

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

Diferencias en la cinética y consecuencias de la evasión del punto de chequeo del huso: líneas celulares humanas *versus* de roedores

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Beatriz Álvarez Bernad

DIRIGIDA POR

Juan Francisco Giménez Abián
José Fernando Díaz Pereira

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

**DOCTORADO EN BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOMEDICINA**



TESIS DOCTORAL

**DIFERENCIAS EN LA CINÉTICA Y CONSECUENCIAS DE LA EVASIÓN
DEL PUNTO DE CHEQUEO DEL HUSO: LÍNEAS CELULARES HUMANAS
VERSUS DE ROEDORES**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA PRESENTADA POR

BEATRIZ ÁLVAREZ BERNAD

DIRECTORES

JUAN FRANCISCO GIMÉNEZ ABIÁN

JOSÉ FERNANDO DÍAZ PEREIRA

TRABAJO REALIZADO EN EL

**CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS MARGARITA SALAS.
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**

*“The gift of the great
microscopist is the ability to think
with the eyes and see with the brain.”*

Daniel Mazia, 1996

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
FIGURAS	5
TABLAS	9
RESUMEN	11
ABSTRACT	13
INTRODUCCIÓN	15
1.1. HISTORIA DE LOS DESCUBRIMIENTOS PIONEROS SOBRE PROLIFERACIÓN CELULAR	17
1.1.1. La mitosis	17
1.1.2. El ciclo celular y su regulación	19
1.2. EL CICLO CELULAR Y SU REGULACIÓN	20
1.2.1. Fases del ciclo celular	21
1.2.1.1. Interfase.....	21
1.2.1.1.1. Fase G1.....	22
1.2.1.1.2. Fase G0.....	22
1.2.1.1.3. Fase S	23
1.2.1.1.4. Fase G2.....	24
1.2.1.1.5. Fase M	24
1.2.1.2. Mitosis.....	25
1.2.1.2.1. Profase	25
1.2.1.2.2. Prometafase	25
1.2.1.2.3. Metafase.....	26
1.2.1.2.4. Anafase A	27
1.2.1.2.5. Anafase B.....	27
1.2.1.2.6. Telofase	27
1.2.1.2.7. Citocinesis	27
1.2.2. Regulación del ciclo celular	29
1.2.2.1. Ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas.....	29
1.2.2.1.1. Ciclinas.....	29
1.2.2.1.2. Quinasas dependientes de ciclina	29
1.2.2.2. Puntos de chequeo del ciclo celular	31
1.2.2.2.1. Transición G1/S.....	32
1.2.2.2.2. Fase S.....	33

1.2.2.2.3.	Transición G2/M	33
1.2.2.2.4.	Transición metafase-anafase.....	34
1.3.	PUNTO DE CHEQUEO DEL HUSO (SAC)	34
1.3.1.	Función, descubrimiento y mecanismo.....	34
1.3.2.	Evasión del punto de chequeo del huso	40
1.3.2.1.	Destino celular tras la evasión del SAC.....	41
1.3.2.2.	Mecanismos de evasión del SAC.....	43
1.3.3.	Consecuencias de la evasión. Aberraciones nucleares: núcleos de restitución y micronúcleos. Paradoja de la tasa de proliferación	44
1.4.	CÁNCER	48
1.4.1.	Tratamientos del cáncer. Quimioterapia.....	49
1.4.2.	Agentes clastogénicos y agentes aneugénicos.....	49
OBJETIVOS	53
MATERIAL Y MÉTODOS	57
3.1.	PRODUCTOS, LÍNEAS CELULARES, PLÁSMIDOS, ANTICUERPOS Y DROGAS	59
3.1.1.	Productos	59
3.1.2.	Líneas celulares	60
3.1.3.	Plásmidos y oligonucleótidos	61
3.1.4.	Anticuerpos.....	63
3.1.5.	Drogas.....	63
3.2.	TAMPONES Y FIJADORES	63
3.3.	BIOLOGÍA MOLECULAR	64
3.3.1.	Clonaje plasmídico	64
3.3.1.1.	Purificación de ADN	64
3.3.1.2.	Cuantificación de ADN plasmídico	64
3.3.1.3.	Diseño <i>in silico</i> de oligonucleótidos.....	64
3.3.1.4.	PCR clásica	66
3.3.1.5.	PCR de fusión.....	66
3.3.1.6.	Comprobación de fragmentos y digestión de ADN	67
3.3.1.7.	Ligación	68
3.3.1.8.	Transformación bacteriana y siembra	68
3.3.1.9.	Comprobación de colonias.....	69
3.3.1.10.	Secuenciación y amplificación	69
3.4.	BIOLOGÍA CELULAR	70
3.4.1.	Cultivo celular	70
3.4.2.	Criopreservación y descongelación celular	70

3.4.3.	Clonaje celular	71
3.4.3.1.	Titulación de antibióticos de selección	71
3.4.3.2.	Transfección y dilución	72
3.4.3.3.	Aislamiento y selección clonal	73
3.4.3.3.1.	Obtención de la línea celular NIH/3T3 T	76
3.4.3.3.2.	Dilución límite	77
3.4.4.	Inmunofluorescencia indirecta	78
3.4.5.	Fijación con Carnoy's y tinción con Giemsa	80
3.5.	MICROSCOPIA	82
3.5.1.	Microscopía <i>time-lapse in vivo</i>	82
3.5.2.	Microscopía de campo claro y de epifluorescencia	83
3.6.	ANÁLISIS DE DATOS	83
RESULTADOS	85
4.1.	GUÍA DE RESULTADOS	87
4.2.	ANÁLISIS CROMOSÓMICO DE LAS LÍNEAS CELULARES	92
4.3.	ALTERACIONES EN INTERFASE Y MITOSIS INDUCIDAS POR EL TRATAMIENTO CON PACLITAXEL, MAYTANSINA Y GSK923295	94
4.3.1.	Interfase	96
4.3.2.	Mitosis	99
4.3.3.	Citología de la evasión del punto de chequeo del huso	103
4.3.4.	Resultado de la evasión del punto de chequeo del huso	109
4.4.	EVALUACIÓN PROLIFERATIVA Y ESTADOS CELULARES DURANTE EL TRATAMIENTO CON PACLITAXEL, MAYTANSINA Y GSK923295	112
4.5.	ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN EN LA CINÉTICA DE EVASIÓN DEL PUNTO DE CHEQUEO DEL HUSO	117
4.6.	ESTUDIO DE LAS CONSECUENCIAS CELULARES TRAS LA EVASIÓN MITÓTICA CON EL TRATAMIENTO DE PACLITAXEL, MAYTANSINA Y GSK923295	123
4.6.1.	Escasas diferencias en el número de células generadas	123
4.6.2.	Disparidad en la generación de células multinucleadas o con núcleos de restitución	126
4.6.3.	Análisis de la dinámica de micronúcleos	127
4.6.4.	Destinos celulares post evasión mitótica	133
4.7.	COMPARATIVA ENTRE FÁRMACOS CLASTOGENICOS VERSUS ANEUGENICOS	136
4.7.1.	Diferencias en la fracción proliferante y estados celulares	143
4.7.2.	Variación en la duración de la mitosis entre fármacos clastogénicos <i>versus</i> aneugénicos	144

4.7.3.	Variación en la generación de aberraciones nucleares	146
4.7.4.	Diferencias tras la salida de mitosis	149
DISCUSIÓN		151
5.1. LA RELEVANCIA DEL MATERIAL Y METODOLOGÍA		155
5.2. POSIBLES CAUSAS DE LAS DIFERENCIAS ENTRE LÍNEAS CELULARES HUMANAS VERSUS DE ROEDORES		160
5.2.1. Importancia de las proteínas Mad1 y Mad2		165
5.2.2. ¿Por qué las células evaden el punto de chequeo del huso?		167
5.3. DIFERENCIAS ENTRE LÍNEAS CELULARES, TRATAMIENTOS Y DESTINOS TRAS LA EVASIÓN DEL SAC		170
5.4. COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS DE AGENTES ANEUGÉNICOS Y AGENTES CLASTOGÉNICOS. GENERACIÓN Y POSIBLE RELEVANCIA DE LOS MICRÓNÚCLEOS Y NÚCLEOS DE RESTITUCIÓN		174
CONCLUSIONES		181
BIBLIOGRAFÍA		185
ANEXOS		207

ABREVIATURAS

ADC	Conjugado anticuerpo-fármaco
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APC/C	Complejo promotor de la anafase/Ciclosoma
AMP	Adenosín monofosfato
A.N.	Apertura numérica
ANOVA	Análisis de la varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ARNi	ARN de interferencia
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
ATM	Mutada en Ataxia Telangiectasia
ATP	Adenosín trifosfato
ATR	Relacionada con ATM y Rad3
BFP2	Proteína fluorescente azul 2
BSA	Albúmina sérica bovina
Bub	Germinación no inhibida por benzimidazol
CAK	Quinasa activadora de Cdks
CBMN	Ensayo de micronúcleos en citocinesis
Cdks	Quinasas dependientes de ciclinas
CENP-A	Proteína asociada al centrómero A
CENP-E	Proteína asociada al centrómero E
cGAMP	Monofosfato de guanosina-adenosina cíclico
cGAS	Sintasa de cGAMP
Cki	Inhibidor de Cdks
CPC	Complejo de pasajeros cromosómicos
DAPI	4',6-diamidino-2 fenilindol
DBS	Suero bovino adulto
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d6	Dimetilsulfóxido deuterado
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
eGFP	Proteína verde fluorescente mejorada

EGTA	Ácido etilenglicol tetraacético
EMA	Agencia Europea de Medicamentos
EMn	Micronúcleos ectópicos
EtBr	Bromuro de etidio
FCS	Suero fetal bovino
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FISH	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente
Fw	<i>Forward</i>
G-418	Geneticina
GEMM	Modelo murino genéticamente modificado
GMP	Monofosfato de guanosa
GSK	GSK923295
GTP	Trifosfato de guanosa
H2B	Histona H2B
INCENP	Proteína del centrómero interno
IRF1	Factor regulador de interferón 1
KDa	Kilodalton
K_i	Constante de inhibición
LAP2β	Proteína asociada a lamina β
LB	Caldo Luria-Bertani
Mad	Deficiente en arresto mitótico
MAY	Maytansina
MCC	Complejo de punto de control mitótico
MgCl₂	Cloruro de magnesio
MgSO₄	Sulfato de magnesio
MN	Micronúcleos
MPF	Factor promotor de la maduración, de la mitosis o de la meiosis
MTOC	Centro organizador de microtúbulos
MTs	Microtúbulos
NaCl	Cloruro de sodio
NLS	Señal de localización nuclear
NuMA	Proteína del aparato nuclear mitótico
Opti-MEM	Medio esencial mínimo optimizado
Pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCNT	Pericentrina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

PDOX	Xenoinjerto ortopico derivado de paciente
PDX	Xenoinjerto derivado de paciente
PEG	Polietilenglicol
PFA	Paraformaldehído
PIPES	Piperazina-N, N'-bis(2-etanosulfonato)
PMDA	Agencia de Productos Farmacéuticos y Dispositivos Médicos
pRb	Proteína del retinoblastoma
PTX	Paclitaxel
rpm	Revoluciones por minuto
Rv	<i>Reverse</i>
SAC	Punto de chequeo del huso
SASP	Fenotipo secretor asociado a senescencia
SEM	Error estándar de la media
STING	Estimulador de genes de interferón
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TANK	Proteína de unión a TBK1
TBK1	Quinasa 1 unida a TANK
Tm	Temperatura de fusión
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
TUB	Tubulina

Las abreviaturas que no se indican siguen el código de la IUPAC.

