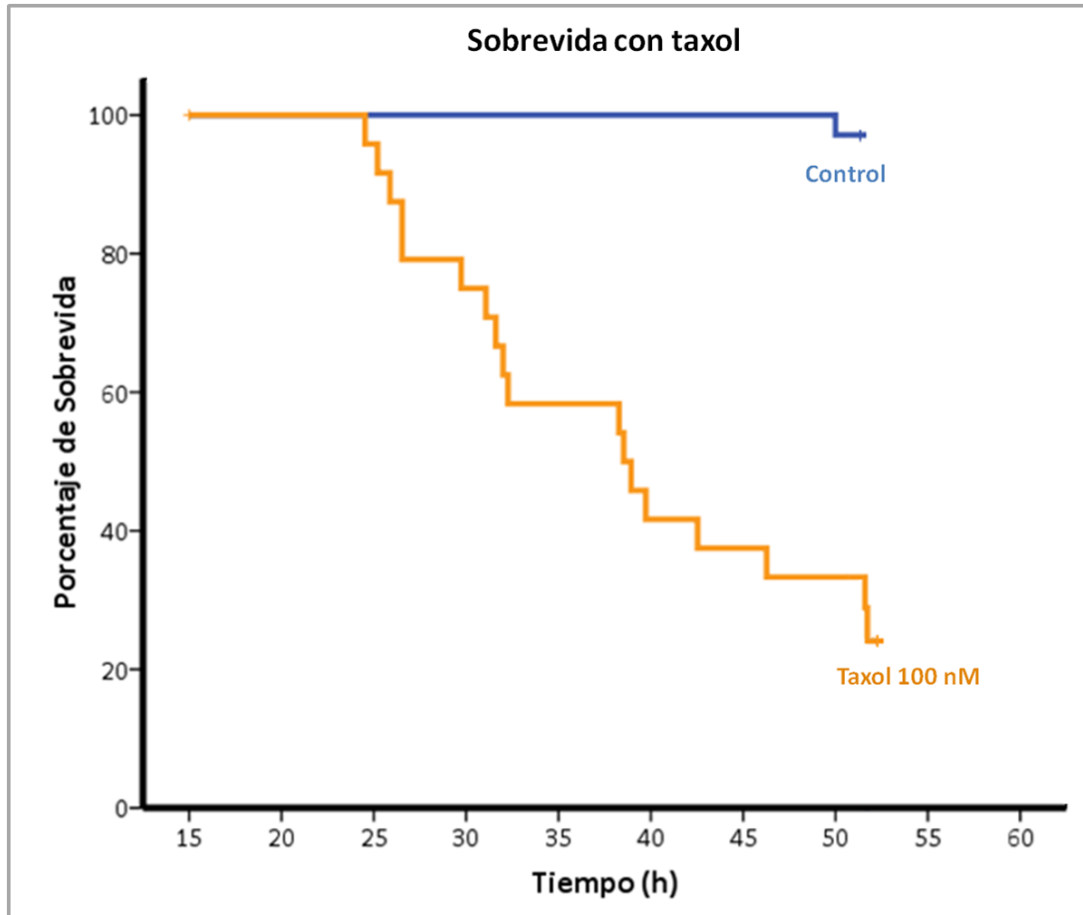


Imagen 14. Gráfica de sobrevida en respuesta al tratamiento con taxol 100nM. Las células fueron consideradas muertas a partir del momento en que mostraron una morfología similar al *membrane blebbing* (ver imagen 15), o que perdieron la marca fluorescente. Las dos curvas muestran diferencias estadísticamente significativas con una $p < 0.0001$, de acuerdo con una prueba de Log Rank.

- Descondensación de los cromosomas: En el 54% de las células analizadas, los cromosomas parecen descondensarse sin agregarse en un solo núcleo, dando origen a células aparentemente multinucleadas. De manera interesante, todas las células que sobrevivieron hasta el final del video mostraron este fenómeno.

- Citocinesis fallida: En algunos casos, las células parecieron lograr segregar sus cromosomas e iniciar la citocinesis. Sin embargo, los dos núcleos recién formados se volvían a unir, posiblemente fusionándose. Seis de siete células que mostraron este fenómeno murieron más adelante (ver Material Adicional).
- Pérdida de la marca fluorescente: en el 37.5% de las células analizadas, la marca fluorescente invadió todo el citoplasma. Más adelante, estas células se encogieron y, al parecer, vaciaron su citoplasma en el medio (esto incluye la pérdida de la marca fluorescente). Esto podría deberse a la degradación del DNA, y la subsecuente liberación de proteínas quiméricas H2B-DsRed. Sin embargo, las células que perdieron la marca fluorescente no necesariamente sufrieron el *membrane blebbing*.

Tabla 2: Análisis del video de tratamiento con taxol (tiempo en horas)					
Célula	Mitosis	Descondensación	Intento de citocinesis	Vacuolarización	Pérdida de marca fluorescente
1	11.07			29.73	31
2	21.73		30.00	38.27	40
3	12.13			25.87	26.5
4	15.33			24.53	32
5	43.73			51.73	
6	17.07		26.67	31.07	
7	17.07		46.00	46.27	
8	16.53	35.20			
22	13.73	37.33			
23	14.40	25.47			38.93
24	18.27	30.67		38.53	
26	13.47			32.27	
27	12.67	25.33	28.80	31.60	47.20
29	15.60	29.33			
30	15.47	25.33			39.73
31	11.87	20.80	23.07		
37	15.33	30.93			
38	19.20			26.53	
39	19.20			26.53	
De las siguientes células, no se pudo determinar la duración de la mitosis.					
Célula	Mitosis	Descondensación	Intento de citocinesis	Vacuolarización	Pérdida de marca fluorescente
11	22.40	35.73*		51.60	
32	N/D	15.87	22.53	25.20	36.00
35	N/D	29.20			
36	N/D		27.07	32.00	40.53
40	N/D	31.07		42.53	

Tabla 2: Análisis del video de tratamiento con taxol. Tiempo en horas de inicio de cada uno de los fenómenos indicados. N/D no disponible: células que ya estaban en mitosis al iniciar el video. * Esta célula se perdió de foco y reapareció con los cromosomas descondensados. Un acercamiento del video en las células que presentan el intento de citocinesis se puede observar en el Material Adicional.

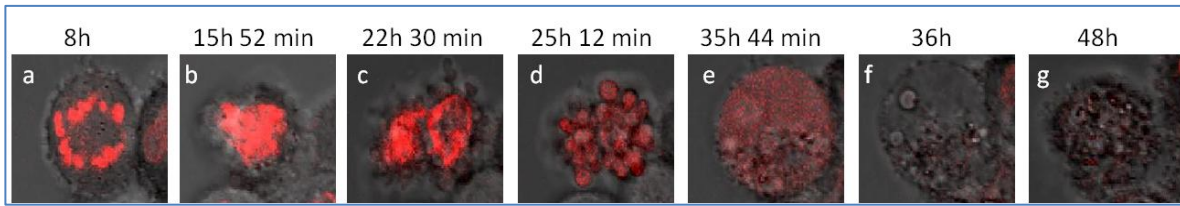


Imagen 15. Morfologías observadas en las células tratadas con taxol en video (Video Células 32 y 36 plano 3). Seguimiento de la célula 32 del video a lo largo del tiempo (ver Tabla 2). Las diferentes morfologías referidas en el texto. a) Prometafase, la célula está arrestada en mitosis. b) Cromosomas descondensados. c) Célula en citocinesis (fallida). d) Formación de vacuolas, morfología similar al *membrane blebbing*. e-f) Pérdida de la marca fluorescente. g) Célula después de haber perdido la marca fluorescente. En esta célula, las morfologías de b y d son particularmente fáciles de distinguir. El DNA se observa en rojo (DsRed, 532 nm).

LAS VARIANTES DE SURVIVINA DURANTE EL ARRESTO MITÓTICO

Con base en las funciones que tienen las variantes de Survivina, tanto en la regulación de la muerte, como, al menos en el caso de Survivina, en la división celular, es razonable pensar que estas proteínas intervienen en la muerte por arresto mitótico mediante cambios en su localización intracelular. Bajo esta premisa, células HCT116 fueron tratadas con taxol a fin de evaluar por inmunofluorescencia la localización intracelular de Survivina, Survivina 2B y Δ ex3 durante el arresto mitótico.

En primer lugar, las células fueron teñidas con anticuerpos específicos contra cada isoforma y contra β -tubulina. Al analizar estos experimentos, se observó que ni el tratamiento con taxol ni con vinblastina inducen cambios en la localización de Survivina (Imágenes 16 y 17), ya que ésta permaneció asociada al centrómero interno a lo largo del arresto mitótico.

Por su parte, Survivina 2B se acumula en los centrosomas no separados de las células arrestadas en mitosis (Imagen 18 a).

