



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

ALTERACIONES EN LA CITOCINESIS COMO UN  
MECANISMO ALTERNATIVO DE TOXICIDAD  
INDUCIDO POR PACLITAXEL.

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
BIÓLOGO**

**P R E S E N T A :**  
MARCO ARMANDO ESCOBAR ARRAZOLA

**DIRECTOR DE TESIS:**  
DR. MARCO ALONSO ANDONEGUI ELGUERA

**2018**  
**Ciudad Universitaria, CDMX.**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**1. Datos del alumno**

Escobar  
Arrazola  
Marco Armando  
51-12-66-27  
Universidad Nacional Autónoma de  
México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
310147729

**2. Datos del tutor**

Dr.  
Marco Alonso  
Andonegui  
Elguera

**3. Datos del sinodal 1**

Dr.  
Luis Alonso  
Herrera  
Montalvo

**4. Datos del sinodal 2**

Dra.  
María Eugenia  
Gonsebatt  
Bonaparte

**5. Datos del sinodal 3**

Biól.  
Saúl  
Cano  
Colín

**6. Datos del sinodal 4**

LIBB.  
Rodrigo Enrique  
Cáceres  
Gutiérrez

**7. Datos del trabajo escrito**

Alteraciones en la citocinesis como un mecanismo alternativo de toxicidad inducido por paclitaxel.  
76 p  
2018



### **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Carcinogénesis del Instituto Nacional de Cancerología, en la unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM; bajo la dirección del Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo, la tutela del Dr. Marco Alonso Andonegui Elguera y el apoyo del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT, IN208815) y el Colegio Mexicano para la Investigación en Cáncer (C-MIC).

Agradezco el apoyo académico del cuerpo docente de la facultad de ciencias de la UNAM, así como también, al taller de “Bases moleculares del cáncer” a cargo del Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo.

Agradezco al grupo de investigadores asociados del Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo, por su incondicional apoyo en mi formación como científico en la línea de investigación: Inestabilidad cromosómica.

Agradezco el generoso apoyo técnico y personal de la M. en BB. Clementina Castro Hernández.

Finalmente, agradezco y reconozco a mi comité de sinodales que dedicaron tiempo en revisar, comprender y mejorar el presente trabajo a través de sus valiosas críticas y observaciones:

Dr. Marco Alonso Andonegui Elguera  
Instituto Nacional de Cancerología

Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo  
Instituto Nacional de Cancerología

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte  
Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Biól. Saúl Cano Colín  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición

LIBB. Rodrigo Enrique Cáceres Gutiérrez  
Instituto Nacional de Cancerología

## «TABLA DE CONTENIDO»

<b>ANTECEDENTES</b>	<b>8</b>
1. Ciclo celular eucarionte.....	8
1.1. División Celular.....	9
1.1.1. Mitosis.....	9
1.1.1.1. Punto de Monitoreo Mitótico.....	11
1.1.2. Citocinesis.....	14
2. Drogas Antimitóticas y Su Importancia En El Estudio De La División Celular.....	17
2.1. Drogas Anti Microtúbulos.....	17
2.2. Taxanos.....	18
2.2.1. Paclitaxel (Taxol®).....	20
3. Destino Celular Inducido Por Paclitaxel.....	21
3.1. Arresto Mitótico.....	21
3.1.1. Muerte Celular Durante La Mitosis.....	21
3.2. "Escape De Mitosis" (Mitotic Slippage).....	23
3.2.1. Progresión A Través Del Ciclo Celular.....	23
3.2.2. Arresto En Interfase.....	23
3.2.3. Muerte Durante Interfase.....	24
4. Mecanismo De Toxicidad Generado Por el Paclitaxel.....	24
4.1. Mecanismo Clásico.....	25
4.2. Mecanismo Alternativo.....	25
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>26</b>
<b>PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>27</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>27</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>27</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>27</b>
<b>MÉTODOS</b>	<b>28</b>
1. Línea Celular y Condiciones De Cultivo Celular.....	28
2. Sincronización Celular.....	28
3. Tratamiento con Fármacos.....	28
4. Cuantificación Celular por microscopía fotónica.....	28
4.1. Índice Mitótico (IM), De Células Binucleadas (IBn) y De Células Poliploides (IPp).....	28
5. Citometría De Flujo.....	29
5.1. Análisis De La Población De Células Sub-G1 y Poliploides.....	29
5.2. Inmunodetección De $\gamma$ H2A.X.....	29
5.3. Inmunodetección De La Histona H3S10ph.....	30
6. Video Por Microscopía En Time-Lapse.....	30
<b>RESULTADOS</b>	<b>31</b>
1. Obtención De La Dosis Mínima Efectiva De Citocalasina B y Blebistatina.....	31
1.1. Conteo De Células Binucleadas.....	31
1.2. Efecto Citotóxico.....	36
1.3. Conteo De Células Poliploides.....	36
2. Los Tratamiento De Paclitaxel (100 nM) con Citocalasina B (2 $\mu$ g/ml) o Blebistatina (50 $\mu$ M) No Alteran La Dinámica Del Arresto Mitótico.....	38
3. Células Tratadas con Paclitaxel + CB o BBT Poseen Niveles Bajos De Daño Al DNA Respecto Al Generado En Células Tratadas Únicamente Con Paclitaxel.....	38
4. Células Tratadas Con Paclitaxel + CB o BBT Mantienen Un Efecto Tóxico Mínimo En Relación A las Células Tratadas Únicamente Con Paclitaxel.....	40
5. Inhibición De Movimientos En La Membrana Plasmática (surcos citocinéticos) En Células HCT116 Posterior A La Salida Del Arresto Mitótico en Tiempo Real.....	42
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>43</b>
1. La Dinámica del Arresto Mitótico en Respuesta a los Diferentes Tratamientos "Estadísticamente" Favorece al Modelo de Estudio.....	43
2. "Enérgicas Acciones; Enérgicas Consecuencias": El Daño al DNA es Generado a Través de Movimientos de la Membrana Plasmática Inducidos por Paclitaxel.....	44

3. Efecto Tóxico Causado por la Formación de Surcos en la Membrana Plasmática en Células HCT116 Tratadas con Paclitaxel.....	45
4. Variación Celular En Tiempo Real: Heterogeneidad en la Respuesta a los Distinto Tratamientos con Paclitaxel Mediante Microscopía de Time-lapse .....	46
5. Un Mecanismo Alternativo De Toxicidad en Construcción.....	46
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>47</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>48</b>
<b>UNIDADES DE MEDICIÓN</b>	<b>49</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS</b>	<b>49</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>51</b>
<b>ANEXO</b>	<b>57</b>
1. Especificaciones de Reactivos y Soluciones. ....	57
1.1. Reactivos. ....	57
1.2. Soluciones.....	59
2. Protocolos En Extenso. ....	60
2.1. Sincronización celular: .....	60
2.2. Tratamientos: .....	61
2.2.1. Tratamiento con paclitaxel. ....	61
2.2.2. Tratamiento con paclitaxel + citocalasina b .....	61
2.2.3. Tratamiento con paclitaxel + blebistatina. ....	62
2.3. Índice Mitótico (IM), De Células Binucleadas (IBn) y De Células Poliploides (IPp). ....	63
2.4. Análisis De La Población De Células Sub-G1 y Poliploides. ....	64
2.5. Inmunodetección De $\gamma$ H2A.X.....	65
2.6. Inmunodetección De H3S10ph.....	66
2.7. Video Por Microscopía En Time-Lapse. ....	67
3. Figuras Suplementarias. ....	68

## RESUMEN

El ciclo celular eucarionte posee una maquinaria capaz de interrumpir la progresión de la división celular a partir de un sistema de señales denominado “*Punto de Monitoreo Mitótico*” (PMM), el cual es activado cuando se presentan defectos en la unión entre microtúbulos y cinetocoro. La exposición a ciertas drogas anti mitóticas provoca alteraciones en la dinámica del citoesqueleto de microtúbulos y por lo tanto, la detención en mitosis («arresto mitótico») por tiempo indefinido. Por tal motivo, la división celular es considerada un importante blanco terapéutico para el tratamiento contra el cáncer. El paclitaxel (PTX) es una droga anti microtúbulos que impide la salida de la mitosis. Como resultado de la acción del PTX la célula puede morir en mitosis o escapar del arresto a través de un fenómeno llamado *mitotic slippage*. Las células que se liberan de mitosis son detenidas en G<sub>1</sub>, pueden progresar a través del ciclo celular o morir por apoptosis en interfase. Además, se sabe que el PTX provoca daño al DNA y toxicidad en las células que se liberaron del arresto mitótico. Por otra parte, nuestro grupo ha demostrado que durante el *mitotic slippage*, las células sufren cambios drásticos en la membrana plasmática similares a los observados en un intento fallido de citocinesis, debido a que el PTX puede promover la formación de surcos citocinéticos (SC) a través de la interacción de los microtúbulos con la membrana plasmática. Nosotros nos preguntamos si dichos movimientos de la membrana durante el *mitotic slippage* se deben a la formación de los SC y que si estos son los causantes del daño al DNA y la toxicidad observados posteriormente.

El objetivo de este trabajo fue determinar la relación entre la formación de SC y la toxicidad en células HCT116 tratadas con PTX que fueron liberadas de un arresto mitótico prolongado. Nuestra hipótesis propone que el paclitaxel favorece la formación de SC hacia el final de la mitosis prolongada, provocando daño al DNA y, por lo tanto, un aumento en la toxicidad en las células HCT116.

Como modelo de estudio se utilizó la línea celular HCT116, la cual se sincronizó con timidina y se trató con PTX solo o en combinación con agentes anticitocinéticos en los tiempos establecidos. Primeramente, se obtuvo la concentración mínima efectiva de los agentes anticitocinéticos a través de ensayos de dosis-respuesta utilizando 3 parámetros: el índice de células binucleadas, efecto citotóxico e índice de células poliploides. Las concentraciones mínimas efectivas para inhibir la citocinesis con un menor efecto tóxico y un porcentaje mayor de células viables fueron 2 µg/ml de citocalasina B (CB) y 50 µM de blebistatina (BBT). Posteriormente, se analizó el índice mitótico en las condiciones en las que fueron tratadas las células a través de microscopía fotónica y citometría de flujo, en donde se observó el mismo índice mitótico para los tres tratamientos analizados. Esto sugiere que el tratamiento de PTX en combinación con los fármacos anticitocinéticos no induce variaciones en el tiempo de arresto y salida de la mitosis respecto al tratamiento exclusivo con PTX. Adicionalmente, se evaluó el daño al DNA inducido con PTX y PTX en combinación con CB y BBT posterior a la salida del arresto mitótico mediante ensayos con gamma H2A.X a través de citometría de flujo. Esto mostró un incremento gradual en el daño al DNA en células tratadas únicamente con PTX posterior a la salida del arresto mitótico. En contraste, se observó un decremento en el daño al DNA después de la salida del arresto mitótico con el tratamiento de PTX en combinación con CB y BBT. Esto podría implicar que el daño al DNA generado, posterior al arresto mitótico, es atribuido a la inducción de los SC generados por PTX. Contrariamente, la disminución del daño al DNA se asocia a la inhibición de los SC durante el tratamiento con CB y BBT en combinación con PTX. Posteriormente, se evaluó el efecto citotóxico por citometría de flujo mediante el análisis de la población Sub G<sub>1</sub>. Aquí, se observó un incremento en el daño al DNA después del *mitotic slippage* en células tratadas con PTX, respecto al observado en el

tratamiento de PTX en conjunto con CB y BBT y un aumento en el porcentaje de células muertas posterior a la salida del arresto mitótico con PTX. Esto sugiere que el efecto citotóxico observado en el tratamiento exclusivamente con PTX después de la salida del arresto mitótico se asocia con el daño al DNA y por ende a la inducción de SC. El caso contrario fue observado en el tratamiento de PTX en combinación con las drogas anticitocinéticas, adquiriendo menor porcentaje de células muertas. Así mismo, se evaluó la capacidad del PTX para inhibir la citocinesis de células HCT116 en tiempo real a través de microscopía en *time-lapse* y observando de manera directa una disminución en la formación de SC en células individuales tratadas con PTX con CB y BBT, y un aumento total de células con SC durante el tratamiento exclusivo con PTX. Por tal razón, la inducción de SC con PTX promueve el daño al DNA y favorece la muerte en células que han salido del arresto mitótico.

Los datos obtenidos durante el presente trabajo determinaron que el daño al DNA y el efecto citotóxico son generados por la inducción de SC en células HCT116 expuestas a PTX posterior a la salida del arresto mitótico, confirmando la presencia de un mecanismo alternativo de toxicidad en una fracción de la población celular.



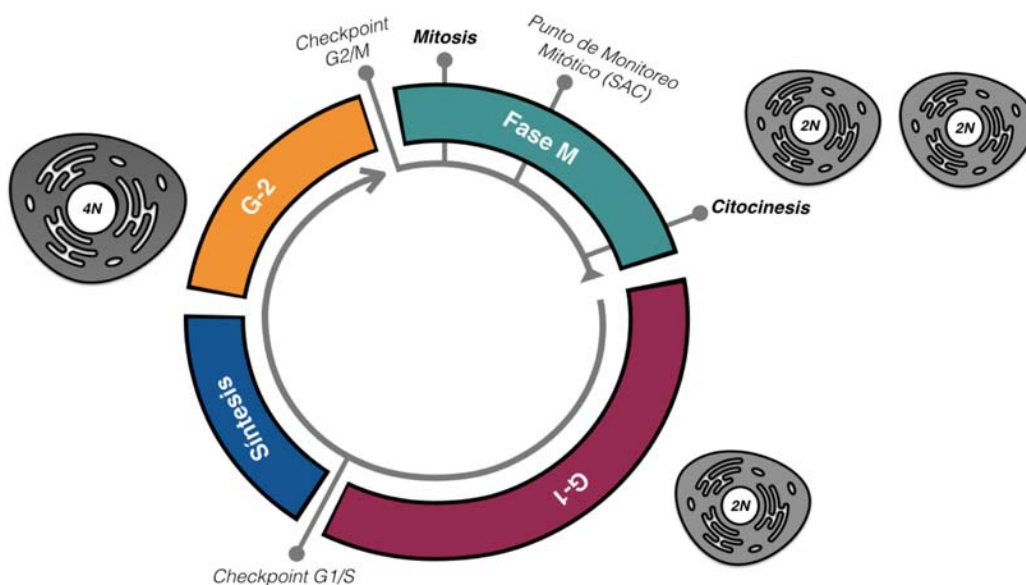
## ANTECEDENTES

La célula es considerada la unidad básica, funcional y estructural de todos los seres vivos; entidad que le otorga continuidad a la vida. Una actividad esencial de la célula es la reproducción, y la vida depende de la destreza de una sola célula para dividirse. Todos los seres vivos, desde una bacteria hasta un mamífero son producto de la constante ronda de crecimiento, división y diferenciación que se ha mantenido conservada en el tiempo a través de varios millones de años sobre el planeta tierra<sup>1,2</sup>.

Desde el momento en que Rudolf Virchow proclamara el famoso “*Omnis Cellula ex Cellula*” (una célula deriva de otra célula preexistente), el desafío ha sido comprender y explicar cómo la célula se duplica y transmite su información genética a la siguiente generación, un proceso denominado Ciclo Celular<sup>4</sup>.

### 1. CICLO CELULAR EUKARIONTE.

El ciclo celular es considerado una secuencia de periodos discretos, donde una célula duplica el contenido genético y posteriormente lo divide en dos células hijas totalmente independientes; un principio organizador que distingue células procariontes y eucariontes<sup>5</sup>. En procariontes, el crecimiento y la duplicación del DNA ocurren durante todo el ciclo celular y los cromosomas duplicados son distribuidos a las células hijas en asociación con la membrana plasmática. En eucariontes, el ciclo celular es más complejo y se organiza en cuatro periodos. La progresión entre los periodos del ciclo celular eucarionte es controlada por una maquinaria reguladora que no sólo coordina los diferentes eventos, sino también asocia el ciclo celular con señales extracelulares que controlan la proliferación de la célula<sup>8</sup>. Aunque ciertas características del ciclo celular no se repiten de organismo a organismo, hay propiedades que son generales a lo largo del ciclo en células eucariontes<sup>2,3</sup>.



**Figura No. 1. Las cuatro fases del ciclo celular eucarionte.** En la mayoría de las células, las fases Gap separan a los principales eventos del ciclo celular; fase de síntesis (azul) y fase M (verde). La fase G1 (rosa) se ubica entre la fase M y la fase S, mientras que G2 (naranja) se localiza entre la fase S y M.

La mayoría de las células eucariontes coordinan la síntesis de DNA y la segregación de los cromosomas para generar una cuidadosa replica de sí mismas. Esos eventos son confinados a periodos denominados síntesis (S) y mitosis (M) <sup>5</sup>. En células de mamífero, la separación temporal de la síntesis de DNA y mitosis permite la existencia de fases intermedias; Gap 1 (G<sub>1</sub>) y Gap 2 (G<sub>2</sub>) que dividen a los dos principales eventos del ciclo celular <sup>6</sup>. La fase G<sub>1</sub> delimita el final de la fase M y el inicio de la fase S; mientras que, G<sub>2</sub> separa el fin de la fase S y el comienzo de la fase M <sup>2</sup>.

Un ciclo completo de proliferación en eucariontes tradicionalmente implica una progresión secuencial a través de las fases G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> y M <sup>5</sup> (Figura No. 1). Las fases G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub> son nombradas en conjunto interfase, el período más largo del ciclo celular y donde ocurre la duplicación del DNA y el crecimiento celular <sup>2, 4-6</sup>.

Las fases G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> proporcionan el tiempo necesario para que la célula monitoree el ambiente interno y externo, asegurando que las condiciones sean adecuadas antes de comprometer la entrada a las fases S y M respectivamente <sup>2</sup>. La fase G<sub>1</sub> también es un importante periodo de regulación, dado que la mayoría de las células pueden comprometerse en progresar a través del ciclo celular si las condiciones extracelulares son favorables. Si las condiciones extracelulares son desfavorables, la célula retrasa el progreso por G<sub>1</sub> e incluso entra a un estado de quiescencia conocido como G<sub>0</sub>, hasta que las condiciones externas sean nuevamente favorables <sup>2, 7</sup>. Durante la fase G<sub>2</sub>, la célula prepara los componentes necesarios para la división celular y resguarda la integridad del genoma mediante el "Punto de monitoreo de replicación", una maquinaria molecular que detiene el progreso del ciclo celular en respuesta al daño del DNA (e.g radiación ionizante) antes de progresar por fase M <sup>9</sup>.

Durante la fase S del ciclo celular, las moléculas de DNA en cada cromosoma son duplicadas cuidadosamente y empaquetadas por una variedad de componentes protéicos, incluyendo histonas, condensinas y proteínas reguladoras involucradas en el control de la expresión génica. Al final de la fase S, cada cromosoma replicado consta de un par de cromátidas hermanas unidas entre sí por complejos multiprotéicos denominados cohesinas <sup>2, 10</sup>.

### **1.1. DIVISIÓN CELULAR.**

Posterior al periodo de síntesis de DNA y al tránsito de G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> durante interfase, el segundo evento del ciclo celular es la fase M, que comprende dos procesos importantes: división nuclear (mitosis) y división del citoplasma (citocinesis) <sup>7, 2</sup>.

#### **1.1.1. MITOSIS**

La división nuclear es un breve periodo donde los cromosomas condensados son equitativamente segregados en dos núcleos hijos. En animales, la mitosis es mediada por un aparato bipolar en forma de huso que está ensamblado en el citoplasma a manera de fibras radiales, conocidas como "ásteres". Estos ásteres se constituyen en asociación con los centrosomas, principales centros organizadores de microtúbulos ubicados en polos opuestos de la célula en división <sup>13,15</sup>. Estudios en células mitóticas demostraron que cada cromosoma posee dos estructuras denominadas cinetocoros, ubicadas en lados opuestos del cromosoma, sobre una región de cromatina especializada nombrada centrómero <sup>14,16,17,19</sup>. Esta plataforma (centrómero y cinetocoro) permite la unión directa de los cromosomas a los microtúbulos en su respectivo polo.

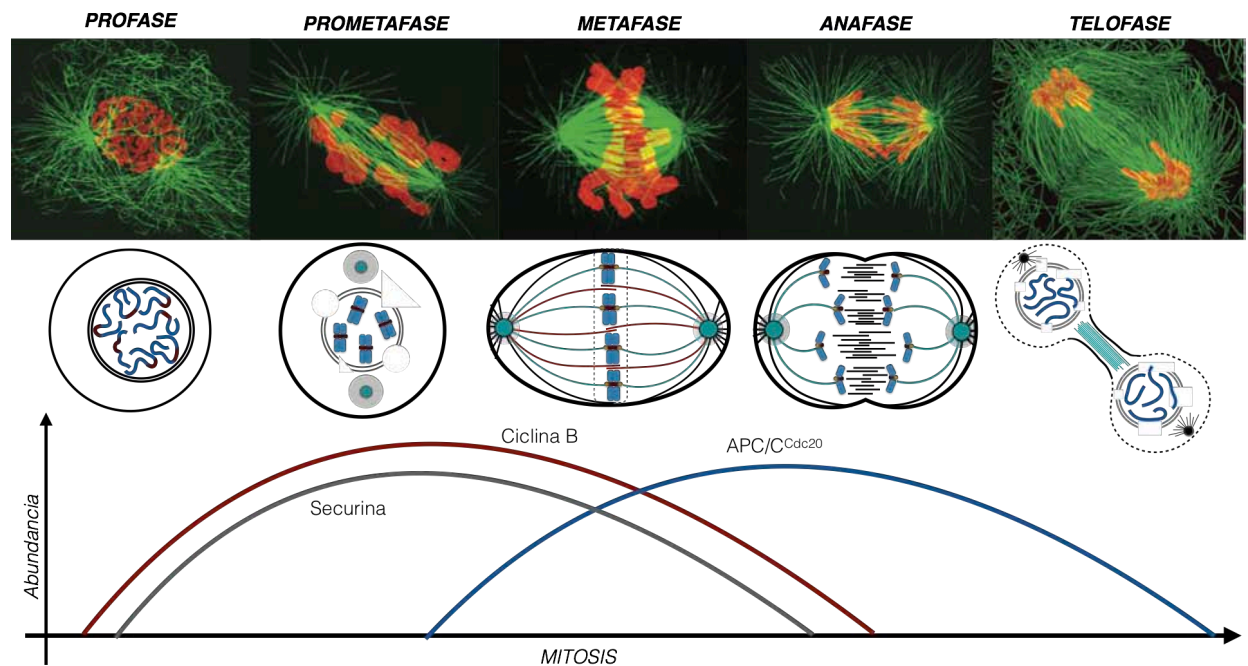
Una vez que todos los cromosomas se han unido a los microtúbulos, las cromátidas hermanas son irreversiblemente separadas asegurando que cada célula hija hereda una copia idéntica del genoma progenitor <sup>18</sup>.

La primera persona en observar la mitosis en detalle fue el anatomista alemán, Walther Flemming (1882) cuyo conocimiento sobre la composición de los cromosomas era escaso. No obstante, en la actualidad se sabe que los cromosomas son estructuras organizadas de DNA, proteína y RNA que cambian dramáticamente de forma durante la división celular y bajo diferentes condiciones fisiológicas <sup>9,13</sup>.

Históricamente, la división del núcleo se ha dividido en cinco fases; profase, prometafase, metafase, anafase y telofase, definidas por la estructura de los cromosomas y la posición de los mismos <sup>1</sup>. Además de una maquinaria molecular que coordina la correcta transición a través de las etapas de la mitosis, denominada Punto de Monitoreo Mitótico (PMM) y la cual será detallado en la siguiente sección (Figura No. 2).

1. En la profase, los cromosomas inician la condensación dentro de una envoltura nuclear intacta y los centrosomas replicados comienzan a separarse. Asimismo, los centrosomas se someten a un proceso denominado maduración y desempeñan un papel importante en la formación del huso mitótico, y en el nucleamiento de microtúbulos para la construcción del mismo <sup>1,2,11</sup>.
2. Posteriormente, la prometafase comienza con la disgregación de la envoltura nuclear, que le permite a los microtúbulos del huso mitótico unirse a los cinetocoros. Cuando los microtúbulos que emanan de ambos polos del huso se han unido exitosamente a los cromosomas (vía los cinetocoros), estos son desplazados a la región central de la célula, formando así, la placa metafásica <sup>1, 2, 11</sup>.
3. Durante la metafase todos los cromosomas logran alinearse en el ecuador de la célula. La actividad de algunos reguladores moleculares termina, y la activación del "Complejo Promotor de la Anafase (APC/C del inglés *Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*) comienza. La acción de la E3 ubiquitin-ligasa APC/C conduce a la degradación de varias proteínas, entre las cuales destacan ciclina B y securina, involucradas en la salida de la mitosis y la pérdida de cohesión entre las cromátidas hermanas respectivamente <sup>2, 11, 12</sup>.
4. En la anafase, las cromátidas hermanas se separan de manera sincronizada hacia los polos opuestos de la célula, mediante el acortamiento (despolimerización) de microtúbulos y degradación de los complejos cohesina (Anafase A). Posteriormente, los polos del huso se alejan impulsados por la separación de los centrosomas con asistencia de microtúbulos interpolares (Anafase B) <sup>1,11</sup>.
5. Finalmente, en la telofase la envoltura nuclear se reconstituye alrededor de ambas masas de cromosomas cercanas a cada polo del huso, y la cromatina comienza a descondensarse para formar un par de núcleos repartidos en las próximas células hijas <sup>4, 11</sup>.

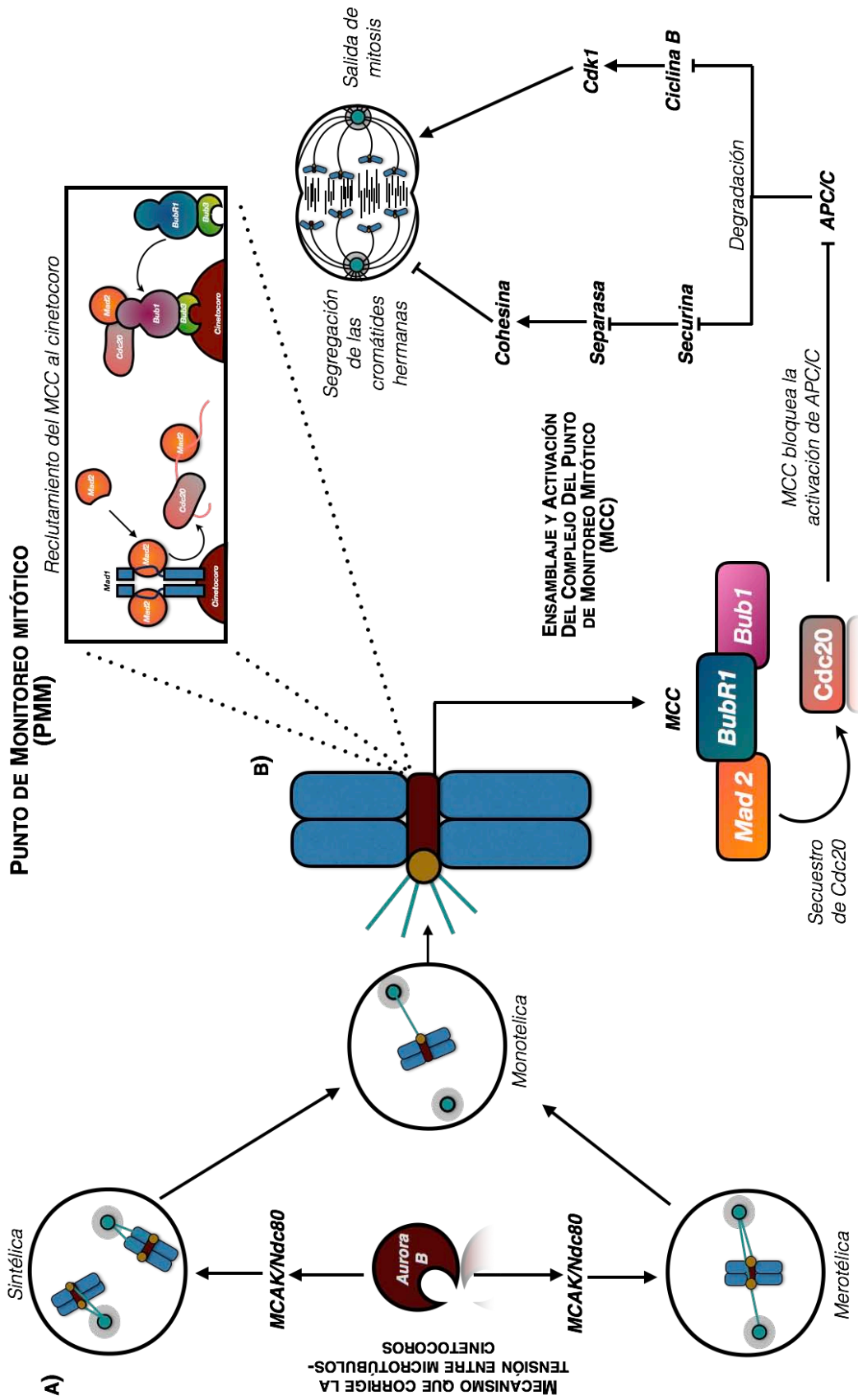
Por otro lado, la mitosis también puede dividirse en dos principales eventos gobernados por componentes moleculares del sistema de control del ciclo celular. El primero de ellos consiste en un incremento en la actividad del complejo proteico ciclina B-Cdk1 (principal regulador de la mitosis) y otras cinasas (Aurora B, Plk1, Mps1 etc.) que fosforilan una amplia variedad de sustratos, y suscitan así el progreso a través de mitosis temprana (profase, prometafase y metafase). El segundo evento comienza con la ubiquitinación y degradación de securina y ciclina B por APC/C, favoreciendo la separación de las cromátidas hermanas, desensamblaje del huso mitótico y el desenlace de la mitosis tardía (anafase y telofase), el cual se abordará con mayor detalle en la siguiente sección <sup>2</sup>.



**Figura No. 2. La mitosis.** Caricaturas y fotografías que ilustran las distintas fases de la mitosis en células eucariontes: microtúbulos (verde) y cromatina (rojo); 1) Profase, 2) Prometafase, 3) Metafase, 4) Anafase y 5) Telofase. Así como también los principales eventos moleculares ocurridos durante la mitosis: Degradación de ciclina B (barra roja), degradación de securina (barra gris) y aumento en la actividad de APC/C<sup>Cdc20</sup> (barra azul). Imagen modificada de Alberts B. et al. "The Cell". 2017.