FIGURAS

INTRODUCCIÓN:

Figura 1. Dibujos originales de Van Benedin, 1876	18
Figura 2. Montaje basado en los dibujos originales de Walther Flemming.....	18
Figura 3. Figura del trabajo original de Tim Hunt.....	20
Figura 4. Esquema de las fases del ciclo celular.....	21
Figura 5. Composición de micrografías de las fases del ciclo celular. Inmunofluorescencia indirecta en células A549.....	28
Figura 6. Representación esquemática de los complejos ciclina-Cdk que predominan en cada una de las fases del ciclo celular.	31
Figura 7. Esquema de los principales puntos de chequeo del ciclo celular	33
Figura 8. Simplificación esquemática de la estructura trilaminar del cinetocoro de mamíferos.....	35
Figura 9. Esquema de los experimentos de Rieder y de Nicklas.....	37
Figura 10. Representación esquemática del experimento principal del trabajo de Nicklas/Gorbsky.....	37
Figura 11. Representación esquemática simplificada de la ruta bioquímica del punto de chequeo del huso.	39
Figura 12. Representación esquemática de los destinos celulares tras el bloqueo en c-mitosis por el tratamiento con fármacos antimitóticos	41
Figura 13. Representación de la generación de núcleos de restitución y micronúcleos	45

MATERIAL Y MÉTODOS:

Figura 14. Observación del fenotipo celular en contraste de fase	61
Figura 15. Representación esquemática y simplificada del procedimiento de aislamiento y selección clonal.....	76

RESULTADOS:

Figura 16. Fotogramas de experimentos de microscopía *time-lapse in vivo*. Marcaje doble..... 90

Figura 17. Fotogramas de experimentos de microscopía *time-lapse in vivo*. Marcaje triple..... 91

Figura 18. Análisis citogenético básico de las líneas utilizadas 94

Figura 19. Imágenes de inmunofluorescencia de células A549 en interfase: α -tubulina, DAPI y pericentrina 97

Figura 20. Imágenes de inmunofluorescencia de células A549 en interfase: α -tubulina, DAPI y NuMA..... 98

Figura 21. Esquema e inmunofluorescencia de los tipos de microtúbulos en el huso mitótico 99

Figura 22. Imágenes de inmunofluorescencia de células A549 en mitosis. α -tubulina, DAPI y pericentrina 101

Figura 23. Imágenes de inmunofluorescencia de células A549 en mitosis. α -tubulina, DAPI y NuMA..... 102

Figura 24. Imágenes de inmunofluorescencia de células A549 de la evasión del punto de chequeo del huso: α -tubulina, DAPI y pericentrina..... 105

Figura 25. Imágenes de inmunofluorescencia de células A549 de la evasión del punto de chequeo del huso: α -tubulina, DAPI y NuMA 106

Figura 26. Evasión del SAC en tratamiento con paclitaxel 108

Figura 27. Imágenes de inmunofluorescencia de células A549 como resultado de la evasión del punto de chequeo del huso: α -tubulina, DAPI y pericentrina 110

Figura 28. Imágenes de inmunofluorescencia de células A549 como resultado de la evasión del punto de chequeo del huso: α -tubulina, DAPI y NuMA..... 111

Figura 29. Fracción proliferante 114

Figura 30. Estados celulares durante los tratamientos con antimitóticos..... 117

Figura 31. Dispersión del tiempo (horas) en realizar la evasión mitótica 119

Figura 32. Tiempo promedio (horas) de bloqueo en c-mitosis 122

Figura 33. Imágenes de inmunofluorescencia de células A549 realizando la evasión mitótica 124

Figura 34. Número de células generadas durante el tratamiento con antimetabólicos ..	125
Figura 35. Generación de células micronucleadas durante el tratamiento con antimetabólicos.....	127
Figura 36. Representación esquemática de la dinámica de colapso y reconstitución de micronúcleos	128
Figura 37. Fragmento de <i>time-lapse</i> mostrando el colapso de micronúcleos	129
Figura 38. Generación, colapso y reconstitución de micronúcleos por célula durante el tratamiento con antimetabólicos	131
Figura 39. Colapso y reconstitución de micronúcleos totales	132
Figura 40. Destinos celulares tras la evasión mitótica.....	134
Figura 41. Duración ciclo celular y tiempo en morir tras la evasión del SAC	135
Figura 42. Aberraciones cromosómicas generadas con agentes clastogénicos	139
Figura 43. Defectos en congregación cromosómica con agentes aneugénicos	142
Figura 44. Parámetros de proliferación en agentes clastogénicos <i>versus</i> agentes aneugénicos	144
Figura 45. Duración de la mitosis con agentes clastogénicos <i>versus</i> agentes aneugénicos	145
Figura 46. Representación esquemática de fenotipos nucleares en el tratamiento con agentes clastogénicos y aneugénicos.....	146
Figura 47. Generación de aberraciones nucleares en agentes clastogénicos <i>versus</i> agentes aneugénicos.....	148
Figura 48. Destinos celulares en agentes clastogénicos <i>versus</i> aneugénicos.....	150
DISCUSIÓN:	
Figura 49. Esquema de las fases de evaluación de un fármaco.....	153
Figura 50. Comparación entre líneas celulares humanas <i>versus</i> de roedores bajo tratamiento control (DMSO).....	158
Figura 51. Representación de la duración promedio de la mitosis en líneas celulares control (DMSO).....	160

TABLAS

MATERIAL Y MÉTODOS:

Tabla 1. Clasificación de las líneas celulares utilizadas según su especie y su estado de transformación.....	61
Tabla 2. Plásmidos generados y empleados en el presente trabajo.	63
Tabla 3. Oligonucleótidos diseñados para la construcción de los plásmidos mCherry-3xNLS-IRES_hygR y eGFP-3xNLS-IRES_bsdR.....	63
Tabla 4. Concentración mínima de antibióticos de selección capaz de inducir la muerte en el 95% de las células.	72
Tabla 5. Anticuerpos utilizados en los ensayos de inmunofluorescencia indirecta.	80

RESUMEN

El ciclo celular es un conjunto ordenado de eventos que conducen a la formación de dos células hijas a partir de una célula madre. Dicho ciclo debe estar estrictamente regulado para garantizar la correcta progresión del mismo, por ello, existen puntos de control que se aseguran que un proceso no comience si la finalización del anterior no se ha completado con éxito. Uno de los principales puntos de chequeo del ciclo celular es el punto de chequeo del huso (*Spindle Assembly Checkpoint*, SAC) que actúa en la mitosis controlando la transición metafase-anafase. El SAC permanece activo desde el inicio de la mitosis, momento en el cual los cinetocoros no anclados a microtúbulos (MTs) del huso inhiben la activación del complejo promotor de la anafase o ciclosoma (APC/C). Cuando todos los cinetocoros de los cromosomas han biorientado en la placa ecuatorial, el punto de chequeo se satisface, de tal forma que el APC/C se activa, y por un lado se pierde la cohesión entre cromátidas hermanas y, por otro, se degrada ciclina B licenciando la anafase.

Al tratar las células con fármacos antimitóticos, el SAC no se satisface y permanece activo por lo que las células quedan bloqueadas en c-mitosis y pueden seguir diferentes destinos: 1) morir en mitosis o 2) evadir el SAC. Los mecanismos por los cuales las células escapan del bloqueo prolongado en mitosis no están claros en la actualidad. Al evadir el SAC, se generan células con aberraciones nucleares, como micronúcleos o núcleos de restitución. A su vez, estas células que evaden el SAC pueden sufrir diferentes destinos: muerte, arresto en G1 o volver a realizar una segunda mitosis. Hoy en día, el éxito subyacente al tratamiento con fármacos antimitóticos en tumores cuya tasa de proliferación es baja no está claro. Para resolver esta paradoja de la tasa de proliferación, se propone, por un lado, que los micronúcleos tienen una envoltura nuclear más lábil que colapsa desencadenando una cascada de señalización que culmina con la activación del sistema inmune lo cual afectaría también a las células vecinas. Alternativamente, se propone que el éxito de estos fármacos antimitóticos es debido a la generación de células multipolares que provocan una mala segregación de los cromosomas generando aneuploidías tan graves que llevan a la muerte de la célula. El tratamiento del cáncer mediante quimioterapia consiste en la administración de fármacos antineoplásicos que afectan a las características de las células tumorales. Estos fármacos pueden clasificarse como aneugénicos, que provocan aneuploidías, y clastogénicos, que afectan al ADN mediante distintos mecanismos.

En el presente trabajo, se analiza a nivel citológico la evasión del SAC, siendo el objetivo principal estudiar las diferencias en la cinética de evasión del punto de chequeo del huso, en la generación de células multinucleadas y en las consecuencias de dicha evasión; entre líneas celulares humanas *versus* de roedores. Para ello se han empleado líneas celulares de cuatro especies y tres compuestos aneugénicos, dos que afectan a la dinámica de tubulina (paclitaxel y maytansina), y un compuesto que afecta a la congregación cromosómica (GSK923295). Los resultados obtenidos muestran que, con cualquiera de los tres tratamientos, las líneas celulares de roedores evaden el punto de chequeo más rápido que las líneas humanas. Con los compuestos dirigidos contra tubulina, las líneas celulares humanas, de hámster y de rata, generan un mayor porcentaje de células micronucleadas que las de ratón que tienden a generar núcleos de restitución. Las líneas celulares humanas mueren más que las de roedores en el bloqueo c-mitótico, las que lo evaden vuelven a morir más que las de roedores al entrar en un nuevo ciclo, y las que sobreviven no son capaces de completar con éxito un segundo ciclo, al contrario que las de roedores que, en cada paso, muestran una supervivencia notablemente superior.

Estos resultados sugieren que hay diferencias claras en el tratamiento con fármacos antimitóticos entre líneas humanas y de roedores, sobre todo en la cinética de evasión del SAC. Esta observación puede estar relacionada con las discrepancias entre la experimentación *in vitro*, *in vivo* y preclínica de fármacos antimitóticos, puesto que los roedores, principalmente ratones, son el principal modelo de investigación *in vivo*.

Un segundo objetivo ha consistido en evaluar si la generación de aberraciones nucleares es el denominador común entre una batería de compuestos aneugénicos y clastogénicos. Los fármacos clastogénicos principalmente provocan roturas en el ADN, generando fragmentos cromosómicos, de tal forma que presentan un mayor porcentaje de células con núcleos de restitución y un fenotipo híbrido con micronúcleos de muy pequeño tamaño. Por el contrario, los aneugénicos afectan a la maquinaria de la mitosis impidiendo la formación de una placa ecuatorial de tal forma que causan una incorrecta segregación de los cromosomas originando células micronucleadas, a excepción de dos compuestos que tienen un comportamiento más similar a los clastogénicos. Los resultados obtenidos indican que ambos tipos de compuestos coinciden en generar aberraciones nucleares pero su origen y el tipo de aberración depende del tipo de compuesto.

ABSTRACT

The cell cycle is an organized series of events that lead to the formation of two daughter cells from a mother cell. The cell cycle must be strictly regulated to ensure the correct progression of the cell, thus there are checkpoints that secure that a process does not begin if the previous one has not been successfully completed. One of the main checkpoints in the cell cycle is the spindle assembly checkpoint (SAC), which controls the metaphase-anaphase transition during cell division. The SAC remains active from the onset of mitosis, when kinetochores which are not attached to spindle microtubules inhibit the activation of the anaphase-promoting complex or cyclosome (APC/C). Once all the kinetochores of the chromosomes have bioriented on the equatorial plate, the checkpoint is satisfied, the APC/C is activated and the cohesion between sister chromatids is lost and cyclin B is degraded, licensing the anaphase.

When cells are treated with antimetabolic drugs, they are blocked in mitosis and can follow different fates 1) to die in mitosis or 2) to evade the SAC, a process that is called mitotic slippage. The mechanisms that allow cells to escape from a prolonged block in mitosis are currently unknown. After mitotic slippage, cells with nuclear aberrations are generated, mainly with micronuclei or restitution nuclei. These cells can undergo different fates: death, arrest in G1 or a second mitosis. Nowadays, the underlying success of treatments with antimetabolic drugs in tumors with low proliferation rates is unclear. Regarding this proliferation rate paradox two explanations have been proposed: it is argued that micronuclei have a more labile nuclear envelope that collapses, triggering a signaling cascade that culminates with the activation of the immune system producing a bystander effect around the leading cell. Alternatively, it has been proposed that the success of these drugs is due to the generation of multipolar mitoses that produce incorrect chromosome segregation, generating such severe aneuploidies that they cause cell death. Cancer treatment with chemotherapy consists on the administration of antineoplastic drugs that affect the features of tumor cells. These drugs can be classified as aneuploidy-inducers, which cause aneuploidy, or clastogenics, which affect DNA by different mechanisms.

In this thesis, mitotic slippage is analyzed at the cytological level, being the main focus to study the differences in the kinetics of the mitotic slippage, the generation of multinucleated cells, and the dynamics of micronuclei, as well as the consequences of

such evasion; between human and rodent cell lines. To this end, cell lines of four species and three aneugenic compounds were used, two of which affect tubulin dynamics (paclitaxel and maytansine) and one that affects chromosome congression (GSK923295). The results obtained show that, with all the treatments, rodent cell lines do mitotic slippage faster than human cell lines. Regarding the compounds targeting tubulin, human, hamster and rat cell lines generate a higher percentage of micronucleated cells than mouse cell lines which generate restitution nuclei. In contrast, the drug that affects chromosome congression, which has no known effect on the microtubule cytoskeleton, generates cells with restitution nuclei in all cell lines. Rodent cell lines present a survival rate higher than human cell lines; as they also survive better after mitotic slippage, including a higher capacity to undergo and complete a second cell cycle.