En cambio, Survivina Δ ex3 se observa difusa en el citoplasma de las células arrestadas en mitosis y sus niveles no disminuyen a lo largo del arresto (Imagen 18 c). Esto confirma la observación hecha en las células mitóticas control sobre la degradación de Survivina Δ ex3, ya que las células HCT-116 arrestadas con taxol no progresan más allá de la profase. En células que logran liberarse del arresto mitótico y entrar a interfase, ambas isoformas se aprecian difusas en el núcleo y citoplasma (Imagen 18 b y d).

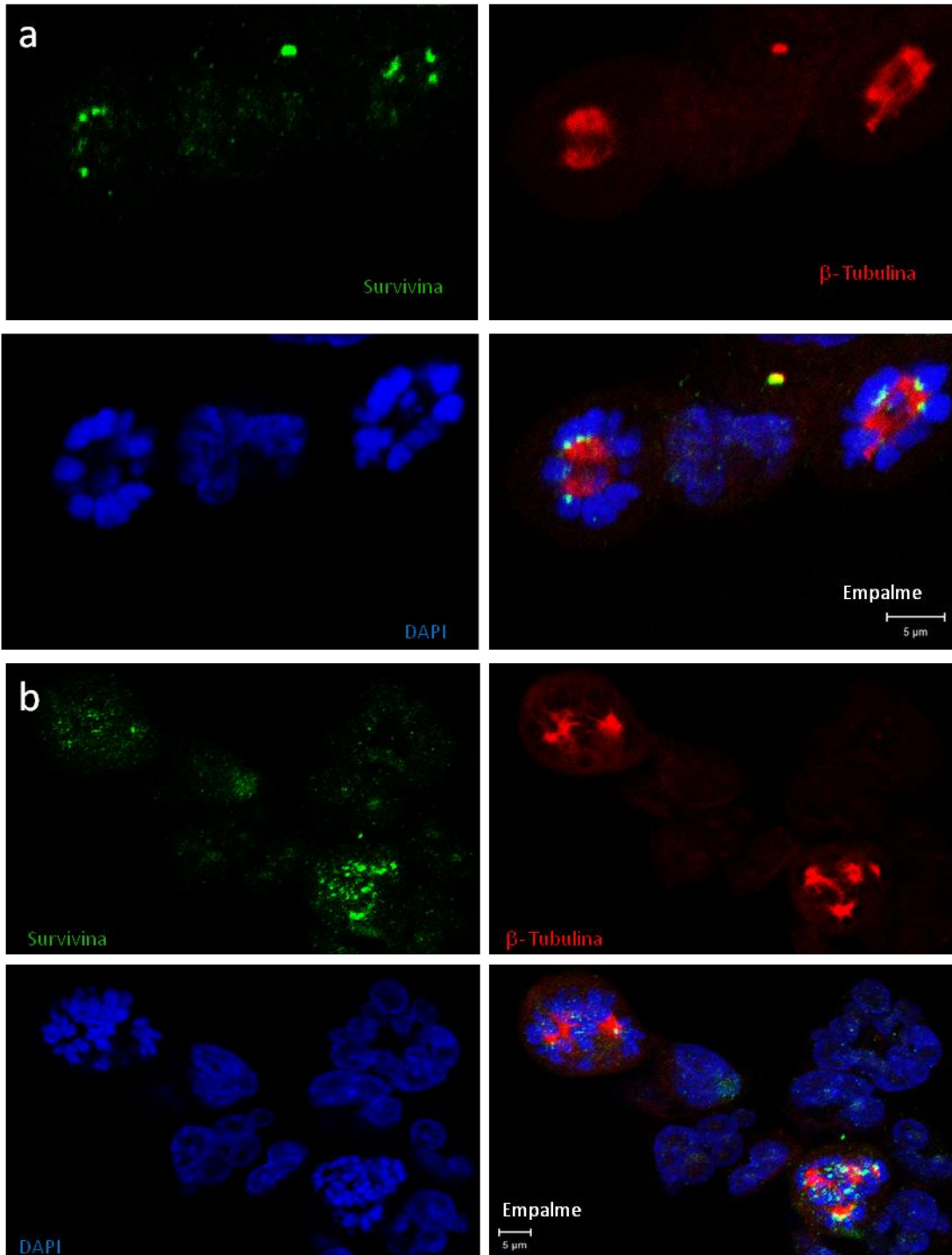


Imagen 16. El tratamiento con taxol no altera la localización de Survivina durante el arresto mitótico. a) 12h de taxol. b) 18h de taxol. En las células mitóticas se observa Survivina en el centrómero en ambas condiciones. Células previamente sincronizadas con un doble bloqueo de timidina. Survivina en verde (Alexa Fluor® 568), β -tubulina en rojo (FITC, 488) y DNA en azul (DAPI 710 nm, láser multifotónico). Las barras de escala representan 5 μ m, imágenes tomadas en un microscopio confocal LSM 7 DUO (Zeiss) con una apertura del *pinhole* de 1 UA.

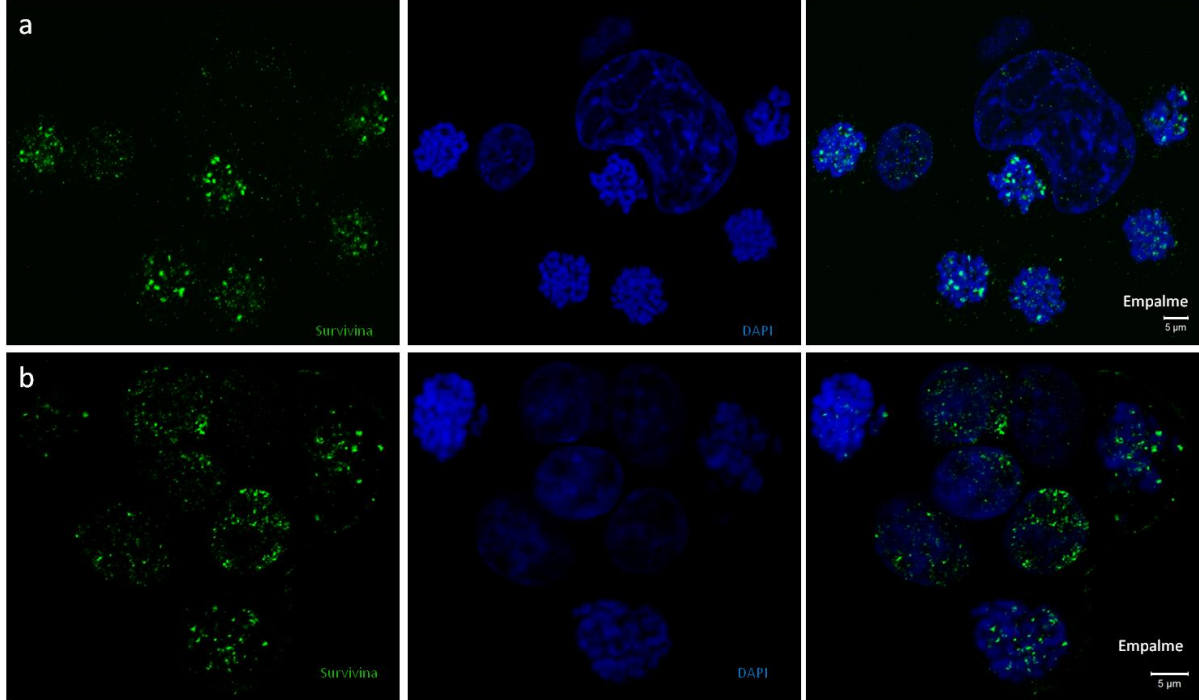


Imagen 17. El tratamiento con vinblastina no altera la localización de Survivina durante el arresto mitótico. a) 12h de vinblastina. b) 15h de vinblastina. En ambas condiciones se observa Survivina en los centrómeros en las células mitóticas. Células previamente sincronizadas con un doble bloqueo de timidina. Survivina en verde (Alexa Fluor® 488) y DNA en azul (DAPI 710 nm, láser multifotónico). Las barras de escala representan 5 μm . Imágenes tomadas en un microscopio confocal LSM 7 DUO (Zeiss) con una apertura del *pinhole* de 1 UA.

Así mismo, surgió la pregunta de si las variantes de Survivina pudieran participar en la regulación de la muerte dependiente de arresto mitótico a través de la interacción con las mitocondrias. A fin de contestarla, se co-tiñeron Survivina 2B o Δex3 con MitoTracker®. En contraste con publicaciones anteriores, ninguna de las isoformas colocalizó con las mitocondrias en interfase ni en mitosis en células control. Tampoco en condiciones proapoptóticas tal como lo es el tratamiento con taxol colocalizaron Survivina 2B ni Survivina Δex3 con las mitocondrias (Imagen 19). Esto sugiere que las posibles funciones de estas variantes en la regulación de la muerte inducida por arresto mitótico son independientes de las mitocondrias.