### 1.1.1.1. PUNTO DE MONITOREO MITÓTICO.

El cinetocoro es un conjunto de complejos multi-proteicos involucrados en el reclutamiento de los microtúbulos del huso mitótico. En ciertos casos, cuando los microtúbulos son reclutados a un solo cinetocoro del cromosoma se denomina unión *monotélica*. Esta situación es común durante el inicio de la mitosis y corregida antes del inicio de la anafase. En ocasiones, el cinetocoro de un cromosoma puede interactuar con microtúbulos que emanan de polos diferentes; tal unión se nombra *merotélica*. Por otra parte, cuando ambos cinetocoros del mismo cromosoma pueden unirse a microtúbulos que surgen del mismo centrosoma se designa como *sintélica*. Dichas uniones aberrantes poseen mecanismos de corrección que promueven el desensamblaje de los microtúbulos y como resultado la presencia de cinetocoros «libres» (unión monotélica). Un solo cinetocoro «libre» puede generar señal



**Figura No. 3 Punto de Monitoreo Mitótico (PMM):** El punto de monitoreo mitótico es un sistema de señales encargado de monitorear la correcta unión entre los microtúbulos del huso mitótico y los cinetocoros durante mitosis temprana (prometáfase y metafase). El PMM consta de dos vías de regulación dependientes de acuerdo al tipo de unión que la célula presenta. **(A)** Cuando la célula posee uniones sintéticas o merotéticas se activa un mecanismo encargado de monitorear la tensión entre microtúbulos y cinetocoros a través de la enzima cinasa aurora B. Cuando dicha tensión es inestable, aurora B fosforila a sus proteínas blanco y despolimeriza o desestabiliza la unión entre cinetocoro y microtúbulos, dando como resultado células con uniones monotelicas. **(B)** Cuando la célula posee uniones monotelicas, los cinetocoros «libres» regulan el ensamblaje del MCC. Este complejo inhibe la actividad de APC/C y en consecuencia, mantiene elevados niveles de ciclina B y securina; proteínas cuya destrucción es necesaria para la progresión y salida de mitosis. De tal modo, la célula se mantiene arrestada en mitosis, hasta que las uniones sean corregidas y el MCC apartado del cinetocoro (inactivo).

suficiente para bloquear la progresión del ciclo celular hasta que los microtúbulos de ambos polos se encuentren unidos adecuadamente a su respectivo cinetocoro (unión anfitélica/bioorientación). Dicha señal es liberada por el Punto de Monitoreo Mitótico (PMM, por sus siglas en inglés), un mecanismo de vigilancia ubicado temporalmente en la transición metafase/anafase, encargado de supervisar la correcta unión de los microtúbulos del huso mitótico a los cromosomas y la tensión entre las cromátidas hermanas. Cuando tal unión no es corregida, el PMM evita el inicio de la anafase a través de un complejo efector denominado el Complejo del Punto de Monitoreo Mitótico (CPMM, por sus siglas en inglés).<sup>51, 52, 59</sup>

De esta manera el PMM se divide en dos niveles de regulación: el primero es de manera indirecta y consiste en la regulación de la tensión entre las cromátidas hermanas para generar uniones monotéticas y el segundo consiste en el reclutamiento del MCC al cinetocoro para impedir el progreso de la mitosis (*Figura No. 3*).

El proceso por el cual la célula monitorea la tensión entre las cromátidas hermanas se da principalmente con aurora B. Aurora B es una proteína cinasa localizada en la región interna del centrómero durante la mitosis temprana. Este componente posee un gradiente de actividad que emana desde la región interna del centrómero hasta alcanzar la región interna y externa del cinetocoro (red *CCAN*, *KMN* y componentes de la corona del cinetocoro). Cuando se generan uniones sintéticas y merotéticas, la tensión generada entre las cromátidas hermanas es irregular y la separación entre las regiones del cinetocoro y centrómero son mínimas, por tal motivo aurora B y su gradiente de actividad son capaces de «alcanzar» a ciertos sustratos y favorecer y/o inhibir su actividad. Entre los sustratos se encuentra *MCAK* y el sub-complejo *Ndc80*, componentes importantes en la despolimerización y desensamblado de microtúbulos respectivamente, capaces de generar uniones *monotéticas*. En contraste, cuando los microtúbulos se unen correctamente a los cinetocoros, comienza la atracción de las cromátidas hermanas a sus respectivos polos. La tensión generada entre las regiones del cinetocoro y el centrómero comienzan a incrementar, hasta distar una de la otra. Este fenómeno trae como consecuencia la inactivación de aurora B, imposibilitándola para activar a los elementos desestabilizadores de microtúbulos y favorecer la segregación de las cromátidas hermanas <sup>16, 17, 18, 59, 51, 52</sup>.

Por otra parte, el mecanismo de tensión de aurora B permite el ensamblado del MCC. El MCC es un complejo efector compuesto de cuatro subunidades protéicas: Mad2, BubR1, Bub3 y Cdc20. El ensamblado del MCC se da a partir del reclutamiento independiente de sus subunidades en los cinetocoros «libres». Cuando Bub3, BubR1 y Mad2 se han ensamblado; éste último secuestra a Cdc20, un cofactor importante para APC/C durante la mitosis tardía. Dicho secuestro impide la unión de Cdc20 a APC/C y por tal motivo inhibe la ubiquitinización y degradación de proteínas importantes hacia el final de la mitosis. Entre las cuales se hallan ciclina B y securina, proteínas involucradas en el progreso a través de la mitosis. No obstante, cuando los microtúbulos comienzan a unirse al cinetocoro «libre», éstos eliminan a los componentes del MCC a través de desmantelamiento ("*stripping*"). Esta eliminación impide que el MCC se ensamble al cinetocoro y APC/C sea activado a través de Cdc20. La activación del APC/C<sup>Cdc20</sup> implica la degradación de varias proteínas importantes durante el ciclo celular de las cuales destacan: *securina*, proteína importante en la inhibición de la proteasa separasa. Esta proteasa se encarga de degradar las cohesinas que mantienen a las cromátidas hermanas unidas, favoreciendo así la segregación de las mismas. Por otra parte, APC/C también degrada a *ciclina B* y por lo tanto inactiva a Cdk1; regulador maestro en la maquinaria del ciclo celular y salida de la mitosis<sup>16, 17, 18, 59</sup>.

### 1.1.2. CITOCINESIS.

El último paso del ciclo celular finaliza con la citocinesis; proceso por el cual dos células hijas son separadas posterior a la segregación de sus cromosomas [20, 21, 22](#). En células animales, la citocinesis normalmente comienza poco tiempo después del inicio de anafase y representa uno de los cambios más dramáticos en el aspecto de la célula que requiere una compleja reorganización del citoesqueleto [22, 23](#). Dicha reorganización inicia por la inactivación de la proteína cinasa Cdk1 y activación del complejo E3 de ubiquitin-ligasa, APC/C.

La progresión de la citocinesis en células animales está constituida de cuatro principales eventos: 1) Ensamblaje del huso central, 2) Especificación del plano de división y ensamblaje del anillo contráctil, 3) Formación del surco de citocinesis y 4) Abscisión (escisión) (Figura No. 4).

1. La citocinesis comienza después del inicio de la anafase a causa del declive en la actividad de Cdk1, que a su vez conduce a la reorganización del huso mitótico y posteriormente al ensamblaje del huso central. El huso central es un conjunto de microtúbulos interpolares con orientación antiparalela que se traslapan en el ecuador de la célula ayudando a orquestar eventos críticos durante la citocinesis [20, 21, 22, 24](#). Esta estructura se origina en gran medida por cuatro componentes protéicos clave que ejercen distintas funciones en la formación del huso central: 1) PRC1; una proteína (homodímero) asociada a microtúbulos (MAP) y activada por la adición de un grupo fosfato por Cdk1, permite el correcto alineamiento de los microtúbulos antiparalelos en la región central de la célula [20, 23, 38](#). 2) Kif4A; una proteína motora tipo cinesina capaz de controlar el tamaño del huso central suprimiendo la dinámica de los microtúbulos antiparalelos y transportando a PRC1 sobre la región central del huso [24, 25](#). 3) Centralspindilina; heterotetrámero compuesto de dímeros de MKLP1 y CYK-3 se asocian a microtúbulos antiparalelos mediante la cinesina Kif23, favoreciendo el enriquecimiento del complejo en la región central. 4) El complejo pasajero cromosómico (CPC); a través de la subunidad catalítica Aurora B, fosforregula componentes importantes del huso central que participan en el ensamblaje del mismo [26, 27](#).
2. En células animales, el plano de división es definido por la difusión de señales entre el huso y la corteza celular durante anafase temprana. Estudios genéticos y de micromanipulación han establecido que el huso envía dos señales a la corteza celular, la primera se origina a partir del huso central y una segunda deriva de los ásteres del huso mitótico [20, 28, 29](#). La señal del huso central se origina mediante la activación de RhoA, una proteína con actividad de GTPasa que es regulada por Factores de Intercambio de Nucleótidos-Guanina (GEF, por sus siglas en inglés) y Proteínas Activadoras de GTPasas (GAP, por sus siglas en inglés), dichos componentes se hallan distribuidos en el ecuador de la célula e impulsan el ensamblaje del anillo contráctil [20, 30](#). Por otra parte, los microtúbulos en contacto directo con la membrana celular proporcionan una segunda “señal de posicionamiento”. Los “microtúbulos polares” son altamente dinámicos, no obstante, un subgrupo de ellos se extiende a través de los cromosomas mitóticos formando interacciones estables con la membrana celular en el sitio de división (ecuador de la célula). Contrariamente a los “microtúbulos dinámicos” que ayudan a suprimir la formación de surcos en polos de la célula [20, 31, 32](#).

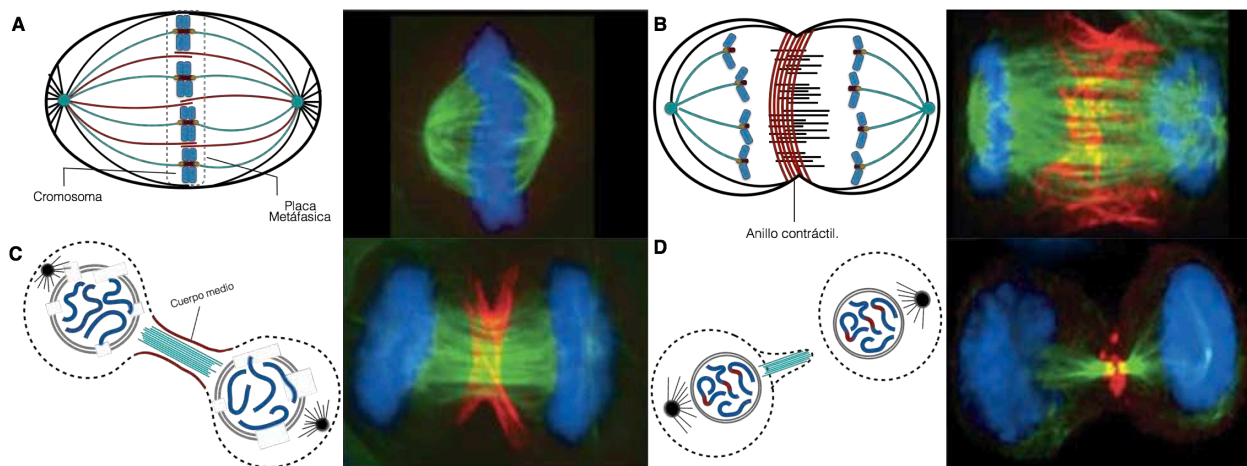
Posterior a la especificación del plano de división, la célula ensambla una red de filamentos asociada a la membrana, permitiendo la contracción e ingresión de la misma en su región ecuatorial. La red de filamentos es conocida como anillo contráctil o de actinmiosina y su ensamblaje depende de una variedad de componentes estructurales y enzimáticos. Como ya se había mencionado en el párrafo anterior; el primer paso requiere que los microtúbulos (ásteres) se encuentren distribuidos apropiadamente y RhoA sea activado. Una vez activado, RhoA promueve el ensamblaje del anillo de actomiosina por dos principales eventos: 1) Estimula la nucleación de los filamentos de actina a través de las forminas y 2) Promueve la actividad de la miosina II por activación de la cinasa ROCK y citron-K, que a su vez, fosforilan a Ser19/Thr18 activando la cadena ligera de miosina II (MLC, por sus siglas en inglés) <sup>20, 30, 33</sup>. RhoA, actina y miosina II son concentrados en el ecuador de la célula a través de un tercer componente estructural conocido como anillina, una proteína de andamiaje que forma parte del anillo contráctil y que asocia la membrana celular con señales del huso central. La organización y función del anillo contráctil también involucra el ensamblaje de otros componentes, como filamentos de septina y fosfolípidos específicos <sup>20, 34, 35, 36, 37</sup>.

3. Posterior a su ensamblaje, la contracción del anillo de actomiosina provoca la invaginación de la membrana plásmica en la región ecuatorial de la célula, permitiendo la formación de un surco citocinético. El modelo clásico, «Modelo del anillo contráctil» propone que la acumulación de actina y miosina II en el ecuador de la célula conduce a la formación de «filamentos contráctiles» (semejante al mecanismo generador de fuerza en los sarcómeros del músculo), y de ésta manera, generar el deslizamiento de miosina II sobre los filamentos de actina, análogo a un “cordón de bolsa” <sup>20, 39, 40</sup>. Varios modelos combinan la fuerza contráctil sobre la región central y la relajación en los polos para explicar por qué las células se alargan en los extremos y al mismo tiempo merman en el ecuador durante la citocinesis. Como ya se ha señalado, el modelo clásico explica únicamente la formación de surcos en la región central de la célula, comprendiendo a miosina II, actina y factores reguladores bajo el control de la GTPasa RhoA como una señal originada a partir de un grupo de microtúbulos ubicados en el ecuador de la célula <sup>43</sup>. Por otra parte, modelos alternativos como el «modelo de relajación astral/polar» y el «modelo de estimulación ecuatorial» describen a los microtúbulos astrales capaces de estabilizar la dinámica de la membrana en la región polar y establecer interacciones estables con la misma en la región central de la célula, así como también, inhibir la actividad de RhoA en las regiones polares y controlar la dinámica del anillo contráctil <sup>41, 42, 43</sup>. No obstante, el progreso para entender la maquinaria molecular, el exacto arreglo espacial y el mecanismo que genera la fuerza del anillo contráctil así como la formación del surco citocinético sigue siendo poco entendido hasta la el día de hoy <sup>20, 39</sup>.
4. Finalmente, la separación de dos células hijas requiere de la ruptura de la membrana, proceso denominado absición (escisión). Esta separación depende del desensamblaje y remoción de estructuras citoplasmáticas que conectan a ambas células, incluyendo componentes del anillo contráctil (e. g filamentos de actina) y del huso central (e. g. microtúbulos) <sup>45</sup>. No obstante, durante el inicio de esta fase, la progresiva compactación del anillo de actomiosina forma un puente intercelular (*ICB*, por sus siglas en ingles) que conecta a las dos células hijas. Al mismo tiempo, la compactación de los microtúbulos del huso central forman una estructura denominada «cuerpo medio», una plataforma de microtúbulos necesaria para el apropiado reclutamiento y organización de proteínas que



regulan el evento final de la citocinesis [22, 46](#). Posteriormente, el ICB se somete a una extensa remodelación en la arquitectura y composición de la membrana plasmática a través de vesículas denominadas endosomas, encargadas de la liberación de componentes protéicos requeridos para inducir la despolimerización de los filamentos de actina (e. g. Fosfatasa *OCRL*) e inhibir la actividad de la GTPasa Rho (e. g. Inhibidor p50RhoGAP), generando como resultado un surco secundario en el ICB y estableciendo el sitio de escisión de la membrana [46, 47, 48](#). Por otra parte, los endosomas también contribuyen al proceso de escisión a través del reclutamiento del complejo *ESCRT III* (endosomal sorting complex required for transport III) y algunos componentes catalíticos (e. g. Spastina, *VPS4*, *CPC* etc.) coordinando así, la deformación y escisión de la membrana durante la abscisión [20, 22, 46, 48, 49, 50](#)

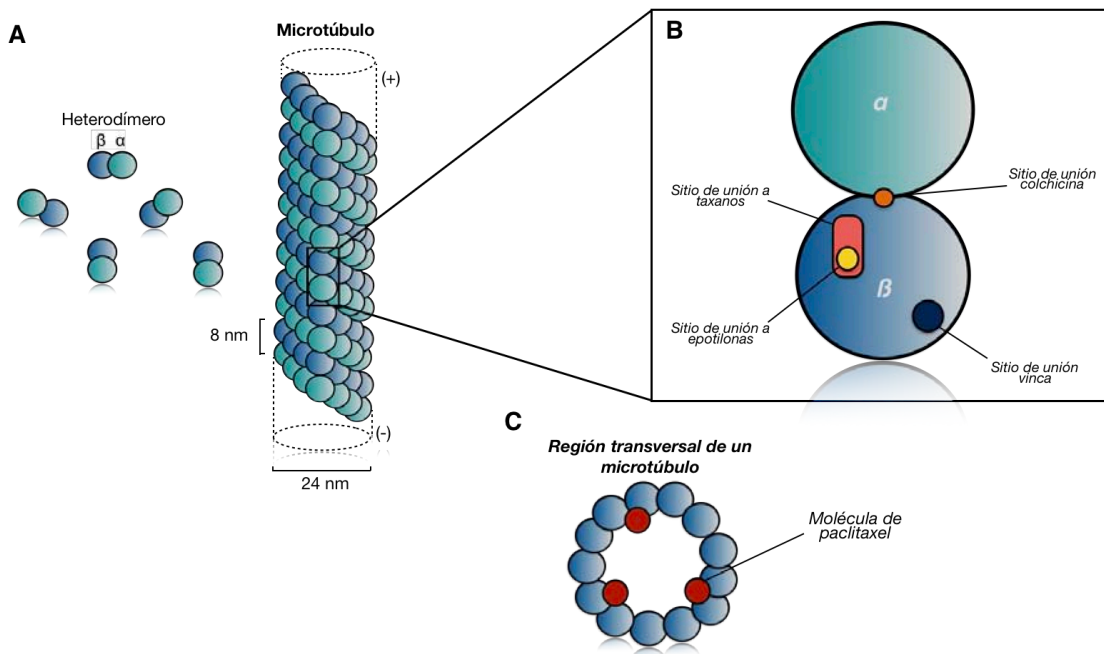
En resumen, la división celular es el proceso por el cual una célula origina dos células hijas genéticamente idénticas. Cada cromosoma es replicado antes del comienzo de la mitosis y ambas células hijas reciben exactamente una copia de cada cromosoma. Esta compleja serie de eventos ha sido dividida en dos procesos: la mitosis, en el cual los cromosomas son separados y transportados a extremos opuestos de la célula y la citocinesis, en donde la célula se divide físicamente para formar dos células hijas independientes. La preservación de la integridad genética requiere que la célula se divida solamente después de asegurar la segregación de los cromosomas. Alteraciones en tiempos críticos de la división celular conduce a pérdidas y ganancias de cromosomas completos, una condición conocida como aneuploidía y asociada a enfermedades como el cáncer [56, 57](#)



**Figura No. 4. La citocinesis.** Caricaturas y fotografías ilustran diferentes estados de la citocinesis: microtúbulos (**verde**), anillina (**rojo**); **A)** Los cromosomas son alineados en la placa metafásica gracias a los microtúbulos del huso. **B)** El ensamblaje del huso central se da a partir de la interacción de los microtúbulos interpolares. **C)** Se señala el plano de división y el ensamblaje del anillo contráctil. Además, llevar a cabo la formación del surco de citocinesis. **D)** Finalmente, se compacta el huso central para dar origen al cuerpo medio y guiar la abscisión. Imagen modificada de D'Avino, P. et al. "Cytokinesis in Animal Cells". 2015.

## 2. DROGAS ANTIMITÓTICAS Y SU IMPORTANCIA EN EL ESTUDIO DE LA DIVISIÓN CELULAR

El cáncer se refiere a un grupo de enfermedades de crecimiento anormal causada por una alta capacidad adaptativa de las células tumorales sobre un nicho específico. Como resultado, las células cancerosas poseen elevadas tasas de proliferación e invasión mediante un ciclo celular hiperactivo y por lo tanto, incontables rondas de división celular. Por esta misma razón, la división celular es considerada un excepcional blanco terapéutico para el tratamiento contra el cáncer, siendo una fase del ciclo celular importante en el mantenimiento y distribución del genoma. Como consecuencia, la capacidad replicativa de la célula puede interrumpirse al exponerse a ciertos agentes químicos o físicos durante la fase M del ciclo celular <sup>51, 52</sup>. Dentro de los agentes químicos, las drogas antimitóticas forman parte del régimen de quimioterapia para tratar muchos tipos de cáncer (Tabla No.1). Particularmente, existe un grupo de agentes antimitóticos dedicados a perturbar la dinámica de los microtúbulos del huso, impidiendo satisfacer el Punto de Monitoreo Mitótico (PMM o SAC, por sus siglas en inglés), un sistema molecular ubicado temporalmente en mitosis y encargado de monitorear la correcta unión de los microtúbulos y cinetocoros y, por ende, el progreso a través del ciclo celular <sup>53, 54, 55</sup>.



**Figura No. 5. Los agentes antimicrotúbulos se unen directamente a tubulina. A)** Distribución de  $\alpha$  (verde) y  $\beta$  (azul) tubulina, y su asociación en un polímero denominado microtúbulo. **B)** Las drogas antimicrotúbulos poseen diferentes sitios de unión sobre el heterodímero de  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina. **C)** Interacción del paclitaxel (rojo) en la región interna de los microtúbulos del huso mitótico. Imagen modificada de DeVita V. et al. "Cancer: Principles & Practice of Oncology", 2014.

### 2.1. DROGAS ANTI MICROTÚBULOS

Las drogas anti microtúbulos o agentes de unión a tubulina (TBAs, por sus siglas en inglés) son fármacos quimioterapéuticos utilizados en el tratamiento contra el cáncer <sup>58, 59 60</sup>. Estos agentes se unen a heterodímeros de  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina, componente dinámico y estructural de los

microtúbulos y principal constituyente del citoesqueleto. Los microtúbulos tienen un papel clave en ciertos eventos importantes, por ejemplo: motilidad, tráfico intracelular y división celular. Interferir con la dinámica de los microtúbulos durante la división celular genera uniones inestables e impide la unión entre los microtúbulos y los cinetocoros, esto resulta en la activación del PMM; mecanismo encargado de detener a las células en mitosis por tiempo indefinido hasta corregir los errores relacionados con la dinámica del huso mitótico. Dicha detención durante mitosis se denomina «*arresto mitótico*» y puede prolongarse en la presencia de tales drogas promoviendo así la muerte celular. Información sobre la respuesta celular con agentes anti microtúbulos será detallado en las siguientes secciones <sup>58 60</sup>.

Las drogas que actúan sobre los microtúbulos pueden estar divididas en dos principales grupos de acuerdo a su mecanismo de acción; como agentes que desestabilizan microtúbulos (MDA's, por sus siglas en inglés) o agentes que estabilizan microtúbulos (MSA's, por sus siglas en inglés). Dentro de las drogas desestabilizadoras de microtúbulos se encuentran la colchicina y los vinca alcaloides, siendo estos últimos, introducidos en la década de 1970 para el tratamiento de leucemias, y en asociación con otros fármacos para tratar un amplio rango de cánceres. En contraste, la colchicina no contribuye al tratamiento contra algún tipo de neoplasia <sup>60, 61</sup>.

Los MDAs inhiben la polimerización de microtúbulos cuando se presentan en altas concentraciones y la mayoría de estos agentes interactúan con uno de los dos dominios de unión a tubulina; ya sea el «dominio vinca» o el «dominio colchicina». Los agentes que se unen al «dominio vinca» incluyen a los vinca alcaloides (vinblastina, vincristina y vinorelbina), criptoficinas y dolastatinas, obstaculizando la unión de dos heterodímeros de  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina y el ensamblado de los microtúbulos a través de la interacción en sus extremos positivos. Por otra parte, los agentes que se unen al «dominio colchicina» incluyen propiamente a colchicina y sus análogos (podofilotoxina, combrestatina, 2-metoxioestradiol, esteganacinas y curacinas), uniéndose a heterodímeros solubles de tubulina, y de esta manera impedir la polimerización del citoesqueleto de microtúbulos.

Finalmente, los MSAs conforman un grupo de agentes que estabilizan a los polímeros de tubulina evitando la despolimerización de los mismos. Dentro de este grupo se incluyen a los taxanos, epotilonas, ixabepilones, laumalidalde, peloruside A y dictiostatina. La mayoría de los agentes estabilizadores de microtúbulos se unen al «dominio taxano» sobre  $\beta$ -tubulina, el cual está localizado en la superficie interna de los microtúbulos (Figura No. 5). No obstante, el grupo de los laumalidaldes y peloruside A, son considerados en interactuar sobre un nuevo dominio en  $\beta$ -tubulina <sup>60 - 66</sup>.

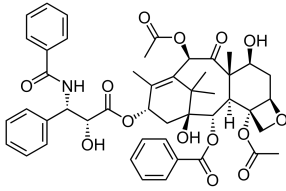
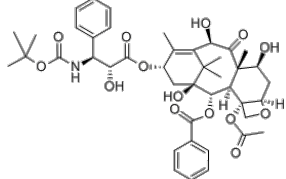
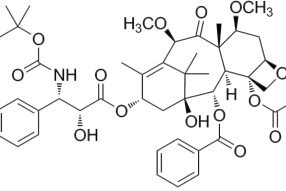
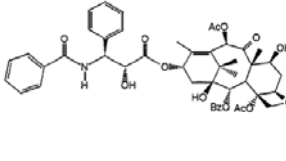
## 2.2. TAXANOS.

Los taxanos fueron los primeros agentes estabilizadores de microtúbulos identificados en su clase. Estos compuestos son comúnmente usados en el tratamiento de varios tumores sólidos <sup>66, 67</sup>. Los taxanos son dipertenos (terpenos de 20 carbonos) producidos a partir de árboles de coníferas del género *Taxus* y como su nombre lo sugiere, se derivaron de fuentes naturales y posteriormente producidos de manera semisintética (Tabla No. 2) <sup>68</sup>. Los taxanos clásicos como; el paclitaxel y docetaxel, así como los más recientes; cabazitaxel y paclitaxel unido a nanopartículas de albúmina (Nab-paclitaxel) son catalogadas como drogas mayormente usadas en el tratamiento contra varios tipos de cáncer (Tabla No. 1; Tabla No. 2) <sup>67</sup>.

**Tabla No. 1: Uso de agentes que afectan el uso mitótico en quimioterapia.**

<b>Fármaco</b>	<b>Tipo de cáncer</b>	<b>1ª línea</b>	<b>2ª línea</b>	<b>3ª línea</b>
<b>Vincristina</b>	Linfoma Hodking	✓		
	Linfoma no Hodking	✓		
	Tumor neuroectodérmico primitivo	✓		
<b>Vinblastina</b>	Tumor de células germinales de testículo		✓	
<b>Vinorelbine</b>	Cáncer de mama metastásico		✓	
	Cáncer de ovario recurrente		✓	✓
	Cáncer de pulmón (tratamiento adyuvante)	✓		
<b>Paclitaxel</b>	Cáncer de mama (tratamiento adyuvante y neoadyuvante)	✓		
	Cáncer de mama metastásico	✓		
	Cáncer gástrico avanzado		✓	
	Cáncer de cabeza y cuello (tratamiento neoadyuvante)	✓		
	Cáncer de pulmón enfermedad metastásica	✓		
	Cáncer de pulmón (tratamiento adyuvante)	✓		
	Cáncer de testículo platino resistente			✓
	Cáncer de cérvix metastásico	✓		
	Angiosarcoma	✓		
<b>Docetaxel</b>	Cáncer de mama (tratamiento adyuvante y neoadyuvante)	✓		
	Cáncer de mama enfermedad metastásica	✓		
	Cáncer de próstata hormono refractario	✓		
	Cáncer de cabeza y cuello (tratamiento adyuvante y neoadyuvante)	✓		
	Cáncer gástrico enfermedad avanzada	✓		
	Cáncer de ovario recurrente			✓

**Tabla No. 2: Principales compuestos de la familia de los taxanos, características generales y estructura química.**

Nombre del fármaco	Descripción	Estructura química
Paclitaxel (Taxol®)	Principal taxano y un agente anticanceroso de amplio espectro. Actualmente usado en el tratamiento de carcinoma de ovario y mama; es también efectivo en el tratamiento de cánceres de pulmón, cabeza y cuello, vejiga y esófago <sup>67, 71 72</sup>	
Docetaxel	Segundo taxano detectado y sintetizado a partir del precursor inactivo 10-desacetilbaccatina III, siendo más soluble en agua y más potente comparado con el paclitaxel <sup>67</sup>	
Cabizataxel (Jextana®)	Tercer componente en su clase, cabazitaxel (Jextana®), es un taxano semisintético y seleccionado en pruebas clínicas debido a su nula afinidad a bombas dependientes de ATP relacionadas a la resistencia de fármacos (MDR) y su alta citotoxicidad <i>in vitro</i> comparada con paclitaxel y docetaxel <sup>67, 69</sup>	
Nab-Paclitaxel (Abraxane®)	Forma soluble del paclitaxel asociada a nanopartículas de albúmina (Nab-paclitaxel) que resulta en el mejoramiento de la farmacocinética y farmacodinámica del paclitaxel, neutralizando la hidrofobicidad heredada por la familia de los taxanos <sup>67</sup> .	

### 2.2.1. PACLITAXEL (TAXOL ®).

El paclitaxel (mejor conocido como Taxol®) es el primer miembro de la familia de los taxanos en ser usado en la quimioterapia contra el cáncer y el primer compuesto de esta clase. Descubierta aproximadamente 50 años atrás como parte de un programa del *Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos* (NCI) en el que extractos de miles de plantas fueron analizados para determinar alguna actividad anticancerosa <sup>67, 70</sup>. Monroe E. Wall y Mansukh C. Wani en el año 1967 aislaron un extracto crudo de la corteza de *Taxus* del pacífico (*Taxus brevifolia*), ubicado en el antiguo bosque del Noroeste del pacífico. Esto permitió impulsar estudios preclínicos sobre la actividad citotóxica del paclitaxel contra varios tumores malignos (Tabla No. 2) <sup>71, 72</sup>. Finalmente, el paclitaxel fue aprobado formalmente por la *Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos* (FDA, por sus siglas en inglés) en el año 1992 para el tratamiento contra el cáncer de ovario. Dado a su efecto farmacológico el paclitaxel logró desarrollarse de manera inmediata en la investigación clínica que se conoce hasta la fecha <sup>64</sup>.

El mecanismo de acción del paclitaxel fue inicialmente definido por Horwitz S. y Schiff P. en 1979 <sup>75</sup>, demostrando que este agente puede unirse a la superficie interna de los microtúbulos, en un sitio específico sobre  $\beta$ -tubulina (dominio de unión a taxanos) <sup>76</sup>. Por otra parte, investigadores observaron que cuando las células son tratadas con agentes antimitóticos como el paclitaxel, el número de células mitóticas incrementa dramáticamente con el tiempo, teniendo dificultades para satisfacer el PMM y posteriormente la división celular <sup>59, 73</sup>. Esto se debe a que el paclitaxel altera la constante tasa de disociación de tubulina en ambos extremos del polímero, estabilizando el polímero y suprimiendo procesos importantes en la dinámica y formación del citoesqueleto de microtúbulos <sup>77</sup>. En consecuencia, se interrumpe la dinámica del huso mitótico impidiendo la formación de uniones estables entre cinetocoro y cromosomas, favoreciendo las señales que emergen del cinetocoro y que son capaces de ensamblar al MCC, el cual difunde diferentes señales para ser comunicadas a la maquinaria del ciclo celular, obstaculizando así, el progreso a través de la fase M tardía (segregación de los cromosomas) y favoreciendo el arresto durante la mitosis.