These findings suggest that there are clear differences in the response to antimetabolic drugs between human and rodent lines, especially in the kinetics of the mitotic slippage. This observation may explain some of the discrepancies between *in vitro*, *in vivo*, and preclinical experimentation for drug approval, given that rodents, particularly mice, are the main *in vivo* research model.

A second objective has been to evaluate whether the generation of nuclear aberrations is the common denominator among a battery of aneugenic and clastogenic compounds. Clastogenic drugs mainly cause DNA breaks, generating chromosomal fragments, and present a higher percentage of cells with restitution nuclei and a hybrid phenotype with very small micronuclei. In contrast, aneugenic compounds affect the machinery of mitosis by preventing the formation of an equatorial plate, causing chromosome missegregation, thus resulting in micronucleated cells, except for two compounds that behave more similarly to the clastogenic compounds. The results obtained indicate that both types of drugs generate nuclear aberrations, although the nature and origin of these abnormalities depend on the type of compound.

1

INTRODUCCIÓN

1.1. Historia de los descubrimientos pioneros sobre proliferación celular

La proliferación celular es a la vez el resultado y el proceso de sucesivas fases alternadas de crecimiento y división celular que llevan a la constitución y mantenimiento de un organismo pluricelular partiendo de una única célula. Es, por tanto, un mecanismo básico para la vida. Su desregulación trae consigo alteraciones en la constitución genética de la célula, cáncer, aberraciones embrionarias, malformaciones genéticas, etc.

1.1.1. La mitosis

Han pasado ya 360 años desde que Robert Hooke publicó su libro llamado *Micrographia* en el que aparece por primera vez el término “célula”, del latín *cellŭla* (celdilla, hueco), referida a la organización en panal de las paredes de células muertas en el corcho. En la década de 1830, Theodor Schwann y Matthias Schleiden estudiaron las células animales y vegetales, respectivamente, y concluyeron que 1) todos los organismos están formados por una o más células y que 2) la célula, por tanto, es la unidad básica de la vida. En 1825 Vincent Raspail acuñó el aforismo: *omnis cellula e cellula* que Rudolf Virchow, en 1858, popularizó al postular que 3) toda célula proviene de otra célula preexistente, por división de ésta. Con esta máxima, se completan los tres postulados de la teoría celular.

En los años siguientes, se hicieron descubrimientos muy importantes para la biología celular recogidos, en su mayoría, en el libro *Cell in Development and Inheritance* de Edmund B. Wilson (Wilson, 1911), que cuenta con varias ediciones en las primeras décadas del siglo XX –disponibles en internet- y nos permite seguir en inglés los descubrimientos que frecuentemente eran publicados en alemán o francés. Una recopilación más moderna de dichos descubrimientos la encontramos en *The birth of a cell* por Henry Harris, en 1999. Fontana describió el nucléolo (“núcleo pequeño”) tan temprano como en 1781. Karl Wilhelm von Nägeli descubrió los cromosomas en 1842. En 1876 Van Benedin describía estructuras en los polos del huso mitótico y fibras partiendo de ellos hacia el ecuador de la célula (figura 1).

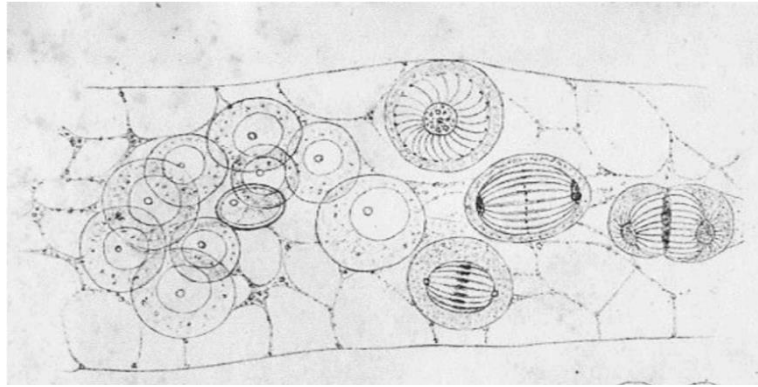


Figura 1. Dibujos originales de Van Benedin, 1876. Primeras descripciones de lo que ahora se conoce como los centrosomas, el huso mitótico y los microtúbulos del huso.

En 1882, Walther Flemming definió (y nombró) la mitosis, describiendo cada una de las fases de la división celular (figura 2), siendo continuación de los trabajos pioneros de Schneider en animales, 1873; y Strasburger en plantas, 1880.

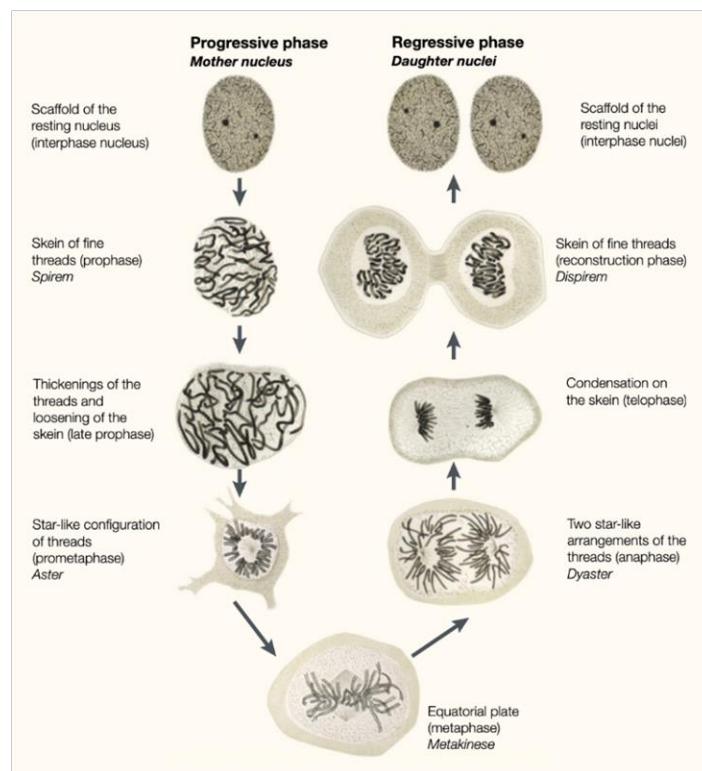


Figura 2. Montaje basado en los dibujos originales de Walther Flemming (Paweletz, 2001). El trabajo original cuenta con una traducción al inglés para el *Journal of Cell Biology* de Henry Harris (Flemming, 1965) que cuenta con la reproducción de todas las figuras originales. Pese a que la terminología ha cambiado en algunos aspectos y hay ciertos errores en la descripción original por Flemming (obviados en este montaje de Paweletz) el proceso de la mitosis fue descrito con sorprendente exactitud por una pléyade de autores tanto en animales como en plantas, siendo la versión de Flemming la más conocida.

1.1.2. El ciclo celular y su regulación

Desde principios del siglo XIX, se sabe que todos los organismos están formados por unidades individuales llamadas células. El crecimiento, desarrollo y supervivencia de todos los seres vivos depende de la reproducción de sus células. Así que, la reproducción celular es clara y fundamentalmente un proceso biológico importante (Uzbekov & Prigent, 2022).

Aunque la molécula de ADN había sido descubierta en 1869 por Johan Friedrich Miescher (cuatro años tras la formulación de las leyes de Mendel), no fue hasta la década de 1950 cuando James Watson y Francis Crick descubrieron su estructura. En esa misma década y año, en 1953, Alma Howard y Stephen Pelc, haciendo experimentos con *Vicia faba* y fósforo-32, identificaron tres periodos diferentes durante la interfase celular (hasta entonces un periodo críptico que recibía poca atención) estableciendo así las cuatro grandes fases del ciclo celular: mitosis (M), Gap 1 (G1), síntesis de ADN (S) y Gap 2 (G2) (Howard & Pelc, 1953).

Inicialmente, el modelo que explicaba la sucesión de eventos en el ciclo celular era similar a un reloj, en el que se asumía que cada fase tenía un rango de duración determinado y unas seguían a otras en un orden definido. Los experimentos de fusiones celulares de Johnson y Rao demostraron que el orden podía ser alterado y que unas fases dominaban sobre otras (Rao & Johnson, 1970) existiendo un “motor” o maquinaria responsable del avance del ciclo: el previamente descubierto MPF (inicialmente, del inglés, *Maturation Promoting Factor* aunque la “M” sirvió después igualmente para *Mitotic* o *Meiotic*). Se tardó casi dos décadas en aislar y purificar el esquivo MPF responsable de la dominancia de la fase mitótica sobre la interfase, descubierta por Bob Johnson y Potu Rao (M. I. Lohka & Maller, 1985; M. J. Lohka et al., 1988).

Mucho más rápidos fueron los avances en genética del control del ciclo con la llegada de las levaduras como sistema modelo. En los años 70-80, varias personas contribuyeron a la comprensión de la regulación del ciclo celular. Lee Hartwell y Paul Nurse descubrieron en años diferentes y especies distintas de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, respectivamente) las posteriormente llamadas quinasas dependientes de ciclina (Cdks, del inglés, *Cyclin dependent kinases*), el primero de los dos componentes del MPF en ser identificado. Con el descubrimiento y la conceptualización de los puntos de chequeo por parte de Hartwell se dio un paso más pues son estos puntos de chequeo los realmente

responsables del orden de eventos (relacionados o no entre sí) en el ciclo celular. Por último, Tim Hunt descubrió las ciclinas en las primeras divisiones embrionarias del erizo de mar (figura 3). Las ciclinas, concretamente la ciclina B, son el segundo componente del MPF. En 2001 Hartwell, Nurse y Hunt recibieron el premio Nobel de medicina por sus descubrimientos, los cuales confirmaban las tempranas intuiciones de Murdoch Mitchison (J. Mitchison, 1971) con el que se había formado una pléyade de “curiosos” del ciclo celular, entre ellos el mismo Paul Nurse.

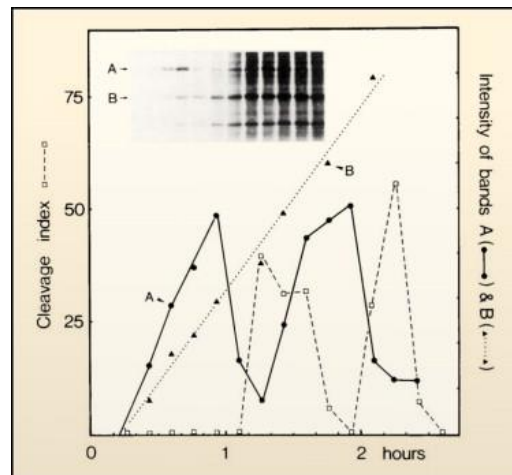


Figura 3. Figura del trabajo original (Evans et al., 1983). “La mayoría de embriólogos no toman muestras cada diez minutos”, fue la sencilla justificación de Tim Hunt para su descubrimiento en su conferencia de recepción del premio Nobel.

La regulación del ciclo celular es, por tanto, un proceso complejo en el que coexisten los tres conceptos: el “reloj” es la secuencia de eventos subyacente, impulsado por el “motor” o la maquinaria del ciclo (MPF: Cdk1/ciclina B) y los “puntos de chequeo” son los responsables de que todo ocurra sin errores (Nurse, 2000; Tyson & Novak, 2008). Con el tiempo han ido apareciendo más quinasas dependientes de ciclinas, más ciclinas (más motores, por tanto) y más puntos de chequeo, que explican una regulación pormenorizada del ciclo celular (Martínez-Alonso & Malumbres, 2020).

1.2. El ciclo celular y su regulación

El ciclo celular eucariota puede definirse como un conjunto ordenado de eventos que conducen a la reproducción de una célula en dos células hijas. Durante su ciclo, las células presentan dos estados diferenciados: estado de no división o interfase (duplicación de componentes celulares) y división celular o mitosis (segregación entre las células hijas de los componentes previamente duplicados) (figura 4). Es importante

destacar que, salvo excepciones, de una célula madre surgen dos células hijas “jóvenes” y no una “vieja” y una “joven”.