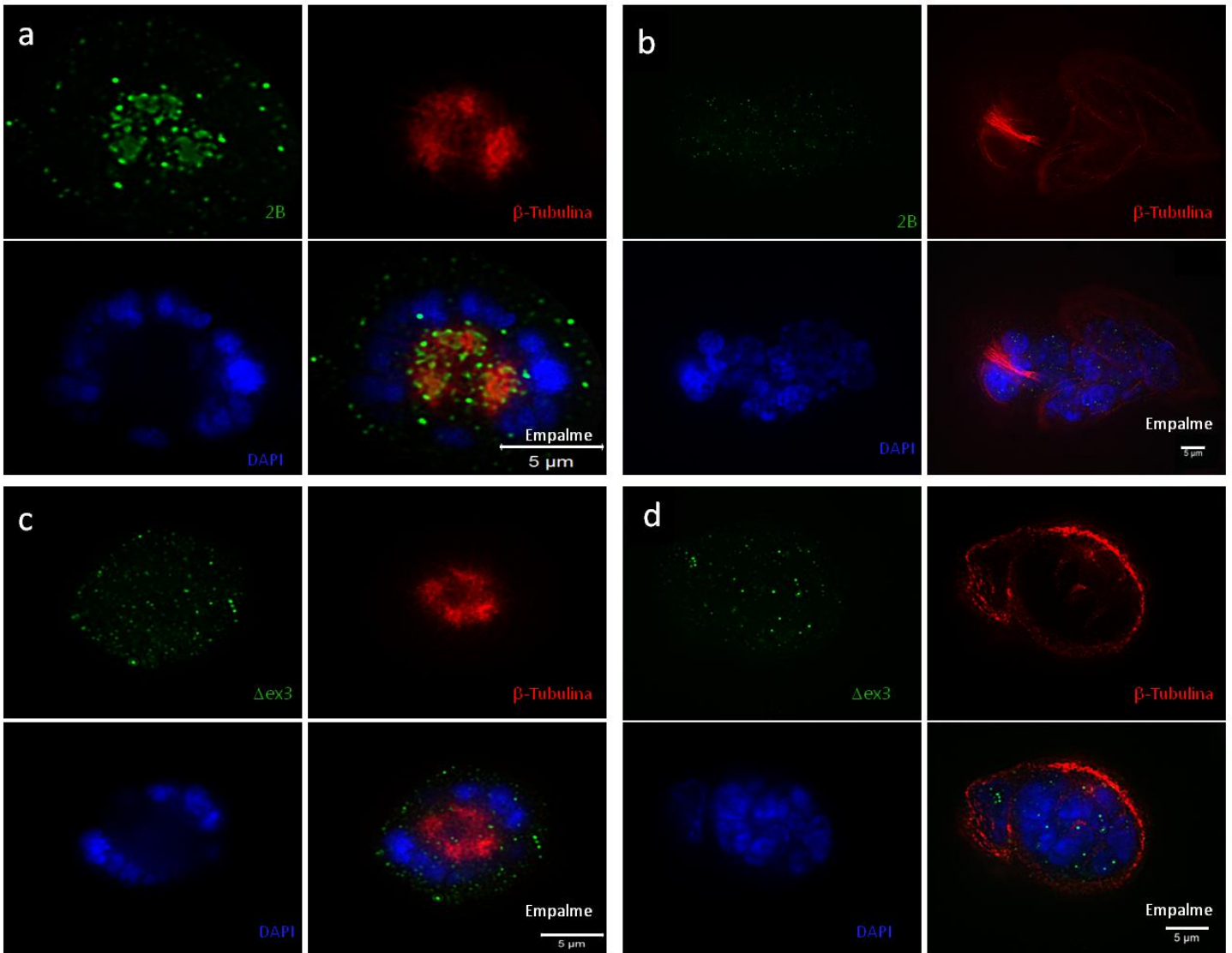


Imagen 18. Localización de Survivina 2B y $\Delta ex3$ en células tratadas con taxol. a) Survivina 2B se acumula en los centrosomas al tratar las células HCT116 con taxol 100 nm durante 12h. b) Survivina 2B se observa difusa en células HCT116 tratadas con taxol 100 nm durante 24h. c) Survivina $\Delta ex3$ se observa difusa en células tratadas con taxol 100 nm durante 12h o 24h (d). En verde Survivina 2B/ $\Delta ex3$ (Cy3, 514 nm), en rojo β -tubulina (FITC, 488 nm) y en azul el DNA (DAPI, 405 nm). Las barras de escala representan 5 μ m. Imágenes tomadas en un microscopio ELYRA (Zeiss).

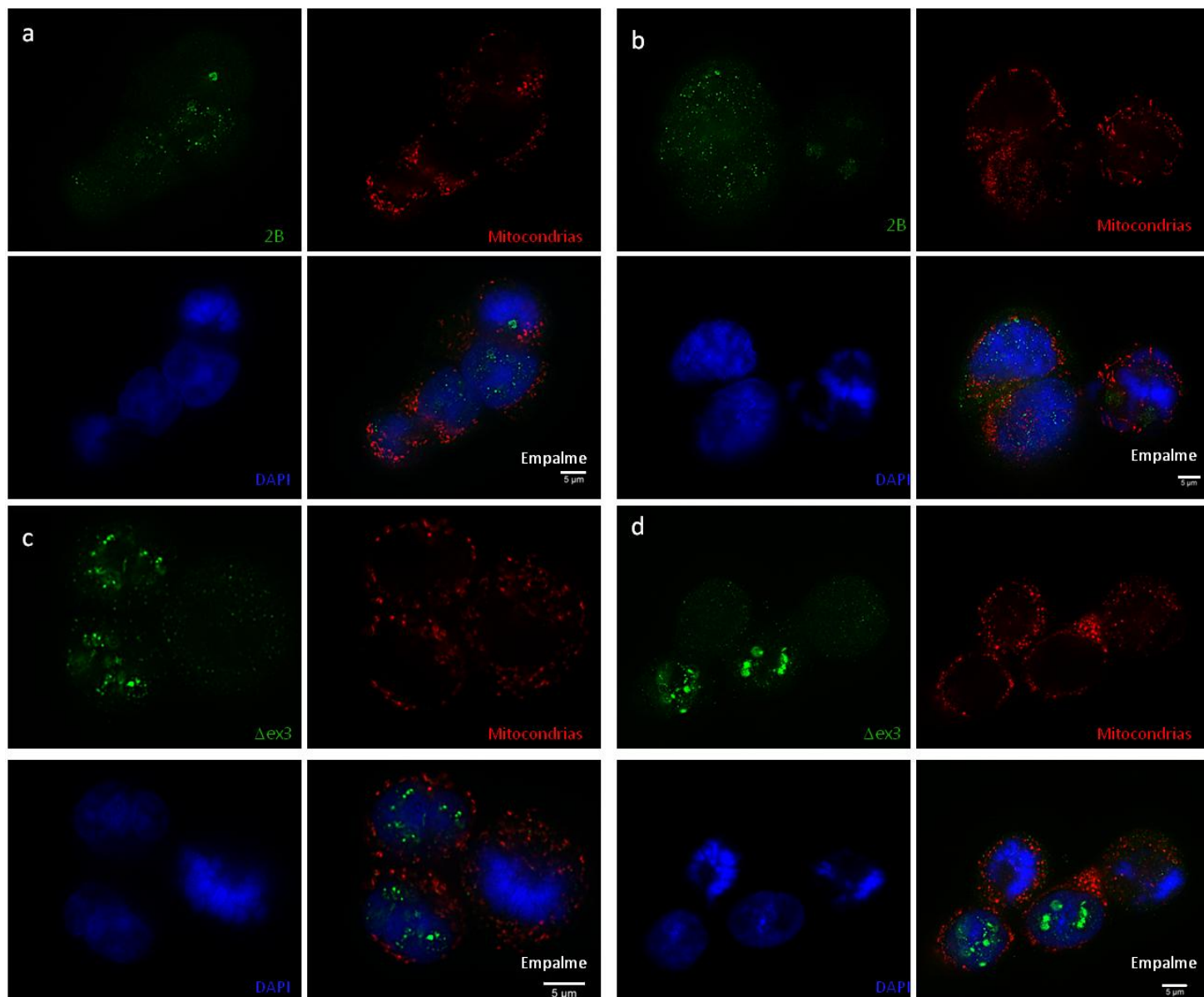


Imagen 19. Las isoformas de Survivina 2B y $\Delta ex3$ no colocalizan con las mitocondrias. a) Survivina 2B en células interfásicas y una profase, control. b) Survivina 2B en células tratadas con taxol, se muestran dos interfases y una profase. c) Survivina $\Delta ex3$ en células control, se muestran dos interfásicas y una mitótica. d) Survivina $\Delta ex3$ células tratadas con taxol, se muestran dos interfases y dos profases. En ninguna de las células se observa colocalización de Survivina 2B ni Survivina $\Delta ex3$ con las mitocondrias. En verde Survivina 2B/ $\Delta ex3$ (Cy3, 514 nm), en rojo β -tubulina (FITC, 488 nm) y en azul el DNA (DAPI, 405 nm). Las barras de escala representan 5 μ m. Imágenes tomadas en un microscopio ELYRA (Zeiss).