### **3. DESTINO CELULAR INDUCIDO POR PACLITAXEL.**

#### **3.1. ARRESTO MITÓTICO.**

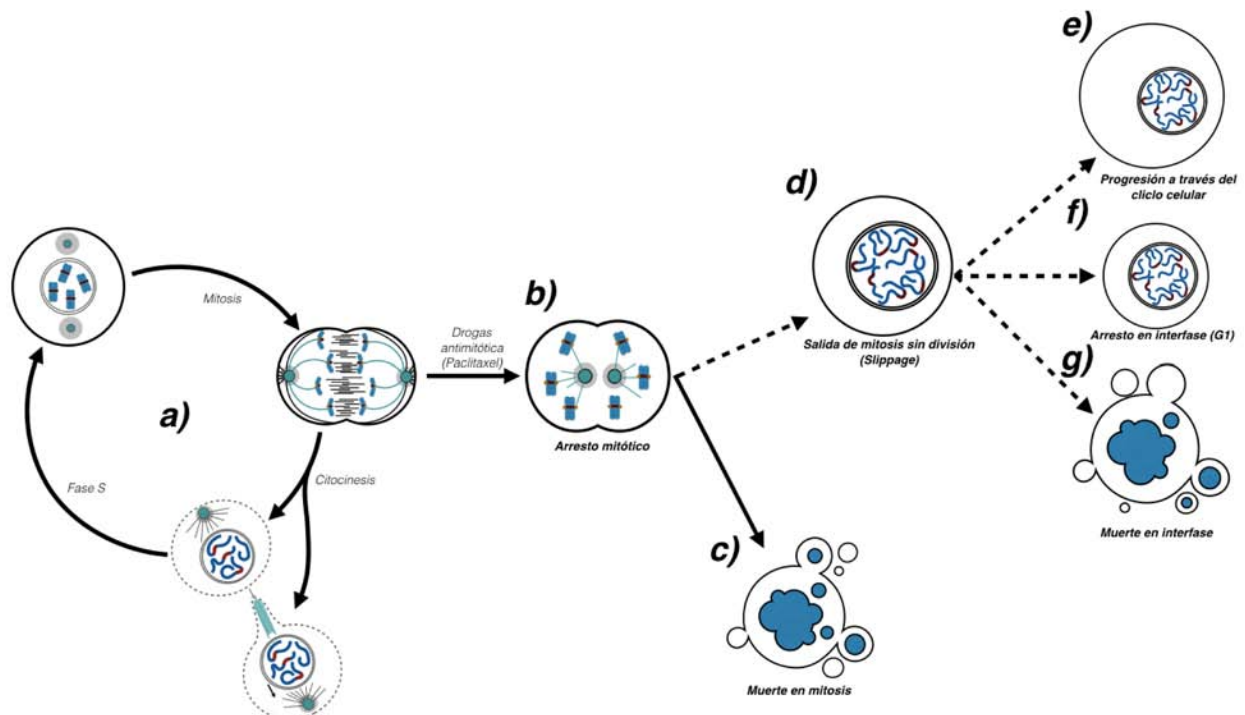
La activación de la Cinasa dependiente de ciclina 1 (Cdk1) por ciclina B provoca que las células entren a mitosis. En una metafase habitual, la activación del PMM mantiene los niveles altos de ciclina B como resultado de la inhibición del APC/C, una E3 ubiquitin-ligasa encargada de «marcar» a ciclina B para su degradación a través del proteosoma. La degradación de ciclina B es interrumpida por la actividad del PMM hasta el momento en que los cromosomas se encuentren correctamente alineados (biorientados). Sin embargo, en la ausencia de dicho estado, los cinetocoros libres reclutan y activan a proteínas del MCC (Mad2, Bub3, y BubR1), posibilitando el ensamblado de un único complejo capaz de secuestrar a Cdc20, y por lo tanto inhibir a APC/C; manteniendo constantes los niveles de ciclina B y el arresto en metafase/anafase <sup>59, 54, 78</sup>. Por otro lado, cuando todos los microtúbulos se han unido apropiadamente a los cinetocoros; Mad2, Bub3, y BubR1 ya no son requeridos en el cinetocoro y Cdc20 es liberado para activar a APC/C, conduciendo a la degradación de ciclina B y el inicio de la anafase <sup>59</sup>.

En contraste, cuando la célula entra a mitosis en presencia del paclitaxel, los cinetocoros nunca son capaces de formar uniones apropiadas con los microtúbulos del huso. Esto resulta en la activación permanente del SAC, activación constitutiva del complejo Cdk1-Ciclina B y consecuentemente un arresto mitótico prolongado <sup>59</sup>.

#### **3.1.1. MUERTE CELULAR DURANTE LA MITOSIS.**

Se ha establecido que en células tratadas con paclitaxel, el arresto persiste hasta que la célula muere o escapa de la mitosis (Figura No. 6) <sup>59</sup>. Dicho de otra manera, el arresto prolongado durante mitosis está vinculado a la muerte celular inducida por paclitaxel (y a otras drogas antimitóticas) <sup>74</sup>. No obstante, el proceso detallado por el cual esta droga mata a las células hasta ahora no es del todo claro. A pesar de ello se han descrito varios factores que pueden inducir muerte celular durante un arresto mitótico prolongado <sup>79, 80</sup>. Algunos estudios han destacado una vía de muerte celular por apoptosis que involucra a la proteína Mcl-1 (miembro de la familia Bcl-2 de proteínas anti-apoptóticas) como el factor determinante <sup>52, 80</sup>.

Mcl-1 al igual que los miembros anti-apoptóticos de su familia, interacciona con proteínas pro-apoptóticas (e. g. Bak, Noxa y Bim) <sup>81, 101</sup>. De esta manera, Mcl-1 previene la permeabilización (formación de poros) de la membrana mitocondrial y por ende, evita la liberación de factores mitocondriales (e. g. citocromo c) involucrados en la activación de la vía de muerte celular por apoptosis. A diferencia de la expresión constante de Bcl-2 durante el ciclo celular, la expresión de Mcl-1 incrementa durante el arresto mitótico <sup>82, 59</sup>. Esto le permite a la célula inhibir la apoptosis, adquirir tiempo necesario para corregir errores y direccionarse a un destino celular en particular. No obstante, los niveles de Mcl-1 durante el arresto mitótico son breves y disminuyen gradualmente a medida que la proteína cinasa p38, Cinasa Jun N-terminal (*JNK*), Caseína Cinasa II (*CKII*) y Cdk1 fosforilan a Mcl-1, favoreciendo su interacción con *FBW7*, un componente de unión al complejo de E3 Ubiquitin-Ligasa *SCF*, encargado de ubiquitinar a Mcl-1 para finalmente llevarlo a su degradación a través del proteosoma. Por otra parte, si los niveles de Mcl-1 no son lo suficientemente bajos para inhibir a Bak durante el arresto mitótico, la apoptosis será efectuada antes de que la célula pueda escapar de mitosis <sup>52, 80, 81</sup>



**Figura No. 6. Destinos celulares inducidos con paclitaxel.** a) Ciclo celular, b) La célula es arrestada en mitosis a través del tratamiento con paclitaxel. c) La célula muere por apoptosis durante el arresto mitótico prolongado. d) La célula escapa del arresto mitótico prolongado (mitotic slippage) e inicia nuevamente al ciclo celular e) Células expuesta a bajas concentraciones de paclitaxel entran a interfase acompañadas de varias rondas de síntesis del material genético. f) Las células expuestas a bajas concentraciones de paclitaxel son arrestadas en la fase G1 por la proteína p53. g) Las células que salen del arresto mitótico mueren en el subsecuente ciclo celular por una respuesta de daño al DNA dependiente de la proteína p53.

### **3.2. “ESCAPE DE MITOSIS” (MITOTIC SLIPPAGE).**

Por otra parte, la salida de la mitosis después de un arresto prolongado es un fenómeno recientemente caracterizado que involucra la competencia con la maquinaria de apoptosis (ver “Cancer Cells Display Profound Intra and Interline variation following prolonged exposure to Antimitotic Drugs” por Gascoigne K. y Taylor S.)<sup>54</sup>.

Durante una mitosis normal, el final es orquestado por la degradación de ciclina B y la inactivación de Cdk1. Entre los principales factores que favorecen la salida de mitosis se encuentra APC/C<sup>Cdc20</sup> cuya actividad es responsable de controlar los niveles de ciclina B cada que el PMM permanece inactivo. A pesar de ello, el PMM no arresta a la célula en mitosis de manera incesante, por lo cual la célula puede salir de mitosis sin requerir de la actividad de APC/C<sup>Cdc20</sup>. Dicho de otra manera, aunque APC/C<sup>Cdc20</sup> sea inactivado por el PMM durante el arresto mitótico, los niveles de ciclina B paulatinamente descienden hasta superar un umbral requerido para mantener a la célula en mitosis; en consecuencia, la célula se «libera» o «escapa» en un proceso conocido como “*Mitotic Slippage*”<sup>52, 78, 83</sup>.

Tan pronto como la célula se haya liberado del arresto mitótico, numerosos resultados se han sido descritos: algunos estudios demuestran que un determinado número de células entran nuevamente al ciclo celular y se someten a constantes rondas de división celular; son arrestadas en fase G1 del ciclo celular; o mueren por apoptosis en interfase<sup>54, 78, 84</sup>.

#### **3.2.1. PROGRESIÓN A TRAVÉS DEL CICLO CELULAR.**

La salida del arresto mitótico inducido por paclitaxel es considerada un evento anormal que ocurre en la ausencia de anafase y citocinesis. Las células entran a interfase, que involucra reorganización de la membrana nuclear, descondensación de la cromatina en numerosos núcleos (multinucleación) y fragmentación del DNA, además de células con un contenido de DNA tetraploide ( $\geq 4N$ ). A pesar de los eventos tan drásticos que experimentan las células, se ha determinado que en bajas concentraciones de paclitaxel (10 nM), las líneas celulares de carcinoma de colon (HCT116), ovario (A2780) y leucemia (K572) salen del arresto mitótico y entran a interfase seguido de varias rondas de síntesis del material genético (Figura No. 6e)<sup>85, 87</sup>.

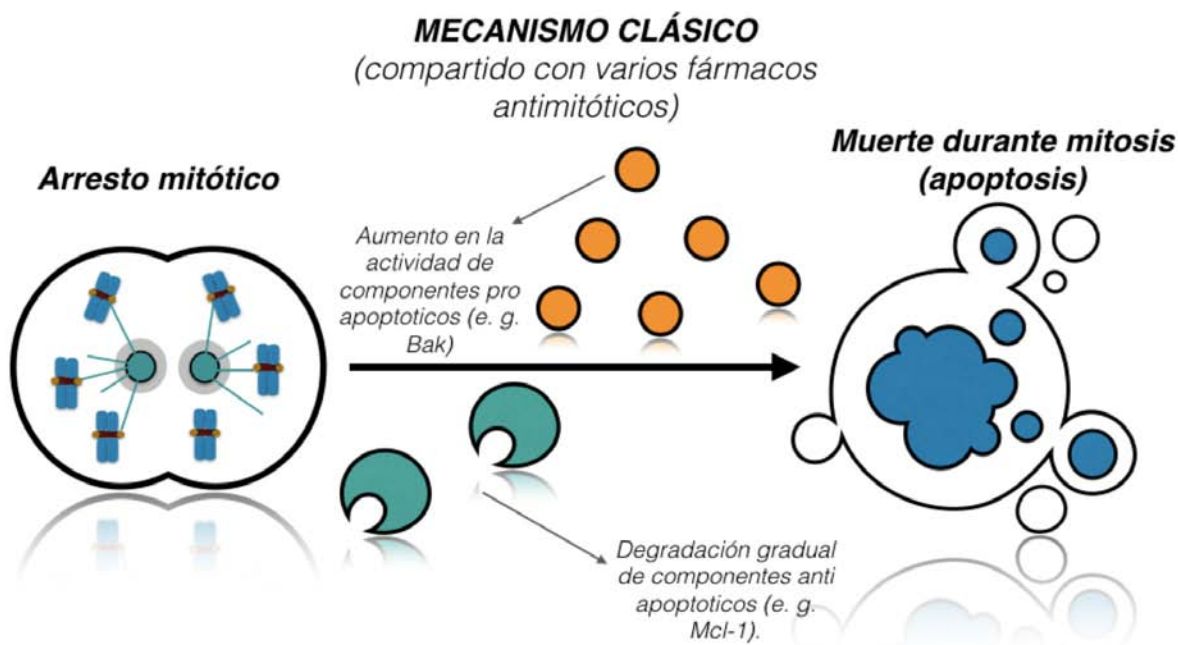
#### **3.2.2. ARRESTO EN INTERFASE.**

El tratamiento con paclitaxel en bajas concentraciones (3 - 12 nM) causa la detención del ciclo celular en la fase G1 (Figura No. 6f), tales células detenidas en G<sub>1</sub> no son multinucleadas, sino mononucleadas. Por tal motivo, las células que salen del arresto mitótico se dividen de forma anormal generando más de dos células interfásicas con contenido genético sub-G<sub>1</sub> ( $\leq 2N$ ). Aunque dicha población representa células muertas, las células en sub G<sub>1</sub> evaluadas mediante TUNEL (ensayo para medir muerte celular) demostraron ausencia de células muertas. Este hecho indica que la detención del ciclo celular durante G<sub>1</sub> se efectúa después del arresto mitótico, dado que las bajas concentraciones de paclitaxel al igual que las concentraciones «estándar» alteran la dinámica de la mitosis, aunque no de la misma manera<sup>86, 86</sup>.

Por otro lado, durante el arresto mitótico transitorio (0.5 - 4 h) causado por bajas concentraciones de paclitaxel, la transcripción es inhibida y los niveles de p53 incrementan y se estabilizan. Curiosamente, dicha acumulación de p53 se muestra acompañada de la



proteína p21 (CKI importante en la detención de la fase G<sub>1</sub>) durante el arresto mitótico; hecho no observable en células tratadas con altas concentraciones de paclitaxel (25 - 100 nM), en donde solo se manifiestan los niveles de p53 sin p21. Por esta razón, el arresto mitótico transitorio resulta en el arresto en G<sub>1</sub> del segundo o incluso tercer ciclo celular, demostrando que hasta 4 h de arresto en mitosis es suficiente para favorecer el arresto en G<sub>1</sub> dependiente de p53 <sup>86, 87</sup>.



**Figura No. 7. Mecanismo clásico de citotoxicidad inducido por paclitaxel.** Durante un arresto mitótico prolongado los niveles de Mcl-1 (factor anti apoptótico) disminuyen gradualmente, favoreciendo el aumento en la actividad de Bak (factor anti apoptótico) y promoviendo la permeabilización de la membrana mitocondrial y la apoptosis.

### 3.2.3. MUERTE DURANTE INTERFASE.

La apoptosis inducida con paclitaxel ocurre durante el arresto mitótico o posterior a una salida de mitosis anormal (*mitotic slippage*). Si bien, los diferentes fármacos antimitóticos inducen un grado muy parecido de muerte celular durante el arresto mitótico, su capacidad para causar apoptosis después del *mitotic slippage* parece ser muy variable. <sup>88, 89</sup>.

Se ha reconocido al paclitaxel como un fármaco capaz de favorecer la muerte celular después del *mitotic slippage* (Figura No. 6g), promoviendo la formación de células multinucleadas con importante daño al DNA, y consecuentemente una respuesta asincrónica durante apoptosis dependiente de p53 <sup>88</sup>.

### 4. MECANISMO DE TOXICIDAD GENERADO POR EL PACLITAXEL.

El paclitaxel ejerce un efecto citotóxico dual a través de dos mecanismos distintos y dependientes; el primero de ellos ocurre durante la mitosis, el cual será nombrado como «mecanismo clásico», mientras que el segundo se da en células interfásicas que han escapado del arresto mitótico y denominado «mecanismo alternativo». Ambos procesos favorecen la apoptosis a partir de la regulación de genes implicados en la muerte celular a

través de la inducción de una respuesta de daño al DNA en células que se han liberado del arresto mitótico <sup>88</sup>.

#### **4.1. MECANISMO CLÁSICO.**

Como ya se ha revisado en la sección 3.1.1. del presente trabajo. El mecanismo clásico de toxicidad engloba una serie de procesos moleculares que tienen como resultado la muerte celular durante la detención mitótica. No obstante, el mecanismo detallado y los factores involucrados no han sido del todo estudiados.

Existen estudios que señalan algunos factores implicados en la muerte durante la mitosis; Wertz I. *et al.* (2011) y Chu R. *et al.* (2012) definieron un mecanismo molecular que involucra la degradación de Mcl-1 y la activación de la apoptosis como la principal maquinaria de muerte celular durante el arresto mitótico (Figura No. 7) <sup>80, 81</sup>. Por otra parte, Yan V. W *et al.* (2007) describieron que células humanas HCT116 tratadas con drogas antimitóticas adquirieron daño al DNA durante el arresto mitótico. No obstante, dicho daño al DNA no recluta componentes involucrados en la respuesta de daño al DNA (DDR, por sus siglas en inglés) durante el arresto mitótico, sino, el reclutamiento ocurre cuando las células se encuentran temporalmente localizadas en el siguiente ciclo celular. Así mismo, la respuesta a la apoptosis en relación con el daño al DNA durante mitosis es escaso, con un 99% de células viables después de varias horas de tratamiento <sup>90</sup>. De esta manera, el daño observado mediante  $\gamma$ H2A.X durante la mitosis no parece estar relacionado al daño convencional estudiado durante el mecanismo alternativo de toxicidad <sup>88, 90</sup>.

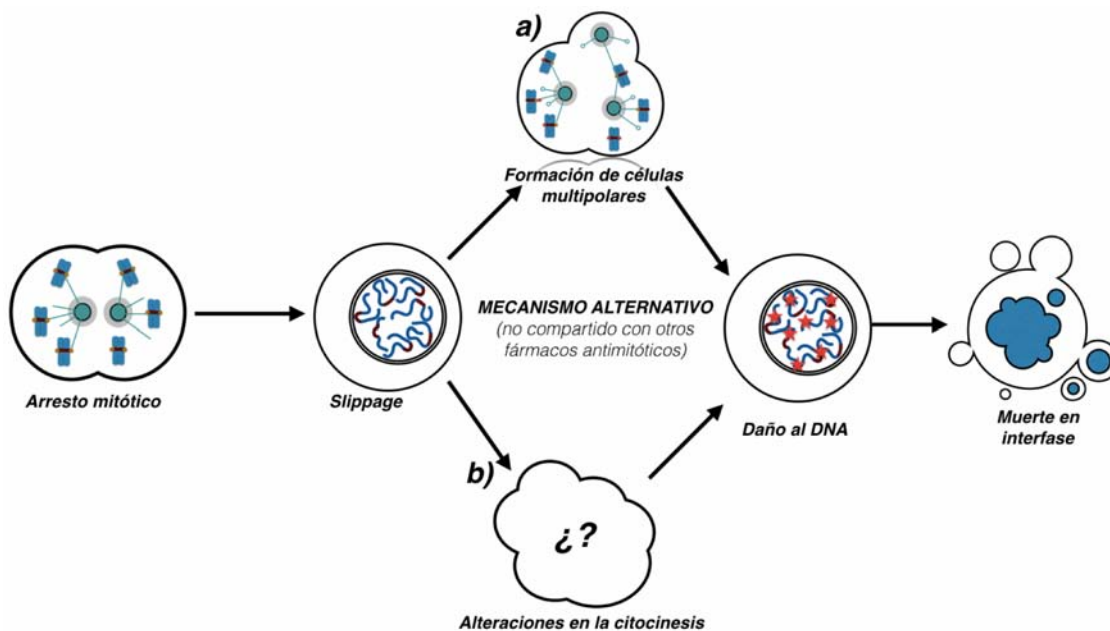
#### **4.2. MECANISMO ALTERNATIVO.**

Comparado con el mecanismo clásico, el mecanismo alternativo de toxicidad sigue siendo poco comprendido. A pesar de ello, estudios previos comparan probables mecanismos moleculares y celulares por los cuales el paclitaxel genera muerte celular después del arresto mitótico. Shi J. *et al.* (2014) identificó la formación de pequeños núcleos como un proceso característico de células que escaparon del arresto mitótico después del tratamiento con paclitaxel. La formación de dicho fenotipo es probablemente causada por la formación de células multipolares; en donde cada polo atrae un conjunto de DNA hacia su respectivo extremo de la célula durante el arresto mitótico. En consecuencia, el ensamblado de la envoltura nuclear y la condensación de la cromatina en células después del *mitotic slippage* genera células multinucleadas con evidente daño al DNA y una respuesta apoptótica dependiente de p53. No obstante, este hallazgo no ha sido del todo comprobado <sup>88</sup>. Por otro lado, existe un mecanismo adicional por el cual se presenta un efecto citotóxico en células postmitóticas; de acuerdo a estudios previos de Orth D. *et al.* (2008) y Shi J. *et al.* (2014) la activación parcial de caspasas y de la DNasa activada por caspasas (CAD, por sus siglas en inglés) genera daño al DNA y muerte celular dependiente de p53 en células tratadas con paclitaxel <sup>88, 89</sup>.

En un trabajo previo de nuestro grupo ( ver Andonegui M. A. *et al.* (2016)) se observó que tan pronto la célula escapa de mitosis en la presencia de paclitaxel, comienza un «intento fallido de citocinesis»; el cual resulta ser más enérgico que el «*membrane blebbing*» durante la apoptosis, de acuerdo a las observaciones en células individuales realizadas a través de microscopía por time-lapse <sup>52</sup>. Por otra parte, Sahannon, K. *et al.* (2005) elucidaron en elucidar un mecanismo desconocido del paclitaxel durante la citocinesis; el paclitaxel promueve la estabilización de los microtúbulos asociados a la corteza celular, dicho evento posiciona la formación de algunos surcos citocinéticos, aunque algunos mantienen un número anormal de

invaginación o se encuentran mal posicionados antes que la célula salga del arresto mitótico. No obstante, todas las invaginaciones de la membrana coinciden con los microtúbulos asociados a la corteza celular, confirmando que los microtúbulos estabilizados con paclitaxel pueden especificar la formación del surco citocinético en el sitio en el que hacen contacto con la corteza celular <sup>32</sup>.

Referido a lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo caracterizar un mecanismo alternativo de toxicidad generado por paclitaxel (Figura No. 8a). Por tal motivo, se hipotetizó que la inducción de las contracciones en la membrana plasmática observadas por Andonegui M. A. et al. (2016) son una consecuencia del fenómeno descrito por Sahannon, K. et al. (2005) en células tratadas con paclitaxel (Figura No. 8b), el cual es la causa del daño al DNA y citotoxicidad por un mecanismo diferente a la muerte durante la mitosis.



**Figura No. 8. Mecanismos alternativos de citotoxicidad inducidos por paclitaxel. a)** Shi J. et al. 2014 describe la formación de “clusters” de DNA debido a que cada polo de la célula atrae un número determinado de cromosomas posterior al tratamiento con paclitaxel. **b)** El mecanismo alternativo de toxicidad; describe que la inducción de surcos por el paclitaxel a lo largo de toda la corteza celular es el principal factor que favorece el daño al DNA y en consecuencia, la muerte celular en interfase.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El paclitaxel es un agente ampliamente utilizado en quimioterapia con el objetivo de erradicar células cancerosas en pacientes que poseen dicha enfermedad. Es un compuesto capaz de estabilizar la polimerización de microtúbulos del huso y en consecuencia, arrestar a las células en mitosis durante largos periodos hasta morir o bien, escapar de mitosis («mitotic slippage») hacia un destino todavía no descrito con exactitud. Los factores que controlan la duración de mitosis, así como también los que influyen en el destino de una mitosis prolongada han sido una materia de amplio estudio. Adicionalmente, se ha caracterizado en ciertas células la habilidad para escapar del arresto mitótico inducido por paclitaxel, exhibiendo a nivel de membrana un fenómeno que nosotros denominamos como un «intento fallido de citocinesis»

debido a la capacidad del paclitaxel para estabilizar la unión entre microtúbulos y membrana plasmática, promoviendo así, la formación de dichos surcos considerados por nuestro grupo; un fenómeno con potencial para generar daño al DNA y toxicidad. Sin embargo, los procesos que pueden contribuir a un mecanismo diferente de toxicidad generado por el paclitaxel posterior a la salida del arresto mitótico se mantienen poco entendidos. Es por ello necesario estudiar y caracterizar dicho evento celular no solo *in vitro*, sino también *in vivo* y a nivel individual dentro de una población celular. Esto es importante, ya que no existe información ni reportes previos acerca del mecanismo alternativo de toxicidad, el cual podría estar siendo enmascarado por la heterogeneidad en la respuesta al paclitaxel que hay en una población total de células tumorales.

Previamente se mencionó este nuevo mecanismo como un «mecanismo alternativo de toxicidad», sin embargo, ¿Podría participar como un mecanismo complementario en adición a otros procesos desencadenados después del arresto mitótico? o ¿Es exclusivamente un mecanismo independiente que contribuye a la muerte de cierto porcentaje de la población celular después del arresto mitótico?

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿La formación de surcos citocinéticos durante el arresto mitótico prolongado con paclitaxel favorece el aumento en su toxicidad sobre células HCT116?

## **HIPÓTESIS**

El paclitaxel favorece la formación de surcos citocinéticos hacia el final de la mitosis prolongada, lo cual provoca daño al DNA y, por lo tanto, contribuye a su toxicidad sobre células HCT116.

## **OBJETIVO GENERAL**

- Determinar la relación entre la formación de surcos citocinéticos, el daño al DNA y la toxicidad mediada por paclitaxel en células que se liberaron de una mitosis prolongada.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Establecer un modelo de estudio *in vitro* que permita examinar la formación e inhibición de surcos citocinéticos (SC) en células tratadas con paclitaxel.
- Evaluar daño al DNA ocasionado por el paclitaxel posterior a la formación e inhibición de surcos citocinéticos.
- Determinar el porcentaje de células muertas por paclitaxel posterior a la formación e inhibición de surcos citocinéticos.

## MÉTODOS

### 1. LÍNEA CELULAR Y CONDICIONES DE CULTIVO CELULAR

En el presente trabajo se estableció como modelo de estudio la línea celular de adenocarcinoma de colon humano (HCT116) obtenida de ATCC (American Type Culture Collection), ya que tiene un PMM eficiente y los niveles de proteína p53 funcional, permitiendo detener a las células durante mitosis y desencadenar una respuesta de citotoxicidad. La línea celular HCT116 fue mantenida en medio McCoy's 5A (GIBCO) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (GIBCO) sin antibiótico. Las células se mantuvieron incubadas a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>. Durante los experimentos se utilizó una cabina de flujo laminar nivel de seguridad A2 y un rango límite de pase celular 3 – 25.

### 2. SINCRONIZACIÓN CELULAR

La línea celular HCT116 fue sincronizada en la fase G1/S del ciclo celular mediante un bloqueo con timidina (*ver anexo: especificación de soluciones y reactivos y protocolos en extenso*) para homogenizar la respuesta inducida por algún fármaco en particular. Cuando el cultivo celular alcanzó una confluencia del 50-60%, las células fueron lavadas con amortiguador de sales de fosfatos 1X (PBS) en dos ocasiones, y finalmente tratadas con timidina 2 mM diluida en medio McCoy's A5 a 37°C por 18 h. (*ver anexo: protocolos en extenso*)

### 3. TRATAMIENTO CON FÁRMACOS

Al término de las 18 h de sincronización, se retiró el medio McCoy's A5 con timidina y se lavó en dos ocasiones con PBS 1X. Finalmente, se adicionaron tres tratamientos de manera independiente (*ver anexo: especificación de soluciones y reactivos*).

- 3.1. Paclitaxel (100 nM) para inducir la formación de surcos citocinéticos posterior a la salida del arresto mitótico.
- 3.2. Paclitaxel (100 nM) + citocalasina B (CB) para inhibir la formación de surcos durante citocinesis a través de la despolimerización de filamentos de actina.
- 3.3. Paclitaxel (100 nM) + blebistatina (BBT) para inhibir la formación de surcos durante citocinesis a través de la inactivación de la miosina II.

Todos los fármacos fueron diluidos en medio McCoy A5 en los tiempos indicados en el presente trabajo (*ver anexo: protocolos en extenso*).

### 4. CUANTIFICACIÓN CELULAR POR MICROSCOPIA FOTÓNICA

4.1. ÍNDICE MITÓTICO (IM), DE CÉLULAS BINUCLEADAS (IBN) Y DE CÉLULAS POLIPLOIDES (IPP)  
Al finalizar el tiempo de incubación, el fármaco se retiró del cultivo celular y se lavó una vez con PBS 1X. En seguida se adicionó solución hipotónica (*ver anexo: especificación de soluciones y reactivos*) durante 20 minutos a 37°C y las células fueron recolectadas de manera mecánica con ayuda de una espátula y prefijadas adicionando solución fijadora fría. Se centrifugaron a 1200 rpm por 5 minutos, se decantó el sobrenadante y el botón se resuspendió en un ml de solución fijadora. Esta suspensión fue almacenada a -20°C por 20 minutos. Posteriormente se adicionó un ml de solución fijadora (*ver anexo: especificación de soluciones y reactivos*) y 40 µl de suspensión celular se colocaron en el adaptador de la centrífuga (Rotofix 32A, Hettich), las células se adhirieron a una laminilla cargada

positivamente (Superfrost plus, Fisher scientific) con centrifugación de 600 rpm por 1 minuto. La laminilla fue secada al aire y sumergida por 4 minutos en un vaso coplin que contenía una solución de eosina (Milipore, solución 2 Microscopy Hemacolor®), fue lavada ligeramente en agua destilada, sumergida en azul de metileno (Milipore, solución 3 Microscopy Hemacolor®) por 10 segundos y finalmente lavada con agua destilada.

Las células fueron observadas y cuantificadas a través de laminillas mediante un microscopio fotónico (LEICA, ZEISS) con un objetivo 40X en campo claro. Se contaron al menos 1000 células por laminilla y se registró la coordenada inicial y final de la cuantificación en un experimento por triplicado. El índice mitótico (IM), Índice de células binucleadas (IBn) e índice de células poliploides (IPp) se obtuvo a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Índice} = \frac{\text{Células } M, \text{ Bn o Pp}}{\text{Células totales}} \times 100$$

**M:** Mitóticas, **Bn:** Binucleadas y/o **Pp:** poliploides.

## 5. CITOMETRÍA DE FLUJO

### 5.1. ANÁLISIS DE LA POBLACIÓN DE CÉLULAS SUB-G<sub>1</sub> Y POLIPLOIDES

El análisis de la población sub-G<sub>1</sub> y de células poliploides se llevó a cabo mediante la cuantificación del contenido de DNA teñido con yoduro de propidio (IP), siguiendo las condiciones establecidas a continuación (*ver anexo: Protocolos en extenso*). Al finalizar el tiempo de tratamiento, las células fueron lavadas con PBS 1X, tripsinizadas durante 5 minutos a 37°C y neutralizadas con un volumen duplicado de medio McCoy 5A respecto a la tripsina agregada. A continuación, las células fueron centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos, se decantó el sobrenadante y resuspendió el botón de células en PBS 1X, este proceso se repitió una vez más. Posteriormente, las células fueron centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos, se decantó el PBS 1X, se resuspendió el botón de células en etanol al 70% frío y se almacenaron a -20°C por lo menos 24 h. Para realizar las lecturas en el citómetro de flujo, el botón de células fue lavado en dos ocasiones con PBS 1X y resuspendido en solución de tinción con yoduro de propidio (IP) (*ver anexo: especificación de soluciones y reactivos*). Finalmente, las células fueron incubadas en baño maría (ThermoFisher Scientific) a 37°C por 2 h en total oscuridad. La lectura de las muestras se realizó en un citómetro de flujo FACS CANTO II (Becton Dickinson), con el software FACSDIVA (Becton Dickinson) versión 6.1.3 y se capturaron los datos cuantitativos.

### 5.2. INMUNODETECCIÓN DE γH2A.X

El análisis de daño al DNA se realizó por citometría de flujo mediante un anticuerpo anti-Phospho-Histone H2A.X (Ser139). Un ensayo basado en la detección de los niveles de histona H2A.X fosforilada (Ser139) utilizando un anticuerpo monoclonal acoplado a Alexa® 488 y siguiendo las condiciones establecidas a continuación (*ver anexo: Protocolos en extenso*).

Después de haber transcurrido el tiempo de tratamiento, se removió el medio de cultivo y se lavaron las células en dos ocasiones con un volumen tres veces mayor de PBS 1X respecto al volumen de medio McCoy's 5A agregado. Se despegaron las células con tratamiento de tripsina a 37°C por 5 minutos y se neutralizó con un volumen duplicado de medio McCoy's 5A. Las células se lavaron en dos ocasiones con PBS 1X y posteriormente fueron fijadas con metanol frío durante 10 minutos a -20°C. Transcurrido el tiempo de incubación, las células se centrifugaron a 1200 rpm y permeabilizaron con acetona fría durante 1 minuto a -20°C. En

seguida, se lavaron en dos ocasiones con PBS 1X y almacenaron a 4°C durante 24 h. Posteriormente, las células fueron incubadas con 5 µl de anti-Phospho-Histone H2A.X (Ser139) conjugado con Alexa® 488 (Biolegend) para cada muestra, y un control negativo ratón IgG conjugado a Alexa® 488 (Biolegend) en una solución de BSA 1% (ver anexo: especificación de soluciones y reactivos) durante 40 minutos en un rotador (DAIGGER) en total oscuridad. Finalmente, las células se lavaron con PBS 1X, suspendieron en FACS flow y se trasladaron a tubos de citometría FACS CANTO II (Becton Dickinson). Los datos cuantitativos se capturaron a través del programa FACS DIVA versión 6. 1. 3.