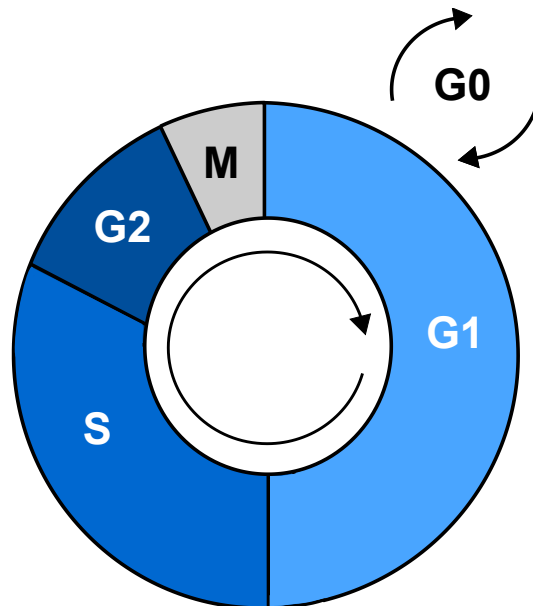


Figura 4. Esquema de las fases del ciclo celular. La interfase o etapa de no división, es el periodo más largo y está formada por varias fases (G1, S y G2) representadas en tonos azules. En la fase M o fase de división, representada en tono gris, se reparten los componentes celulares duplicados en la interfase entre las dos células hijas. Algunas células salen del ciclo “proliferativo” y entran en una fase de latencia celular (fase G0) pudiendo volver a reintegrarse en el ciclo. Los segmentos representan de forma aproximada la duración de las fases en células somáticas humanas. Si el ciclo celular tiene una duración de 24 horas, la fase G1 duraría 12 horas, la fase S unas 8 horas, la fase G2 entre 3 y 4 horas, y la fase M entre 1 y 2 horas.

1.2.1. Fases del ciclo celular

1.2.1.1. Interfase

La interfase es el periodo más largo de la vida de la célula, y a su vez está subdividida en varias etapas. En términos muy generales, en la primera fase, G1, se produce la duplicación de los componentes de la célula (orgánulos citoplasmáticos, proteínas estructurales, ARN, etc.) lo que resulta en un aumento del tamaño celular. A continuación, en la fase S o fase de síntesis, se produce la duplicación del material genético nuclear, y la revisión de la fidelidad de la misma, es decir, cada cromosoma se replica y pasa a estar formado por dos cromátidas hermanas, proceso en el que se duplica el contenido en ADN (valor c), pero la ploidía o número cromosómico permanece (valor n , $2n$ en células diploides). La última parte de la interfase, se denomina fase G2.

En esta fase, aunque también hay algo de crecimiento celular, se procuran corregir los posibles errores que las ADN polimerasas, el azar o la presencia de mutágenos hayan podido causar durante la replicación del material genético (Uzbekov & Prigent, 2022).

1.2.1.1.1. Fase G1

Comprende el periodo desde el final de la mitosis hasta el inicio de la fase S. Al finalizar la fase M, durante la fase G1, la célula aumenta de tamaño y sintetiza ARN mensajero, orgánulos y proteínas necesarias para las siguientes fases del ciclo. Además, comprueba también las condiciones en las que se encuentra, y decide si continuar con el ciclo celular, detenerlo o abandonarlo. Es el punto denominado “*Start*” en levaduras o *punto de restricción* en seres pluricelulares. Es un punto de no retorno altamente regulado con un papel fundamental para el complejo Cdk4/6-ciclina D y que temporalmente se sitúa 2-3 horas antes del comienzo de la replicación del ADN (Blagosklonny & Pardee, 2002). Una vez que se completan las proteínas requeridas y el crecimiento, la célula comienza la siguiente fase del ciclo celular, la fase S (Blomen & Boonstra, 2007).

Sin embargo, la mayoría de las células, en un organismo ya desarrollado, no se dividen constantemente, sino que abandonan el ciclo celular en la fase G1, temporal o permanentemente, entrando en una fase denominada G0 (algunas, sobre todo en plantas, pueden abandonar el ciclo en el periodo G2).

1.2.1.1.2. Fase G0

En esta fase, propuesta en 1963 (Lajtha, 1963), se pueden distinguir tres tipos de células: quiescentes, senescentes y diferenciadas. Las células quiescentes se encuentran en un estado reversible, del que pueden salir e ingresar de nuevo en el ciclo celular cuando se den las condiciones adecuadas. Las células senescentes por el contrario están en un estado irreversible. Este estado, está relacionado con células que presentan daños en el ADN y por tanto no son viables. Las células diferenciadas son células no proliferantes que han completado su proceso de diferenciación. Se dice que las células cancerígenas están indiferenciadas, pero se podría entender que dichas células, al contrario, están diferenciadas a proliferar permanentemente, sin limitaciones.

1.2.1.1.3. Fase S

Durante la fase S o fase de síntesis tiene lugar tanto la replicación del material genético como la duplicación de los centriolos. Es el período comprendido entre la fase G1 y la fase G2.

El ADN es una doble hélice antiparalela formada por una secuencia repetitiva de nucleótidos complementarios entre sí: adenina-timina y citosina-guanina unidos por puentes de hidrógeno. La replicación del ADN se realiza en múltiples sitios a la vez denominados orígenes de replicación. Para que se produzca la replicación del ADN, la hélice pierde la unión de las bases nitrogenadas, de tal manera que la doble hebra se abre y las dos cadenas quedan accesibles para que la maquinaria proteica pueda copiar el material genético (Burgers & Kunkel, 2017).

En la fase S, no solo se duplica el ADN, sino que también se sintetizan unas proteínas básicas asociadas a éste denominadas histonas, muy conservadas en la evolución. El ADN, junto con un octámero de histonas, forma el nucleosoma que se define como la unidad estructural básica de la cromatina, en la llamada fibra de 11 nm que, por intermediación de la histona H1, se plegará de forma helicoidal en la fibra de 30 nm que es la fisiológicamente relevante. La fibra de 30 nm, a su vez, en forma de lazos, se une a la matriz nuclear en interfase (factorías de transcripción y de replicación) o, al condensarse, al andamiaje (*scaffold*) cromosómico (topoisomerasa II α , condensina), formando la cromátida mitótica, con un grosor cercano a la media micra. En cromosomas de gran tamaño esta estructura puede plegarse nuevamente en helicoidal para conseguir una mayor compactación del material genético, en cuyo caso, a la fibra plegada se la denomina cromonema (Chu et al., 2020).

El centrosoma es el centro organizador de microtúbulos (MTOC, del inglés *Microtubule Organizing Centers*) en células animales (las plantas carecen de centrosomas, aunque sí tienen MTOCs) (Pickett-Heaps, 1969), y desempeña un papel importante durante la mitosis con la formación del huso bipolar. Al igual que el ADN, el centrosoma se duplica una vez por ciclo celular. Cuando finaliza la mitosis, cada una de las dos células hijas hereda un centrosoma formado por dos centriolos dispuestos de forma ortogonal, rodeados de material pericentriolar (PMC). Cada centriolo del centrosoma está formado por un microtúbulo de nueve tripletes ensamblados en una estructura en forma de rueda de carro. Durante la nueva fase G1, los centriolos se desacoplan transitoriamente, pero no es hasta la fase de síntesis cuando ocurre la duplicación. Durante la fase S temprana,

vuelven a recuperar la conexión y empieza a crecer en el extremo proximal de cada centriolo parental un procentriolo que durante la fase G2 del ciclo va a ir aumentando su tamaño y madurando. Durante la transición entre la fase G2/M, los dos centrosomas se separan gracias a la quinesina Eg5 (proteína asociada a MTs) cada uno con su material pericentriolar, y en la fase M formarán los dos polos del huso mitótico (Bornens, 2012; Fu et al., 2015).

1.2.1.1.4. Fase G2

Una vez finalizada la fase de replicación, se inicia la fase G2. Es una fase importante en la que se intentan reparar todos los errores que se hayan podido cometer durante la duplicación del material genético de tal forma que el ciclo celular se detendrá temporalmente si los daños no son reparados antes, en lo que constituye el punto de chequeo de daño al ADN de G2, con las proteínas ATM y ATR (del inglés, *Ataxia Telangiectasia Mutated* y *ATM and Rad3-related*, respectivamente) como principales implicadas (O'Connell et al., 2000). Es importante resaltar que una vez se separen las cromátidas hermanas en anafase, a la célula le resultaría imposible reparar errores en el ADN al carecer de la cromátida hermana con la que comparar. Durante esta fase, la célula también aumenta su tamaño porque comienza a prepararse para la entrada en fase M, de tal forma que los centrosomas comenzarán a separarse para dirigirse a zonas opuestas del exterior del núcleo. El aparato de Golgi pierde su organización al igual que el retículo endoplasmático. También hay un proceso de desfosforilación sin el cual las células no podrían reconocer mitógenos (Mascanzoni et al., 2019; Matson & Cook, 2017).

1.2.1.1.5. Fase M

La fase de división, mitosis o fase M, consiste en la generación de dos células hijas, genéticamente idénticas, a partir de una única célula. Para que este proceso pueda ser llevado a cabo con éxito, tiene que dividirse primero el material genético (cariocinesis) y, posteriormente, el citoplasma (citocinesis) entre las dos células hijas, manteniendo así la constitución y estabilidad genética. Es de destacar que la división del material genético debe de ser exacta, mientras que la del material citoplásmico suele ser tan sólo aproximada, existiendo numerosos ejemplos en desarrollo embrionario o de tejidos en los que es, y debe ser, claramente asimétrica.

1.2.1.2. Mitosis

La mitosis es el proceso mediante el cual una célula madre da origen a dos células hijas con la misma información genética. Durante este proceso, el material genético se reparte de forma precisa entre ambas células (cariocinesis) y, posteriormente, el citoplasma se divide de forma aproximada (citocinesis), garantizando la estabilidad genética. Es un proceso altamente regulado en el que principalmente interviene el complejo ciclina B/Cdk1 y el punto de chequeo del huso. La mitosis está dividida en varias fases que se describen a continuación (figura 5 y vídeo 1 de anexos).

1.2.1.2.1. Profase

Los centrosomas duplicados en la fase S, pueden comenzar a separarse al final de la fase G2 del ciclo o una vez la célula ha entrado en la primera fase de la división celular llamada profase. Se separan hacia polos opuestos de la periferia nuclear donde en torno a ellos comienza a formarse el huso bipolar mitótico. A nivel nuclear, el nucléolo desaparece y la cromatina comienza a condensarse. Al inicio de la profase se observa como filamentos laxos, pero conforme avanza los plegamientos son mayores para constituir los cromosomas (Nunes & Ferreira, 2021) con sus dos cromátidas hermanas visibles al comienzo de la prometafase (Giménez-Abián et al., 1995) unidas por concatenaciones de ADN y por complejos de cohesinas (Díaz-Martínez et al., 2008). El centrómero constituye la clásicamente llamada constricción primaria, en la que, en mitosis, se organiza una estructura multiproteica denominada cinetocoro que es donde se van a anclar los microtúbulos del huso bipolar (Paulson et al., 2021) (figura 8). A nivel citoplasmático, hay una reorganización y desaparición del citoesqueleto para poder formar el huso mitótico usando sus componentes básicos (tubulina), y hay una pérdida parcial de adhesión en células en cultivo haciendo que la célula adquiera una forma redondeada.

1.2.1.2.2. Prometafase

La envoltura nuclear separa el contenido nuclear del contenido citoplasmático. La membrana nuclear interna, está formada por un entramado de filamentos intermedios que se denomina lamina nuclear compuesta por las proteínas lamina A, B y C. Durante la profase, la envoltura nuclear comienza a despolimerizarse por fosforilación de las proteínas de la envuelta. Una vez está completamente fragmentada comienza la

prometafase. En ese momento de ruptura, la barrera física existente entre los cromosomas y el citoplasma desaparece. El huso bipolar está completamente formado y los microtúbulos cinetocóricos o fibras K pueden unirse a los cinetocoros de los cromosomas para biorientarlos y formar la placa metafásica (Ferreira & Maiato, 2021).

El cinetocoro está formado por varias capas, cada una con sus complejos macromoleculares correspondientes que intervienen activamente en el proceso de biorientación de los cromosomas (figura 8). Las células animales tienen una extensión transitoria del cinetocoro externo denominado corona fibrosa. Está formada por un complejo denominado ROD–ZW10–Zwilch–Spindly que recluta una serie de proteínas implicadas en la congregación cromosómica como por ejemplo CENP-E (del inglés, *Centromere associated protein E*), una proteína motora que se encarga de mover hacia el ecuador de la célula a los cromosomas que inicialmente han orientado hacia uno u otro polo (Navarro & Cheeseman, 2021).