DISCUSIÓN

OSCILACIÓN DEL ÍNDICE MITÓTICO EN RESPUESTA A VINBLASTINA

El análisis del índice mitótico en células fijadas en laminillas en respuesta a taxol y vinblastina reveló importantes diferencias en la dinámica de arresto mitótico que estas drogas inducen. La vinblastina causa un arresto mitótico menos robusto que el taxol ya que, a las 12h, el tratamiento con taxol 100 nM induce el 72% de células en mitosis, mientras que la vinblastina 100 nM alcanza el 59%. Así mismo, la población de células tratadas con taxol 500 nM muestra un claro aumento en el índice mitótico, que se mantiene constante entre las 9 y las 18h. En contraste, las células tratadas con vinblastina 500 nM se quedan arrestadas únicamente entre las 12 y las 15h y el índice mitótico de esta población muestra un aumento nuevamente a las 21h. Sin embargo, el tratamiento con vinblastina 20 nM mostró una dinámica particular, ya que indujo un pico de mitosis del 40% a las 9h en contraste con el tratamiento con taxol 20 nM, cuyo pico a las 9h fue del 27%.

Las oscilaciones en el índice mitótico inducido por vinblastina podrían reflejar cambios en la concentración intracelular de la droga. Las concentraciones de vinblastina usadas en este estudio fueron escogidos en función del rango que la droga alcanza en el plasma de pacientes adultos (el máximo es entre 100 y 500 nM). Sin embargo, estas concentraciones no son necesariamente un reflejo de la concentración intracelular de la droga ²⁹. La expulsión, mediada por ejemplo por canales MDR (*Multi Drug Resistance*) ²⁹, o acumulación de vinblastina en el citoplasma de las células puede modificar sus efectos en los microtúbulos en base a los distintos mecanismos de acción de la droga a diferentes rangos de concentración ⁸⁵. Se sabe que concentraciones de vinblastina mayores a 10 nM destruyen el huso, mientras que concentraciones mayores a 10 μ M inducen la formación de cristales con tubulina ⁸⁶.

La concentración intracelular de vinblastina podría variar en función del tejido o línea celular, modificando así los efectos que esta pueda tener en la célula ²⁹. Por ejemplo, en células HeLa, la vinblastina 0.8 nM induce arresto mitótico y muerte celular ⁸⁵. Por el contrario, tal como se muestra en este trabajo, las células HCT116 tratadas con vinblastina 4 nM se comportan prácticamente igual que el control. Para probar esta hipótesis, sería

necesario probar la dinámica del arresto mitótico en un mayor número de líneas celulares y relacionarla con cambios en la concentración intracelular de la droga.

TRATAMIENTO CON TAXOL

El arresto mitótico inducido por taxol fue estudiado a detalle mediante el seguimiento en video de la población de células tratadas. El análisis de la grabación reveló algunas diferencias en la coordinación de los eventos del arresto mitótico con respecto al análisis del índice mitótico en laminillas. Aparentemente, la muerte celular tarda más en empezar en las células que fueron grabadas, lo cual podría sugerir que el arresto mitótico de las células HCT116-H2B/DsRed es más largo que en las HCT116 *silvestres*. Para determinar si este es el caso, se contó el índice mitótico de las células HCT116-H2B/DsRed a fin de compararlo con el índice mitótico del conteo en laminillas (ver más adelante). Al analizar el video, se observaron dos morfologías muy similares: las células con membrana “vacuolar” y las células “multinucleadas”, con cromosomas descondensados. Estas morfologías también eran predominantes en las inmunofluorescencias de 18 y 24h, donde el DNA fue teñido con DAPI. El seguimiento de las células en tiempo real permite distinguir que son fenómenos independientes. Sin embargo, estas dos morfologías pueden ser confundidas fácilmente en las laminillas. Así, para ver si las células HCT116-H2B/DsRed sufrían un arresto mitótico más largo que las HCT116 *silvestres*, se contó el número de células que mostraban alguna de estas morfologías a lo largo del tiempo en el video y en las laminillas. En realidad, las células HCT116-H2B/DsRed tardaron más en entrar a mitosis, pero el tiempo que pasaron arrestadas es similar, así como la proporción de células con cromosomas descondensados y/o con la membrana “vacuolar” (Imagen 21). No obstante, esta evaluación no explica por qué las células HCT116-H2B/DsRed tardan más en entrar a mitosis. Hay algunas consideraciones que pueden explicarlo:

- La transfección de la quimera H2B-DsRed podría modificar la dinámica de condensación de los cromosomas. Existe evidencia experimental de que la histona H2B está involucrada en este proceso ⁸⁷. La expresión de la quimera H2B-DsRed podría afectar la interacción de la histona con el DNA o con las demás histonas, alargando así el tiempo que tardan en condensarse los cromosomas.
- Al determinar el índice mitótico de los cultivos mediante fijación/tinción, los lavados necesarios para la fijación podrían provocar la pérdida de células mitóticas o muertas. Así mismo, en esta técnica, las células son incubadas en solución hipotónica antes de ser fijadas, lo cual permite una visualización más clara de los

cromosomas mitóticos, incluso en células profásicas. En contraste, podría haber células en el video que ya hubieran condensado sus cromosomas, pero que hayan sido confundidas con interfásicas.

- A fin de analizar el video, se enumeraron 44 células que se pudieran distinguir claramente al inicio del mismo para su seguimiento a lo largo de 50h. El video fue grabado en un microscopio confocal que permite hacer cortes en el eje z para poder distinguir diferentes planos focales. No obstante, algunas células se despegaron de la superficie de cultivo a lo largo del video y comenzaron a flotar en el medio. Su morfología no se puede distinguir aún en el plano más alejado de la superficie de cultivo. Esto excluyó algunas células del análisis. Adicionalmente, el video inició cuando el cultivo llevaba 8h de tratamiento, momento en el cual algunas células ya habían entrado a mitosis, lo cual hizo imposible determinar cuánto tiempo había pasado desde que hubieran iniciado la profase. Así, la n del análisis se redujo a únicamente 24 células. Por otro lado, los índices mitóticos en laminillas resultaron del conteo de 1000 células por laminilla. Estos experimentos fueron hechos por triplicado. Si bien el seguimiento de células en tiempo real arroja mucha información valiosa, será necesario hacer más repeticiones de estos experimentos para confirmar los resultados.
- Adicionalmente, las células que pierden la marca fluorescente en el video (ver Tabla 1) podrían ser confundidas con células interfásicas en las laminillas.
- Podría haber ligeras variaciones en las condiciones de cultivo de la cámara de incubación del microscopio donde se tomaron los videos con respecto a la incubadora donde se cultivaron las células que después fueron montadas en laminillas y teñidas.
- Finalmente, las células grabadas en el microscopio son sometidas a una exposición de láser cada 8 min, lo cual podría provocar fototoxicidad.

VARIACIÓN EN LA ACTIVACIÓN DEL ARRESTO MITÓTICO

Los resultados del análisis del índice mitótico muestran una amplia variedad de eventos relacionados con el arresto en mitosis. La concentración intracelular de las drogas utilizadas no es el único factor que puede influir en esta variabilidad: 1) Las diferentes respuestas de las células frente al tratamiento con distintos fármacos antimicrotúbulos también pueden depender de los mecanismos de activación del arresto mitótico de las células. El PMM se activa en respuesta a la falta de unión de microtúbulos a los

cinetocoros, o a la falta de tensión entre los cinetocoros de dos cromátidas hermanas ²⁶. En este sentido, tanto el taxol como la vinblastina pueden inducir un arresto mitótico, aunque probablemente por vías de señalización diferentes. 2) Adicionalmente, las distintas drogas que afectan a los microtúbulos pueden tener efectos en vías de señalización paralelas al PMM, lo que podría explicar sus diferentes implicaciones en la muerte en mitosis ⁷⁰.