### 5.3. INMUNODETECCIÓN DE LA HISTONA H3S10PH

El índice mitótico se llevó a cabo mediante inmunodetección de la histona H3 fosforilada en la serina 10 (pH3S10), una marca post traduccional y específica de células mitóticas. Se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón acoplado al fluorocromo Alexa® 488 (Cell signalling) siguiendo las condiciones establecidas a continuación (*ver anexo: Protocolos en extenso*).

Después de haber transcurrido el tiempo de tratamiento, se removió el medio de cultivo y se lavaron las células en dos ocasiones con un volumen mayor de PBS 1X respecto al volumen de medio de cultivo agregado. Se despegaron las células con tratamiento de tripsina-EDTA a 37°C por 5 minutos y se neutralizó con un volumen duplicado de medio McCoy's 5A. Se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos y fijaron con metanol frío durante 10 minutos a -20°C. Transcurrido el tiempo de incubación, las células se centrifugaron a 1200 rpm y permeabilizaron con acetona fría durante 1 minuto a -20°C. En seguida, se lavaron en dos ocasiones con PBS 1X y almacenaron a 4°C durante 24 h. Posteriormente, las células fueron incubadas con anti-phospho Histone 3 (Serina 10) conjugada con Alexa® 488 (Cell signalling) a una concentración de 1:100 en solución de BSA 1% (ver anexo: especificación de soluciones y reactivos) durante 40 minutos en un rotador (DAIGGER) en total oscuridad. Finalmente, las células se lavaron con PBS 1X, suspendieron en FACS flow y se trasladaron a tubos de citometría FACS CANTO II (Becton Dickinson), donde los datos cuantitativos se capturaron a través del programa FACS DIVA versión 6. 1. 3.

## 6. VIDEO POR MICROSCOPIA EN TIME-LAPSE

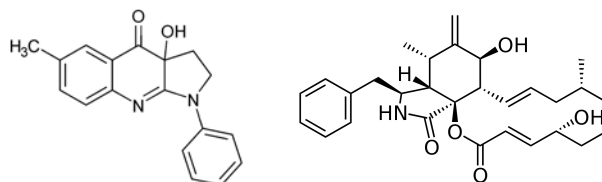
Para poder analizar la dinámica y formación de surcos citocinéticos durante la salida del arresto mitótico en células HCT116 in vivo, se siguieron las siguientes condiciones: (*ver anexo: Protocolos en extenso*). Se sembró una cantidad de células HCT116 mínima (2.500 células) para obtener una confluencia del 30% después de 2 a 3 días de tratamiento. Las células fueron sembradas en una cámara POC-R2 (PECON®). Las células fueron sincronizadas con timidina 2 mM y tratadas en la misma cámara. Posterior al tratamiento, las células fueron fotografiadas cada 10 min durante 48 h a través de un objetivo DIC (*Differential Interference Contrast*) de inmersión 40X en un microscopio Zeiss AxioVert 200 Motorized (Carl Zeiss) con la finalidad de definir la dinámica en la membrana celular. Finalmente, las células individuales fueron analizadas a partir del software AxioScan .Z1 y ZEN Lite (Carl Zeiss).

## RESULTADOS

### 1. OBTENCIÓN DE LA DOSIS MÍNIMA EFECTIVA DE CITOCALASINA B Y BLEBISTATINA

Para definir la concentración mínima efectiva que se utilizó en los siguientes experimentos, primero se estableció como modelo de estudio la línea celular humana HCT116 de carcinoma colorectal, dado que posee dos características relevantes; 1) tiene un punto de monitoreo eficiente (PMM) que nos permite arrestar a las células en mitosis durante periodos prolongados hasta inducir una salida forzada del arresto mitótico que incluye movimientos evidentes en la membrana celular, y 2) mantiene los niveles protéicos de p53 estables y funcionales, posibilitándonos analizar una respuesta citotóxica en células tratadas con varios fármacos.

Para determinar la dosis mínima efectiva se seleccionaron un par de fármacos con mecanismos de acción particulares para inhibir la citocinesis y/o el «intento fallido de citocinesis» comentado anteriormente (*Figura No. 9*). El primer fármaco fue *citocalasina B (CB)*, el cual evita la polimerización de los filamentos de actina y la formación del anillo de actinmiosina. El segundo fue *blebistatina (BBT)*, que inhibe la actividad de la ATPasa de miosina II y evita el ensamblaje y contracción del anillo contráctil durante la citocinesis. La dosis mínima efectiva para cada fármaco fue determinada de acuerdo a tres parámetros: porcentaje de células binucleadas, efecto citotóxico del fármaco y fracción de células poliploides.



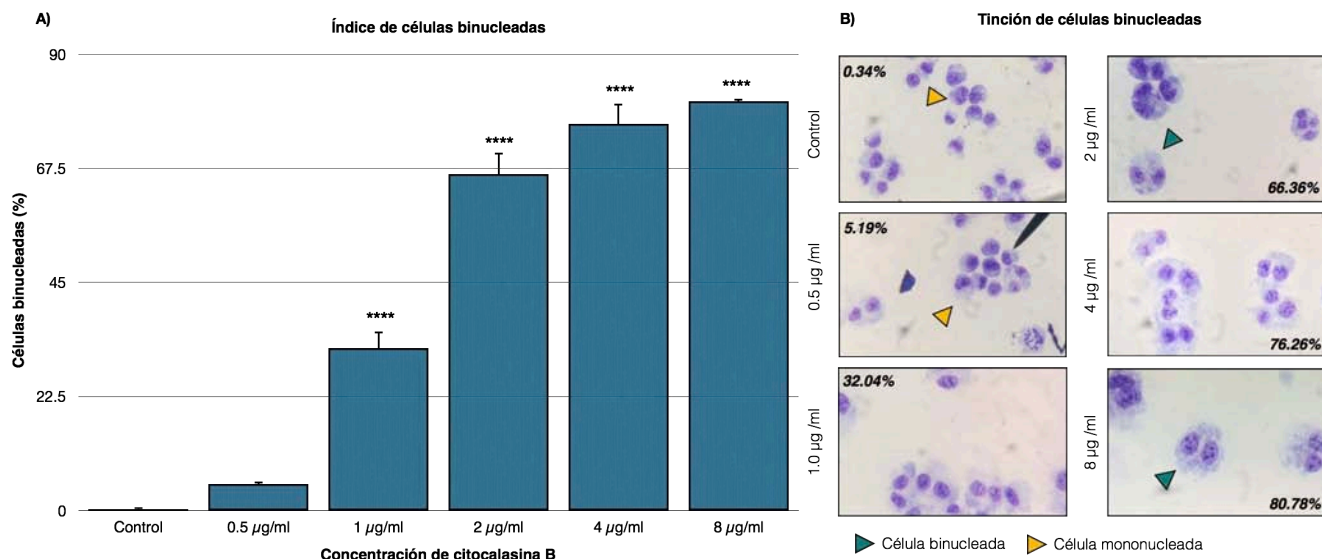
**Figura No. 9: Drogas anti citocinesis utilizadas en el modelo de estudio del presente trabajo.** Del lado izquierdo se observa la estructura química de la blebistatina (BBT). En el lado derecho se aprecia la estructura química de la citocalasina B.

#### 1.1. CONTEO DE CÉLULAS BINUCLEADAS

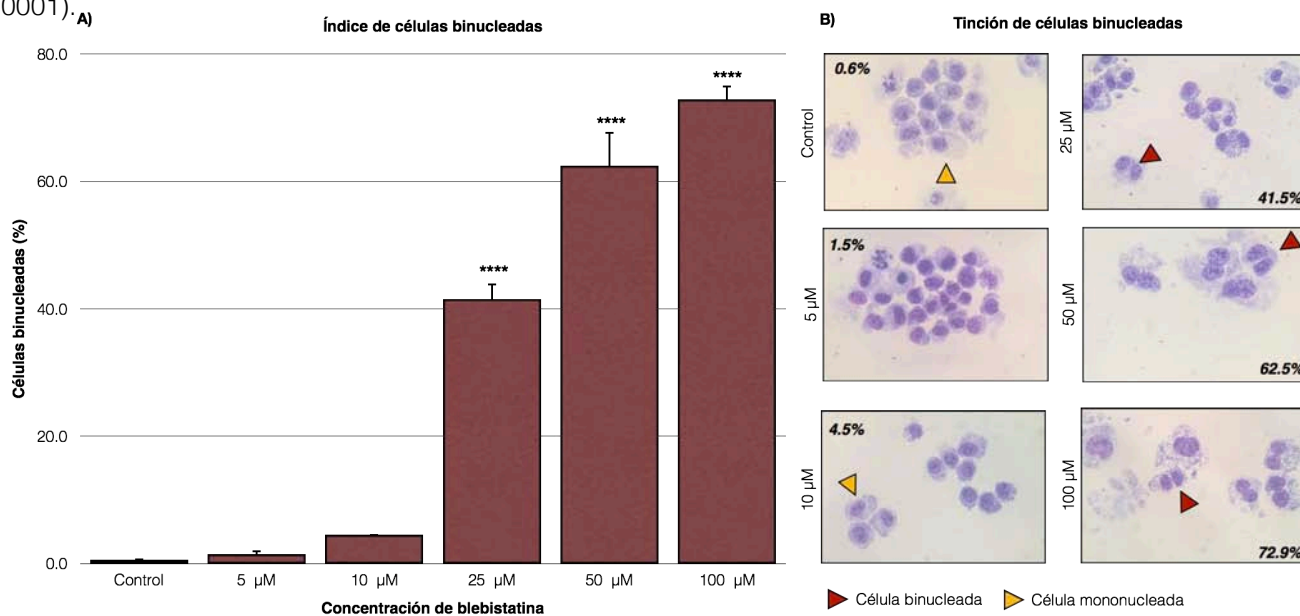
Para determinar la dosis mínima efectiva de CB y BBT que genera un mayor porcentaje de células binucleadas es decir, células en las que el fármaco inhibió la citocinesis a pesar de la segregación del material genético, se realizó una curva dosis-respuesta en donde la dosis se tomó en cuenta de acuerdo al porcentaje de células binucleadas obtenida tras 24 h de tratamiento con el fármaco (*Figura No. 10A y 11A*). El conteo de células binucleadas se llevó a cabo a través de un microscopio fotónico (*Figura No. 10B y 11B*).

El porcentaje de células binucleadas cuantificadas posterior al tratamiento con CB durante 24 h poseen diferencias estadísticamente significativas respecto a control. En contraste, 0.5 µg/ml no resulta ser estadísticamente significativo en comparación al control (células HCT116 tratadas con DMSO:PBS). Por otro lado, el porcentaje de células binucleadas analizadas después del tratamiento de 24 h con BBT es significativo a partir de 25 µM. No obstante, 5 y 10 µM no poseen significancia estadística respecto a su control y fueron descartados del estudio al igual que 0.5 µg/ml de CB.

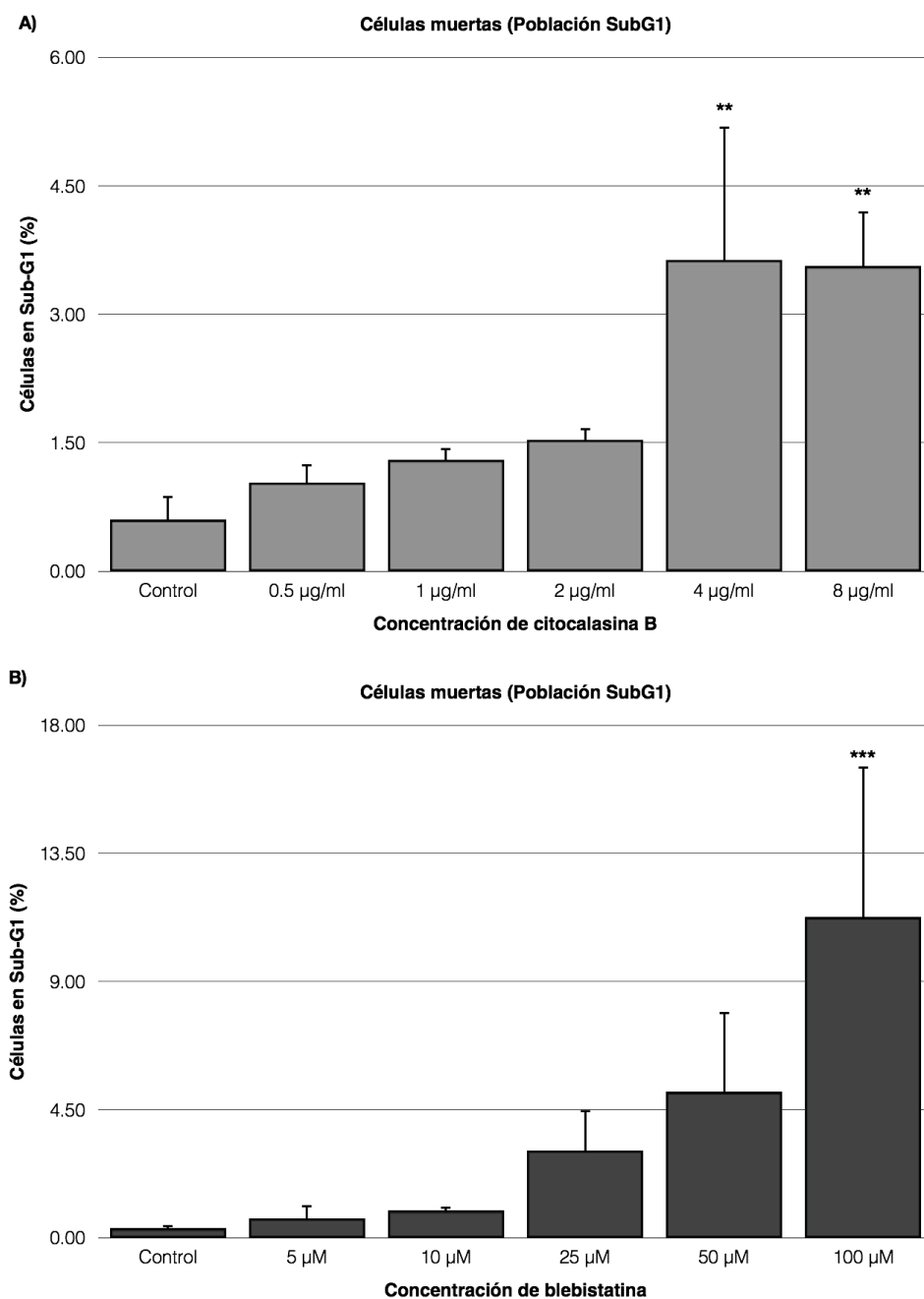




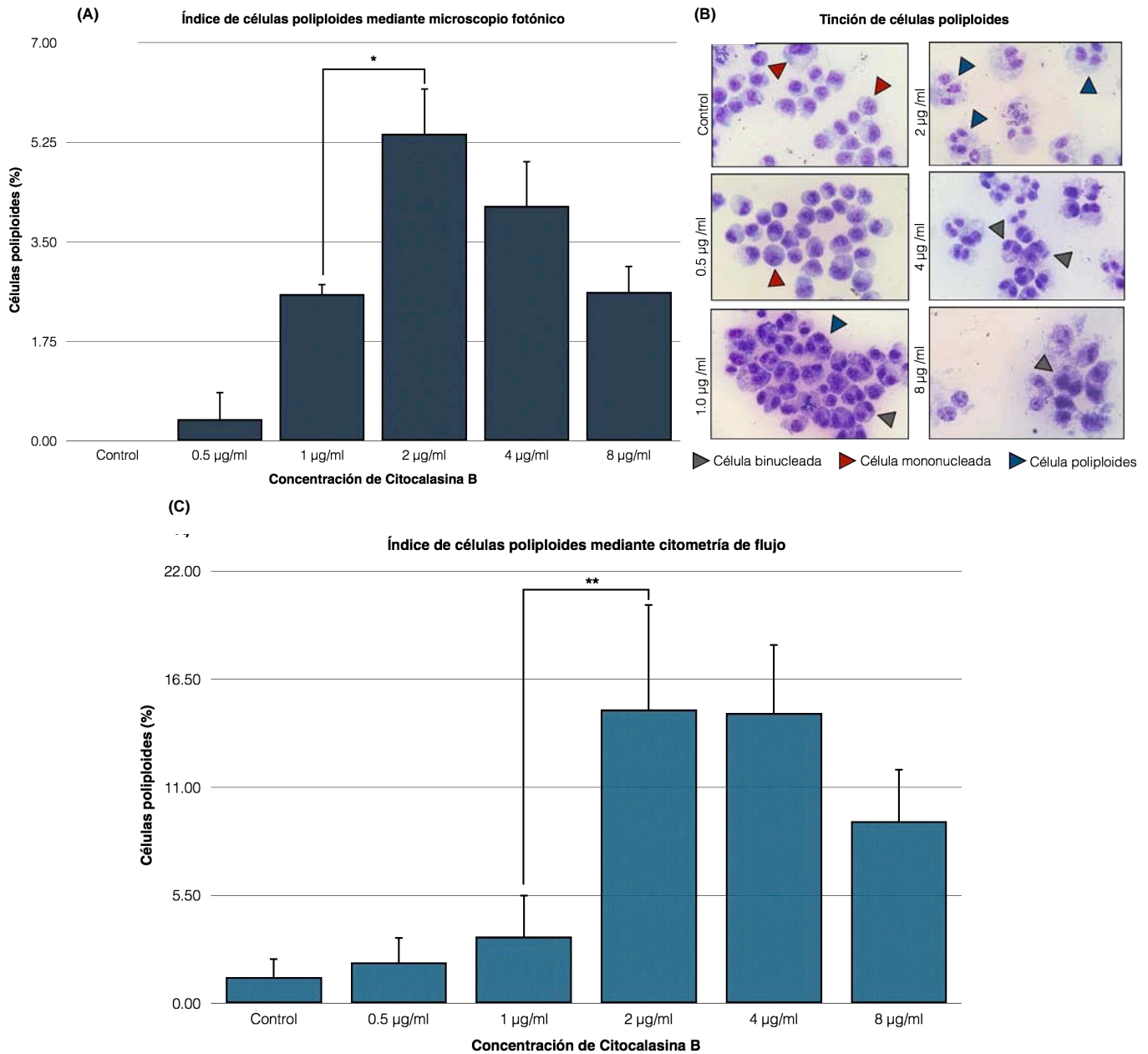
**Figura No. 10: Ensayo dosis-respuesta con citocalasina B (CB), en relación con el porcentaje de células HCT116 binucleadas.** (A) Cuando las células son tratadas con citocalasina B en las concentraciones señaladas en la gráfica de barras (región inferior), muestran un incremento significativo en el porcentaje de células binucleadas a partir de 1 µg/ml respecto al control (DMSO:PBS). En contraste, 0.5 µg/ml incrementa ligeramente el porcentaje de células binucleadas pero no demuestra alguna diferencia significativa respecto al control. (B) Fotografías representativas demuestran la identificación de células binucleadas (▶) y mononucleadas (▶) que se llevó a cabo mediante tinción con eosina y azul de metileno, mientras la cuantificación se efectuó a través del análisis con microscopio fotónico. Los experimentos se realizaron por triplicado y la significancia estadística se determinó por análisis de varianza de una sola vía (ANOVA,  $p < 0.0001$ ) y análisis de comparación múltiple de Dunnett (\*\*\*\*,  $p < 0.0001$ ).



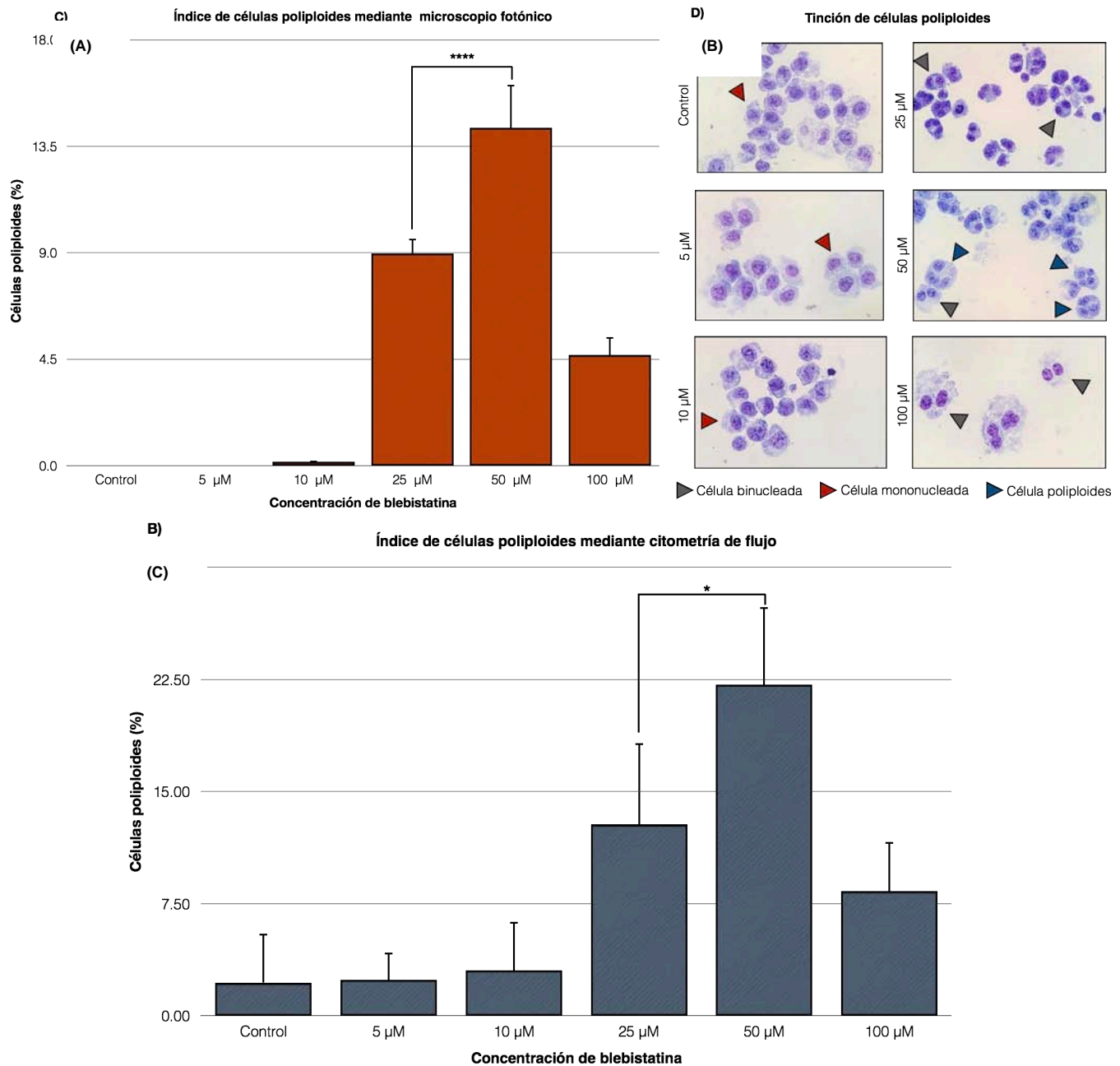
**Figura No. 11: Ensayo dosis-respuesta con blebistatina (BBT), en relación con el porcentaje de células HCT116 binucleadas.** (A) Las células tratadas con blebistatina a las concentraciones señaladas en la gráfica de barras (región inferior) determina que 25, 50 y 100 µM poseen un incremento significativo en el porcentaje de células binucleadas respecto al control (DMSO:PBS). En oposición con 5 y 10 µM, en donde se demuestra un ligero incremento que no representa diferencias estadísticamente significativas. (B) Fotografías representativas demuestran el reconocimiento de células binucleadas (▶) y mononucleadas (▶), el cual se llevó a cabo mediante tinción con eosina y azul de metileno, mientras la cuantificación se efectuó a través del análisis con microscopio fotónico. Los experimentos se realizaron por triplicado y la significancia estadística se determinó por análisis de varianza de una sola vía (ANOVA,  $p < 0.0001$ ) y análisis de comparación múltiple de Dunnett (\*\*\*\*,  $p < 0.0001$ ).



**Figura No. 12: Ensayo dosis-respuesta con citocalasina B (CB) y blebbistatina (BBT), en relación con el porcentaje de células HCT116 muertas (población SubG<sub>1</sub>).** Células HCT116 tratadas con CB (A) y BBT (B) en las concentraciones señaladas de acuerdo a los gráficos de barras (región inferior). **(A)** Durante el tratamiento con CB por 24 h se observa un incremento significativo en la fracción de células muertas a 4 y 8 µg/ml. En contraste, en 0.5, 1 y 2 µg/ml aumenta ligeramente la población subG<sub>1</sub> pero no representa significancia estadística en relación al control. Los experimentos se realizaron por triplicado y la significancia estadística se determinó por análisis de varianza de una sola vía (ANOVA,  $p=0.0019$ ) y análisis de comparación múltiple de Dunnett (Ctl vs 4 µg/ml \*\*,  $p=0.0031$  y Ctl vs 8 µg/ml \*\*,  $p=0.0036$ ) **(B)** Durante el tratamiento con BBT por 24 h, se observa un aumento importante y estadísticamente significativo en 100 µM en relación al control. No obstante, el resto de las concentraciones incrementaron el número de células muertas de manera sutil sin alguna diferencia estadística respecto al control. Los experimentos se realizaron por triplicado y la significancia estadística se determinó por análisis de varianza de una sola vía (ANOVA,  $p=0.0013$ ) y análisis de comparación múltiple de Dunnett (\*\*\*,  $p=0.0008$ )



**Figura No. 13: Ensayo dosis-respuesta con citocalasina B (CB) en relación al porcentaje de células poliploides a través del análisis de microscopía fotónica y citometría de flujo.** Células HCT116 fueron tratadas con CB durante 24 h en las concentraciones señaladas en la parte inferior de las gráficas de barra y a un costado de las fotografías. **(A)** Posterior al tratamiento con CB se observa un incremento estadísticamente representativo de células poliploides en 1 y 2 µg/ml respecto al control. No obstante, la diferencia entre ambas concentraciones también fue significativo, siendo 2 µg/ml la concentración con mayor número de células con poliploidía. Los experimentos se realizaron por triplicado, y la significancia estadística se determinó por análisis de varianza de una sola vía (ANOVA,  $p=0.0002$ ) y prueba de comparación múltiple de Dunnett (\*,  $p=0.0197$ ) **(B)** Fotografías representativas demuestran el reconocimiento de células poliploides (▶), binucleadas (▶) y mononucleadas (▶) tratadas con CB a distintas concentraciones durante 24 h. La tinción se llevó a cabo con eosina y azul de metileno y la cuantificación se efectuó a través del análisis con microscopio fotónico. **(C)** Después del tratamiento con CB, se observa un aumento del número de células poliploides en 1 y 2 µg/ml. Ambas concentraciones tienen significancia estadística con su control y también entre ellas mismas, siendo 2µg/ml la concentración con mayor porcentaje de poliploidía. Los experimentos se realizaron por triplicado, y la significancia estadística se determinó por análisis de varianza de una sola vía (ANOVA,  $p < 0.0001$ ) y prueba de comparación múltiple de Dunnett (\*\*,  $p=0.0013$ ).



**Figura No. 14: Ensayo dosis-respuesta con blebbistatina (BBT) en relación al porcentaje de células poliploides a través del análisis de microscopía fotónica y citometría de flujo.** Células HCT116 fueron tratadas con BBT durante 24 h a las concentraciones señaladas en la gráfica de barras (parte inferior). **(A)** Después del tratamiento con BBT se observa un aumento considerable de células poliploides en 25 y 50 µM. Dichas concentraciones demuestran ser estadísticamente significativas entre sí. Sin embargo, fue 50 µM cuya concentración generó un porcentaje mayor de células poliploides. Los experimentos se realizaron por triplicado y la significancia estadística se determinó por análisis de varianza de una sola vía (ANOVA,  $p < 0.0001$ ) y análisis de comparación múltiple de Dunnett (\*\*\*\*,  $p < 0.0001$ ) **(B)** Fotografías representativas demuestran el reconocimiento de células poliploides (▶), binucleadas (▶) y mononucleadas (▶) tratadas con BBT a distintas concentraciones durante 24 h. La tinción se realizó con eosina y azul de metileno y la cuantificación se efectuó a través del análisis con microscopio fotónico **(C)** Posterior al tratamiento con BBT, se contempla un porcentaje estadísticamente diferente de poliploidía en 25 y 50 µM respecto a su control, y también entre ambas concentraciones. No obstante, 50 µM fue la concentración que presenta mayor porcentaje de células poliploides. Los experimentos se realizaron por triplicado y la significancia estadística se determinó por análisis de varianza de una sola vía (ANOVA,  $p = 0.0002$ ) y análisis de comparación múltiple de Dunnett (\*,  $p = 0.0478$ )

## **1.2. EFECTO CITOTÓXICO**

La línea celular HCT116 fue expuesta a las mismas concentraciones de CB y BBT utilizadas en la sección anterior (sección 1.1) por 24 h. Posteriormente se midió la fracción de células muertas mediante citometría de flujo. El porcentaje de células muertas se estimó a través del análisis de la población SubG<sub>1</sub>, un indicador de material genético fragmentado (fenómeno ocurrido en células con muerte celular por apoptosis) (Figura No. 12 A y B).

El porcentaje de células en subG<sub>1</sub> después del tratamiento con CB aumenta ligeramente en 0.5, 1 y 2 µg/ml sin alcanzar significancia estadística respecto al control. No obstante, en 4 y 8 µg/ml observamos una fracción de células muertas estadísticamente mayor y por lo tanto, dichas concentraciones no fueron consideradas para el presente estudio. Por otra parte, el tratamiento con BBT demuestra únicamente a 100 µM un incremento significativo en el porcentaje de células SubG<sub>1</sub> respecto al control. En contraste, 5, 10, 25 y 50 µM solo se tiene un sutil aumento en la población de células muertas que no es estadísticamente significativo respecto al control.

Estos hallazgos sugieren que 4 y 8 µg/ml de citocalasina B y 100 µM de blebistatina no son concentraciones ideales para el presente estudio debido a su efecto citotóxico y por lo tanto, también fueron descartadas; recordemos que 5, 10 µM de BBT y 0.5 µg/ml de CB ya habían sido descartadas anteriormente.