La correcta unión de los cinetocoros hermanos con las fibras K hacia polos opuestos (anfitética) está regulada por un complejo denominado CPC (Complejo Pasajero Cromosómico). Está compuesto por cuatro proteínas: aurora B, INCENP, survivina y borealina. Este complejo, y especialmente aurora B (que es fosforilada para ello por aurora A), es esencial para detectar los errores de anclaje entre los microtúbulos y los cinetocoros y corregirlos. Como se ha dicho, el anclaje correcto es el anfitético, pero existen otros posibles que la célula debe evitar: en el anclaje monotético, solo uno de los dos cinetocoros hermanos ha anclado a uno de los polos, mientras que en el sintético los dos cinetocoros se han unido, pero a microtúbulos del mismo polo (este anclaje, aberrante en mitosis, es el correcto en la primera división meiótica). Las orientaciones monotéticas, sintéticas o las ausentes carecen de tensión entre cinetocoros hermanos y, por tanto, impiden la satisfacción del punto de chequeo del huso (véase el apartado 1.3). Por otra parte, hay anclajes merotéticos en los que una cromátida se une a microtúbulos de ambos polos en los que sí se genera tensión (Cheeseman, 2014).

1.2.1.2.3. Metafase

La metafase comienza cuando todos los cinetocoros de todas las cromátidas hermanas están anclados anfitéticamente a microtúbulos provenientes de polos opuestos, es decir, han congregado, biorientado, y forman la placa ecuatorial o placa metafásica. En este momento, el punto de chequeo del huso (SAC) se satisface: se liberan concatenaciones de ADN y se rompe el anillo de cohesina perdiéndose la cohesión entre las cromátidas

hermanas, permitiendo así su segregación posterior a polos opuestos de la célula. Asimismo, se degrada una segunda diana del SAC: ciclina B, lo cual permitirá tanto el avance a la anafase como la posterior salida de mitosis e ingreso en la interfase siguiente (Díaz-Martínez et al., 2008).

1.2.1.2.4. Anafase A

Una vez la ciclina B se ha degradado y se rompe la unión centromérica entre las dos cromátidas hermanas, éstas se separan y se mueven rápidamente hacia los polos opuestos de la célula (segregación). El movimiento se produce por despolimerización de los microtúbulos del cinetocoro generando fuerzas que tiran de las cromátidas en sentidos opuestos.

1.2.1.2.5. Anafase B

La segregación continúa hacia los extremos de la célula, y la separación cada vez es mayor por la tensión y fuerza que los microtúbulos astrales hacen tirando de cada uno de los centrosomas junto con otras proteínas motoras; asimismo los polos del huso mitótico se separan entre sí por interacciones entre los microtúbulos interdigitados (no cinetocóricos) de la zona central del huso (Vukušić & Tolić, 2021).

1.2.1.2.6. Telofase

El material genético se ha dividido de forma equitativa entre las dos células hijas. En este momento, las cromátidas de cada uno de los núcleos hijos comenzarán a descondensarse y se reformará la envoltura nuclear en cada uno de los núcleos hijos.

1.2.1.2.7. Citocinesis

La separación del citoplasma entre las dos células hijas se solapa con la última fase de la cariocinesis. La separación se produce en la zona ecuatorial de la célula por la formación del anillo contráctil (en inglés, *midbody*). Este anillo está formado por filamentos de actina, miosina II y los restos del huso mitótico, que tras completarse la abscisión se tienen que desensamblar (Glotzer, 2005).

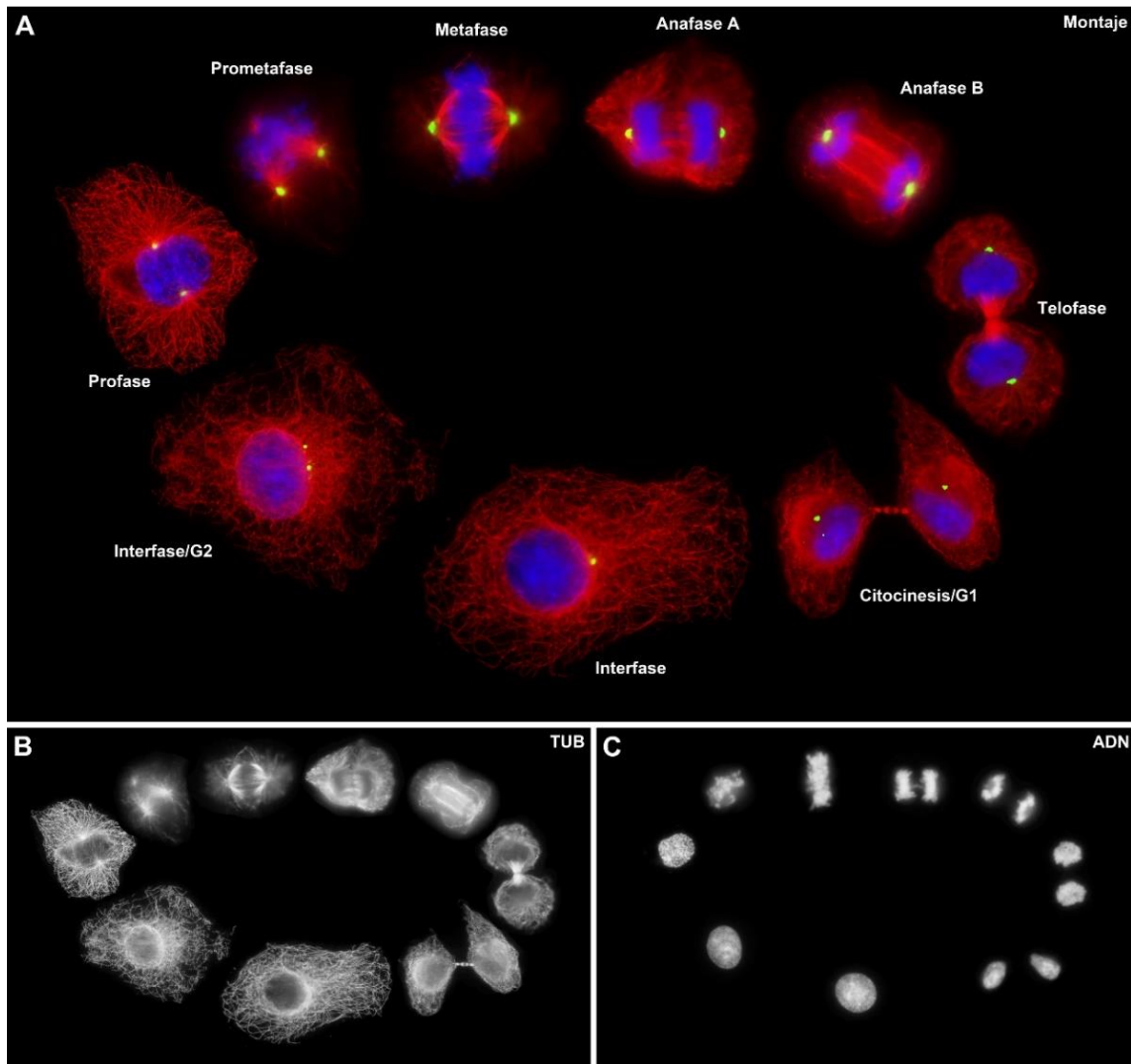


Figura 5. Composición de micrografías de las fases del ciclo celular. Inmunofluorescencia indirecta en células A549. Inmunomarcaje de α -tubulina (rojo), pericentrina (verde) y ADN (azul). (A) Montaje con los tres marcadores; (B) Marcaje de α -tubulina; (C) Marcaje del ADN. Las células están a diferente aumento (las mitosis están 2-3 veces a más aumento que las interfases para una mejor observación).

La duración del ciclo celular varía en función de la especie, la edad e incluso dentro de un mismo organismo varía en función del tipo de tejido y línea celular. Por ejemplo, durante las primeras etapas del desarrollo embrionario la proliferación celular es muy alta, pero según se va avanzando en el desarrollo las tasas de proliferación disminuyen o se detienen, ajustándose en cada momento a las necesidades del organismo. En términos generales, en la especie humana, las células somáticas de un adulto tienen una duración del ciclo celular de 24 horas. La fase G1 comprende prácticamente la mitad de la duración del ciclo, 12 horas. La segunda etapa mayoritaria es la fase S que abarca unas 8 horas. Seguidamente, la fase de corrección de errores, fase G2, dura unas 3

horas, y finalmente la fase de mitosis es la más corta con una duración de 1-2 horas (Yanagida, 2014).

1.2.2. Regulación del ciclo celular

El sistema de control del ciclo celular está compuesto por interruptores bioquímicos que desencadenan los eventos del ciclo en orden determinado garantizando la correcta progresión del ciclo celular.

Los principales componentes de la maquinaria del ciclo celular son dos familias de proteínas llamadas ciclinas y quinasas dependientes de ciclina (Cdks). Los puntos de chequeo interrelacionan, mediante rutas de señalización sensor-transductor-diana, procesos bioquímicamente independientes generando una relación que liga el comienzo de un proceso a la correcta compleción del anterior; entre sus dianas está la destrucción de ciclinas (figura 6).

1.2.2.1. Ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas

1.2.2.1.1. Ciclinas

Las ciclinas fueron descubiertas en 1983 por Hunt mientras realizaba estudios sobre el ciclo celular en erizos de mar (Evans et al., 1983). Son una familia de proteínas bastante heterogénea (entre 36-87 kDa), pero todas tienen en común una secuencia de aminoácidos denominada caja de la ciclina a través de la cual va a interactuar con la Cdk activando la función quinasa de ésta. Las ciclinas, como su nombre indica, son cíclicas en cuanto a su síntesis y degradación, con una vida media corta. En cada una de las fases del ciclo celular intervienen unas u otras (Morgan, 2007).

Inicialmente se pensó que una ciclina controlaba la progresión de todo el ciclo, pero, posteriormente, se identificaron cuatro ciclinas principales.

1.2.2.1.2. Quinasas dependientes de ciclina

Las quinasas dependientes de ciclina (Cdks) fueron descubiertas gracias a los estudios llevados a cabo por Lee Hartwell y Paul Nurse en *S. cerevisiae* y *S. pombe*, respectivamente. Son una familia de enzimas, concretamente serina/treonina quinasas,

muy conservadas durante la evolución. Todas las Cdks necesitan de la unión de una subunidad reguladora de ciclina para su activación enzimática. Originalmente se identificaron como enzimas que controlan eventos del ciclo celular, sin embargo, miembros de esta misma familia están involucrados en otros procesos celulares. Por ejemplo, las células animales tienen al menos 9 Cdks de las cuales solo 4 están implicadas directamente en el control del ciclo celular. En las levaduras de fisión, *S. pombe*, y de gemación, *S. cerevisiae*, todos los eventos del ciclo celular están controlados por una única Cdk, llamada Cdc2 y Cdc28, respectivamente. En organismos eucariotas pluricelulares está controlado por dos Cdks, Cdk1 y Cdk2 que trabajan principalmente en la fase M y S del ciclo, respectivamente. Además, las células animales tienen dos Cdks más (Cdk4 y Cdk6) que participan en la regulación del ciclo celular y que son importantes para controlar la entrada en el ciclo celular en respuesta a factores extracelulares (Łukasik et al., 2021).

Son proteínas de unos 30-40 kDa aproximadamente, cuya estructura terciaria está formada por un lóbulo amino-terminal y un lóbulo carboxilo-terminal. El surco que hay entre los dos lóbulos, es el sitio catalítico, el sitio de unión de ATP. Las Cdks en ausencia de ciclina son inactivas, y su activación requiere cambios estructurales en el sitio activo. Cuando la ciclina y la Cdk se unen, la actividad catalítica se activa, pero previamente a ello la Cdk tiene que ser fosforilada en un residuo de treonina de su lazo T por un complejo denominado CAK o quinasa activadora de Cdk.

Los principales complejos ciclina/Cdk que se conocen en la actualidad son los siguientes: durante la fase G1 del ciclo intervienen Cdk6 y Cdk4 junto con ciclina D, en la transición G1/S interviene Cdk2 y ciclina E, durante la fase S encontramos a Cdk2 y ciclina A, entre la transición G2/M actúa Cdk1 y ciclina A y durante la mitosis hasta que la célula comienza la anafase encontramos Cdk1 y ciclina B.