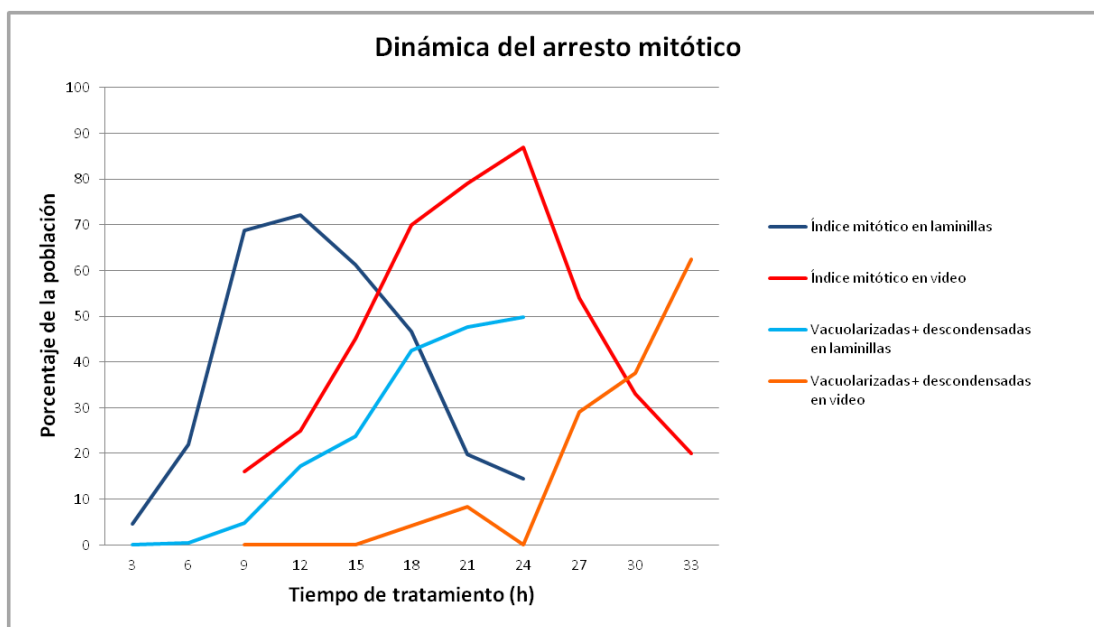


Imagen 20. Comparación de la dinámica de arresto observada en las laminillas contra la observada en video. Células tratadas con taxol 100 nM.

La tesis generalmente aceptada con respecto al fin de la mitosis sostiene que la degradación de la ciclina B es una condición *sine qua non* para la liberación de las células y su entrada nuevamente a G1. Una prueba de este requerimiento es que tanto la depleción experimental de CDC20 como la transfección de una ciclina B resistente a degradación son más eficientes e inducen un comportamiento menos variable que las terapias anti-microtúbulos al inducir la muerte por arresto mitótico ²⁷. Estas evidencias refuerzan la idea de que la variación en el desenlace del arresto mitótico no se debe tanto a variaciones en eficiencia del PMM *per se*, sino más bien a qué tan eficientemente las diferentes vías de señalización pueden activarlo (falta de tensión o falta de unión) ^{25,26}.

VARIACIÓN EN EL TIEMPO DE ARRESTO Y TIPO DE MUERTE

La muerte inducida por venenos del huso también da cuenta de una variabilidad en el tiempo de arresto previo a la muerte celular y en las distintas modalidades de muerte.

En este trabajo, más del 50% de las células tratadas con taxol murió antes de las 40h de tratamiento y éstas siguieron muriendo hasta el final del video. Ninguna de las células logró dividirse incluso después de la liberación del arresto mitótico. Esto significa que, si el cultivo se hubiera seguido comportando de esta manera, las células multinucleadas que quedaron al final del video tenían muy pocas probabilidades de volver a reproducirse y la mayoría hubiera muerto. Aún falta confirmar que este comportamiento del cultivo sea reproducible.

Con respecto a los tipos de muerte inducida por arresto mitótico, algunos autores reportan que es apoptótica²⁹. Sin embargo, resultados de inmunofluorescencias contra la caspasa 3 activa y contra fosfatidil-serina (con anexina V) en nuestro laboratorio muestran que éste no es el caso (Marco Andonegui, comunicación personal). Adicionalmente, en la literatura existen antecedentes que soportan este hallazgo. Un estudio reporta que la muerte en mitosis ocurre a través de BUB1 y es independiente de caspasas⁸⁸. Por otro lado, cuando Gascoigne y Taylor inhibieron la muerte inducida por fármacos anti-microtúbulos con un pan-inhibidor de caspasas, lograron reducir significativamente la muerte en mitosis, pero no totalmente³⁰. En cambio, incluso en algunas líneas celulares aumentó el porcentaje de células que morían en interfase después del arresto (a expensas del porcentaje de las que morían en mitosis). Otro trabajo indica que células en las que es sobre-expresada Bcl-2 mueren, al ser tratadas con venenos del huso, por un mecanismo independiente de caspasas²⁷.

Con base en estos antecedentes, en este trabajo se ha procurado evitar el término “apoptosis” al referirse a la muerte dependiente de arresto mitótico. Los resultados del presente estudio apoyan la idea de que el arresto mitótico inducido por fármacos anti-microtúbulos induce más de un tipo de muerte:

- Las células que perdieron la marca fluorescente y se encogen probablemente hayan muerto por necrosis.
- Otro tipo de muerte mostró una morfología similar al *membrane blebbing* que ocurre en la apoptosis, aunque queda por demostrar que este proceso comparta características bioquímicas con la apoptosis.

- Otra proporción de células murió con una morfología que no había sido descrita previamente: después de haber intentado dividir su citoplasma. Este fenómeno podría constituir un nuevo mecanismo de muerte por arresto mitótico, dado que no ocurre en mitosis ni en G1, sino en el proceso que ocurre entre las dos: la citocinesis. Propongo la palabra “metaxypnosis” (del griego *metaxý*, que significa entre y *ptosis*, que significa caída) para denotar a este nuevo tipo de muerte.
- Finalmente, algunas células mostraron una mezcla de más de una de las morfologías descritas. Esto podría significar que su muerte es resultado de varias vías de señalización diferentes (Imagen 15). Incluso en algunos casos, las células podrían iniciar un programa de apoptosis, pero morir por necrosis sin poder terminar de completarlo³³.

LAS VARIANTES DE SURVIVINA Y SU RELACIÓN CON LA MUERTE EN CÉLULAS MITÓTICAS

Es probable que los distintos aspectos de las variaciones del arresto mitótico sean definidos por una red de interacciones donde la regulación de las variables va más allá de los alcances de este estudio (*e.g.* expresión diferencial de MDRs, IAPs o caspasas). Una observación que apoya esta tesis proviene del video control presentado en este estudio en el que una célula murió por metaxypnosis después de segregar sus cromosomas, sin haber podido concluir la citocinesis durante 2h 24 min. Este evento demuestra que la muerte por arresto mitótico puede ocurrir en cultivos libres de drogas y sugiere que existen variables que lo definen que no fueron controladas en este estudio y/o no son susceptibles de ser controladas. Estas variables incluyen la abundancia de señales pro/antiapoptóticas en cada célula con respecto a las demás del mismo cultivo. La tesis central de este trabajo es que Survivina y sus isoformas constituyen un nodo central en la red de antagonismo de estas señales durante el arresto mitótico. Survivina podría tener actividad antiapoptótica dependiente de mitocondrias durante el arresto mitótico pero este aspecto no fue abordado en este estudio. Así mismo, antecedentes del laboratorio muestran que los niveles de Survivina disminuyen a lo largo del arresto mitótico, de tal manera que al parecer su disminución se asocia con la muerte de células arrestadas en mitosis (Marco Andonegui, comunicación personal).

Otro posible mecanismo de acción de Survivina en este proceso se sustenta en su actividad como regulador de la citocinesis. Otros grupos de investigación han descrito la ausencia del ortólogo de Survivina en levadura (Deterina) como causa de la muerte celular a través de errores en la citocinesis^{89,90}. Sin embargo, este fenómeno no ocurre en

Drosophila. Así mismo, recientemente se describió una mutación que afecta la función de Survivina en citocinesis, pero no en profase-metáfase. En espermátocitos de *Drosophila*, esta mutación previene la compleción de la citocinesis pero no se ha demostrado que dicha falla en la citocinesis induzca la muerte celular ⁹¹.

Dado que Survivina interacciona con los microtúbulos para poder ser reclutada al cuerpo medio, la alteración de la dinámica de los microtúbulos podría afectar su correcta localización en este sitio. Así, las drogas anti-microtúbulos podrían causar metaxiptosis mediante las alteraciones que inducen en el citoesqueleto y, como efecto secundario, la falla en el reclutamiento de Survivina.

Sin embargo, esta hipótesis no se pudo probar con las aproximaciones usadas en este trabajo. Por un lado, muy pocas células tratadas con taxol alcanzan la citocinesis y estas fueron observadas únicamente en video. Por otro lado, las técnicas que implican fijación no permiten predecir si una célula en la que falló el reclutamiento de Survivina hubiera muerto o no. Por lo tanto, para confirmar estas hipótesis es necesario generar células que expresen construcciones quiméricas de Survivina con algún reportero fluorescente y seguir estas células por videomicroscopía a lo largo del tratamiento con taxol o algún otro fármaco anti-microtúbulos.

En este estudio se observó que Survivina 2B se localiza en el anillo contráctil durante la citocinesis. Existen dos trabajos que concluyen que esta proteína no participa en la división celular ^{59,60}. Sin embargo, uno de ellos demuestra que Survivina 2B puede inmunoprecipitar a Aurora B y, con menor eficiencia, a Borealina ⁵⁹. El otro reporta que una sobre-expresión de Survivina 2B (marcada con un *tag* de HA) 38 veces mayor que la expresión endógena puede rescatar la falla de citocinesis que resulta de la depleción de Survivina; en contraste con la postura apoyada por la enorme mayoría de la literatura, los autores de este trabajo concluyen que Survivina 2B no promueve la apoptosis ⁶⁰. Por lo tanto, la observación del rescate de la depleción de Survivina se puede deber a un artefacto derivado del *tag* de HA. Adicionalmente, estos dos estudios definen la participación de esta proteína en base a la generación de células tetraploides en ausencia de Survivina al transfectar Survivina 2B. Esta aproximación no permite discernir los efectos de Survivina 2B en la muerte.