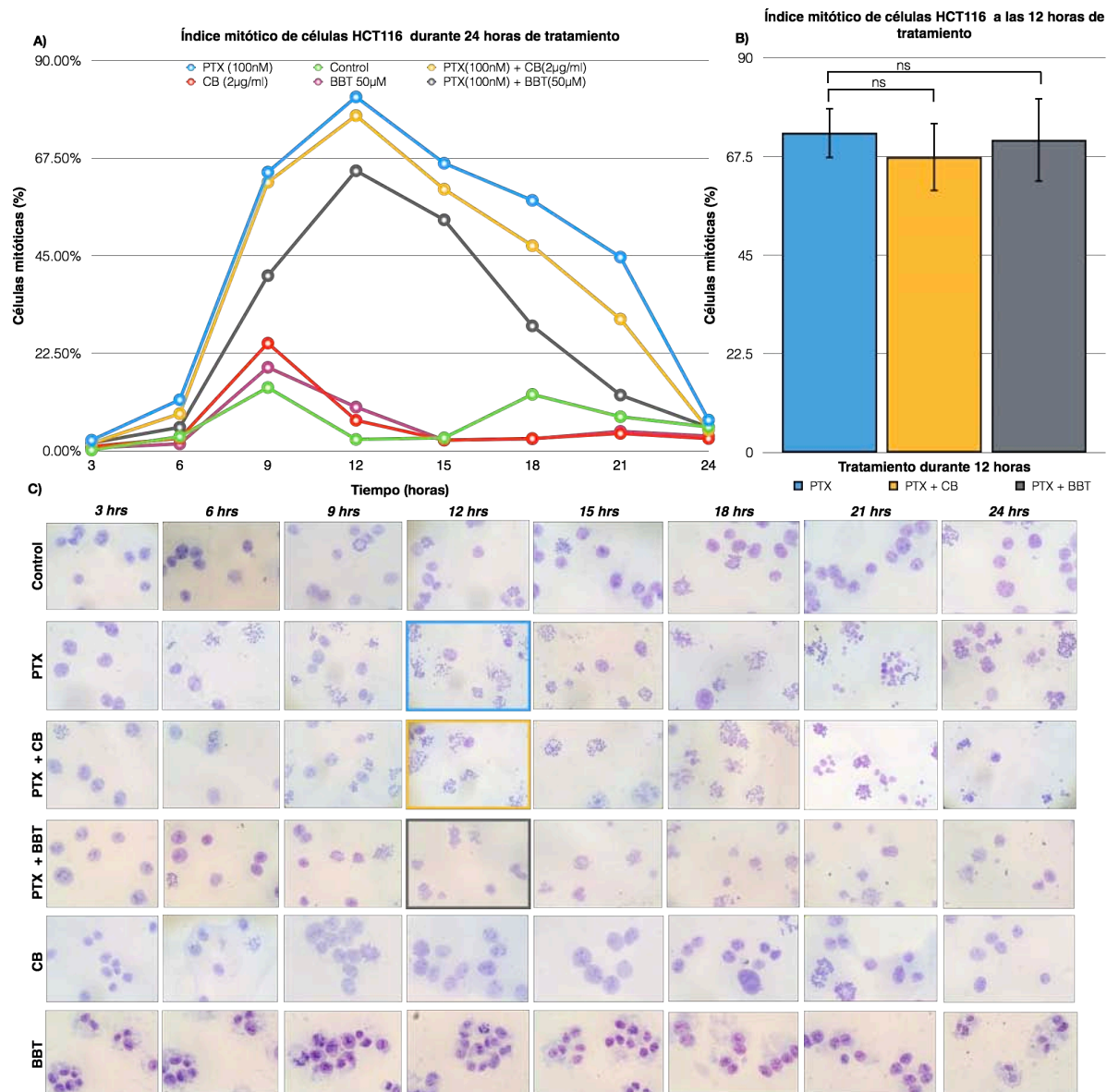
## **1.3. CONTEO DE CÉLULAS POLIPLOIDES**

La fracción de células HCT116 con poliploidía representa el porcentaje de células que inhibieron satisfactoriamente el proceso de citocinesis, continuaron dividiéndose y por tal motivo fueron viables hasta el momento del análisis. Dicha fracción se estimó a partir de la cuantificación por microscopía fotónica de células >2 núcleos y por citometría de flujo analizando la población de células con contenido de DNA >4N, posterior al tratamiento con CB y BBT durante 24 h.

En la línea celular HCT116 tratada con CB en las concentraciones utilizadas en la sección 1.1 y 1.2 incrementó la fracción de células poliploides de manera significativa en 1 y 2 µg/ml respecto al control. Por otra parte, existe una diferencia estadísticamente significativa entre ambas concentraciones, siendo 2 µg/ml la concentración con mayor número de células poliploides (Figura No. 13 A y B; Figura suplementaria No. 3). Adicionalmente, el análisis a través de citometría de flujo demostró un comportamiento similar al observado en microscopía fotónica; siendo 2 µg/ml la concentración con mayor fracción de células poliploides y la dosis efectiva mínima utilizada para todos los experimentos subsecuentes (Figura No. 13 C; Figura suplementaria No. 3), dado que 0.5 µg/ml no generó suficientes células binucleadas, 4 y 8 µg/ml promueven demasiada toxicidad y 1 µg/ml no induce un porcentaje alto de células poliploides respecto a 2 µg/ml.

En células tratadas con BBT utilizadas en la sección 1.1 y 1.2, aumentó la fracción celular con poliploidia de manera significativa en 25 y 50 µM respecto a su control. Dichas concentraciones son estadísticamente diferentes entre sí, siendo 50 µM la concentración con mayor porcentaje de células poliploides (Figura No.14 A y B). Además, a través del análisis con citometría de flujo se corroboraron los resultados obtenidos por microscopía fotónica, en donde 50 µM es la concentración con mayor porcentaje de células poliploides (Figura No.14 C; Figura suplementaria No. 4). Recordemos que 5 y 10 µM no producen suficientes células binucleadas, 100 µM genera demasiada citotoxicidad y 25 µM mantiene un porcentaje de células con poliploidia bajo respecto a 50 µM. Por tal razón 50 µM de BBT fue la concentración seleccionada para los subsecuentes experimentos.

Estos hallazgos demuestran que 2  $\mu\text{g/ml}$  de CB y 50  $\mu\text{M}$  de BBT son las concentraciones idóneas para tratar de evitar la formación de surcos citocinéticos durante la salida del arresto mitótico inducido por paclitaxel.



**Figura No. 15: La dinámica del arresto mitótico inducido con paclitaxel no se ve afectada al incluir citocalasina B (2 $\mu\text{g/ml}$ ) y blebistatina (50 $\mu\text{M}$ ) en adición al paclitaxel. (A)** Las células HCT116 fueron expuestas a tres tratamientos diferentes; paclitaxel, paclitaxel + CB y paclitaxel + BBT y analizadas cada 3 h durante 1 día. El índice mitótico posee un comportamiento similar en los tres tratamientos utilizados a través del tiempo (dinámica del arresto mitótico). **(B)** A las 12 h de tratamiento se observó un punto máximo de células mitóticas, dicho punto se analizó mediante citometría de flujo evaluando el porcentaje de células positivas para pH3S10, una marca de células mitóticas. La diferencia en el porcentaje de células mitóticas obtenido no fue estadísticamente significativo entre los tres tratamientos analizados. **(C)** Fotografías representativas demuestran el reconocimiento de células mitóticas en las condiciones señaladas. La tinción se realizó con eosina y azul de metileno y la cuantificación se efectuó a través del análisis con microscopio fotónico. Se realizó un solo experimento para (A) y (C); triplicado de (B) y la significancia estadística se determinó mediante análisis de varianza de una sola vía (ANOVA,  $p=0.4087$ ) y análisis de comparación multiple de Dunnett (PTX vs PTX + CB,  $p=0.3269$  y PTX vs PTX + BBT,  $p=0.8268$ ).

## **2. LOS TRATAMIENTO DE PACLITAXEL (100 nM) CON CITOCALASINA B (2 µg/ml) o BLEBISTATINA (50 µM) NO ALTERAN LA DINÁMICA DEL ARRESTO MITÓTICO**

Una vez obtenida la concentración mínima efectiva de CB y BBT, se prosiguió a examinar la dinámica del arresto mitótico inducido por paclitaxel 100 nM. La dosis mínima del paclitaxel en la cuál se obtiene un porcentaje mayor de células mitóticas fue revisada en Andonegui-Elguera et al. 2016 y corroborada en nuestros subsecuentes experimentos.

La línea celular HCT116 fue expuesta a tres tratamiento distintos con sus respectivos controles en los tiempo señalados en la figura No. 15 A y B. Durante el tratamiento con paclitaxel (100 nM), la población celular comienza a aumentar considerablemente el índice de células mitóticas hasta alcanzar un máximo (81.59%) a las 12 h de tratamiento. Posteriormente (15 h), se observa una caída prominente del índice mitótico, hasta llegar a menos de una décima parte de la población total (7%) a las 24 h de tratamiento.

A lo largo del tratamiento con paclitaxel + CB (2 µg/ml) y paclitaxel + BBT (50 µM) se observa un comportamiento de células mitóticas muy parecido al observado en el tratamiento únicamente con paclitaxel en donde, el máximo índice mitótico se alcanzó de igual manera a las 12 h de tratamiento (paclitaxel + CB: 77.29% y paclitaxel + BBT: 64.56%). Dichos tratamientos fueron respaldados con sus respectivos controles; CB (2 µg/ml) y BBT (50 µM), los cuales poseen un comportamiento similar al control sin fármaco (DMSO:PBS) (Figura No. 15 A). Este ensayo se llevó a cabo con una sola replica biológica, por tal motivo no se determinaron las diferencias estadísticamente significativas entre los picos de células mitóticas a las 12 h de tratamiento. No obstante, para determinar la existencia de tal diferencia estadística, se prosiguió a medir la fracción de células mitóticas marcadas con la histona H3 fosforilada en la serina 10 (pH3S10), una marca particular de células en mitosis. Dicha lectura se realizó a través de citometría de flujo, y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en paclitaxel + CB (67.4%) y paclitaxel + BBT (71.2%) respecto a paclitaxel (72.9%) en el índice de células positivas para pH3S10 (mitosis) durante las 12 h de tratamiento (Figura No. 15 B: Figura suplementaria No. 5).

Este hallazgo demuestra que no existe adelanto o retraso temporal en el índice mitótico y por lo tanto, los tratamientos posteriores con paclitaxel que incluyen a CB (2 µg/ml) y BBT (50 µM) pueden analizarse de la misma manera que el tratamiento con únicamente paclitaxel (100 nM) sin generar variables que puedan afectar el análisis de nuestro estudio.

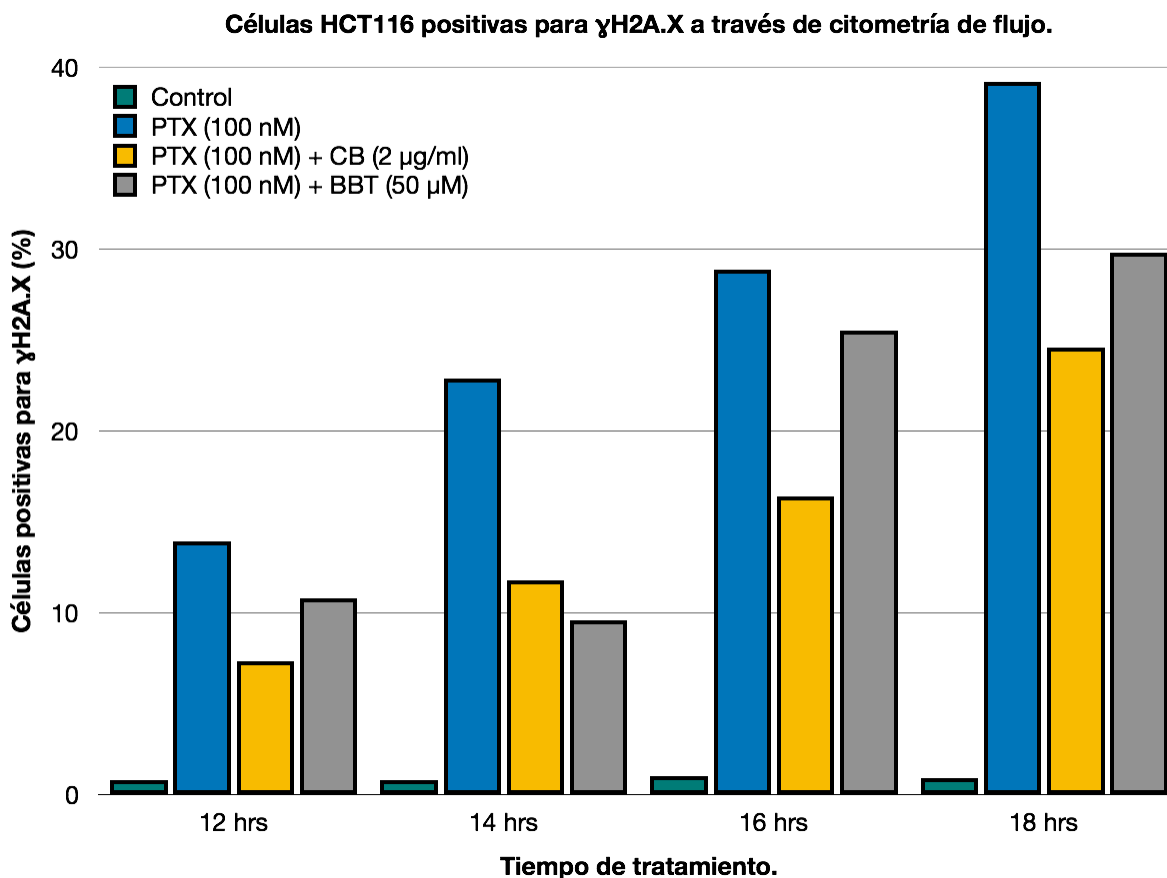
## **3. CÉLULAS TRATADAS CON PACLITAXEL + CB o BBT POSEEN NIVELES BAJOS DE DAÑO AL DNA RESPECTO AL GENERADO EN CÉLULAS TRATADAS ÚNICAMENTE CON PACLITAXEL**

La línea celular HCT116 fue tratada con paclitaxel, paclitaxel + CB (2 µg/ml) y paclitaxel + BBT (50 µM). La fracción de células con daño al DNA se evaluó a través de inmunotinción con un marcador de respuesta de daño al DNA (DDR) denominado γH2A.X, dicho marcador fue evaluado en células durante mitosis (12 h) y posterior a la salida del arresto mitótico temprano (14 y 16 h) y tardío (18 h) por citometría de flujo (Figura No. 16).

El tratamiento con paclitaxel (100 nM) durante 12 h produjo daño al DNA en un porcentaje mínimo de la población total. En contraste, durante 18 h de tratamiento con paclitaxel el porcentaje de células positivas incremento en casi la mitad de la población total. Evidentemente, la diferencia en el porcentaje de células con daño a las 12 y 18 h fue estadísticamente significativa. Por otra parte, el tratamiento con paclitaxel + CB y BBT durante

12, 14, 16 y 18 h generó un número menor de células positivas con daño al DNA en relación al tratamiento único con paclitaxel (Figura No. 16).

Este hecho sugiere que el porcentaje de células con daño al DNA posterior al tratamiento con paclitaxel (100 nM) + CB (2 µg/ml) o paclitaxel (100 nM) + BBT (50 µM) disminuye de forma notable en células HCT116 que han escapado del arresto mitótico (14, 16 y 18 h) y por lo tanto, se ha inhibido la inducción de movimientos evidentes en la membrana plasmática y así evitar la formación de células con daño al DNA.



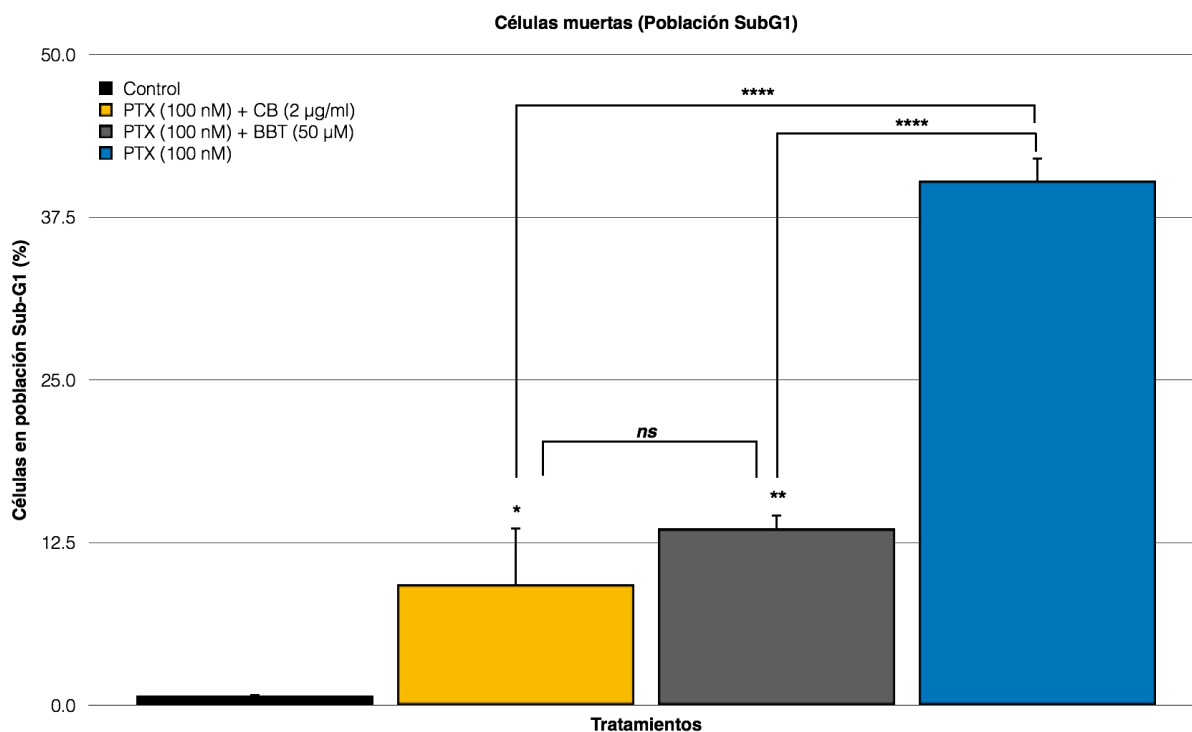
**Figura No. 16: Análisis del daño al DNA con  $\gamma$ H2A.X en células HCT116 tratadas con paclitaxel y paclitaxel en combinación con CB o BBT posterior a la salida del arresto mitótico:** Células HCT116 fueron expuestas a tres tratamientos diferentes; paclitaxel (100 nM), paclitaxel (100 nM) + CB (2µg/ml) y paclitaxel (100 nM) + BBT (50µM) a la salida del arresto mitótico. El porcentaje de células con daño al DNA a través de  $\gamma$ H2A.X demostró que antes de la salida del arresto mitótico (12 h) no hay presencia de daño significativo en ninguna población de células expuestas a algún tratamiento en particular, por lo cual el poco porcentaje de daño al DNA se atribuye al reducido número de células que han «escapado» del arresto mitótico e inducido la formación de surcos citocinéticos. Por otro lado, la población de células expuestas a paclitaxel incrementó en gran medida el porcentaje de daño al DNA posterior a las 12 h de tratamiento (14, 16 y 18 h). En contraste, el tratamiento de PTX + CB y PTX + BBT en los mismos tiempos de exposición redujo el daño al DNA respecto al tratamiento con únicamente PTX.



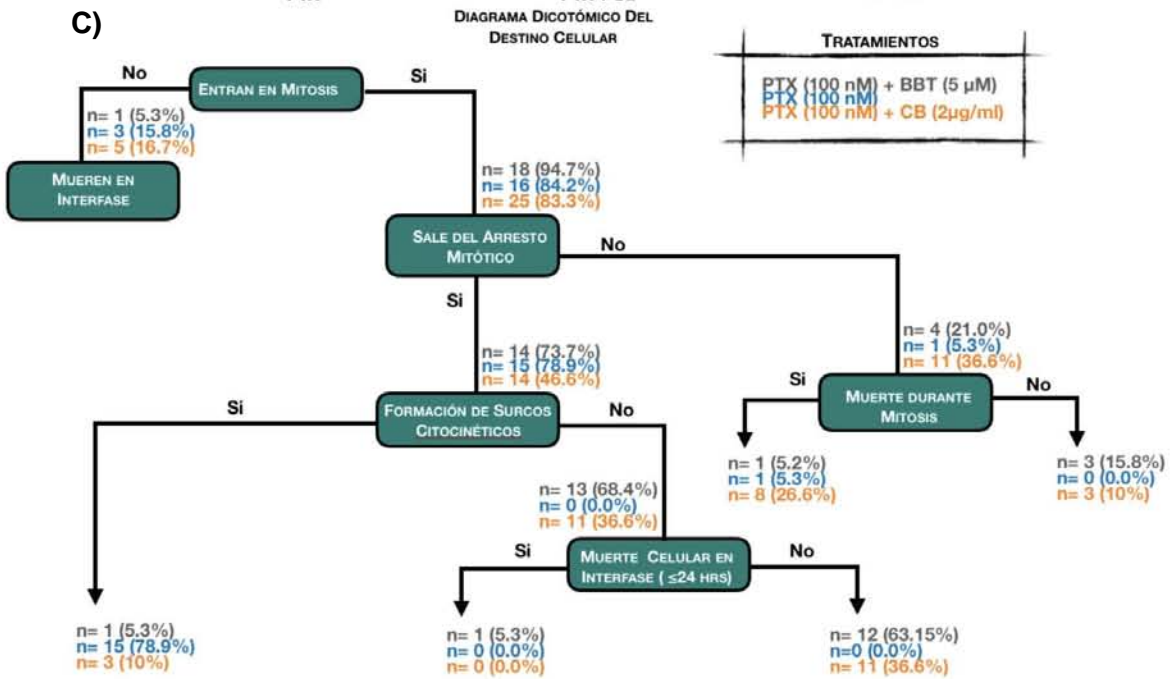
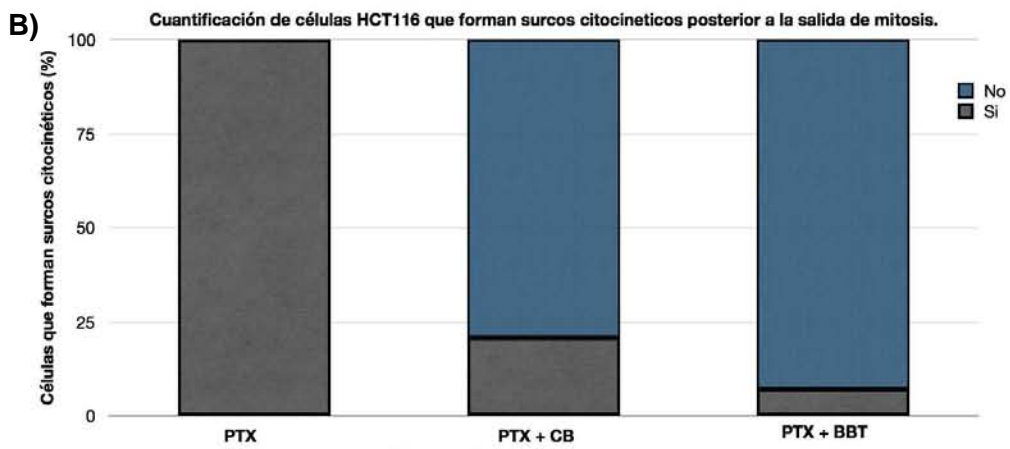
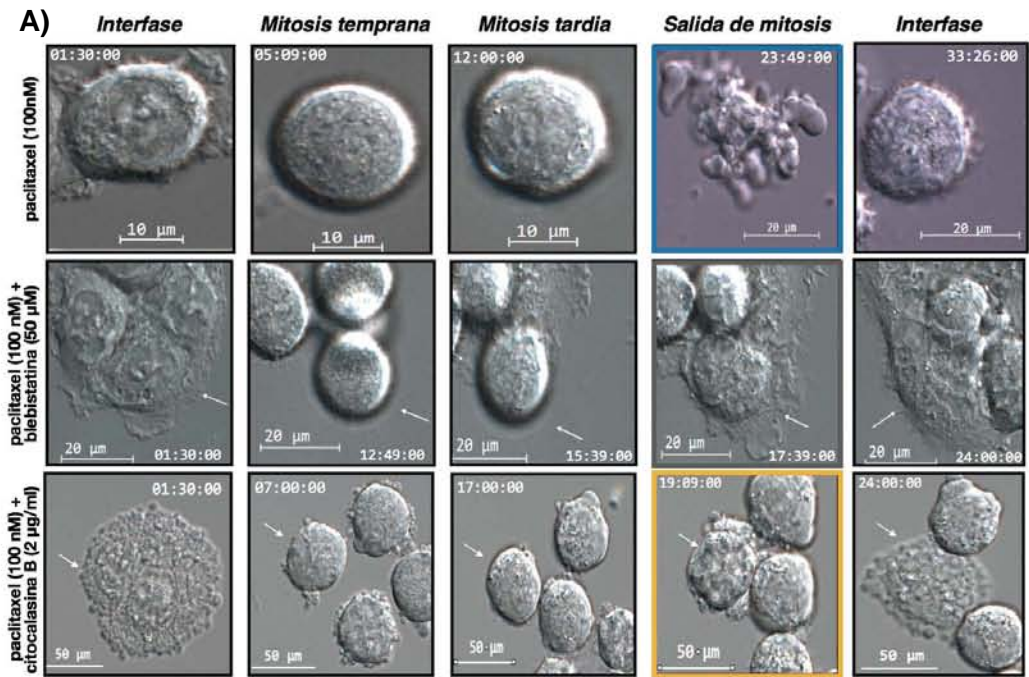
#### 4. CÉLULAS TRATADAS CON PACLITAXEL + CB o BBT MANTIENEN UN EFECTO TÓXICO MÍNIMO EN RELACIÓN A LAS CÉLULAS TRATADAS ÚNICAMENTE CON PACLITAXEL

Posterior al análisis del daño al DNA, se prosiguió a determinar una asociación con el efecto citotóxico generado con paclitaxel, paclitaxel + CB (2 µg/ml) o BBT (50 µM) durante 24 h de tratamiento, asegurando que la mayoría de las células hayan escapado del arresto mitótico y adquirido daño al DNA. Dicho efecto citotóxico se evaluó a partir del análisis de la fracción de células SubG<sub>1</sub> (células muertas) mediante citometría de flujo.

Al término del tratamiento con paclitaxel se observó un incremento de células en subG<sub>1</sub> notoriamente significativo respecto al control y a los tratamientos de paclitaxel + CB y paclitaxel + BBT. Por otra parte, el tratamiento de paclitaxel + CB y BBT demostró un ligero pero significativo aumento en el porcentaje de células en SubG<sub>1</sub> en comparación al control. No obstante, la diferencia entre el control y el tratamiento con paclitaxel representó una diferencia estadísticamente significativa. Este hallazgo sugiere que el elevado efecto citotóxico del paclitaxel en células HCT116 es inhibido a través de la adición de CB (2 µg/ml) y BBT (50 µM) (Figura No. 17), dada la capacidad de CB y BBT de inhibir la formación de surcos citocinéticos. Por otro lado, no existe una diferencia significativa entre los tratamientos de paclitaxel en combinación con CB y BBT, y por tal motivo ambos fármacos anticitocinéticos tienen el potencial de mantener el efecto citotóxico del paclitaxel en niveles mínimos.



**Figura No. 17: Análisis del efecto citotóxico del DNA en células HCT116 tratadas con paclitaxel y paclitaxel en combinación con CB o BBT durante 24 h.** Células HCT116 fueron expuestas a tres tratamientos diferentes con paclitaxel en combinación con CB (2 µg/ml) y BBT (50 µM) durante 24 h. El tratamiento con únicamente paclitaxel demostró un aumento predominante del efecto citotóxico, demostrando diferencias estadísticamente significativas respecto al control. Por otra parte, el tratamiento con paclitaxel + CB y BBT demostró un ligero incremento en el porcentaje de células SubG<sub>1</sub>. El porcentaje en ambos tratamientos resulta significativo respecto al control y evidente en comparación al tratamiento con paclitaxel. Por otra parte ambos tratamientos no muestran diferencias estadísticamente significativas entre sí. Los experimentos se realizaron por triplicado y la significancia estadística se determinó por análisis de varianza de una sola vía (ANOVA,  $p < 0.0001$ ) y análisis de comparación múltiple de Dunnett (\*,  $p = 0.0331$ . \*\*,  $p = 0.0038$ . PTX vs PTX + CB \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ . PTX vs PTX + BBT \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ . y ns,  $p = 0.3244$ )



**Figura No. 18: Análisis por microscopía en *time-lapse* de la formación de surcos citocinéticos.**

Células HCT116 fueron expuestas a tres tratamientos diferentes con paclitaxel en combinación con CB (2 µg/ml) y BBT (50 µM) durante 48 h. **(A)** Microscopía en *time-lapse* demuestra en la parte superior de la figura la entrada a mitosis, arresto mitótico y formación de surcos citocinéticos (**recuadro azul**) posterior a la salida del arresto mitótico en células HCT116 tratadas con paclitaxel. Por otro lado, en la región intermedia e inferior de la figura se observan células tratadas con paclitaxel en combinación con CB (**recuadro amarillo**) y BBT (**recuadro gris**), en donde no se percibe la inducción de surcos citocinéticos posterior a la salida del arresto mitótico. **(B)** El tratamiento con paclitaxel genera un porcentaje total (100%) de células con inducción de surcos citocinéticos posterior a la salida del arresto mitótico. Por otro lado, el tratamiento de paclitaxel en combinación con CB y BBT muestra un incremento en la formación de surcos citocinéticos del 79 y 93% respectivamente. **(C)** El «*diagrama dicotómico del destino celular*» representa un porcentaje dado de células (*n*), las cuales se desplazan a través de procesos celulares destacados de acuerdo a los videos por microscopía en *time-lapse* analizados durante el tratamiento.

**5. INHIBICIÓN DE MOVIMIENTOS EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA (SURCOS CITOCINÉTICOS) EN CÉLULAS HCT116 POSTERIOR A LA SALIDA DEL ARRESTO MITÓTICO EN TIEMPO REAL**

Las células HCT116 fueron seguidas en tiempo real con la finalidad de analizar el comportamiento de la membrana celular de acuerdo a cada tratamiento. Las células fueron tratadas con paclitaxel (100 nM), paclitaxel (100 nM)+ CB (2 µg/ml) o BBT (50 µM) y seguidas de manera individual por microscopía en *time-lapse* durante 48 h de tratamiento (Figura No. 18 A).

El 100% de las células HCT116 tratadas con paclitaxel (100 nM) presenta inducción de movimientos en la membrana celular (surcos citocinéticos) después de la salida del arresto mitótico. Por otro lado, los tratamiento con paclitaxel en combinación con CB y BBT demostraron una disminución en la inducción de surcos citocinéticos posterior a la salida de mitosis en un 79 y 93% respectivamente, permitiendo inhibir la inducción de surcos citocinéticos en la presencia de CB y BBT en un alto porcentaje de células HCT116 (Figura No. 18 B).

Análisis del video por microscopía en *time-lapse* permitió establecer «*el destino celular*» de cada célula tratada con paclitaxel y paclitaxel en combinación con CB y BBT posterior al conteo celular. El análisis fue resumido a través de un «*diagrama dicotómico del destino celular*» (Figura 18 C), el cual incluye los eventos celulares más relevantes durante el tratamiento en células HCT116.

El porcentaje de células HCT116 que lograron entrar a mitosis permaneció elevado para cualquiera de los tres tratamientos. Posteriormente, la mayoría de las células salieron del arresto mitótico con un porcentaje equivalente en todos los tratamientos utilizados. Sin embargo, solo en el tratamiento con paclitaxel se indujo la formación de surcos citocinéticos en todas las células. En contraste, la formación de surcos citocinéticos en células tratadas con paclitaxel + CB o BBT disminuyó respecto al tratamiento con únicamente paclitaxel. De tal modo, el análisis permitió determinar que la mayoría de las células tratadas con paclitaxel en combinación con CB o BBT no favorece un efecto tóxico importante respecto a las células tratadas únicamente con paclitaxel, siendo este último tratamiento capaz de inducir un porcentaje muy amplio de células muertas durante el tratamiento.

Por tal motivo, el modelo de estudio establecido desde el inicio del presente trabajo, nos permitió esclarecer de manera individual el efecto citotóxico generado por el paclitaxel en células HCT116, cuando éstas comienzan a generar movimientos en la membrana después del arresto mitótico.