Las Cdks también pueden ser inhibidas por unos complejos denominados Cki como por ejemplo las proteínas p21 y p27 que se unen a la Cdk bloqueando su sitio activo. Por otra parte, las ciclinas se degradan mediante ubiquitinación por parte de enzimas ubiquitina E3 ligasas como por ejemplo el complejo SCF (del inglés, *Skp, Cullin, F-box containing complex*) que ubiquitina ciclinas G1/S o el complejo APC/C (del inglés, *Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*) que ubiquitina a la ciclina B, responsable en la fase M del ciclo celular, siendo así marcadas para su degradación por el proteasoma (Hives et al., 2023).

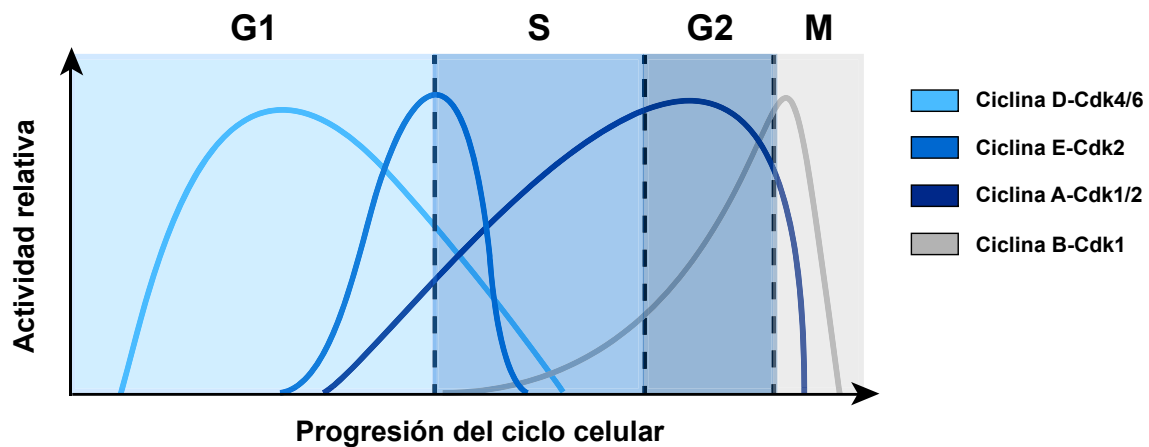


Figura 6. Representación esquemática de los complejos ciclina-Cdk que predominan en cada una de las fases del ciclo celular. Cada complejo ciclina-Cdk predomina en una fase concreta del ciclo celular, como en el caso de la mitosis que es el complejo ciclina B-Cdk1 (gris).

1.2.2.2. Puntos de chequeo del ciclo celular

Un punto de chequeo o de control es un mecanismo que establece una relación de interdependencia entre dos procesos no relacionados bioquímicamente. Los puntos de chequeo existen para hacer a un suceso posterior dependiente de la correcta finalización de un evento anterior. Para ello un punto de chequeo necesita un sensor, un transductor de la señal y una diana (Clarke & Giménez-Abián, 2000; Nurse, 2000).

El descubrimiento, definición y explicación de las características de los puntos de chequeo por parte de Lee Hartwell es una de las grandes contribuciones al conocimiento de la regulación del ciclo celular. La idea es que la célula monitoriza diferentes procesos y hace depender su progresión en el ciclo celular de la compleción y correcta conclusión de los mismos. Esta dependencia puede de hecho perderse (mutaciones), lo cual nos indica y demuestra que la dependencia no es intrínseca a los procesos sino debida a un mecanismo de control. Un punto de chequeo determinado está siempre activo y sólo la conclusión del proceso por él monitorizado lo desactiva, permitiendo la progresión a la siguiente fase del ciclo (Hartwell & Weinert, 1989). Así, una célula no entrará en mitosis si no ha terminado de replicar su ADN, ni tampoco lo hará si hay daño en el mismo. De igual manera, una célula no entrará en anafase mientras queden cromosomas por biorientar en la placa metafásica. Si no se dan los requisitos necesarios para pasar a la siguiente fase, el ciclo se frena o se detiene (Barnum & O'Connell, 2014; Visconti et al., 2016).

En muchos organismos superiores, incluyendo mamíferos, los puntos de chequeo tienen propiedades que, en la práctica, los hacen parecer imperfectos: 1) no afectan a todas las células por igual, 2) son caducos en el tiempo, 3) presentan diferente rigurosidad/laxitud (combinación de 1 y 2) tanto entre especies como incluso entre líneas celulares de la misma especie y 4) no todos los procesos celulares son monitorizados (Chao et al., 2017; Clarke et al., 2006). La célula monitoriza sobre todo la exactitud en la duplicación y segregación del genoma mientras que la duplicación y segregación de la mayoría de sus orgánulos es tan solo aproximada. No trataremos sobre todos ellos.

En algunos casos los podemos agrupar por su función: daño al ADN (se encuentran presentes en G1, S y G2 y en todos participan las quinasas ATM y ATR tanto en levaduras como en mamíferos) (Shaltiel et al., 2015); dependientes de topoisomerasa II (Clarke et al., 2006) (se aseguran de la correcta liberación de concatenaciones para poder resolver, separar y segregar cromátidas hermanas, localizados en G2 y mitosis, comunes a levaduras, plantas y mamíferos), el punto de chequeo de abscisión (Petsalaki & Zachos, 2021) (monitoriza que no haya cromosomas retrasados durante la citocinesis), punto de chequeo de tetraploidía (Margolis et al., 2003) (una vez ya han ocurrido errores en mitosis insalvables se asegura de bloquear en G1 células con contenido excesivo –tetraploide- de ADN, su existencia es muy debatida).

Los puntos de chequeo se encuentran ubicados en etapas clave del ciclo celular y a nivel práctico constituyen diferentes dianas de tratamientos antitumorales (Song et al., 2024). A continuación, se destacan de forma resumida sólo los más relevantes (figura 7).

1.2.2.2.1. Transición G1/S

Se comprueba que la célula tenga las condiciones adecuadas para entrar en la fase de replicación del material genético. El punto de control verifica factores tanto internos como externos de la célula. Por un lado, a nivel externo comprueba la disponibilidad de nutrientes, la llegada de factores de supervivencia, mitógenos. Por otro lado, a nivel interno comprueba si se han duplicado los componentes celulares, el tamaño celular, el estado metabólico de la célula y la integridad del ADN.

La señalización implicada en este punto de control, al igual que en todos, es muy compleja. Consiste en la hiperfosforilación de la proteína de retinoblastoma (pRb) para que el factor de transcripción E2F quede libre, lo que permite la expresión de genes necesarios para la fase S. Por otro lado, el APC/C se inhibe para evitar que ubiquitine a

la ciclina A, la cual es necesaria para la activación de Cdk2 en la fase S (Rubin et al., 2020).

1.2.2.2. Fase S

Es el mecanismo de vigilancia que asegura que la replicación del ADN ocurra de forma correcta antes de la fase G2. Controla que la replicación se desarrolle sin interrupciones, que todo el ADN se replique por completo pero que sólo sea una única vez por ciclo para evitar la inestabilidad genética. Además, también controla si se producen daños en el ADN. Las proteínas principales implicadas en este punto de chequeo son las quinasas ATR, ATM y Chk1 (Ciardo et al., 2019).

1.2.2.3. Transición G2/M

Por un lado, controla que toda la maquinaria necesaria para la regulación de la mitosis esté lista. Para ello, es necesario que el complejo ciclina B-Cdk1 se active. Por otro lado, es el punto de chequeo donde se produce la reparación de errores que se hayan podido cometer en la fase de síntesis del ADN. En este caso, hay una cascada de señalización en la que están involucradas varias quinasas (incluidas ATM y ATR de nuevo) que si se detectan daños en el ADN se activan para impedir el inicio de la fase M (Yam et al., 2022).

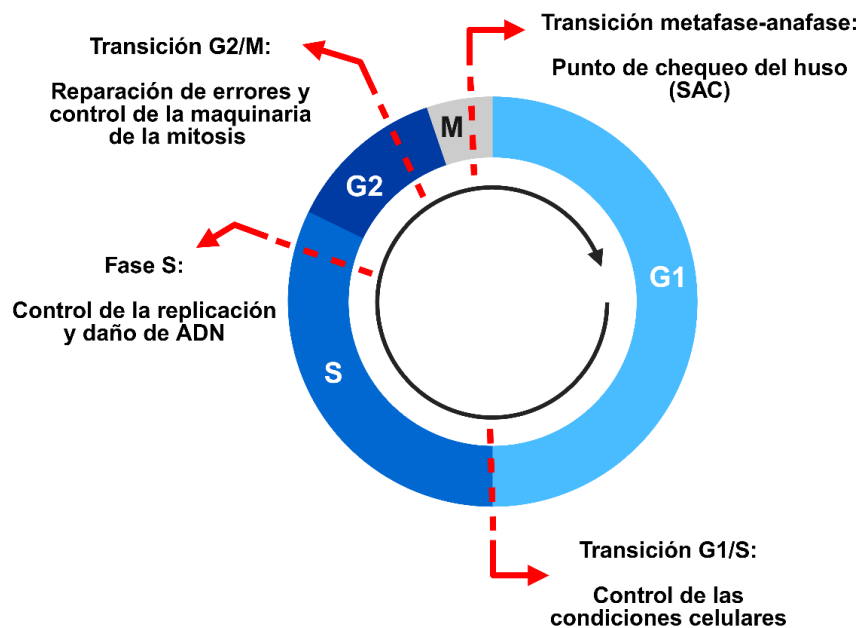


Figura 7. Esquema de los principales puntos de chequeo del ciclo celular. Los puntos de chequeo se localizan en transiciones clave para la correcta progresión del ciclo celular. Si la célula detecta algún fallo, detiene su progresión en el ciclo e intenta repararlo.

1.2.2.2.4. Transición metafase-anafase

A este punto de chequeo (de sus siglas en inglés, *Spindle Assembly Checkpoint*, SAC) le dedicaremos el siguiente apartado ya que la presente tesis se centra en la comparación de las características, nivel de rigor y dinámica del punto de chequeo del huso entre líneas celulares de roedores y humanas y entre líneas celulares inmortales y transformadas.

1.3. Punto de chequeo del huso (SAC)

1.3.1. Función, descubrimiento y mecanismo

Altos niveles de ciclina B-Cdk1 impulsan la entrada en mitosis. Cuando la envoltura nuclear se rompe, los microtúbulos del huso bipolar empiezan a anclar a los centrómeros de los cromosomas a través de sus cinetocoros. Todas estas estructuras son importantes para la correcta segregación cromosómica. En primer lugar, el centrómero es una región especial de ADN (altamente repetido, satélite), formada por heterocromatina constitutiva, con ausencia de genes, y una histona específica (CENP A en metazoos) que va a ser reconocida por multitud de proteínas, ensamblándose en la maquinaria proteica que constituye el cinetocoro el cual es la interfaz entre los cromosomas y el huso mitótico, y en el caso de mamíferos presenta una estructura trilaminar (figura 8). Mientras que el cinetocoro interno persiste durante todo el ciclo, el cinetocoro externo se ensambla sólo de cara a la mitosis. Estas proteínas del cinetocoro permiten el anclaje de los microtúbulos del huso que van a proporcionar la fuerza necesaria para primero biorientar los cromosomas en la placa ecuatorial y posteriormente segregar las cromátidas hermanas a las dos células hijas. Igualmente, proteínas de los cinetocoros son también responsables de 1) la verificación de los anclajes al huso por medio del complejo NDC80, 2) la corrección de defectos en los mismos y 3) la señalización del punto de chequeo del huso. El huso bipolar se organiza alrededor de los MTOCs que, en muchas especies, tienen en su centro una pareja centriolar (a diferencia de las plantas que carecen de centriolos).

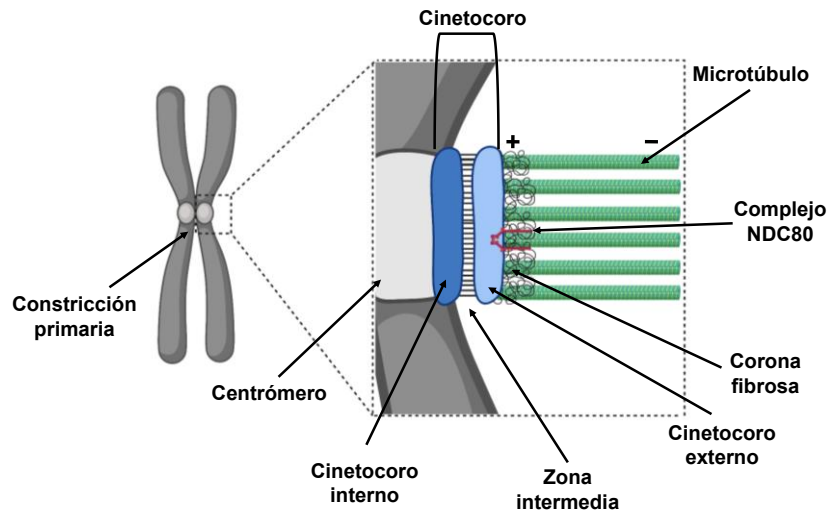


Figura 8. Simplificación esquemática de la estructura trilaminar del cinetocoro de mamíferos, basado en (Rieder & Salmon, 1998). El cinetocoro es una estructura multiproteica localizada en la región centromérica de los cromosomas. En mamíferos presenta una organización trilaminar: la placa interna, la zona intermedia y la placa externa. La zona interna se asocia con el ADN del centrómero, mientras que la intermedia conecta con el cinetocoro externo. En la zona externa se localiza el complejo NDC80, encargado de anclar los microtúbulos del huso a través de su extremo positivo. Además, posee una extensión, la corona fibrosa, que recluta proteínas, como CENP-E, que ayudan a la congregación de los cromosomas en la placa ecuatorial.