Dado que Survivina 2B no se localiza en centrómero, su interacción con Aurora B y Borealina puede ser explicada por la asociación de Survivina 2B con estas proteínas durante la citocinesis.

Survivina 2B cuenta con la secuencia peptídica del dominio que permite la interacción de Survivina con los microtúbulos (aunque la inserción del exón 2B podría causar cambios en el plegamiento del dominio). Una posibilidad es que exista cierto recambio entre Survivina y Survivina 2B en el anillo contráctil. En vista de que Survivina 2B es una proteína proapoptótica, su localización en el anillo contráctil podría facilitar la muerte por metaxiptosis.

Otro de los resultados de esta investigación consistió en la determinación de la dinámica de degradación de Survivina $\Delta ex3$ en la mitosis. Su clara disminución en anafase sugiere que podría ser un blanco de ubiquitinación de APC. Sin embargo, la mayoría de las células tratadas con taxol no alcanzan la anafase, por lo que no se pudo determinar si la degradación de Survivina $\Delta ex3$ hace parte de los mecanismos que definen la muerte/sobrevida de las células arrestadas en mitosis.

En cambio, los resultados de esta investigación sí revelaron una posible relación de Survivina $\Delta ex3$ con la muerte dependiente de arresto mitótico: en tanto que las células multinucleadas que se liberaron del arresto muestran una franca tendencia a morir, Survivina $\Delta ex3$ no se localiza en el nucleolo después del arresto mitótico. Recordemos que la degradación activa de Survivina $\Delta ex3$ en el nucleolo es necesaria para la actividad antiapoptótica de esta proteína⁶⁸.

De esta manera, la reorganización aberrante del DNA en múltiples núcleos a raíz de la liberación del arresto podría impedir la correcta localización de Survivina $\Delta ex3$ en las células y, por ende, inducir la muerte celular. Visto de esta forma, tal como la degradación de Survivina $\Delta ex3$ es necesaria para su actividad antiapoptótica en interfase⁶⁸, su degradación en anafase podría también tener implicaciones en la regulación de la muerte celular por arresto mitótico.

Así como con Survivina y Survivina 2B, ésta pregunta podría ser contestada con el seguimiento en video de células que expresen una quimera fluorescente de Survivina $\Delta ex3$, al ser tratadas con fármacos que inducen arresto mitótico.

DINÁMICA NOVEDOSA DE LOCALIZACIÓN/DEGRADACIÓN DE SURVIVINA 2B Y Δ EX3

Éste es el primer reporte en el que Survivina 2B muestra una localización dinámica a lo largo de la mitosis, primero en centrosomas y después relocalizándose al cuerpo medio durante la telofase y la citocinesis. En otros estudios, se han reportado estas dos localizaciones, pero de manera inconexa- en algunos trabajos una y en otros trabajos la otra. En la mayoría de los casos, la localización reportada de las isoformas es la de construcciones fluorescentes de la proteína en contraste con la localización presentada en este trabajo, que es de la proteína endógena. Así mismo, la localización de Survivina 2B no había sido reportada en células HCT116. En apoyo a la localización observada en este estudio, se ha reportado que Survivina 2B expresada de manera exógena puede coimmunoprecipitar con tubulina γ ⁷⁰. Esto permite descartar que dicha localización sea un artefacto de inespecificidad del anticuerpo usado. Estos antecedentes sugieren que Survivina 2B podría estar ejerciendo alguna función en los centrosomas.

La dinámica de degradación de Survivina Δ ex3 al inicio de la anafase observada en este estudio también es novedosa. Ha sido demostrado que al expresar de manera exógena Survivina Δ ex3 en células HeLa, ésta es degradada en el nucléolo en interfase⁶⁸. Sin embargo, no habían sido explorados los cambios de localización o abundancia de esta proteína durante la mitosis ni su localización en células HCT116. Así como en el caso de Survivina 2B, la mayoría de las aproximaciones para la determinación de la localización de Survivina Δ ex3 habían consistido en la transfección de quimeras fluorescentes. Survivina Δ ex3, a pesar de la ausencia del exón 3, comparte cierta homología estructural con Survivina (que es un blanco de degradación del APC), particularmente en el dominio BIR, que es esencial para la degradación de Survivina⁹². Esto sugiere que Survivina Δ ex3 puede ser un blanco de ubiquitinación del APC. Sin embargo, la dinámica de degradación de ambas proteínas es distinta, ya que Survivina se relocaliza al cuerpo medio en anafase y luego al anillo contráctil, donde contribuye a concluir la citocinesis. En contraste, Survivina Δ ex3 es totalmente degradada en anafase y vuelve a aparecer en la célula cuando se ensambla de nuevo el núcleo. La reaparición de Survivina Δ ex3 en células telofásicas es particularmente intrigante, ya que el gen de Survivina es reprimido durante G1. Una posibilidad para la reaparición de Survivina Δ ex3 es que haya una poza de su transcrito durante la mitosis que se comience a transcribir a partir de la telofase.

CONCLUSIONES

- El taxol induce un arresto mitótico más robusto que la vinblastina en células HCT116.
- La muerte celular inducida por arresto mitótico es más variable de lo que ha sido reconocido previamente. No constituye una apoptosis ni una necrosis típica. Adicionalmente, algunas células mueren después del arresto mitótico al intentar llevar a cabo la citocinesis, lo cual no había sido descrito antes. Este tipo de muerte podría ser denotado por el término “metaxyptosis”.
- Survivina 2B podría tener funciones en la segregación cromosómica, en la citocinesis o en la metaxyptosis.
- Survivina Δ ex3 podría ser un blanco de degradación del APC-proteosoma.
- La localización aberrante de Survivina Δ ex3 después del arresto mitótico podría constituir un mecanismo de muerte celular.

PERSPECTIVAS

Algunos trabajos anteriores a esta investigación sugieren fuertemente que Survivina y sus isoformas 2B y Δ ex3 participan en la regulación de la muerte inducida por arresto mitótico. En este estudio, el análisis del arresto mitótico en videomicroscopía y de la localización de Survivina 2B y Δ ex3 sugieren varios mecanismos por los cuales esto podría ocurrir. Sin embargo, quedan muchas preguntas abiertas. A continuación, se presentan brevemente algunas aproximaciones que podrían responder dichas preguntas y las posibles implicaciones de este trabajo para el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer.

En primer lugar, es necesario caracterizar a nivel molecular y bioquímico la metaxyptosis para confirmar que se trate de un tipo de muerte independiente de los que ya se conocen. Así mismo, habrá que buscar otros factores que puedan desencadenar la metaxyptosis. Esto podría revelar nuevos blancos terapéuticos.

Por otro lado, el seguimiento de las células por videomicroscopía a lo largo del arresto mitótico durante más tiempo que el que se siguieron en este estudio es esencial para

determinar la participación de las variantes de Survivina en este proceso y en la muerte que provoca. En dichos experimentos, será necesario incluir:

- Mayor número de líneas celulares
- Mayor número de fármacos
- Sobre-expresión/depleción de cada una de las variantes de Survivina
- El seguimiento de la localización de las variantes de Survivina en tiempo real.

Finalmente, es necesario elucidar los mecanismos de la modulación de la producción de variantes de Survivina: al aumentar la producción de Survivina 2B a expensas de la producción de Survivina y Survivina Δ ex3, se inclinaría fuertemente la balanza de factores pro/antiapoptóticos hacia la muerte en las células cancerosas. Así, dirigir un agente contra el *splicing* alternativo de Survivina podría aumentar la muerte de los tumores tratados con terapias antimicrotúbulos.