## DISCUSIÓN

### 1. LA DINÁMICA DEL ARRESTO MITÓTICO EN RESPUESTA A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS “ESTADÍSTICAMENTE” FAVORECE AL MODELO DE ESTUDIO

El presente trabajo reveló y corroboró datos obtenidos por Andonegui-Elguera MA *et al.* 2016 <sup>52</sup>, referentes a la dinámica del arresto mitótico en células HCT116 durante el tratamiento exclusivo con paclitaxel y en combinación con agentes anticitocinéticos. Los agentes anticitocinéticos se seleccionaron de acuerdo a su mecanismo de acción. Por una parte, citocalasina B (CB) <sup>21, 56</sup> evita la polimerización de los filamentos de actina y la formación del anillo contráctil, mientras que blebistatina (BBT) <sup>56, 44</sup> impide la actividad ATPasa de las cadenas de miosina II, y por lo tanto, la contracción del anillo de actinmiosina. Ambos fármacos evitan la formación de movimientos en la membrana plasmática posterior a la salida del arresto mitótico en células tratadas con paclitaxel. Tal fenómeno fue descrito por Andonegui-Elguera MA *et al.* 2016 <sup>52</sup> y Rieder C. *et al.* 2009 <sup>93</sup> como un «*intento fallido de citocinesis*», el cual no posee ninguna asociación con la muerte celular durante la mitosis.

La dinámica del arresto mitótico reveló un comportamiento invariable para los tres tratamientos utilizados. Dicho de otra manera, no prevalece un cambio en la dinámica del arresto mitótico y en el porcentaje de células mitóticas durante el tratamiento con paclitaxel y paclitaxel en combinación con CB y BBT (Figura No. 15 A y C). Para corroborar que el modelo de estudio fuese eficaz en los ensayos posteriores, se analizó el cambio temporal del índice mitótico; el análisis demostró ausencia en el desplazamiento temporal del pico de células mitóticas para cada uno de los tratamientos utilizados y además, no prevalecieron diferencias estadísticamente significativas entre los índices mitóticos examinados a las 12 h de tratamiento. Estos datos confirmaron que la población de células HCT116 no presenta cambios temporales, pero si un porcentaje similar de células mitóticas entre los tres tratamientos utilizados (Figura No. 14 A, B). Por tal motivo, 12 - 24 h es catalogado el periodo necesario para analizar la salida del arresto mitótico, dado que a las 12 h se obtuvo el porcentaje más alto de células mitóticas y a las 24 h el mínimo observado para todos los tratamientos realizados, sugiriendo que la población de células HCT116 tarda 12 h (0 - 12 h) en alcanzar el máximo porcentaje de células en mitosis y 12 h (12 - 24 h) en escapar del arresto mitótico; equiparable a los datos obtenidos por Andonegui-Elguera *et al.* 2016 durante el tratamiento exclusivamente con paclitaxel <sup>52</sup>.

Por otra parte, el análisis de células individuales por microscopía en *time-lapse*, mostró que el porcentaje de células que alcanzan la mitosis en un tiempo dado para los tres tratamientos es irregular y contradictorio respecto al observado en citometría de flujo y microscopía fotónica (Tabla suplementaria No. 1, 2 y 3; Figura No. 14 A, B). No obstante, una explicación a dicho fenómeno radica en el número de células analizadas para cada ensayo. El número de células en citometría de flujo y microscopía fotónica fue de 10,000 y 1000 respectivamente, a diferencia del realizado por microscopía en *time-lapse*, el cual fue de 20-25 células por tratamiento. Este hecho nos permite explicar que no necesariamente el comportamiento de una pequeña muestra tiene que manifestarse de la misma manera al observado en la población; pero si representar un valor dentro del conjunto de datos obtenidos a partir de la población total, ya que es un dato que contribuye a la distribución normal del índice mitótico y a la salida del arresto mitótico en nuestro modelo de estudio.

## 2. “ENÉRGICAS ACCIONES; ENÉRGICAS CONSECUENCIAS”: EL DAÑO AL DNA ES GENERADO A TRAVÉS DE MOVIMIENTOS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA INDUCIDOS POR PACLITAXEL

Ha sido ampliamente establecido que el daño al DNA (por ejemplo, ruptura del DNA de doble hebra o acumulación de DNA de una sola hebra) activa una respuesta de daño al DNA (DDR, por sus siglas en inglés). La ruptura del DNA de doble hebra es un fenómeno citotóxico inmediatamente detectado por proteínas sensores del DDR, tal como la variante de la histona H2A fosforilada en la Ser-139 también conocida como  $\gamma$ H2A.X <sup>94</sup>. Por tal motivo, los focos de  $\gamma$ H2A.X son considerados una marca característica de la respuesta de daño al DNA, y de amplio uso en la investigación básica.

La inducción de daño al DNA después de la salida del arresto mitótico es un atractivo candidato para originar efectos citotóxicos en nuestro modelo de estudio <sup>94</sup>. Por tal motivo, nuestros resultados sugieren que el daño al DNA observado en células HCT116 posterior a la salida del arresto mitótico (12 - 18 h), ocurre a través de la inducción de movimientos de la membrana plasmática («intento fallido de citocinesis») generados por el paclitaxel. Por otra parte, Quignon F. *et al.* en el 2007 <sup>95</sup> apoyan nuestra hipótesis, describiendo una relación positiva entre el aumento de células con daño al DNA y el número de células que salen del arresto mitótico a partir del tratamiento con drogas antimicrotúbulos. Adicionalmente, Kaufmann SH. *et al.* en el 2001 <sup>99</sup>, encontraron en células que salen del arresto mitótico focos de reparación del DNA que preceden a la muerte celular por apoptosis. Estos hechos contradicen un estudio realizado por Yan V. W *et al.* (2007), donde proponen que la inducción de daño al DNA ocurre durante el arresto mitótico en células HCT116 tratadas con drogas anti microtúbulos. No obstante, el daño al DNA adquirido durante el arresto en mitosis no posee un efecto citotóxico importante, dado que el reclutamiento de proteínas del DDR y la inducción en la expresión de genes pro-apoptóticos no sucede hasta el momento en el que la célula es liberada del arresto mitótico y localizada en fase G<sub>1</sub>.

En el presente trabajo se utilizaron dos fármacos anti citocinesis; CB y BBT, con el objetivo de evitar la formación de dichos movimientos posterior al arresto mitótico. Como se esperaba, CB y BBT redujeron el porcentaje de células con «intento fallido de citocinesis» y por ende, el porcentaje de células positivas para  $\gamma$ H2A.X (Figura 18 A, B; Figura No, 16). Estos datos parecen indicar que el daño al DNA posterior a la salida del arresto mitótico es inducido de manera mecánica a través de los movimientos en la membrana plasmática. Dicho proceso ha sido fundamentado por Denais CM *et al.* en el 2017 <sup>95</sup> demostrando que la deformación de la membrana plasmática y ruptura de la envoltura nuclear genera células multinucleadas con daño al DNA <sup>95</sup>. No obstante, Shi J. *et al.* (2014) <sup>88</sup> hacen mención a que todas las células que salen del arresto mitótico inducido por paclitaxel presentan multinucleación con daño al DNA; consecuencia de un mecanismo dependiente del tiempo de tratamiento todavía desconocido. Además, Shi J. *et al.* (2014) resaltan que las células tratadas con paclitaxel generan múltiples polos y éstos se encargan de atraer un número dado de cromosomas a su respectivo extremo de la célula, generando rupturas del material genético y células multinucleadas; resultado de la condensación del material genético <sup>88</sup>. Adicionalmente, Waver B. <sup>96</sup> y Zasadil LM *et al.* en el 2014 <sup>97</sup>. analizaron la presencia de células multipolares durante el tratamiento con paclitaxel, y observaron que las células intentan segregar el material genético en tres, cuatro o hasta cinco direcciones diferentes («intento fallido de citocinesis»). Por otra parte, los surcos citocinéticos usualmente fallan en completar la citocinesis y en la mayoría de los casos, las divisiones producen tres, dos o en ocasiones una célula (información apoyada por el presente trabajo). Estos reportes permiten especular acerca de un proceso compartido; en donde la multipolaridad de las células tratadas con paclitaxel es un requisito indispensable para inducir

movimientos en la membrana plasmática y tales movimientos son los causantes del daño al DNA.

Por otra parte, Orth D. et al. (2008) <sup>89</sup> sugieren que el daño al DNA se debe principalmente a una activación parcial de las caspasas en células tratadas con paclitaxel y no a un mecanismo físico como lo proponemos en el presente trabajo <sup>89</sup>. Sin embargo, nuestros resultados indican todo lo contrario; el daño al DNA y la muerte celular incrementan de manera gradual después de las 12 h de tratamiento con paclitaxel y disminuyen al inhibir la formación del anillo contráctil con CB y BBT, lo cual implica que la activación de las caspasas no es la principal consecuencia del daño al DNA generado en células HCT116. Por lo tanto, es interesante definir y caracterizar si el daño al DNA observado en nuestro trabajo ocurre en complemento al descrito por Orth D. et al. (2008) <sup>89</sup> mediante la inhibición de la actividad de las caspasas después de las 12 h de tratamiento con paclitaxel y paclitaxel en combinación con CB Y BBT.

### **3. EFECTO TÓXICO CAUSADO POR LA FORMACIÓN DE SURCOS EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA EN CÉLULAS HCT116 TRATADAS CON PACLITAXEL**

El paclitaxel ha sido de amplio uso en la quimioterapia debido a su gran capacidad para generar efectos citotóxicos en células cancerosas. No obstante, el mecanismo por el cual promueve dicho efecto no ha sido del todo claro. Algunos autores proponen que la habilidad del paclitaxel para unirse directamente a los microtúbulos del huso y matar a las células tumorales es una consecuencia del arresto mitótico que produce <sup>51, 88</sup>. A pesar de ello, nuestros resultados sugieren la existencia de un mecanismo alternativo causado por la formación de surcos citocinéticos posteriores a la salida del arresto en mitosis (Figura No. 16), y no a la duración del arresto mitótico *per se*.

La muerte celular posterior al tratamiento con paclitaxel ocurrió en la mitad de la población de la línea celular HCT116. En contraste, el tratamiento de paclitaxel en combinación con CB y BBT causó un porcentaje menor de células muertas respecto al observado exclusivamente con paclitaxel. Este hallazgo nos permitió inferir que la formación de movimientos en la membrana después del arresto mitótico es consecuencia del efecto citotóxico en células HCT116. Por lo cual, sería importante definir y observar el citoesqueleto de tubulina, miosina II y actina a través de proteínas quiméricas fluorescentes en tiempo real con células HCT116 que exhiben movimientos de la membrana posterior al arresto mitótico. De esta manera, podríamos inferir si el movimiento es dependiente o independiente del citoesqueleto, ya que como lo sugiere Canman J.C. et al. 2000 <sup>44</sup> y Rieder C.L. et al. 2006 <sup>83</sup>, el tratamiento de agentes desestabilizadores de microtúbulos como el nocodazol, promueve la inducción de movimientos enérgicos de la membrana plasmática en ausencia de microtúbulos, pero no excluye que dichos movimientos dependan del citoesqueleto de actina y miosina II. Por otra parte, es importante determinar la localización de actina y miosina II en los surcos citocinéticos; ya que son componentes importantes del anillo contráctil en generar la fuerza de contracción para contraer la membrana plasmática y originar los surcos durante citocinesis.

Como ya se ha discutido anteriormente, la inducción de los surcos después del arresto mitótico en células HCT116 tratadas con paclitaxel genera un gran porcentaje de células muertas. Estos datos ya han sido sustentados en un estudio realizado por Horwitz S. et al. 2003 <sup>100</sup>, en donde demuestra que células A549 que han salido del arresto mitótico («*Mitotic slippage*») producen un aumento en la ruptura de la proteína PARP, una marca característica de células en apoptosis. En contraste, las células mitóticas A549 inducidas por paclitaxel no

muestran dicha marca, lo cual sugiere que la salida del arresto mitótico pero no el arresto mitótico *per se*, es responsable de la muerte celular por apoptosis inducida en concentraciones nanomolares de paclitaxel (100 nM). No obstante, descifrar el mecanismo de muerte celular para la línea celular HCT116 no fue un objetivo prioritario para el presente trabajo. Por tal motivo, es importante especificar el tipo de muerte celular que este mecanismo de toxicidad puede llevar a cabo en la mitad de la población de células HCT116 (Figura No. 16).

#### **4. VARIACIÓN CELULAR EN TIEMPO REAL: HETEROGENEIDAD EN LA RESPUESTA A LOS DISTINTO TRATAMIENTOS CON PACLITAXEL MEDIANTE MICROSCOPIA DE TIME-LAPSE**

El análisis de células HCT116 individuales mostró un perfil heterogéneo del destino celular. Algunas células sufren apoptosis durante mitosis, mientras que otras permanecen en interfase o mueren, se mantienen arrestadas en mitosis o escapan de la misma y finalmente mueren durante mitosis («mecanismo clásico») o interfase del siguiente ciclo celular («mecanismo alternativo») (Figura 18 C). Todos estos eventos han sido identificados por Gascoigne K y Taylor S en el 2008, argumentando que el destino celular es estocástico y genéticamente indeterminado y por lo tanto tiene que estudiarse a nivel individual; proponiendo vías o mecanismos que permitan explicar el comportamiento molecular de un destino celular en particular. Por tal motivo, es importante homogeneizar la población de células HCT116 tratadas con paclitaxel y así, promover su salida del arresto mitótico y permitir la inducción del mecanismo alternativo de toxicidad. Dicho de otra manera, al inhibir la actividad de Cdk1 cuando el porcentaje más alto de células HCT116 ha alcanzado la mitosis y de esta manera liberarlas de mitosis para entrar a G<sub>1</sub> del subsecuente ciclo celular, evitando de esta manera la muerte celular durante mitosis («mecanismo clásico de toxicidad») y favoreciendo el mecanismo de toxicidad alternativo en la población de células HCT116 a evaluar.

#### **5. UN MECANISMO ALTERNATIVO DE TOXICIDAD EN CONSTRUCCIÓN...**

Como es evidente, para que exista un «mecanismo alternativo de toxicidad» tiene que haber un mecanismo clásico de toxicidad. El mecanismo canónico se lleva a cabo en la mayoría de las células tratadas con casi cualquier agente capaz de alterar la dinámica del huso mitótico. Dicho de otra manera, ocurre cuando la célula es arrestada en mitosis. De acuerdo a Craig, R. et al. (2002) <sup>82</sup>, el arresto prolongado durante mitosis incita a la célula a generar señales anti apoptóticas (señales de sobrevivencia) hasta corregir los errores generados por las drogas a las cuales se encuentra expuesta. No obstante, cuando el tiempo transcurre y los errores no son corregidos, los componentes anti-apoptóticos son degradados, permitiendo a los agentes pro-apoptóticos (señales de muerte) activar la muerte celular durante el arresto mitótico, tal fenómeno es considerado por nuestro grupo como el «*Mecanismo clásico de toxicidad*».

Uno de los fenómenos más relevantes en el presente estudio fue la caracterización de una de las «piezas» faltantes en el mecanismo alternativo de toxicidad. Dicho mecanismo solo ocurre en células tratadas con paclitaxel, ya que como lo sugieren Shi J., et al. (2014) <sup>88</sup> el paclitaxel resulta ser consistentemente más citotóxico posterior a la salida del arresto mitótico que cualquier otra droga. Cuando células HCT116 son expuestas a paclitaxel, estas son arrestadas en mitosis hasta escapar por un mecanismo caracterizado por Brito, D. y Rieder, C. en el 2006, denominado «*Mitotic slippage*». Dicho fenómeno ocurre cuando los niveles de ciclina B caen por debajo de un umbral, de tal manera que la proteína Cdk1 carece de actividad catalítica para llevar a cabo funciones importantes durante mitosis y por lo tanto, la célula es liberada del arresto mitótico <sup>54, 78</sup>. Posterior al arresto mitótico nuestro grupo caracterizó lo que parece ser «la última pieza» del mecanismo alternativo de toxicidad. En

donde, se observaron movimientos de la membrana plasmática en la mayoría de las células HCT116 tratadas con paclitaxel (100 nM), los cuales fueron catalogados como un «intento fallido de citocinesis» o inducción de surcos citocinéticos. Dicho evento fue crucial para posteriormente asociarlo con el daño al DNA y muerte celular inducida por paclitaxel. Adicionalmente, se identificó por microscopía en *time-lapse* la formación de movimientos en la membrana plasmática y se confirmó la ausencia de surcos citocinéticos en células tratadas con paclitaxel en combinación con CB y BBT de acuerdo a nuestro modelo de estudio. Por tal motivo, se determinó que la inducción de surcos citocinéticos coincide en tiempo con la generación de daño al DNA y muerte celular (Figura 18 A, B), y que este fenómeno puede ser totalmente dependiente del citoesqueleto de actina y miosina como en el caso de una citocinesis normal. Para ello es importante seguir los componentes del citoesqueleto de actina y miosina con una marca fluorescente por microscopía en time-lapse,

Finalmente, es importante resaltar que Shi J. et al. (2014) <sup>88</sup> describió una consecuencia (daño al DNA) posterior a la salida del arresto mitótico durante el tratamiento con paclitaxel apoyada por nuestro trabajo. No obstante, el mecanismo por el cual ocurre dicha consecuencia no ha sido descrito y por tal motivo, es interesante establecer un mecanismo que explique la inducción de daño al DNA y por ende, la muerte celular durante el tratamiento con paclitaxel. Por otra parte, la investigación de Shannon, K. et al. 2005 <sup>32</sup> asevera que los movimientos en la membrana inducidos a través del tratamiento con paclitaxel ocurren directamente por el fármaco, dado a la habilidad del paclitaxel para generar uniones estables entre los microtubulos y la membrana plasmática. No obstante, sería relevante determinar que las uniones entre microtúbulos y la membrana después de la salida del arresto mitótico favorecen el reclutamiento de componentes del anillo contráctil que a su vez, promueven la inducción de surcos citocinéticos (SC) y la fragmentación de la cromatina en pequeños núcleos con daño al DNA, y así convencer a los lectores sobre la existencia de un «*mecanismo alternativo de toxicidad*»

## CONCLUSIONES

Los datos obtenidos durante el presente trabajo determinaron que:

1. El uso de drogas anticitocinéticas no altera la dinámica temporal del índice mitótico en células HCT116 tratadas con paclitaxel.
2. La formación de surcos citocinéticos en células HCT116 tratadas con paclitaxel se asocia con la formación de daño en el DNA.
3. El efecto citotóxico inducido por paclitaxel se relaciona a la formación de surcos citocinéticos posterior a la salida del arresto mitótico en células HCT116
4. El «***mecanismo alternativo de toxicidad***» es un fenómeno que se manifiesta en una fracción de células HCT116 expuestas a paclitaxel.



## ABREVIATURAS

APC/C	Complejo Promotor de la Anafase/ Ciclosoma (Anaphase-Promoting Complex).	Kif4A	Kinesin-like protein 4A
ATP	Adenosina trifosfato (Adenosine triphosphate)	MAP	Proteína Cinasa Asociadas a Microtúbulos (Microtubule Associated Protein Kinase)
CAD	DNAasa activada por Caspasas (Caspase-activated DNase)	MCC	Complejo de Punto de Monitoreo Mitótico (Mitotic Checkpoint Complex)
Cdk1	Cinasa dependiente de ciclina 1 (Cyclin-dependent kinase 1)	MDA	Agente desestabilizador de microtúbulos (Microtubule- Destabilizing Agents)
CKII	Casein Kinase II	MKLP1	Mitotic Kinesin-Like Protein 1
CPC	Complejo Pasajero Cromosómico (Chromosomal Passenger Complex)	MKLP2	Mitotic Kinesin-Like Protein 2
CYK3	Cytokinesis Protein 3	MLC	Cadena Ligera de Miosina (Myosin Light Chain)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid)	Mps1	Monopolar Spindle 1
ESCRT III	Complejo de clasificación Endosomal Requerido para Transporte (Endosomal sorting complex required for transport)	MSA	Agente estabilizador de microtúbulos (Microtubule - stabilizing Agent)
FBW7	F-box/WD repeat-containing protein 7	NCI	Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos (U. S. National Cancer Institute)
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (U. S. Food and Drug Administration)	Plk4	Polo-Like Kinase 4
G <sub>1</sub> y G <sub>2</sub>	Fase Gap 1 y Fase Gap 2	PRC1	Protein Regulator of cytokinesis 1
GAP	Proteína activadora de GTPasa (GTPase-activating protein)	RNA	Ácido Ribonucleico (Ribonucleic acid)
GEF	Factor de intercambio de nucleótidos de Guanina (Guanine nucleotide exchange factors)	ROCK	Proteína Cinasa Asociada a Rho (Rho-Associated Protein Kinase)
ICB	Puente Intracelular (Intracellular Bridge)	SAC	Punto de Monitoreo Mitótico (Spindle Assembly Checkpoint)
JNK	c-Jun N-terminal kinase	SCF	Complejo que contiene F-box, Skp, Cullina.

Kif23	Kinesin-like protein 23	TBA	Agente de Unión a Tubulina (Tubulin Binding Agent)
-------	-------------------------	-----	--

### UNIDADES DE MEDICIÓN

<b>µg</b>	microgramos	<b>nM</b>	nanomolar
<b>mL</b>	mililitro	<b>µM</b>	micromolar
<b>L</b>	litro	<b>g.</b>	gramos
<b>M</b>	molar	<b>hr(s)</b>	hora (s).
<b>mM</b>	milimolar	<b>min.</b>	minutos
<b>°C</b>	Grados centigrados	<b>rpm</b>	revoluciones por minuto

### ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura / Tabla	Título	Sección
Figura No. 1	Las cuatro fases del ciclo celular eucarionte.	Antecedentes
Figura No. 2	La mitosis.	Antecedentes
Figura No. 3	Punto de Monitoreo Mitótico (PMM)	Antecedentes
Figura No. 4	La citocinesis.	Antecedentes
Figura No. 5	Los agentes antimicrotúbulos se unen directamente a tubulina.	Antecedentes
Figura No. 6	Destinos celulares inducidos con paclitaxel.	Antecedentes
Figura No. 7	Mecanismo clásico de citotoxicidad inducido por paclitaxel.	Antecedentes
Figura No. 8	Mecanismos alternativos de citotoxicidad inducidos por paclitaxel.	Antecedentes
Figura No. 9	Drogas anti citocinesis utilizadas en el modelo de estudio del presente trabajo.	Resultados
Figura No. 10	Ensayo dosis-respuesta con citocalasina B (CB) para determinar el porcentaje de células HCT116 binucleadas.	Resultados
Figura No. 11	Ensayo dosis-respuesta con blebistatina (BBT) para determinar el porcentaje de células HCT116 binucleadas.	Resultados
Figura No. 12	Ensayo dosis-respuesta con citocalasina B (CB) y blebistatina (BBT), en relación con el porcentaje de células HCT116 muertas (Población SubG <sub>1</sub> ).	Resultados

<b>Figura / Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Sección</b>
Figura No. 13	Ensayo dosis-respuesta con citocalasina B (CB) y blebistatina (BBT) en relación al porcentaje de células poliploides a través del análisis de microscopía fotónica.	Resultados
Figura No. 14	Ensayo dosis-respuesta con citocalasina B (CB) y blebistatina (BBT), en relación al porcentaje de células poliploides a través del análisis de citometría de flujo.	Resultados
Figura No. 15	La dinámica del arresto mitótico inducido con paclitaxel (paclitaxel) no se ve afectado al incluir citocalasina B (2µg/ml) y blebistatina (50µM) en complemento con paclitaxel.	Resultados
Figura No. 16	Análisis del daño al DNA con γH2A.X en células HCT116 tratadas con paclitaxel y paclitaxel en combinación con CB o BBT durante 24 h.	Resultados
Figura No. 17	Análisis del efecto citotóxico del DNA en células HCT116 tratadas con paclitaxel y paclitaxel en combinación con CB o BBT durante 24 h.	Resultados
Tabla No. 1	Uso de agentes que afectan el uso mitótico en quimioterapia.	Antecedentes
Tabla No. 2	Principales compuestos de la familia de los taxanos, características generales y estructura química.	Antecedentes
Tabla No. 3	Condiciones de tratamiento con paclitaxel.	Anexo
Tabla No. 4	Condiciones de tratamiento con paclitaxel y citocalasina B.	Anexo
Tabla No. 5	Condiciones de tratamiento con paclitaxel y blebistatina.	Anexo
Tabla No. 6	Lista de anticuerpos usados durante el presente trabajo.	Anexo
Tabla No. 7	Lista de sales utilizadas durante el presente trabajo.	Anexo
Tabla No. 8	Lista de fármacos utilizados durante el presente trabajo.	Anexo
Tabla No. 9	Lista de sustancias tóxicas/corrosivas utilizadas en el presente trabajo	Anexo
Tabla No. 10	Lista de soluciones especializadas utilizadas en el presente trabajo	Anexo
Tabla No. 11	Tratamiento de células HCT116 con paclitaxel (100nM) + blebistatina (50uM)	Anexo
Tabla No. 12	Tratamiento de células HCT116 con paclitaxel (100 nM) + citocalasina B (2 µg/ml)	Anexo
Tabla No. 13	Tratamiento de células HCT116 con paclitaxel (100nM)	Anexo

## REFERENCIAS

1. Cassimeris, L., Lingappa, V. and Plopper, G. (2012). *Lewin células*. 2nd ed. México, D.F: McGraw Hill Educación, pp.621-627
2. Alberts, B. (2008). *Molecular biology of the cell*. 6th ed. New York, NY [u.a.]: Garland Science Taylor & Francis, pp.963-995.
3. Murray, A. and Hunt, T. (1994). *The cell cycle*. 1st ed. Oxford: O.U.P.
4. Nigg, E. (2001). *Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(1), pp.21-32.
5. Kaldis, P. (2006). *Cell Cycle Regulation*. 1st ed. Berlin: Springer, pp.1-6.
6. Mitchison, J. (1971). *The Biology of the Cell Cycle*. 1st ed. London: Cambridge University Press, p.320.
7. Morgan, D. (2007). *The cell cycle*. 1st ed. London: NSP New Science Press, pp.2-6.
8. Cooper, G. and Hausman, R. (2007). *The Cell: A Molecular Approach*. 4th ed. Washington D. C.: ASM Press, pp.650-655.
9. Yanagida, M., Hyman, A. and Pines, J. (2015). *Mitosis*. 1st ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp.1-7.
10. Canman, C. E. (2001). *Replication checkpoint: preventing mitotic catastrophe*. *Current biology*: CB 11, R121-124
11. Wong, R. (2010). *An update on cohesin function as a 'molecular glue' on chromosomes and spindles*. *Cell Cycle*, 9(9), pp.1754-1758.
12. Carmena, M. and Earnshaw, W. (2003). *The cellular geography of aurora kinases*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(11), pp.842-854.
13. Rieder, C. (2003). *Mitosis Through the Microscope: Advances in Seeing Inside Live Dividing Cells*. *Science*, 300(5616), pp.91-96.
14. Cooper, K. and Schrader, F. (1944). *Mitosis: The Movements of Chromosomes in Cell Division*. *American Midland Naturalist*, 32(1), p.252.
15. Bettencourt-Dias, M. and Glover, D. (2007). *Centrosome biogenesis and function: centrosomes brings new understanding*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(6), pp.451-463.
16. Musacchio, A. and Desai, A. (2017). *A Molecular View of Kinetochore Assembly and Function*. *Biology*, 6(1), p.5.
17. McKinley, K. and Cheeseman, I. (2015). *The molecular basis for centromere identity and function*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(1), pp.16-29.
18. Foley, E. and Kapoor, T. (2012). *Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(1), pp.25-37.
19. Fukagawa, T. and Earnshaw, W. (2014). *The Centromere: Chromatin Foundation for the Kinetochore Machinery*. *Developmental Cell*, 30(5), pp.496-508.
20. Fededa, J. and Gerlich, D. (2012). *Molecular control of animal cell cytokinesis*. *Nature Cell Biology*, 14(5), pp.440-447.
21. Eggert, U., Mitchison, T. and Field, C. (2006). *Animal Cytokinesis: From Parts List to Mechanisms*. *Annual Review of Biochemistry*, 75(1), pp.543-566.
22. D'Avino, P., Giansanti, M. and Petronczki, M. (2015). *Cytokinesis in Animal Cells*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(4), p.a015834.

23. Subramanian, R., Wilson-Kubalek, E., Arthur, C., Bick, M., Campbell, E., Darst, S., Milligan, R. and Kapoor, T. (2010). *Insights into Antiparallel Microtubule Crosslinking by PRC1, a Conserved Nonmotor Microtubule Binding Protein*. Cell, 142(3), pp.433-443.
24. Hu, C., Coughlin, M., Field, C. and Mitchison, T. (2011). *KIF4 Regulates Midzone Length during Cytokinesis*. Current Biology, 21(10), pp.815-824.
25. Zhu, C. and Jiang, W. (2004). *Cell cycle-dependent translocation of PRC1 on the spindle by Kif4 is essential for midzone formation and cytokinesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 102(2), pp.343-348.
26. Kitagawa, M. and Lee, S. (2015). *The chromosomal passenger complex (CPC) as a key orchestrator of orderly mitotic exit and cytokinesis*. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 3, pp.1-14.
27. Carmena, M., Wheelock, M., Funabiki, H. and Earnshaw, W. (2012). *The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 13(12), pp.789-803.
28. Bringmann, H. and Hyman, A. (2005). *A cytokinesis furrow is positioned by two consecutive signals*. Nature, 436(7051), pp.731-734.
29. Bringmann, H. (2008). *Mechanical and genetic separation of aster- and midzone-positioned cytokinesis*. Biochemical Society Transactions, 36(3), pp.381-383.
30. Bement, W., Benink, H. and von Dassow, G. (2005). *A microtubule-dependent zone of active RhoA during cleavage plane specification*. The Journal of Cell Biology, 170(1), pp.91-101.
31. Canman, J., Cameron, L., Maddox, P., Straight, A., Tirnauer, J., Mitchison, T., Fang, G., Kapoor, T. and Salmon, E. (2003). *Determining the position of the cell division plane*. Nature, 424(6952), pp.1074-1078.
32. Shannon, K. et al. (2005). *Taxol-stabilized Microtubules Can Position the Cytokinetic Furrow in Mammalian Cells*. Molecular Biology of the Cell, 16(9), pp.4423-4436.
33. Matsumura, F. (2005). *Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes*. Trends in Cell Biology, 15(7), pp.371-377.
34. Piekny, A. and Glotzer, M. (2008). *Anillin Is a Scaffold Protein That Links RhoA, Actin, and Myosin during Cytokinesis*. Current Biology, 18(1), pp.30-36.
35. Brill, J., Wong, R. and Wilde, A. (2012). *Phosphoinositide Function in Cytokinesis*. Current Biology, 22(1), p.91.
36. Joo, E., Surka, M. and Trimble, W. (2007). *Mammalian SEPT2 Is Required for Scaffolding Nonmuscle Myosin II and Its Kinases*. Developmental Cell, 13(5), pp.677-690.
37. Estey, M., Di Ciano-Oliveira, C., Froese, C., Bejide, M. and Trimble, W. (2010). *Distinct roles of septins in cytokinesis: SEPT9 mediates midbody abscission*. The Journal of Cell Biology, 191(4), pp.741-749.
38. Glotzer, M. (2009). *The 3Ms of central spindle assembly: microtubules, motors and MAPs*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 10(1), pp.9-20.
39. Barr, F. and Gruneberg, U. (2007). *Cytokinesis: Placing and Making the Final Cut*. Cell, 131(5), pp.847-860.
40. Schroeder, T. (1972). *THE CONTRACTILE RING: II. Determining its Brief Existence, Volumetric Changes, and Vital Role in Cleaving Arabacia Eggs*. The Journal of Cell Biology, 53(2), pp.419-434.