Es crucial que cada célula hija reciba una copia, y sólo una, de todos y cada uno de los cromosomas presentes en la célula madre para evitar la generación de aneuploidías y por tanto una posible causa de desarrollo de cáncer (B. A. Weaver & Cleveland, 2006) o de alteraciones durante el desarrollo embrionario. De hecho, la falta de segregación de un número grande de cromosomas provoca la muerte celular de la descendiente que carece de información genética suficiente para sobrevivir (Boveri, 2008) (la cita de 2008 presentada es una traducción del trabajo de Boveri, el cual publicó estas observaciones en 1902 y 1914).

Con la ruptura de la envoltura nuclear, en el irreversible paso profase/prometafase, unos cromosomas se encontrarán más cerca de uno u otro polo mientras otros estarán más cerca de la placa ecuatorial. Esto provoca que el proceso de anclaje de los cinetocoros a los microtúbulos del huso ocurra fundamentalmente al azar, aunque no completamente (Soares-de-Oliveira & Maiato, 2022). Una vez un cromosoma se encuentra biorientado en la placa metafásica (con cada cinetocoro hermano anclado a los polos opuestos del huso bipolar fruto de la tensión establecida por su conexión a las fibras K) podría ya segregar sus cromátidas hermanas a polos opuestos. Este azar en el proceso implica

que unos cromosomas podrían estar segregando mientras otros no hubieran biorientado todavía, de manera que la citocinesis podría ocurrir atrapando cromosomas completos, o falta de ellos, en alguna de las células hijas, con la generación correspondiente de aneuploidías. Para asegurarse que ningún cromosoma separe sus cromátidas hasta que todos ellos hayan biorientado en la placa ecuatorial existe el punto de chequeo del huso o SAC, que retrasa el comienzo de la anafase proporcionando un tiempo extra para permitir (Prosser & Pelletier, 2017) que el último cromosoma llegue a la placa ecuatorial.

El SAC opera como un mecanismo de vigilancia molecular que controla el estado de anclaje de cada cinetocoro al huso y/o la tensión entre cinetocoros de cromátidas hermanas y transduce esa señal hasta sus dianas que son: la degradación de ciclina B (que permite la segregación cromosómica y la salida de mitosis) y la ruptura del anillo de cohesina (que permite la separación de cromátidas hermanas) (Clarke & Giménez-Abián, 2000) así como la liberación de las últimas concatenaciones de ADN entre cromátidas hermanas (Giménez-Abián et al., 2002). El SAC tiene que ser sensible, es decir, tiene que detectar rápidamente cuando un cinetocoro no está unido a microtúbulos del huso, pero también tiene que ser robusto, sin importarle las variaciones que pueda haber entre las uniones cinetocoro-microtúbulo y, por último, debe ser rápido apagando su señalización cuando está satisfecho para poder continuar a la siguiente fase (McAinsh & Kops, 2023).

Los orígenes del descubrimiento del SAC fueron como sigue: Andrew Bajer ya reparó, en películas *time-lapse* en contraste de fases de células en mitosis del endospermo líquido de *Haemaphysalis katherinae* que células bloqueadas en mitosis con colchicina (denominado c-mitosis porque colchicina es el agente con el que primero se describió) terminaban por pasar a interfase (c-telofase lo llamó) después de horas de bloqueo (Molè-Bajer, 1957). Raymond Zirkle en 1970 irradió células en mitosis de *Triturus viridescens* y observó que el inicio de la anafase era más largo si la irradiación ocurría después de que el último cinetocoro llegara a la placa ecuatorial (Zirkle, 1970). Los experimentos de Conly Rieder, discípulo de Bajer, en *Potorous tridactylus*, cortando mediante irradiación láser fragmentos cromosómicos (figura 9 B), centrómeros completos o cinetocoros individuales, durante prometáfase, demostraron que un solo cinetocoro no anclado al huso era suficiente para señalar el retraso de la anafase (Rieder et al., 1994). Bruce Nicklas, mediante micromanipulación de espermatozoides de mantis (figura 9 A), demostró la necesidad de tensión en todos los cinetocoros para el apagado del punto de chequeo del huso. En la primera división meiótica se forma un

trivalente sexual que, en ocasiones, aparece como un bivalente más un monovalente, bloqueándose en esas células el paso a anafase. Al tirar por micromanipulación del monovalente esas células entran en anafase sin retraso (Li & Nicklas, 1995; Nicklas & Ward, 1994).

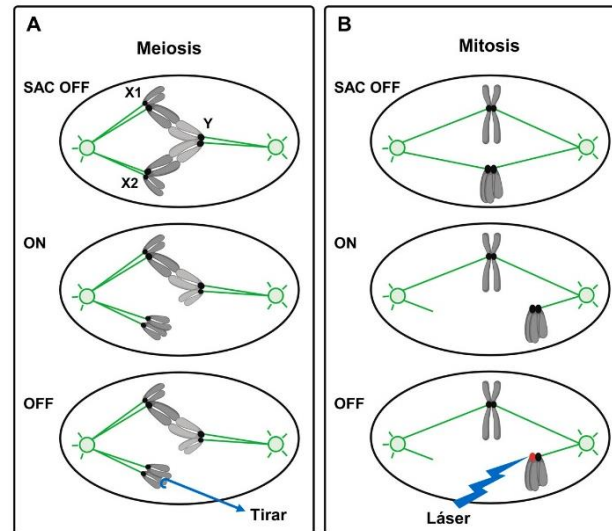


Figura 9. Esquema de los experimentos de Rieder y de Nicklas. Modificado de (Lara-Gonzalez et al., 2012). (A) Experimentos de Bruce Nicklas que demuestran que la tensión es necesaria en todos los cinetocoros para satisfacer el SAC. (B) Experimentos de Conly Rieder que demuestran que un solo cinetocoro no anclado retrasa la entrada en anafase.

Con todo ello, quedó demostrada la existencia de un punto de chequeo y que su satisfacción dependía de 1) el anclaje de todos los cinetocoros al huso y 2) la necesidad de tensión entre cinetocoros. La posterior identificación, por Gary J. Gorbsky, del anticuerpo 3F3/2 abrió el camino para entender cómo la célula era capaz de convertir una señal física (tensión) en una bioquímica (fosforilación), véase la figura 10 (Nicklas et al., 1995).

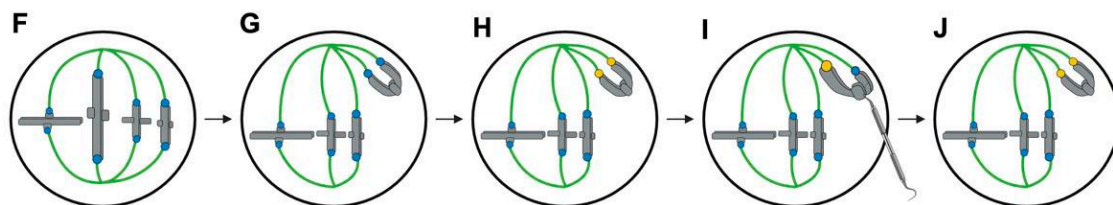


Figura 10. Representación esquemática del experimento principal del trabajo de Nicklas/Gorbsky. Modificado de (Clarke & Giménez-Abián, 2000). Cuando por micromanipulación se fuerza a un cromosoma bivalente, en metafase I meiótica de *Melanoplus* (saltamontes) a anclar sus dos cromosomas al mismo polo, ambas parejas cinetocóricas carecen de tensión y son positivas para el anticuerpo 3F3/2. Al tirar experimentalmente de uno de los cromosomas la señal desaparece del cromosoma sometido a tensión (panel I).

Todos estos trabajos permitieron explicar el funcionamiento real del punto de chequeo del huso y aportar coherencia conceptual al mismo, algunos de cuyos componentes habían sido identificados pocos años antes por estudios genéticos en levaduras: las familias Mad (del inglés, *Mitotic Arrest Deficient*) y Bub (del inglés, *Budding Uninhibited by Benzimidazole*) (Hoyt et al., 1991; R. Li & Murray, 1991).

El punto de chequeo permanece activo desde el inicio de la mitosis hasta que todos los cinetocoros de todas las cromátidas hermanas estén unidas de forma estable con los microtúbulos de polos opuestos de la célula, biorientando así los cromosomas. Los cinetocoros que no están unidos por microtúbulos, emiten una señal de “espera” que promueve el ensamblaje de un complejo formado por 4 proteínas (Mad2, Bub3, BubR1 o Mad3 y Cdc20) llamado MCC (del inglés, *Mitotic Checkpoint Complex*). En el cinetocoro, la proteína Mad1 (del inglés, *Mitotic Arrest Deficient 1*) recluta a Mad2 (del inglés, *Mitotic Arrest Deficient 2*) provocando, en Mad2, un cambio de conformación de abierta a cerrada, lo que permite que secuestre Cdc20, formándose el MCC. Una vez formado el MCC, se libera al citoplasma, y ese complejo, al mantener secuestrado a Cdc20, se encarga de bloquear la activación del APC/C para evitar una anafase prematura.

En el momento, en el que todos los cromosomas están unidos de forma anfitélica mediante las fibras K a los MT de polos opuestos de la célula, el complejo MCC se desensambla permitiendo la liberación de Cdc20. Para que el MCC se desensamble ocurren tres procesos fundamentales: el cese de la producción del complejo MCC, la disminución de la señal del SAC y la desaparición de la inhibición del APC/C (véase el apartado 5.2.2 de la discusión para más detalle).

En ese momento, la proteína Cdc20 se une al APC/C activándolo. APC/C es una ubiquitina E3 ligasa que al activarse comienza a ubiquitinar varios sustratos para su degradación. Por un lado, ubiquitina a securina permitiendo la liberación de separasa de tal forma que separasa puede romper el complejo shugosina-PP2A y a Scc1, abriendo así el anillo de cohesina, y permitiendo la separación entre las dos cromátidas hermanas. Por otro lado, ubiquitina a ciclina B1 desensamblando el complejo Cdk1-ciclina B, y quedando Cdk1 inactiva. Es en este momento cuando se licencia la anafase y la célula puede progresar hacia la interfase siguiente (Lara-Gonzalez et al., 2012) (figura 11).