REFERENCIAS

- 1 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70 (2000).
- 2 Pines, J. Cyclins and cyclin-dependent kinases: take your partners. *Trends in biochemical sciences* 18, 195-197 (1993).
- 3 Malumbres, M. & Barbacid, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews. Cancer* 9, 153-166, doi:10.1038/nrc2602 (2009).
- 4 Malumbres, M. Physiological relevance of cell cycle kinases. *Physiological reviews* 91, 973-1007, doi:10.1152/physrev.00025.2010 (2011).
- 5 Pavletich, N. P. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *Journal of molecular biology* 287, 821-828, doi:10.1006/jmbi.1999.2640 (1999).
- 6 Ray, D. & Kiyokawa, H. CDC25A phosphatase: a rate-limiting oncogene that determines genomic stability. *Cancer research* 68, 1251-1253, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5983 (2008).
- 7 Alberts, B., Wilson, J. H. & Hunt, T. *Molecular biology of the cell*. 5th edn, (Garland Science, 2008).
- 8 McCabe, M. T., Azih, O. J. & Day, M. L. pRb-Independent growth arrest and transcriptional regulation of E2F target genes. *Neoplasia* 7, 141-151, doi:10.1593/neo.04394 (2005).
- 9 Deng, C., Zhang, P., Harper, J. W., Elledge, S. J. & Leder, P. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82, 675-684 (1995).
- 10 Canman, C. E. Replication checkpoint: preventing mitotic catastrophe. *Current biology : CB* 11, R121-124 (2001).
- 11 Carlson, F. D., Society of General Physiologists. & Marine Biological Laboratory (Woods Hole Mass.). *Physiological and biochemical aspects of nervous integration*. (Prentice-Hall, 1968).
- 12 Zhao, J., Meyerkord, C. L., Du, Y., Khuri, F. R. & Fu, H. 14-3-3 proteins as potential therapeutic targets. *Seminars in cell & developmental biology* 22, 705-712, doi:10.1016/j.semcdb.2011.09.012 (2011).
- 13 Lewin, B. *Cells*. (Jones and Bartlett Publishers, 2007).
- 14 Gascoigne, K. E. & Cheeseman, I. M. Kinetochore assembly: if you build it, they will come. *Current opinion in cell biology* 23, 102-108, doi:10.1016/j.ceb.2010.07.007 (2011).
- 15 Cheeseman, I. M., Chappie, J. S., Wilson-Kubalek, E. M. & Desai, A. The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore. *Cell* 127, 983-997, doi:10.1016/j.cell.2006.09.039 (2006).

- 16 Wan, X. *et al.* Protein architecture of the human kinetochore microtubule attachment site. *Cell* 137, 672-684, doi:10.1016/j.cell.2009.03.035 (2009).
- 17 Chan, F. L. *et al.* Active transcription and essential role of RNA polymerase II at the centromere during mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 1979-1984, doi:10.1073/pnas.1108705109 (2012).
- 18 Wong, L. H. *et al.* Centromere RNA is a key component for the assembly of nucleoproteins at the nucleolus and centromere. *Genome research* 17, 1146-1160, doi:10.1101/gr.6022807 (2007).
- 19 Lampson, M. A. & Cheeseman, I. M. Sensing centromere tension: Aurora B and the regulation of kinetochore function. *Trends in cell biology* 21, 133-140, doi:10.1016/j.tcb.2010.10.007 (2011).
- 20 Ruchaud, S., Carmena, M. & Earnshaw, W. C. Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, 798-812, doi:10.1038/nrm2257 (2007).
- 21 Goto, H., Yasui, Y., Nigg, E. A. & Inagaki, M. Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 7, 11-17 (2002).
- 22 Xu, D., Bai, J., Duan, Q., Costa, M. & Dai, W. Covalent modifications of histones during mitosis and meiosis. *Cell Cycle* 8, 3688-3694 (2009).
- 23 Carvalho, A., Carmena, M., Sambade, C., Earnshaw, W. C. & Wheatley, S. P. Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated HeLa cells. *Journal of cell science* 116, 2987-2998, doi:10.1242/jcs.00612 (2003).
- 24 Yamagishi, Y., Honda, T., Tanno, Y. & Watanabe, Y. Two histone marks establish the inner centromere and chromosome bi-orientation. *Science* 330, 239-243, doi:10.1126/science.1194498 (2010).
- 25 Musacchio, A. & Salmon, E. D. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, 379-393, doi:10.1038/nrm2163 (2007).
- 26 Weaver, B. A. & Cleveland, D. W. Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. *Cancer cell* 8, 7-12, doi:10.1016/j.ccr.2005.06.011 (2005).
- 27 Huang, H. C., Shi, J., Orth, J. D. & Mitchison, T. J. Evidence that mitotic exit is a better cancer therapeutic target than spindle assembly. *Cancer cell* 16, 347-358, doi:10.1016/j.ccr.2009.08.020 (2009).
- 28 Matson, D. R. & Stukenberg, P. T. Spindle poisons and cell fate: a tale of two pathways. *Molecular interventions* 11, 141-150, doi:10.1124/mi.11.2.12 (2011).
- 29 Mollinedo, F. & Gajate, C. Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 8, 413-450 (2003).

- 30 Gascoigne, K. E. & Taylor, S. S. Cancer cells display profound intra- and interline variation following prolonged exposure to antimetabolic drugs. *Cancer cell* 14, 111-122, doi:10.1016/j.ccr.2008.07.002 (2008).
- 31 Rieder, C. L. & Maiato, H. Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint. *Developmental cell* 7, 637-651, doi:10.1016/j.devcel.2004.09.002 (2004).
- 32 Cross, S. M. *et al.* A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science* 267, 1353-1356 (1995).
- 33 Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* 35, 495-516, doi:10.1080/01926230701320337 (2007).
- 34 Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26, 239-257 (1972).
- 35 Galluzzi, L. *et al.* Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell death and differentiation* 19, 107-120, doi:10.1038/cdd.2011.96 (2012).
- 36 Frank, S. A. in *Dynamics of Cancer: Incidence, Inheritance, and Evolution* (2007).
- 37 Weinberg, R. A. *The Biology of Cancer*. (Garland Science, 2007).
- 38 Balmain, A., Gray, J. & Ponder, B. The genetics and genomics of cancer. *Nature genetics* 33 Suppl, 238-244, doi:10.1038/ng1107 (2003).
- 39 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013 (2011).
- 40 Kelly, R. J., Lopez-Chavez, A., Citrin, D., Janik, J. E. & Morris, J. C. Impacting tumor cell-fate by targeting the inhibitor of apoptosis protein survivin. *Molecular cancer* 10, 35, doi:10.1186/1476-4598-10-35 (2011).
- 41 Velculescu, V. E. *et al.* Analysis of human transcriptomes. *Nature genetics* 23, 387-388, doi:10.1038/70487 (1999).
- 42 Li, F. & Ling, X. Survivin study: an update of "what is the next wave"? *Journal of cellular physiology* 208, 476-486, doi:10.1002/jcp.20634 (2006).
- 43 Jiang, Y., Saavedra, H. I., Holloway, M. P., Leone, G. & Altura, R. A. Aberrant regulation of survivin by the RB/E2F family of proteins. *The Journal of biological chemistry* 279, 40511-40520, doi:10.1074/jbc.M404496200 (2004).
- 44 Li, F. *et al.* Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 396, 580-584, doi:10.1038/25141 (1998).
- 45 Kobayashi, K., Hatano, M., Otaki, M., Ogasawara, T. & Tokuhiya, T. Expression of a murine homologue of the inhibitor of apoptosis protein is related to cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 1457-1462 (1999).

- 46 Li, Y. *et al.* The expression of antiapoptotic protein survivin is transcriptionally upregulated by DEC1 primarily through multiple sp1 binding sites in the proximal promoter. *Oncogene* 25, 3296-3306, doi:10.1038/sj.onc.1209363 (2006).
- 47 Zhao, J., Tenev, T., Martins, L. M., Downward, J. & Lemoine, N. R. The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner. *Journal of cell science* 113 Pt 23, 4363-4371 (2000).
- 48 Li, F. & Altieri, D. C. Transcriptional analysis of human survivin gene expression. *The Biochemical journal* 344 Pt 2, 305-311 (1999).
- 49 Altieri, D. C. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nature reviews. Cancer* 3, 46-54, doi:10.1038/nrc968 (2003).
- 50 Mita, A. C., Mita, M. M., Nawrocki, S. T. & Giles, F. J. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14, 5000-5005, doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0746 (2008).
- 51 O'Connor, D. S. *et al.* Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 13103-13107, doi:10.1073/pnas.240390697 (2000).
- 52 Wheatley, S. P. & McNeish, I. A. Survivin: a protein with dual roles in mitosis and apoptosis. *International review of cytology* 247, 35-88, doi:10.1016/S0074-7696(05)47002-3 (2005).
- 53 Rosa, J., Canovas, P., Islam, A., Altieri, D. C. & Doxsey, S. J. Survivin modulates microtubule dynamics and nucleation throughout the cell cycle. *Molecular biology of the cell* 17, 1483-1493, doi:10.1091/mbc.E05-08-0723 (2006).
- 54 Lens, S. M. *et al.* Survivin is required for a sustained spindle checkpoint arrest in response to lack of tension. *The EMBO journal* 22, 2934-2947, doi:10.1093/emboj/cdg307 (2003).
- 55 Zaffaroni, N. *et al.* Expression of the anti-apoptotic gene survivin correlates with taxol resistance in human ovarian cancer. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 59, 1406-1412 (2002).
- 56 Wertz, I. E. *et al.* Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7. *Nature* 471, 110-114, doi:10.1038/nature09779 (2011).
- 57 Kelly, A. E. *et al.* Survivin reads phosphorylated histone H3 threonine 3 to activate the mitotic kinase Aurora B. *Science* 330, 235-239, doi:10.1126/science.1189505 (2010).
- 58 Wang, F. *et al.* Histone H3 Thr-3 phosphorylation by Haspin positions Aurora B at centromeres in mitosis. *Science* 330, 231-235, doi:10.1126/science.1189435 (2010).
- 59 Noton, E. A. *et al.* Molecular analysis of survivin isoforms: evidence that alternatively spliced variants do not play a role in mitosis. *The Journal of biological chemistry* 281, 1286-1295, doi:10.1074/jbc.M508773200 (2006).