41. Werner, M., Munro, E. and Glotzer, M. (2007). *Astral Signals Spatially Bias Cortical Myosin Recruitment to Break Symmetry and Promote Cytokinesis*. *Current Biology*, 17(15), pp.1286-1297.
42. Maddox, A. and Oegema, K. (2003). *Deconstructing cytokinesis*. *Nature Cell Biology*, 5(9), pp.773-776.
43. Alsop, G. and Zhang, D. (2003). *Microtubules are the only structural constituent of the spindle apparatus required for induction of cell cleavage*. *The Journal of Cell Biology*, 162(3), pp.383-390.
44. Canman, J., Hoffman, D. and Salmon, E. (2000). *The role of pre- and post-anaphase microtubules in the cytokinesis phase of the cell cycle*. *Current Biology*, 10(10), pp. 611-614.
45. Pollard, T. (2017). *Nine unanswered questions about cytokinesis*. *The Journal of Cell Biology*, 216(10), pp.3007-3016.
46. Nähse, V., Christ, L., Stenmark, H. and Campsteijn, C. (2017). *The Abscission Checkpoint: Making It to the Final Cut*. *Trends in Cell Biology*, 27(1), pp.1-11.
47. Dambournet, D., Machicoane, M., Chesneau, L., Sachse, M., Rocancourt, M., El Marjou, A., Formstecher, E., Salomon, R., Goud, B. and Echard, A. (2011). *Rab35 GTPase and OCRL phosphatase remodel lipids and F-actin for successful cytokinesis*. *Nature Cell Biology*, 13(8), pp.981-988.
48. McCullough, J., Colf, L. and Sundquist, W. (2013). *Membrane Fission Reactions of the Mammalian ESCRT Pathway*. *Annual Review of Biochemistry*, 82(1), pp.663-692.
49. Carmena, M. (2008). *Cytokinesis: the final stop for the chromosomal passengers*. *Biochemical Society Transactions*, 36(3), pp.367-370.
50. Kitagawa, M. and Lee, S. (2015). *The chromosomal passenger complex (CPC) as a key orchestrator of orderly mitotic exit and cytokinesis*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 3.
51. Rieder, C. and Maiato, H. (2004). *Stuck in Division or Passing through*. *Developmental Cell*, 7(5), pp.637-651.
52. Andonegui-Elguera, M., Cáceres-Gutiérrez, R., Luna-Maldonado, F., López-Saavedra, A., Díaz-Chávez, J., Cisneros-Soberanis, F., Prada, D., Mendoza-Pérez, J. and Herrera, L. (2016). *BUB1 and SURVIVIN proteins are not degraded after a prolonged mitosis and accumulate in the nuclei of HCT116 cells*. *Cell Death Discovery*, 2, p.16079.
53. Orth, J., Kohler, R., Fojier, F., Sorger, P., Weissleder, R. and Mitchison, T. (2011). *Analysis of Mitosis and Antimitotic Drug Responses in Tumors by In Vivo Microscopy and Single-Cell Pharmacodynamics*. *Cancer Research*, 71(13), pp.4608-4616.
54. Gascoigne, K. and Taylor, S. (2008). *Cancer Cells Display Profound Intra- and Interline Variation following Prolonged Exposure to Antimitotic Drugs*. *Cancer Cell*, 14(2), pp. 111-122.
55. Huang, H., Shi, J., Orth, J. and Mitchison, T. (2009). *Evidence that Mitotic Exit Is a Better Cancer Therapeutic Target Than Spindle Assembly*. *Cancer Cell*, 16(4), pp. 347-358.
56. Lampson, M. and Kapoor, T. (2006). *Unraveling cell division mechanisms with small-molecule inhibitors*. *Nature Chemical Biology*, 2(1), pp.19-27.
57. Kops, G., Weaver, B. and Cleveland, D. (2005). *On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint*. *Nature Reviews Cancer*, 5(10), pp.773-785.
58. Wood KW, Cornwell WD, and Jackson JR (2001). *Past and future of the mitotic spindle as an oncology target*. *Current Opinion in Pharmacology*, 1(4), pp.370-377.

59. Matson, D. and Stukenberg, P. (2011). *Spindle Poisons and Cell Fate: A Tale of Two Pathways*. *Molecular Interventions*, 11(2), pp.141-150.
60. Kavallaris, M. (2010). *Microtubules and resistance to tubulin-binding agents*. *Nature Reviews Cancer*, (10), pp.194–204.
61. Perez, E. (2009). *Microtubule inhibitors: Differentiating tubulin-inhibiting agents based on mechanisms of action, clinical activity, and resistance*. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(8), pp.2086-2095.
62. Dumontet, C. and Jordan, M. (2010). *Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics*. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(11), pp.897-897.
63. Cormier, A., Knossow, M., Wang, C. and Gigant, B. (2010). *Chapter 20: The binding of vinca domain agents to tubulin. Structural and biochemical studies*. China: *European Journal of Medicinal Chemistry*, pp.373-390.
64. Cao, Y., Zheng, L., Wang, D., Liang, X., Gao, F. and Zhou, X. (2018). *Recent advances in microtubule-stabilizing agents*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143, pp. 806-828.
65. Lu, Y., Chen, J., Xiao, M., Li, W. and Miller, D. (2012). *An Overview of Tubulin Inhibitors That Interact with the Colchicine Binding Site*. *Pharmaceutical Research*, 29(11), pp. 2943-2971.
66. Fanale, D., Bronte, G., Passiglia, F., Calò, V., Castiglia, M., Di Piazza, F., Barraco, N., Cangemi, A., Catarella, M., Insalaco, L., Listi, A., Maragliano, R., Massihnia, D., Perez, A., Toia, F., Cicero, G. and Bazan, V. (2015). *Stabilizing versus Destabilizing the Microtubules: A Double-Edge Sword for an Effective Cancer Treatment Option?* *Analytical Cellular Pathology*, 2015, pp.1-19.
67. Joerger, M. (2015). *Treatment regimens of classical and newer taxanes*. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 77(2), pp.221-233.
68. Kang, B., Kwon, O., Chung, H., Yu, W. and Kim, J. (2016). *Taxanes in the Treatment of Advanced Gastric Cancer*. *Molecules*, 21(5), p.651.
69. Mita, A., Denis, L., Rowinsky, E., DeBono, J., Goetz, A., Ochoa, L., Forouzesh, B., Beeram, M., Patnaik, A., Molpus, K., Semiond, D., Besenval, M. and Tolcher, A. (2009). *Phase I and Pharmacokinetic Study of XRP6258 (RPR 116258A), a Novel Taxane, Administered as a 1-Hour Infusion Every 3 Weeks in Patients with Advanced Solid Tumors*. *Clinical Cancer Research*, 15(2), pp.723-730.
70. Marupudi, N., Han, J., Li, K., Renard, V., Tyler, B. and Brem, H. (2007). *Paclitaxel: a review of adverse toxicities and novel delivery strategies*. *Expert Opinion on Drug Safety*, 6(5), pp.609-621.
71. Rowinsky, E. and Donehower, R. (1995). *Paclitaxel (Taxol)*. *New England Journal of Medicine*, 332(15), pp.1004-1014.
72. Wani, M., Taylor, H., Wall, M., Coggon, P. and McPhail, A. (1971). *Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, 93(9), pp.2325-2327.
73. Priyadarshini, K. (2012). *Paclitaxel Against Cancer: A Short Review*. *Medicinal chemistry*, 02(07).
74. Wang, T., Wang, H. and Soong, Y. (2000). *Paclitaxel-induced cell death*. *Cancer*, 88(11), pp.2619-2628.
75. Schiff, P., Fant, J. and Horwitz, S. (1979). *Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol*. *Nature*, 277(5698), pp.665-667.

76. Rao, S., Horwitz, S. and Ringel, I. (1992). *Direct Photoaffinity Labeling of Tubulin With Taxol*. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 84(10), pp.785–788.
77. De\_Vita, V., Lawrence, T. and Rosenberg, S. (2014). *Cancer*. 10th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health.
78. Gascoigne, K. and Taylor, S. (2009). *How do anti-mitotic drugs kill cancer cells*. Journal of Cell Science, 122(15), pp.2579-2585.
79. Bah, N., Maillet, L., Ryan, J., Dubreil, S., Gautier, F., Letai, A., Juin, P. and Barillé-Nion, S. (2014). *Bcl-xL controls a switch between cell death modes during mitotic arrest*. Cell Death & Disease, 5(6), pp.e1291-e1291.
80. Wertz, I., Kusam, S., Lam, C., Okamoto, T., Sandoval, W., Anderson, D., Helgason, E., Ernst, J., Eby, M., Liu, J., Belmont, L., Kaminker, J., O'Rourke, K., Pujara, K., Kohli, P., Johnson, A., Chiu, M., Lill, J., Jackson, P., Fairbrother, W., Seshagiri, S., Ludlam, M., Leong, K., Dueber, E., Maecker, H., Huang, D. and Dixit, V. (2011). *Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7*. Nature, 471(7336), pp. 110-114.
81. Chu, R., Terrano, D. and Chambers, T. (2012). *Cdk1/cyclin B plays a key role in mitotic arrest-induced apoptosis by phosphorylation of Mcl-1, promoting its degradation and freeing Bak from sequestration*. Biochemical Pharmacology, 83(2), pp.199-206.
82. Craig, R. (2002). *MCL1 provides a window on the role of the BCL2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis*. Leukemia, 16(4), pp.444-454.
83. Brito, D. y Rieder, C. (2006). *Mitotic Checkpoint Slippage in Humans Occurs via Cyclin B Destruction in the Presence of an Active Checkpoint*. Current Biology, 16(12), pp. 1194-1200.
84. Balachandran, R. and Kipreos, E. (2017). *Addressing a weakness of anticancer therapy with mitosis inhibitors: Mitotic slippage*. Molecular & Cellular Oncology, 4(2), p.e1277293.
85. Wilson, L., Copp, H., Derry, W., Wendell, K. and Jordan, M. (1996). *Mitotic Block Induced in HeLa Cells by Low Concentrations of Paclitaxel (Taxol) Results in Abnormal Mitotic Exit and Apoptotic Cell Death*. Experimental Therapeutics, 56(4), pp.816-825.
86. Demidenko, Z., Kalurupalle, S., Hanko, C., Lim, C., Broude, E. and Blagosklonny, M. (2008). *Mechanism of G1-like arrest by low concentrations of paclitaxel: next cell cycle p53-dependent arrest with sub G1 DNA content mediated by prolonged mitosis*. Oncogene, 27(32), pp.4402-4410.
87. Blagosklonny, M. (2006). *Prolonged Mitosis Versus Tetraploid Checkpoint: How p53 Measures the Duration of Mitosis*. Cell Cycle, 5(9), pp.971-975.
88. Zhu, Y., Zhou, Y. and Shi, J. (2014). *Post-slippage multinucleation renders cytotoxic variation in anti-mitotic drugs that target the microtubules or mitotic spindle*. Cell Cycle, 13(11), pp.1756-1764.
89. Shi, J., Orth, J. and Mitchison, T. (2008). *Cell Type Variation in Responses to Antimitotic Drugs that Target Microtubules and Kinesin-5*. Cancer Research, 68(9), pp.3269-3276.
90. Dalton, W., Nandan, M., Moore, R. and Yang, V. (2007). *Human Cancer Cells Commonly Acquire DNA Damage during Mitotic Arrest*. Cancer Research, 67(24), pp. 11487-11492.
91. Orth, J., Loewer, A., Lahav, G. and Mitchison, T. (2011). *Prolonged mitotic arrest triggers partial activation of apoptosis, resulting in DNA damage and p53 induction*. Molecular Biology of the Cell, 23(4), pp.567-576.



92. Yang, Z., Kenny, A., Brito, D. and Rieder, C. (2009). *Cells satisfy the mitotic checkpoint in Taxol, and do so faster in concentrations that stabilize syntelic attachments. The Journal of Cell Biology*, 186(5), pp.675-684.
93. Hayashi, M. and Karlseder, J. (2013). *DNA damage associated with mitosis and cytokinesis failure. Oncogene*, 32(39), pp.4593-4601.
94. Denais, C., Gilbert, R., Isermann, P., McGregor, A., te Lindert, M., Weigelin, B., Davidson, P., Friedl, P., Wolf, K. and Lammerding, J. (2016). *Nuclear envelope rupture and repair during cancer cell migration. Science*, 352(6283), pp.353-358.
95. Uetake, Y., and Sluder, G. (2004). *Cell cycle progression after cleavage failure: mammalian somatic cells do not possess a "tetraploidy" checkpoint. J. Cell Biol.* 165, 609–615.
96. Dalton, W. B. et al. (2007). "Human Cancer Cells Commonly Acquire DNA Damage During Mitotic Arrest". *Cancer Research*, vol 67, no. 24, pp. 11487-11492.
97. Weaver, Beth A. (2014). "How Taxol/Paclitaxel Kills Cancer Cells". *Molecular Biology Of The Cell*, vol 25, no. 18, pp. 2677-2681.
98. Zasadil, L. M. et al. (2014). "Cytotoxicity Of Paclitaxel In Breast Cancer Is Due To Chromosome Missegregation On Multipolar Spindles". *Science Translational Medicine*, vol 6, no. 229, pp. 229ra43-229ra43. 99.
99. Blajeski, April L. et al. (2001). "A Multistep Model For Paclitaxel-Induced Apoptosis In Human Breast Cancer Cell Lines". *Experimental Cell Research*, vol 270, no. 2, pp. 277-288.
100. Bekier, M. E. et al. (2009). "Length Of Mitotic Arrest Induced By Microtubule-Stabilizing Drugs Determines Cell Death After Mitotic Exit". *Molecular Cancer Therapeutics*, vol 8, no. 6, pp. 1646-1654.
101. Haschka, Manuel D. et al. (2015). "The NOXA–MCL1–BIM Axis Defines Lifespan On Extended Mitotic Arrest". *Nature Communications*, vol 6, no. 1.

## ANEXO

### 1. ESPECIFICACIONES DE REACTIVOS Y SOLUCIONES.

#### 1.1. REACTIVOS.

**Tabla No. 5: Lista de anticuerpos usados durante el presente trabajo.**

Anticuerpo(s)	Compañía	Número de catálogo
Anti-phosfo H3 Serina 10 - Alexa® 488	Cell Signalling	3465
Anti-fosfo-H2A.X conjugado- Alexa® 488	Biologend	
Anti-IgG de ratón conjugado -Alexa® 488	Biologend	

**Tabla No. 6: Lista de sales utilizadas durante el presente trabajo.**

Sales	Compañía	Número de catálogo
NaCl	J. T. Baker	3624-01
KCl	J. T. Baker	3040-01
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	J. T. Baker	4062-01
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	J. T. Baker	3246-01
HEPES	J. T. Baker	4018-01
EGTA	Sigma-Aldrich	E-4378
BSA	SIGMA, life science	A3059
Citrato de sodio	HYCEL	40551

**Tabla No. 7: Lista de fármacos utilizados durante el presente proyecto**

<b>Fármaco(s)</b>	<b>Compañía</b>	<b>Número de catálogo</b>
Paclitaxel/Taxol	Sigma-Aldrich	T7191
Citocalasina B	Abcam	ab143482
Timidina	SIGMA, Life Science	T1895
Blebistatina	Abcam	ab120425

**Tabla No. 8: Lista de sustancias tóxicas/corrosivas utilizadas en el presente trabajo**

<b>Sustancia(s) tóxicas o corrosivas</b>	<b>Compañía</b>	<b>Número de catálogo</b>
Metanol	J. K. Baker	9070-03
Ácido acético	Milipore	101830
Dimetil sulfoxido (DMSO)	ATCC®	_____
Yoduro de Propidio (IP)	Sigma-Aldrich	287075

**Tabla No. 9: Lista de soluciones especializadas utilizadas en el presente trabajo.**

<b>Solución(es) especializadas:</b>	<b>Compañía</b>	<b>Número de catálogo</b>
McCoy's 5 <sup>a</sup>	GIBCO	26600080
Suero Fetal Bovino	GIBCO	26140079
Tripsina-EDTA	GIBCO	12604
BD FACSFlo <sup>TM</sup>	Beckton Dickinson	342003
RNasa (10 mg/ml)	Thermo Scientific	EN0531
Reactivo rojo, Microscopy Hemacolor®	Milipore	111661/2
Reactivo azul, Microscopy Hemacolor®	Milipore	111661/3

## 1.2. SOLUCIONES

*Amortiguador de sales de fosfatos 1X:* Se añadieron las sales a un vaso de precipitados adecuado con el volumen de de solución a preparar. De acuerdo a la tabla de cantidades mostrada a continuación:

Reactivos	500 ml	1000 ml
NaCl 137 mM	4 g	8 g
KCl 2.7 mM	100 mg	200 mg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 mM	0.72 g	1.44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2 mM	120 mg	240 mg

Se ajustó el pH a 7.4 y aforó la solución con agua destilada (dH<sub>2</sub>O) al volumen final requerido (500 ml o 1000 ml). Finalmente, se esterilizó en autoclave a 120 psi durante 20 minutos.

*Solución de timidina:* La timidina fue pesada (40 mg) y disuelta en PBS 1X (825 µl) a 37°C por 5 minutos para una concentración de 200 mM. En seguida la solución se filtró utilizando filtros (pirinolas) de 0.25 µm de diámetro. Finalmente, se diluyó 1:100 en medio de cultivo McCoy's 5a para la obtención de una concentración final de 2 mM.

*Solución de paclitaxel/taxol®:* El paclitaxel fue disuelto en una solución de DMSO-PBS 1:10 para obtener una concentración de 100 µM. Posteriormente, dicha concentración fue diluida 1:1000 en medio de cultivo McCoy's 5a para alcanzar una concentración final de 100 nM, la cual se utilizó para tratar a la línea celular HCT116.

*Solución de citocalasina B:* La citocalasina B fue disuelta en una solución de DMSO-PBS a una concentración final de 800 mg/ml, con dicha concentración se realizaron diluciones seriadas 1:1 de; 400, 200, 100 y 50 mg/ml. Finalmente, las soluciones con las concentraciones señaladas fueron diluidas 1:100 en medio de cultivo McCoy's 5 para la obtención de concentraciones finales de 8, 4, 2, 1 y 0.5 mg/ml.

*Solución de blebistatina:* La blebistatina fue diluida 1:1000 directamente en medio de cultivo McCoy's 5a para obtener concentraciones finales de 100, 50, 25, 10 y 5 µM.

*Solución hipotónica:* Se añadieron las sales a un vaso de precipitados adecuado con el volumen de de solución a preparar. De acuerdo a la tabla de cantidades mostrada a continuación:

Reactivos	500 ml	1000 ml
HEPES 10 mM	2.4 g	4.8 g

EGTA 260 nM	0.1 g	0.2 g
KCl 40 mM	1.5 g	3 g

Se ajustó el pH a 7.4 y aforó la solución con agua destilada (dH<sub>2</sub>O) al volumen final requerido (500 ml o 1000 ml).

*Solución Fijadora:* La solución se preparó a partir de una dilución 3:1 de metanol y ácido acético respectivamente. Finalmente, se incubó a -20°C 24 h antes de su uso.

*Solución de BSA 1%:* La solución se preparó a partir de la dilución de 0.5 g de BSA en 50 ml de PBS 1X. Posteriormente se almacenó a 4°C.

*Solución de citrato de sodio 2.2%:* La solución se preparó a partir de la dilución de 6.6 g de citrato de sodio en 300 ml de agua miliQ. Se ajustó el pH a 7.4 y almacenó a 4°C.

*Solución de tinción con yoduro de propidio (IP):* Esta solución se preparó a partir de RNasa a una concentración de 10 mg/ml y yoduro de propidio (IP) a 1 mg/ml en solución de citratos 2.2% en un volumen final de 500 µl por cada muestra.

## 2. PROTOCOLOS EN EXTENSO.

### 2.1. SINCRONIZACIÓN CELULAR:

1. Se pesó la timidina en un tubo Eppendorf (2 ml) con aproximadamente 40 mg.
2. Fue diluida en 825 µl de PBS 1X para obtener una concentración final de 200 mM de timidina .

**¡Recuerda!** El cálculo siempre se realiza con base en la cantidad de timidina pesada.

**¡Recuerda!** Los cálculos se realizaron en base a la cantidad (gramos) y el peso molecular de la timidina (242.24 umas), para obtener el número de moles (n), al dividir los gramos entre el peso molecular.

$$0.04 \text{ g} / 242.25 \text{ g/mol} = 0.000165 \text{ moles.}$$

Posteriormente se despejó la fórmula de la molaridad, en donde ya se conoce la molaridad (0.1) y el número de moles (0.000165):

$$0.000165 / 0.2 = 0.0008255 \text{ L } \text{ o } 825 \text{ µl}$$

Finalmente, se agregaron 825 µl de PBS 1X en un tubo de 2 ml con los 40 mg de timidina para obtener una solución de 200 mM de timidina

3. Se calentó en Termoblock a 37 °C hasta que la timidina fue disuelta completamente.
4. Finalmente se filtró la solución mediante la ayuda de un filtro y una jeringa de 5 ml con embolo en un tubo eppendorof de 1.6 ml

**¡Recuerda!** El filtrado se realizó dentro de la campana de cultivo celular.

5. Posteriormente se diluyó en 1:100 de medio de cultivo para obtener una concentración final de 2 mM de timidina.

- Por último, se cambió el medio de las células por medio McCoy 5.A con timidina y se incubó a 37°C durante 18 h.

## 2.2. TRATAMIENTOS:

### 2.2.1. TRATAMIENTO CON PACLITAXEL.

- Se retiró el medio McCoy 5.A del tratamiento con timidina.
- Las células fueron lavadas en dos ocasiones con PBS 1X
- El paclitaxel fue diluido en una solución de PBS:DMSO y posteriormente en medio McCoy's 5.A
- Las células HCT116 se les adicionó medio de cultivo con paclitaxel (100 nM) en incluyendo un grupo control el cual solo posee solución de DMSO:PBS.
- Se incubaron a 37°C y se obtuvieron muestras para las diferentes técnicas en los tiempos señalados (Tabla No. 3)

**Tabla No. 3: Condiciones de tratamiento con paclitaxel**

Tratamiento con Paclitaxel		Tiempo de evaluación									
Tipo de experimento	Concentración a utilizar	0	3	6	9	12	15	18	21	24	48
Arresto mitótico y tinción con eosina y azul de metileno (índice mitótico)	Paclitaxel: 100 nM	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	●
Arresto mitótico e inmunotinción con anti-phospho Histone 3 (Serina 10)-Alexa® 48* (Citometría de flujo)	Paclitaxel: 100 nM	●	●	●	●	✓	●	●	●	●	●
Células con daño al DNA mediante $\gamma$ H2A.X (Citometría de flujo)	Paclitaxel: 100 nM	✓	●	✓	●	✓	●	✓	●	✓	●
Población Sub G1 (Citometría de flujo)	Paclitaxel: 100 nM	●	●	●	●	●	●	●	●	✓	●
Microscopía de time-lapse	Paclitaxel: 100 nM	●	●	●	●	●	●	●	●	●	✓

● Sin tiempo requerido. ✓ Con tiempo requerido

\* No fue necesario sincronizar el cultivo celular mediante bloqueo con timidina 2 mM.

### 2.2.2. TRATAMIENTO CON PACLITAXEL + CITOCALASINA B

- Se retiró el medio McCoy 5.A del tratamiento con timidina.
- Las células fueron lavadas en dos ocasiones con PBS 1X

- El paclitaxel y la citocalasina B fueron diluidos en una solución de PBS:DMSO y posteriormente en medio McCoy's 5.A
- Las células HCT116 se les adicionó medio de cultivo con paclitaxel (100 nM) en incluyendo un grupo control el cual solo posee solución de DMSO:PBS o solamente citocalasina B.
- Se incubaron a 37°C y se obtuvieron muestras para las diferentes técnicas en los tiempos señalados (Tabla No. 4)

**Tabla No. 4: Condiciones de tratamiento con paclitaxel y citocalasina B**

Tratamiento con paclitaxel y citocalasina B		Tiempo de evaluación									
Tipo de experimento	Concentración a utilizar	0	3	6	9	12	15	18	21	24	48
Concentración mínima efectiva** (índice de células binucleadas y poliploides)	Citocalasina B: 8, 4, 2, 1 y 0.5 µg/ml	●	●	●	●	●	●	●	●	✓	●
Arresto mitótico y tinción con eosina y azul de metileno (índice mitótico)	Citocalasina B: 2 µg/ml y 2 µg/ml + paclitaxel 100 nM	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	●
Arresto mitótico e inmunotinción con anti-phospho Histone 3 (Serina 10)-Alexa® 48** (Citometría de flujo)	Citocalasina B: 2 µg/ml y 2 µg/ml + paclitaxel 100 nM	●	●	●	●	✓	●	●	●	●	●
Células con daño al DNA mediante γH2A.X (Citometría de flujo)	Citocalasina B: 2 µg/ml + paclitaxel 100 nM	✓	●	✓	●	✓	●	✓	●	✓	●
Población Sub G1 y población de células poliploides (Citometría de flujo)	Citocalasina B: 2 y 4 µg/ml + paclitaxel 100 nM	●	●	●	●	●	●	●	●	✓	●
Microscopía de time-lapse	Citocalasina B: 2 y 4 µg/ml + paclitaxel 100 nM	●	●	●	●	●	●	●	●	●	✓

● Sin tiempo requerido. ✓ Con tiempo requerido

\*\* No fue necesario sincronizar el cultivo celular mediante bloqueo con timidina 2 mM.

### 2.2.3. TRATAMIENTO CON PACLITAXEL + BLEBISTATINA.

- Se retiró el medio McCoy 5.A del tratamiento con timidina.
- Las células fueron lavadas en dos ocasiones con PBS 1X
- El paclitaxel fue diluido en una solución de PBS:DMSO y posteriormente en medio McCoy's 5.A, mientras que la blebistatina fue diluida directamente en el medio de cultivo.

- Las células HCT116 se les adicionó medio de cultivo con paclitaxel (100 nM) en incluyendo un grupo control el cual solo posee solución de DMSO:PBS.
- Se incubaron a 37°C y se obtuvieron muestras para las diferentes técnicas en los tiempos señalados (Tabla No. 5)

**Tabla No. 5: Condiciones de tratamiento con paclitaxel y blebistatina**

Tratamiento con paclitaxel y blebistatina		Tiempo de evaluación									
Tipo de experimento	Concentración a utilizar	0	3	6	9	12	15	18	21	24	48
Concentración mínima efectiva*** (índice de células binucleadas y poliploides)	Blebistatina 100, 50, 25, 10 y 5 µM	●	●	●	●	●	●	●	●	✓	●
Arresto mitótico y tinción con eosina y azul de metileno (índice mitótico)	Blebistatina 50 µM y 50 µM + paclitaxel 100 nM	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	●
Arresto mitótico e inmunotinción con anti-phospho Histone 3 (Serina 10)-Alexa® 48*** (Citometría de flujo)	Blebistatina 50 µM y 50 µM + paclitaxel 100 nM	●	●	●	●	✓	●	●	●	●	●
Células con daño al DNA mediante γH2A.X (Citometría de flujo)	Blebistatina 50 µM + paclitaxel 100 nM	✓	●	✓	●	✓	●	✓	●	✓	●
Población Sub G1 y población de células poliploides (Citometría de flujo)	Blebistatina: 100 y 50 µM + paclitaxel 100 nM	●	●	●	●	●	●	●	●	✓	●
Microscopía de time lapse	Blebistatina: 100 y 50 µM + paclitaxel 100 nM	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

● Sin tiempo requerido. ✓ Con tiempo requerido

\*\*\* No fue necesario sincronizar el cultivo celular mediante bloqueo con timidina 2 mM.

### 2.3. ÍNDICE MITÓTICO (IM), DE CÉLULAS BINUCLEADAS (IBN) Y DE CÉLULAS POLIPLÓIDES (IPP).

- Se retiró el medio de cultivo que con el fármaco y se lavó una vez con PBS 1X.
- Se agregó solución hipotónica durante 20 minutos a 37°C.
- Las células fueron recolectadas en un tubo falcon de 15 ml con ayuda de un scrapper, ejerciendo presión sobre la superficie del contenedor para poder despegar las células adheridas.



6. Posteriormente las células fueron fijadas en una proporción de 1 de solución fijadora respecto a 5 de solución hipotónica y resuspendidas en varias ocasiones hasta disgregar la mayor cantidad de células.
7. Las células fueron centrifugadas a 1200 rpm durante 5 minutos.
8. El sobrenadante se decantó y el tubo falcon se dejó invertido sobre una sanita durante 2 minutos para eliminar la mayor cantidad de sobrenadante.
9. El botón de células fue resuspendido en 1 ml de solución fijadora y se almacenó a -20°C por 20 minutos.
10. Las células se mantuvieron en solución de fijación por al menos 24 h a -20°C antes de la tinción.

**Recuerda:** Es recomendable dejar mas de 24 h de incubación con solución de fijación para evitar alteraciones en el procedimiento de tinción.

11. Transcurridas las 24 h, las células fueron centrifugadas a 600 rpm por 1 minuto sobre laminillas cargadas positivamente (Superfrost plus, Fisher scientific), en donde fue agregado 1 ml de solución fijadora con 40 µl de suspensión celular sobre adaptadores de la centrifuga (Rotofix 32A, Hettich).
12. Posteriormente la laminilla fue secada al aire durante 15 minutos.
13. Fueron sumergidas por 4 minutos en un vaso coplin que contenía solución de eosina y lavada en agua destilada.
14. Las células fueron sumergidas es azul de metileno durante 10 segundos , lavadas con agua destilada y secadas al aire durante 10 minutos.
15. Las laminillas fueron colocadas sobre la platina del microscopio y se registraron las coordenadas de inicio y final de la cuantificación a partir de un microscopio invertido (LEICA, ZEISS) con objetivo 40 X en campo claro.

**Recuerda:** La cuantificación se realizó trazando la misma ruta sobre todas las laminillas, seleccionando campos al azar, y contando todas las células observadas en el campo sin importar si la cantidad de células resultantes es mayor a 1000.

14. El porcentaje de células mitóticas, binucleadas o poliploides se obtuvo a partir de la siguiente formula:

$$\text{Índice} = \frac{\text{Células } M, Bn \text{ o } Pp}{\text{Células totales}} \times 100$$

M: mitótica(s), Bn: Binucleada(s) o Pp: Poliploide(s)

#### **2.4. ANÁLISIS DE LA POBLACIÓN DE CÉLULAS SUB-G<sub>1</sub> Y POLIPLOIDES.**

El análisis de la población sub-G<sub>1</sub> y de células poliploides se llevó a cabo mediante la cuantificación del contenido de DNA teñido con yoduro de propidio (IP), siguiendo las condiciones establecidas a continuación:

1. Las células fueron lavadas en una ocasión con PBS 1X.

2. Tripsinizadas durante 5 minutos a 37°C y neutralizadas con un volumen duplicado de medio McCoy 5A respecto a la tripsina agregada.

**Recuerda:** Neutralizar la actividad de la tripsina con medio McCoy 5.A no es un proceso importante y por tal motivo se puede evitar, sin embargo, es importante no dejar células con tripsina por mas de 5 minutos cuando se requiere evaluar proteínas de membrana.

3. Las células fueron centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos
4. Se decantó el sobrenadante y resuspendió el botón de células con PBS 1X, este proceso se repitió una vez más.
5. Posteriormente, las células fueron centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos
6. El sobrenadante se decantó y el tubo falcon se dejó invertido sobre una sanita durante 2 minutos para eliminar la mayor cantidad de sobrenadante.
7. se resuspendió el botón de células en etanol al 70% frío y se almacenó a -20°C por lo menos 24 h.

**Recuerda:** Es recomendable dejar mas de 24 h de incubación con etanol al 70%, antes de su análisis por citometría de flujo.

8. El pellet de células fue lavado en dos ocasiones con PBS IX y resuspendido en solución de tinción con yoduro de propidio (IP) (ver anexo: especificación de soluciones y reactivos).
9. Finalmente, las células fueron incubadas en baño maría (ThermoFisher Scientific) a 37°C por 2 h en total oscuridad.
10. La lectura de las muestras se realizó con ayuda de un citómetro de flujo FACS CANTO II (Becton Dickinson), con el software FACSDIVA (Becton Dickinson) versión 6.1.3 se capturaron los datos cuantitativos.