- 60 Jacob, N. K., Cooley, J. V., Shirai, K. & Chakravarti, A. Survivin splice variants are not essential for mitotic progression or inhibition of apoptosis induced by doxorubicin and radiation. *OncoTargets and therapy* 5, 7-20, doi:10.2147/OTT.S28147 (2012).
- 61 Caldas, H. *et al.* Survivin splice variants regulate the balance between proliferation and cell death. *Oncogene* 24, 1994-2007, doi:10.1038/sj.onc.1208350 (2005).
- 62 Altieri, D. C. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 22, 8581-8589, doi:10.1038/sj.onc.1207113 (2003).
- 63 Marusawa, H. *et al.* HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *The EMBO journal* 22, 2729-2740, doi:10.1093/emboj/cdg263 (2003).
- 64 Dohi, T. *et al.* An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 279, 34087-34090, doi:10.1074/jbc.C400236200 (2004).
- 65 Dohi, T., Beltrami, E., Wall, N. R., Plescia, J. & Altieri, D. C. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *The Journal of clinical investigation* 114, 1117-1127, doi:10.1172/JCI22222 (2004).
- 66 McNeish, I. A. *et al.* Survivin interacts with Smac/DIABLO in ovarian carcinoma cells but is redundant in Smac-mediated apoptosis. *Experimental cell research* 302, 69-82, doi:10.1016/j.yexcr.2004.08.029 (2005).
- 67 Malcles, M. H. *et al.* Characterisation of the anti-apoptotic function of survivin-DeltaEx3 during TNFalpha-mediated cell death. *British journal of cancer* 96, 1659-1666, doi:10.1038/sj.bjc.6603768 (2007).
- 68 Song, Z. & Wu, M. Identification of a novel nucleolar localization signal and a degradation signal in Survivin-deltaEx3: a potential link between nucleolus and protein degradation. *Oncogene* 24, 2723-2734, doi:10.1038/sj.onc.1208097 (2005).
- 69 You, R. I. *et al.* Inhibition of lymphotoxin-beta receptor-mediated cell death by survivin-DeltaEx3. *Cancer research* 66, 3051-3061, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2479 (2006).
- 70 Ling, X., Cheng, Q., Black, J. D. & Li, F. Forced expression of survivin-2B abrogates mitotic cells and induces mitochondria-dependent apoptosis by blockade of tubulin polymerization and modulation of Bcl-2, Bax, and survivin. *J Biol Chem* 282, 27204-27214, doi:10.1074/jbc.M705161200 (2007).
- 71 Jeyapakash, A. A. *et al.* Structure of a Survivin-Borealin-INCENP core complex reveals how chromosomal passengers travel together. *Cell* 131, 271-285, doi:10.1016/j.cell.2007.07.045 (2007).
- 72 Atlasi, Y., Mowla, S. J. & Ziaee, S. A. Differential expression of survivin and its splice variants, survivin-DeltaEx3 and survivin-2B, in bladder cancer. *Cancer detection and prevention* 32, 308-313, doi:10.1016/j.cdp.2008.12.001 (2009).
- 73 Okamura, K., Koike, H., Sekine, Y., Matsui, H. & Suzuki, K. Survivin and its spliced isoform gene expression is associated with proliferation of renal cancer cells and clinical stage of renal cancer. *Cancer Epidemiol* 33, 137-141, doi:10.1016/j.canep.2009.06.005 (2009).

- 74 Mahotka, C. *et al.* Distinct in vivo expression patterns of survivin splice variants in renal cell carcinomas. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 100, 30-36, doi:10.1002/ijc.10450 (2002).
- 75 Meng, H., Lu, C., Mabuchi, H. & Tanigawa, N. Prognostic significance and different properties of survivin splicing variants in gastric cancer. *Cancer letters* 216, 147-155, doi:10.1016/j.canlet.2003.12.020 (2004).
- 76 Ryan, B. *et al.* Expression of survivin and its splice variants survivin-2B and survivin-DeltaEx3 in breast cancer. *British journal of cancer* 92, 120-124, doi:10.1038/sj.bjc.6602314 (2005).
- 77 Krieg, A. *et al.* Expression of different survivin variants in gastric carcinomas: first clues to a role of survivin-2B in tumour progression. *British journal of cancer* 86, 737-743, doi:10.1038/sj.bjc.6600153 (2002).
- 78 Zhu, N., Gu, L., Findley, H. W., Li, F. & Zhou, M. An alternatively spliced survivin variant is positively regulated by p53 and sensitizes leukemia cells to chemotherapy. *Oncogene* 23, 7545-7551, doi:10.1038/sj.onc.1208038 (2004).
- 79 Vegran, F. *et al.* Association of p53 gene alterations with the expression of antiapoptotic survivin splice variants in breast cancer. *Oncogene* 26, 290-297, doi:10.1038/sj.onc.1209784 (2007).
- 80 Small, T. W. & Pickering, J. G. Nuclear degradation of Wilms tumor 1-associating protein and survivin splice variant switching underlie IGF-1-mediated survival. *The Journal of biological chemistry* 284, 24684-24695, doi:10.1074/jbc.M109.034629 (2009).
- 81 Uren, A. G. *et al.* Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype. *Current biology : CB* 10, 1319-1328 (2000).
- 82 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* 8, 49-59, doi:10.1016/j.ccr.2005.06.003 (2005).
- 83 Swansbury, J. in *Methods in Molecular Biology* Vol. 220 (ed John Swansbury) (Springer Protocols, 2003).
- 84 Shi, J., Orth, J. D. & Mitchison, T. Cell type variation in responses to antimetabolic drugs that target microtubules and kinesin-5. *Cancer research* 68, 3269-3276, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6699 (2008).
- 85 Jordan, M. A. & Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature reviews. Cancer* 4, 253-265, doi:10.1038/nrc1317 (2004).
- 86 Jordan, M. A. & Wilson, L. Kinetic analysis of tubulin exchange at microtubule ends at low vinblastine concentrations. *Biochemistry* 29, 2730-2739 (1990).

- 87 de la Barre, A. E., Angelov, D., Molla, A. & Dimitrov, S. The N-terminus of histone H2B, but not that of histone H3 or its phosphorylation, is essential for chromosome condensation. *The EMBO journal* 20, 6383-6393, doi:10.1093/emboj/20.22.6383 (2001).
- 88 Niikura, Y., Dixit, A., Scott, R., Perkins, G. & Kitagawa, K. BUB1 mediation of caspase-independent mitotic death determines cell fate. *The Journal of cell biology* 178, 283-296, doi:10.1083/jcb.200702134 (2007).
- 89 Fraser, A. G., James, C., Evan, G. I. & Hengartner, M. O. Caenorhabditis elegans inhibitor of apoptosis protein (IAP) homologue BIR-1 plays a conserved role in cytokinesis. *Current biology : CB* 9, 292-301 (1999).
- 90 Uren, A. G. *et al.* Role for yeast inhibitor of apoptosis (IAP)-like proteins in cell division. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 10170-10175 (1999).
- 91 Szafer-Glusman, E., Fuller, M. T. & Giansanti, M. G. Role of Survivin in cytokinesis revealed by a separation-of-function allele. *Molecular biology of the cell* 22, 3779-3790, doi:10.1091/mbc.E11-06-0569 (2011).
- 92 Zhao, J., Tenev, T., Martins, L. M., Downward, J. & Lemoine, N. R. The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner. *J Cell Sci* 113 Pt 23, 4363-4371 (2000).

Abreviaturas

DNA	Ácido desoxiribonucleico
cDNA	DNA complementario
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín Trifosfato
BIR	Región de IAP en Baculovirus
Cdk	Ciclina Dependiente de Cinasa
DIABLO	Proteína de Unión a IAP con Bajo PI
dNTPs	Desoxinucleótidos

Fase G2	Fase “gap” o intervalo 2
Fase M	Fase Mitosis
GAPDH	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenada
GFP	Proteína Verde Fluorescente
IAP	Proteínas Inhibidoras de Apoptosis
INCENP	Proteína Interna del Centrómero
NF- κ B	Factor Nuclear- κ B
RT	Transcriptasa reversa

Abreviaturas de medidas

UA	Unidades Aéreas
g	Gramos
mg	Miligramos
μ g	Microgramos
ng	Nanogramos
ml	Mililitros
μ l	Microlitros
M	Moles
mM	Milimoles
μ M	Micromoles
nM	Nanomoles

pb Pares de bases

h Horas

min Minutos