## 2.5. INMUNODETECCIÓN DE $\gamma$ H2A.X

El análisis de daño al DNA se realizó por citometría de flujo mediante un anticuerpo anti-Phospho-Histone H2A.X (Ser139). Un ensayo basado en la detección de los niveles de histona H2A.X fosforilada (Ser139) utilizando un anticuerpo monoclonal acoplado a Alexa® 488 y siguiendo las condiciones establecidas a continuación:

1. Se removió el medio de cultivo y se lavaron las células en dos ocasiones con un volumen tres veces mayor de PBS 1X respecto al volumen de medio McCoy's 5A agregado.
2. Se despegaron las células con tratamiento de tripsina-EDTA a 37°C por 5 minutos y se neutralizó con un volumen duplicado de medio McCoy's 5A.

**Recuerda:** Neutralizar la actividad de la tripsina con medio McCoy 5.A no es un proceso importante y por tal motivo se puede evitar, sin embargo, es importante no dejar células con tripsina por mas de 5 minutos cuando se requiere evaluar proteínas de membrana.

3. Las células se lavaron en dos ocasiones con PBS 1X.
4. Posteriormente fueron fijadas en 500  $\mu$ l de metanol frío durante 10 minutos a -20°C.
5. Transcurrido el tiempo de incubación, las células se centrifugaron a 1200 rpm y permeabilizaron en 500  $\mu$ l de acetona fría durante 1 minuto a -20°C.
6. En seguida, se lavaron en dos ocasiones con PBS 1X y almacenaron a 4°C durante 24 h.
7. Posteriormente, las células fueron incubadas con 5  $\mu$ l de anti-Phospho-Histone H2A.X (Ser139) conjugado con Alexa® 488 (Biolegend) para cada muestra, y un control negativo mouse IgG conjugado a Alexa® 488 (Biolegend) en una solución de BSA 1% (ver anexo: especificación de soluciones y reactivos) durante 40 minutos en un rotador (DAIGGER) en total oscuridad.

**Recuerda:** Los tubos fueron cubierto totalmente con papel aluminio para evitar la entrada de luz y evitar así la baja señal de los fluorocromos asociados al anticuerpo.

8. Las células se lavaron en una ocasión con 500 µl de PBS 1X.
9. Se suspendieron en 250 µl de FACS flow y trasladaron en tubos de citometría FACS CANTO II (Becton Dickinson), donde los datos cuantitativos se capturaron a través del programa FACS DIVA versión 6. 1. 3.

**Recuerda:** Si el número de células es muy bajo, el volumen de FACS flow puede ser menor a los 250 µl establecidos, y de esta manera incrementar la concentración de células en una solución, además de acelerar la lectura en citometría de flujo.

## 2.6. INMUNODETECCIÓN DE H3S10PH

El análisis de la dinámica del arresto mitótico se llevó a cabo mediante inmunodetección de la histona H3 fosforilada en la serina 10 (phH3S10), una marca post traduccional y específica de células mitóticas. Se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón acoplado al fluorocromo Alexa® 488 (Cell signalling) siguiendo las condiciones establecidas a continuación:

1. Se removió el medio de cultivo y se lavaron las células en dos ocasiones con un volumen mayor de PBS 1X respecto al volumen de medio de cultivo agregado.
2. Se despegaron las células con tratamiento de tripsina-EDTA a 37°C por 5 minutos y se neutralizó con un volumen duplicado de medio McCoy's 5A.

**Recuerda:** Neutralizar la actividad de la tripsina con medio McCoy 5.A no es un proceso importante y por tal motivo se puede evitar, sin embargo, es importante no dejar células con tripsina por más de 5 minutos cuando se requiere evaluar proteínas de membrana.

3. Posteriormente se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos
4. Se fijaron en 500 µl de metanol frío durante 10 minutos a -20°C.
5. Las células se centrifugaron a 1200 rpm y permeabilizaron en 500 µl de acetona fría durante 1 minuto a -20°C.
6. Se lavaron en dos ocasiones con PBS 1X y almacenaron a 4°C durante 24 h.
7. Posteriormente, las células fueron incubadas con anti-phospho Histone 3 (Serina 10) conjugada con Alexa® 488 (Cell signalling) a una concentración de 1:100 en solución de BSA 1% (ver anexo: especificación de soluciones y reactivos) durante 40 minutos en un rotador (DAIGGER) en total oscuridad.

**Recuerda:** Los tubos fueron cubierto totalmente con papel aluminio para evitar la entrada de luz y evitar así la baja señal de los fluorocromos asociados al anticuerpo.

8. Las células fueron lavadas en una ocasión con 500 µl de PBS 1X.
9. Se suspendieron en 250 µl de FACS flow y trasladaron en tubos de citometría FACS CANTO II (Becton Dickinson), donde los datos cuantitativos se capturaron a través del programa FACS DIVA versión 6. 1. 3.

**Recuerda:** Si el número de células es muy bajo, el volumen de FACS flow puede ser menor a los 250 µl establecidos, y de esta manera incrementar la concentración de células en una solución, además de acelerar la lectura en citometría de flujo.

## 2.7. VIDEO POR MICROSCOPIA EN TIME-LAPSE.

Para poder analizar la dinámica y formación de surcos citocinéticos durante la salida del arresto mitótico en células HCT116 in vivo, se siguieron las siguientes condiciones:

1. Se prendió el software, hardware y se establecieron las condiciones de incubación 5 h antes de la toma de capturas.
2. La incubadora del microscopio invertido así como también la cámara interna se llevaron a 37°C durante 5 h. La llave del CO<sub>2</sub> se llevo a una presión de 1.5 bares y fue conectada a través de un difusor sumergido en agua MilliQ.

**Recuerda:** Preparar las condiciones 5 h previas al *time-lapse* permite la expansión de los metales como platina y bases de soporte, de esta manera se evita la perdida de planos focales cuando se lleva a cabo el time-lapse.

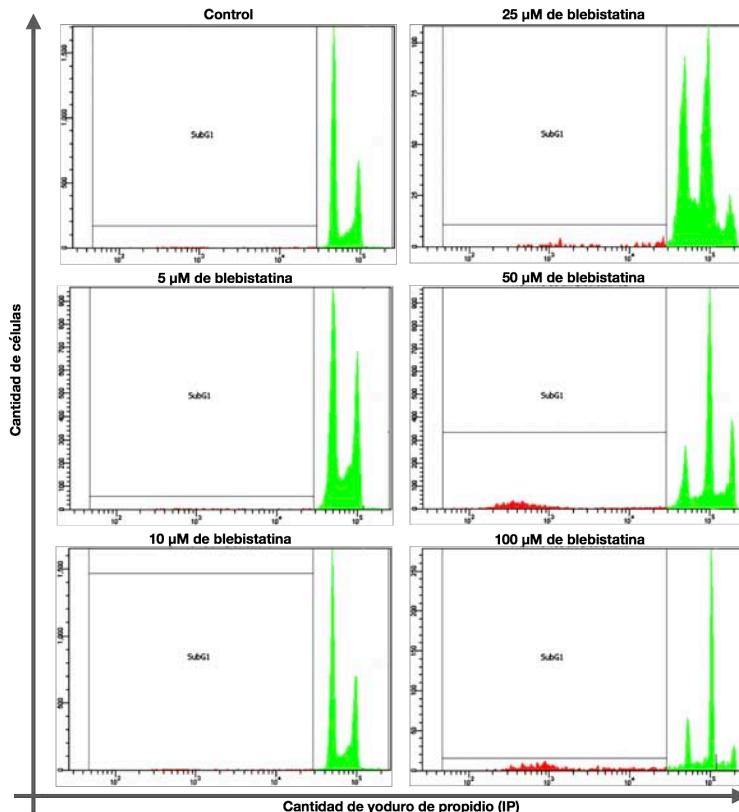
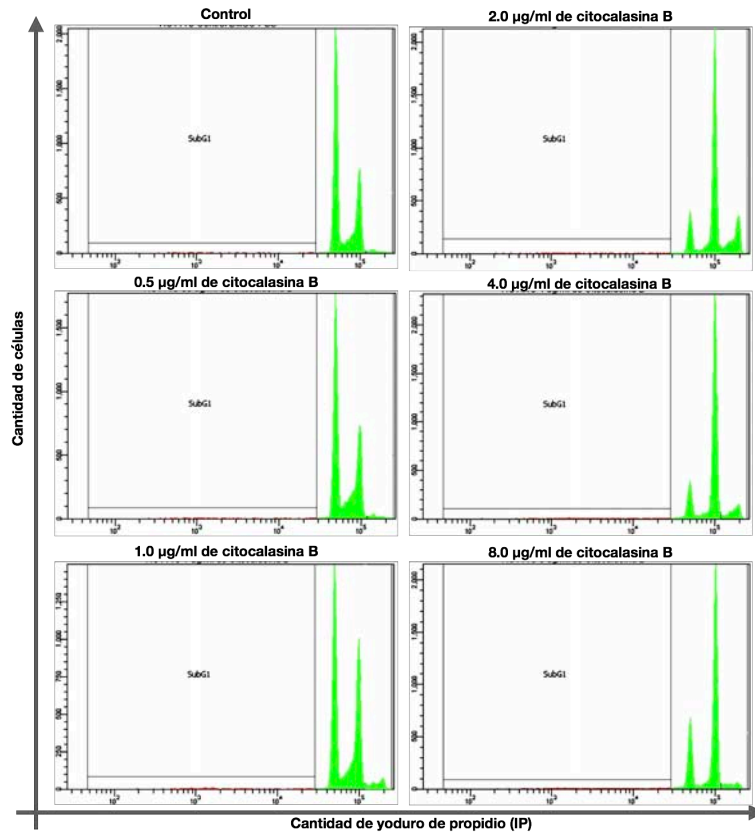
3. Se sembró una cantidad de células HCT116 mínima (2.500 células) para obtener una confluencia del 30% después de 2 - 3 días de tratamiento.

**Recuerda:** Las células fueron sembradas en una cámara especial, POC-R2 (PECON®).

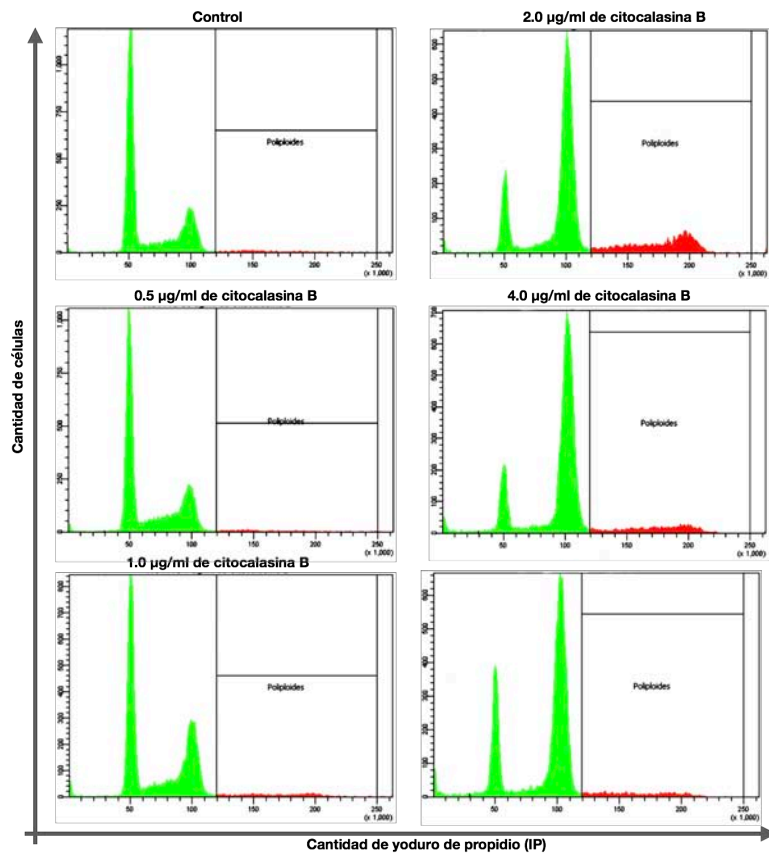
3. Las células fueron sincronizadas y tratadas en la misma cámara.
4. Durante el tratamiento, las células fueron fotografiadas cada 10 min. por 48 h. a través de un objetivo DIC (*differential interference contrast*) de inmersión 40X en un microscopio Zeiss AxioVert 200 Motorized (Carl Zeiss) con la finalidad de definir la dinámica en la membrana celular.
5. Finalmente, las células individuales fueron analizadas a partir del software AxioScan .Z1 y ZEN Lite (Carl Zeiss).

### 3. FIGURAS SUPLEMENTARIAS.

**Figura suplementaria No. 1: Análisis de muerte celular inducida por citocalasina B (CB) mediante citometría de flujo.** Células HCT116 fueron tratadas con citocalasina B durante 24 h a distintas concentraciones como se señala en la parte superior de cada histograma. Se observa un aumento mínimo de la población de células muertas (rojo) en 4 y 8  $\mu\text{g/ml}$  respecto a las otras concentraciones (0.5, 1 y 2  $\mu\text{g/ml}$ ). El porcentaje de células muertas se cuantificó en una zona particular del histograma denominada región  $\text{SubG}_1 < 2\text{N}$  (región izquierda del histograma).

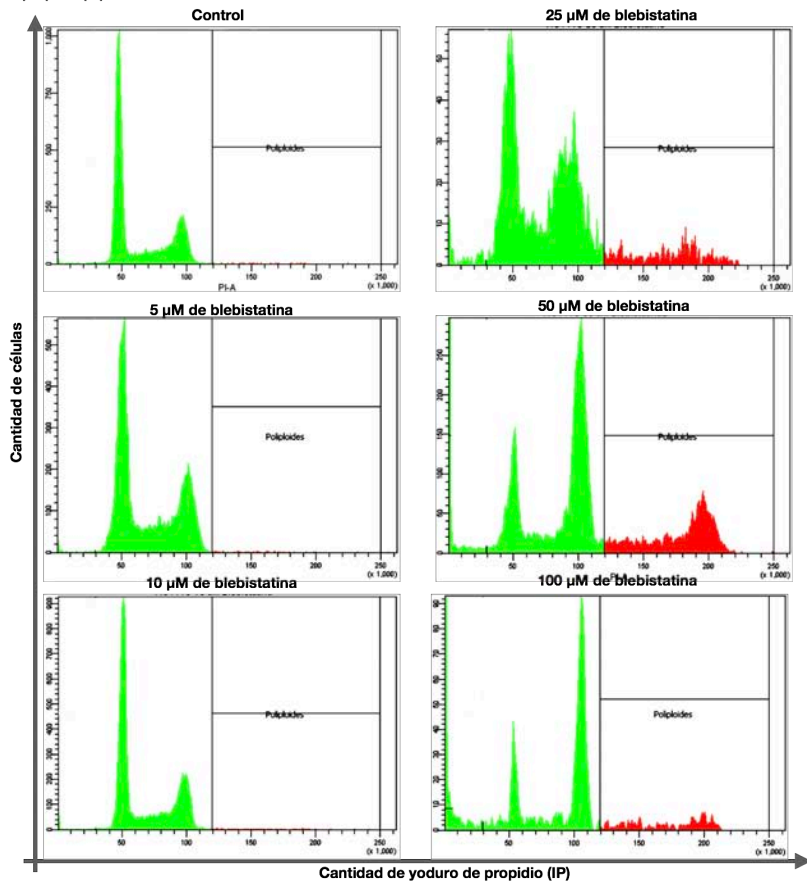


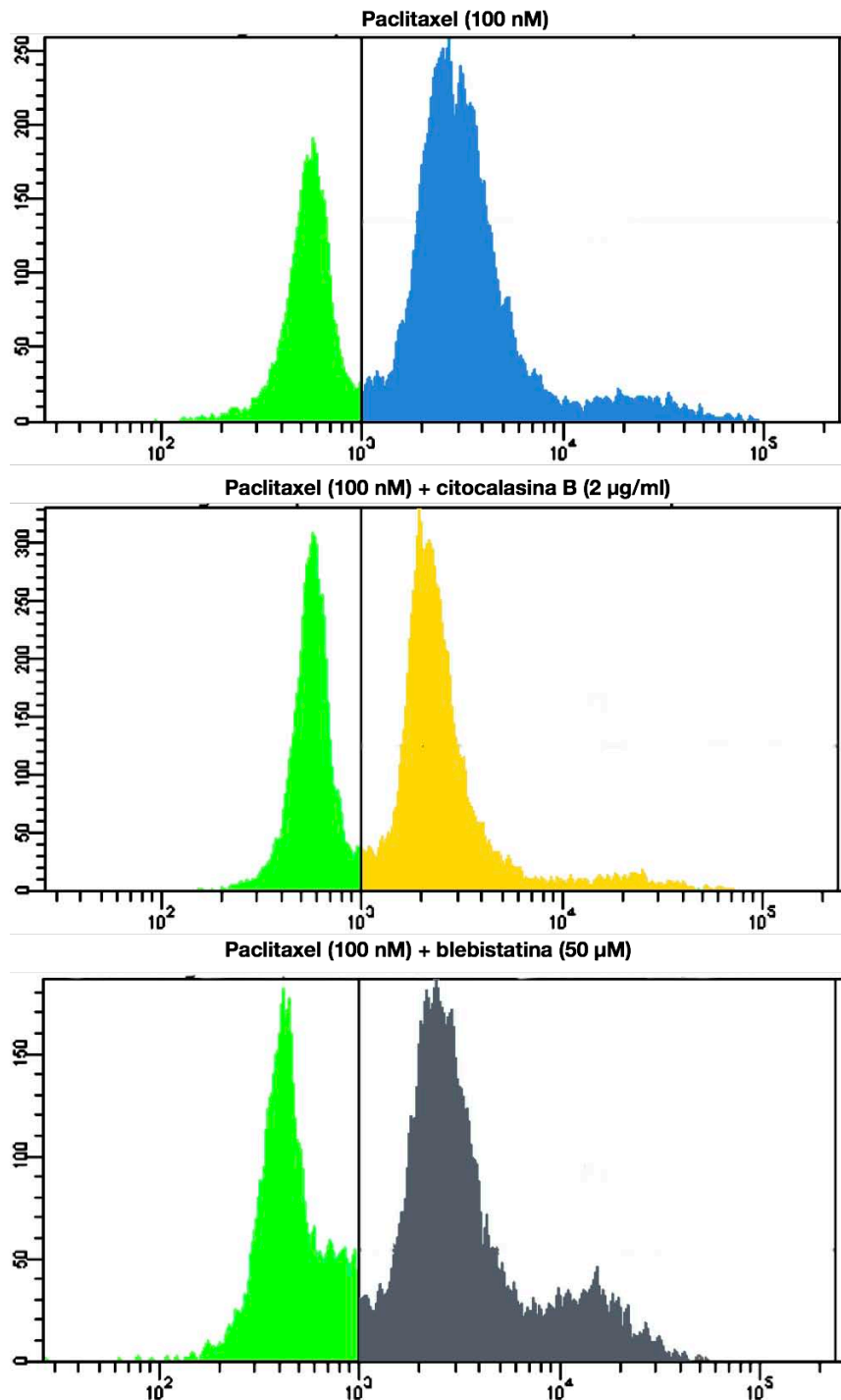
**Figura suplementaria No. 2: Análisis de muerte celular inducida por blebbistatina (BBT) mediante citometría de flujo.** Células HCT116 fueron tratadas con blebbistatina durante 24 h a distintas concentraciones como se señala en la parte superior de cada histograma. Se observa un aumento mínimo de la población de células muertas (rojo) en 100  $\mu\text{M}$  respecto a las otras concentraciones (5, 10, 25 y 50  $\mu\text{M}$ ). El porcentaje de células muertas se cuantificó en una zona particular del histograma denominada región  $\text{SubG}_1 < 2\text{N}$  (región izquierda del histograma).



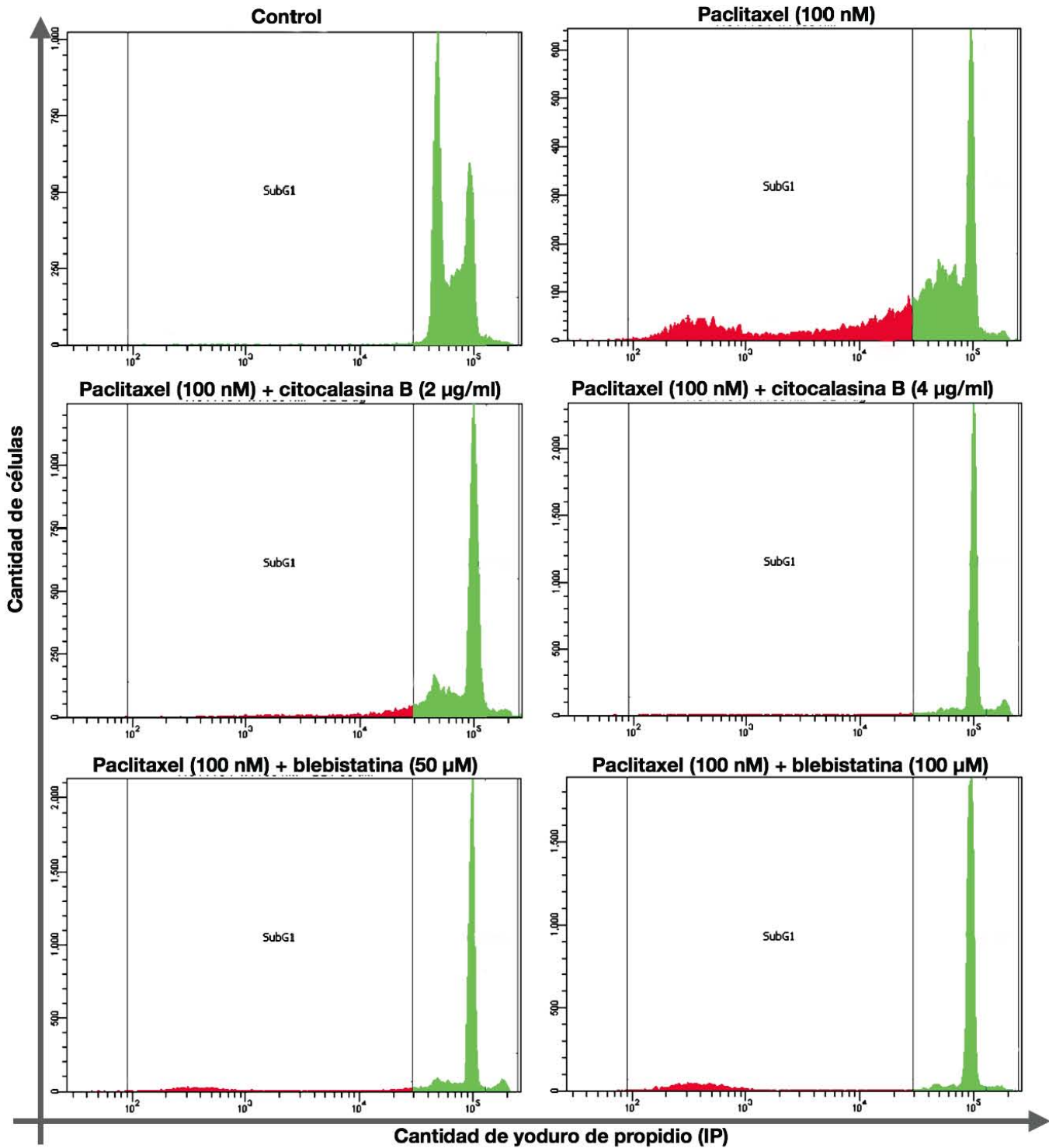
**Figura suplementaria No. 3: Análisis de poliploidía inducida por citocalasina B (CB) mediante citometría de flujo.** Células HCT116 fueron tratadas con citocalasina B durante 24 h a distintas concentraciones como se señala en la parte superior de cada histograma. Se observa un aumento de la población de células poliploides (rojo) en 8, 4 y 2 µg/ml respecto a las otras concentraciones (0.5 y 1 µg/ml). El porcentaje de células poliploides se cuantificó en una zona particular del histograma denominada región poliploide > 4N (región derecha del histograma).

**Figura suplementaria No. 4: Análisis de poliploidía inducida por blebistatina (BBT) mediante citometría de flujo.** Células HCT116 fueron tratadas con blebistatina durante 24 h a distintas concentraciones como se señala en la parte superior de cada histograma. Se observa un aumento mínimo de la población de células poliploides (rojo) en 50 y 25 µM respecto a las otras concentraciones (5, 10, y 100 µM). El porcentaje de células poliploides se cuantificó en una zona particular del histograma denominada región poliploide > 4N (región derecha del histograma).





**Figura suplementaria No. 5: Porcentaje de células arrestadas en mitosis por paclitaxel (paclitaxel), y paclitaxel en combinación con citocalasina B (CB) y blebistatina (BBT) a través de citometría de flujo.** Células HCT116 tratadas durante 24 h con paclitaxel (100 nM) y paclitaxel (100 nM) con CB (2 µg/ml) o BBT (50 µM) e inmunoteñidas con pH3S10. (A) Histograma muestra la fracción de células positivas para pH3S10 (mitóticas) del lado derecho del histograma, posterior al tratamiento únicamente con Paclitaxel (azul). (B) Histograma muestra la fracción de células positivas para pH3S10 (mitóticas) del lado derecho del histograma, posterior al tratamiento únicamente con Paclitaxel en combinación de CB (amarillo). (C) Histograma muestra la fracción de células positivas para pH3S10 (mitóticas) del lado derecho del histograma, posterior al tratamiento con Paclitaxel en conjunto con BBT (gris).



**Figura suplementaria No. 6: Análisis de muerte celular por paclitaxel, y paclitaxel en combinación con citocalasina B y blebistatina mediante citometría de flujo.** Células HCT116 fueron tratadas con Paclitaxel, y Paclitaxel en combinación con CB (2 µg/ml) o BBT (50 µM) durante 24 h. Se observa un amplio aumento en la fracción de células SubG<sub>1</sub> posterior al tratamiento con Paclitaxel. No obstante, en Paclitaxel + CB y Paclitaxel + BBT se aprecia un aumento leve en el porcentaje de células muertas. El porcentaje de células muertas se cuantificó en una zona particular del histograma denominada región SubG<sub>1</sub> < 2N (región izquierda del histograma).



**Tabla No. 12: Tratamiento de células HCT116 con paclitaxel (100nM)**

Células	Entrada a mitosis (hrs)	Duración del arresto mitótico (hrs)	Movimientos en la membrana durante el Mitotic Slippage (hrs)	Muerte celular (hrs)
2	Si (4)	5.83	Si (9.83)	Si (30.5)
3	Si (4.3)	9.53	Si (13.83)	Si (23.5)
4	Si (5.15)	8.35	Si (13.5)	Si (26.66)
5	Si (4.5)	10.5	Si (15)	No
6	Si (4.66)	9	Si (13.66)	Si (30.33)
7	Si (2.83)	10.67	Si (13.5)	Si (27)
8	Si (5)	12.33	Si (17.33)	Si (46.83)
10	Si (5.83)	7	Si (12.83)	Si (40.5)
11	Si (4)	Muere durante mitosis (8.5)		
12	No	Muerte durante interfase (4.16)		
13	No	Muerte durante interfase (7.66)		
14	Si(4.16)	18.67	Si (22.83)	Si (34.16)
15	Si (3)	10.83	Si (13.83)	Si (36.5)
16	Si (5.16)	3.84	Si (9)	Si (34.16)
17	Si (6)	7.66	Si (13.66)	Si (22.84)
18	Si (5.16)	14	Si (19.16)	Si (20.66)
19	No	Muere en interfase (23)		
20	Si (3.66)	20	Si (23.66)	No
21	Si (4.5)	19.33	Si (23.83)	No
<b>PROMEDIO</b>	<b>4.22 hrs.</b>	<b>11.16 hrs.</b>	<b>15.69 hrs.</b>	<b>31.13 hrs.</b>

**Tabla No. 11: Tratamiento de células HCT116 con paclitaxel (100 nM) + citocalasina B (2 µg/ml)**

Célula	Entrada a mitosis (hrs)	Duración del arresto mitótico (hrs)	Movimientos en la membrana durante el Mitotic Slippage (hrs)	Muerte celular (hrs)
1	Si (7.5)	2.66	No (10.16)	No
2	Si (9.33)	2	No (11.33)	No
3	Si (6.66)	4.84	No (11.5)	No
4	Si (7.66)		Si	Si (12.5)
5	Si (7.66)	11.84	No (19.5)	No
6	Si (8)	Se mantuvo en mitosis hasta el final del video		
7	Si (8.16)	Muere durante la mitosis (14.33)		
8	Si (7.83)	Se mantuvo en mitosis hasta el final del video		
9	Si (8.5)	Se mantuvo en mitosis hasta el final del video		
10	Si (7.66)	Muere durante la mitosis (9.5)		
11	Si (6.83)	6.67	No (13.5)	No
12	Si (8.66)	5.7	No (14.36)	No
13	No	Muere en interfase (11)		
14	Si (6.5)	Muere durante la mitosis (15.5)		
15	Si (6.16)	12.17	No (18.33)	No
16	Si (7)	12.16	Si (19.16)	No
17	Si (6.5)	Muere durante la mitosis (14.66)		
18	Si (7.33)	Muere durante la mitosis (11)		
19	Si (6.5)	14.83	No (21.33)	No
20	Si (6.66)	Muere durante la mitosis (11.5)		
21	Si (5.83)	12.03	No (17.86)	No
22	Si (6.66)	11.2	No (17.66)	No
23	Si (6.16)	14.17	Si (20.33)	No
24	Si (6)	Muere durante la mitosis (8.5)		
25	Si (6.33)	10.17	No (16.5)	No
26	Si (6.33)	Muere durante la mitosis (21.66)		
<b>PROMEDIO</b>	<b>7.21 hrs.</b>	<b>9.2 hrs.</b>	<b>No: 15.65 hrs. ; Si: 19.745 hrs.</b>	<b>12.5 hrs.</b>

**Tabla No. 10: Tratamiento de células HCT116 con paclitaxel (100nM) + blebistatina (50uM)**

Célula	Entrada a mitosis (hrs)	Duración del arresto mitótico (hrs)	Movimientos en la membrana/ Mitotic Slippage (hrs)	Muerte celular (hrs)
1	Si (12.16)	8.17	Si (20.33)	No
2	Si (12.16)	3.67	No (15.83)	Si (39.33)
3	Si (9,16)	Se mantiene arrestada en mitosis durante todo el video		
4	Si (12.16)	6.34	No (18.5)	No
5	Si (13.16)	2.84	No (16)	No
6	No	Se mantiene en interfase durante todo el video		
7	Si (8.16)	9.17	No (17.33)	No
8	Si (9.33)	10	No (19.33)	SI (27.83)
9	Si (9.33)	13	No (22.33)	Si (26.16)
10	Si (9.33)	5.17	No (14.5)	Si (37.16)
11	No	Se mantiene arrestada en interfase durante todo el video		
12	No	Muere durante interfase (25.5)		
13	Si (12.66)	3	No (15.66)	Si (20.66)
14	No	Muere durante interfase (24.66)		
15	No	Muere durante interfase (12.16)		
16	Si, (11.5)	3.16	No (14.66)	No
17	Si (10.16)	Se mantiene arrestada en mitosis durante todo el video		
18	Si (10.16)	Muere durante la mitosis (20)		
19	Si (11)	3.5	No (14.5)	No
20	Si (12.66)	4.5	No (17.16)	Si (42.66)
21	Si (10)	Se mantiene arrestada en mitosis durante todo el video		
22	Si (9.83)	8.45	No (17.83)	Si (24.16)
23	Si ND*		ND	Si (42)
24	Si (9.16)	3.6	No (12.83)	No
<b>PROMEDIO</b>	<b>10.67 hrs</b>	<b>6.04 hrs</b>	<b>No:15.88 hrs/Si:20.33 hrs</b>	<b>Si: 31.13 hrs</b>