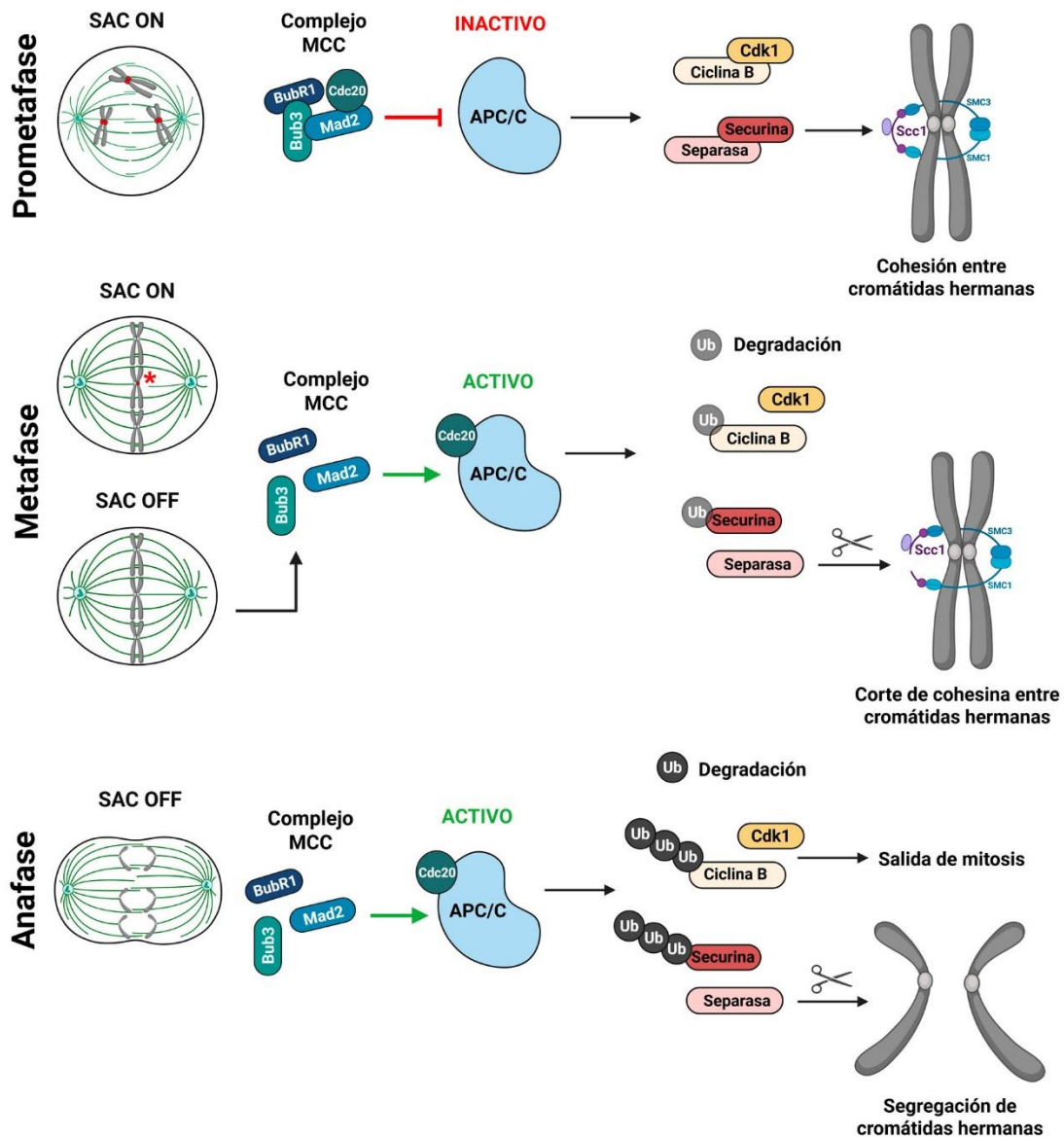


Figura 11. Representación esquemática simplificada de la ruta bioquímica del punto de chequeo del huso. Desde el inicio de la mitosis, el SAC está activo. Los cinetocoros no unidos a MTs del huso señalizan para la formación del complejo MCC, que se une a Cdc20 inhibiendo el APC/C. Durante la metafase, una vez que todos los cromosomas están anclados de forma correcta a MTs del huso, el complejo MCC se desensambla, liberando Cdc20 que se une al APC/C. El APC/C, una vez activo, comienza a ubiquitinar a securina y ciclina B para su degradación. Durante la anafase, la cohesión entre cromátidas hermanas se ha perdido de tal forma que se van a segregar entre las dos células hijas, y los niveles de ciclina B han disminuido impidiendo la formación del complejo ciclina B-Cdk1 lo que permite la salida de mitosis.

1.3.2. Evasión del punto de chequeo del huso

La mitosis es una de las principales dianas de los tratamientos anticancerígenos desde mucho antes de que el punto de chequeo del huso fuera identificado y comprendido. La teoría subyacente era que, frente a las células no transformadas, las células cancerosas proliferan con rapidez, de forma descontrolada, lo cual implica que deben atravesar la mitosis con frecuencia. Atacar el proceso de división mitótica debería, en teoría, perjudicar diferencialmente más a las células tumorales que a las normales. Tras los primeros experimentos con colchicina (agente desestabilizante de microtúbulos) en plantas, perros y humanos (incluyendo tratamientos antitumorales) en los años cuarenta (revisado en (M. Levine, 1951)), los siguientes antimitóticos utilizados en clínica en la década de los sesenta eran venenos microtubulares obtenidos de *Vinca rosea* (*Catharanthus roseus*) que, de nuevo, son agentes desestabilizantes de microtúbulos (Noble et al., 1958). Posteriormente, en la década de los setenta se añadió el Taxol® (paclitaxel) y sus derivados (Wani et al., 1971), siendo el primer agente estabilizante de microtúbulos utilizado en clínica (véase el apartado 1.4.2 para más detalle).

Los fármacos antimitóticos tienen distintas dianas dentro de la mitosis: pueden afectar al ensamblaje del huso como es el caso de fármacos estabilizantes y desestabilizantes de microtúbulos, que ya hemos nombrado. Otros agentes pueden afectar a la mitosis sin afectar a los microtúbulos, al inhibir proteínas que afectan a la congregación cromosómica, como por ejemplo CENP-E, o pueden dirigirse contra la maquinaria del SAC como inhibidores de aurora quinasas, de polo-like quinazas, Mps1 quinasa o Hec1 (Bai et al., 2023), o directamente contra la decatenación del ADN y la separación de cromátidas hermanas, por inhibición de topoisomerasa II, como el etopósido (Clarke et al., 1993).

Aunque la idea original fuera frenar el cáncer al bloquear la mitosis de sus células hoy se sabe que: 1) a las concentraciones intratumorales estos agentes en ocasiones no bloquean la mitosis, sino que tan sólo la perturban; 2) las células bloqueadas no lo son de forma permanente sino transitoria; y 3) la frecuencia de células atravesando mitosis en un tumor, durante la duración del tratamiento con antimitóticos es, en general, muy baja; lo cual no explica el éxito clínico de algunos de estos agentes y el fracaso de otros (Yan et al., 2020). Comentaremos algunos de estos aspectos en los apartados que siguen.

1.3.2.1. Destino celular tras la evasión del SAC

El punto de chequeo del huso, como todos los puntos de chequeo, no es permanente y, con el tiempo, las células lo evaden (en inglés, *mitotic slippage*) y siguen una variedad de destinos. En primer lugar, las células bloqueadas en c-mitosis, pueden sufrir catástrofe mitótica y morir. La catástrofe mitótica es considerada un mecanismo oncosupresor porque impide la supervivencia de las células que sufren arresto mitótico prolongado (Vitale et al., 2011). Es considerada un tipo de muerte celular principalmente por apoptosis o necroptosis, aunque también se ha visto que puede desencadenar la muerte vía autofagia (Sazonova et al., 2021).

En segundo lugar, las células bloqueadas en c-mitosis, pueden evadir el punto de chequeo del huso. Tras el escape del SAC, las células pueden morir por alguno de los mecanismos de muerte celular, pueden quedar arrestadas o senescentes en G1 o pueden continuar el ciclo celular (Cheng & Crasta, 2017). La variedad de destinos celulares tras el bloqueo en c-mitosis se representa en la siguiente figura:

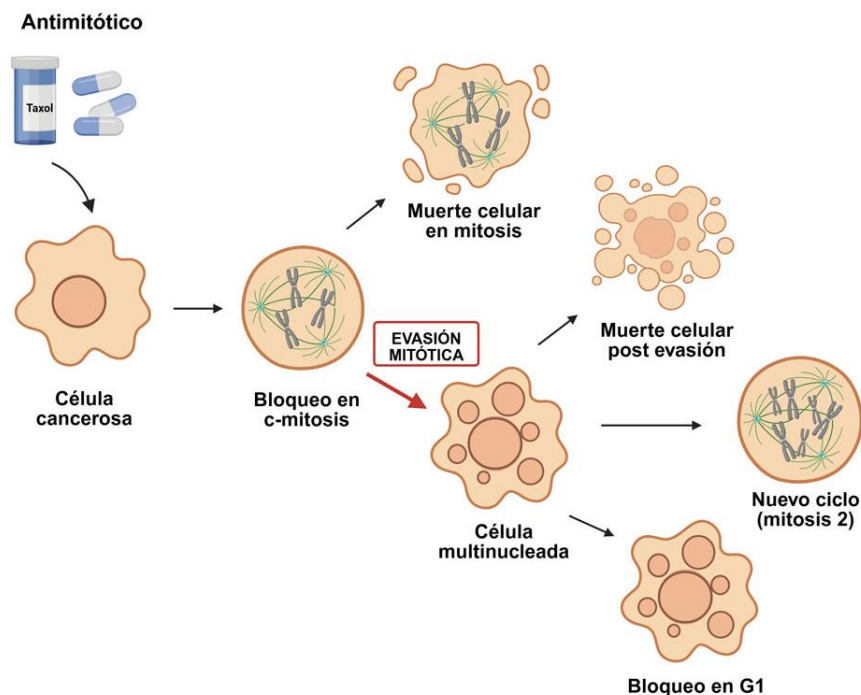


Figura 12. Representación esquemática de los destinos celulares tras el bloqueo en c-mitosis por el tratamiento con fármacos antimitóticos. Al tratar las células con antimitóticos, las células quedan bloqueadas en c-mitosis durante un tiempo variable. En c-mitosis, pueden sufrir muerte celular o evadir el SAC generándose una célula multinucleada. Esta célula a su vez, puede presentar diferentes destinos post-evasión: muerte celular, bloqueo en G1 o entrar en un nuevo ciclo.

El modelo de redes en competencia-umbral (Gascoigne & Taylor, 2008) explica cómo se da el destino que las células siguen después del arresto en mitosis. Por un lado, por la degradación de ciclina B, por otro lado, por la activación de la vía de las caspasas. Hay una degradación lenta pero continua de ciclina B, de tal forma que cuando los niveles caen por debajo de un umbral la célula sale de la mitosis, aunque la biorientación de los cromosomas no sea adecuada. Por otro lado, si las señales de muerte se acumulan antes de que la degradación de ciclina B caiga por debajo del umbral, la célula muere. Se ha demostrado que durante el arresto mitótico hay reguladores que afectan negativamente a la apoptosis. Cuando se inhiben proteínas anti-apoptóticas como Mcl-1 y Bcl-xL la muerte celular se acelera (Sloss et al., 2016) y el porcentaje de células apoptóticas disminuye cuando el ARN de interferencia (ARNi) afecta a un factor proapoptótico llamado Noxa (Díaz-Martínez et al., 2014).

Dentro de una misma línea celular, las diferentes células de la población al ser tratadas con el mismo compuesto pueden sufrir diferentes destinos, lo cual se denomina variación intralineal. Para reforzar esta idea, siguieron el destino de 50 pares de células hijas de HCT-116 tras añadirles un inhibidor de Eg5 (una quinesina) que, al impedir la separación de los centrosomas, provoca un huso monopolar que no puede satisfacer el SAC por ausencia de tensión hacia polos opuestos. Demostraron que el destino celular no está determinado genéticamente, puesto que, tras el bloqueo prolongado, 12 células murieron en mitosis, y solo dos eran células hermanas. Del mismo modo, diferentes líneas celulares al ser tratadas con el mismo compuesto no se van a comportar de la misma forma, lo que se denomina variación interlineal. Asimismo, comprobaron que no hay una correlación entre la duración del arresto mitótico y el subsiguiente destino celular (Gascoigne & Taylor, 2008).

Estas variaciones también se observan entre diferentes especies de mamíferos, siendo las diferencias entre el comportamiento de líneas de roedores y líneas humanas algo asumido esporádicamente en la bibliografía (Kung et al., 1990; Rieder, 2011), pero no estudiado en detalle todavía.

También es importante destacar que la capacidad de sobrevivir al arresto mitótico en presencia de agentes antimicrotubulares difiere entre células cancerígenas y células no transformadas. En tratamientos con nocodazol (desestabilizante) y paclitaxel (estabilizante) se observa que las células no transformadas sobreviven más al tratamiento que las células cancerígenas (Brito & Rieder, 2009). También, hay diferencias significativas entre líneas celulares humanas con respecto a la muerte

celular. Aquellas líneas celulares que tienen una expresión más baja de Bcl- xL como es el caso de HeLa, los niveles de Bax/Bak son más altos y por tanto son más propensas a la muerte celular. Mientras que otras líneas celulares como U-2 OS o A549 presentan unos niveles de expresión altos de Bcl-xL de tal forma que son más resistentes a la muerte celular (Shi & Mitchison, 2017).

Dependiendo del agente antimitótico que se utilice, la distribución cromosómica después del escape del SAC puede ser diferente. Cuando las células son tratadas con un inhibidor de CENP-E, las células resultantes son heteroploides y presentan aneuploidías debido a una mala segregación de los cromosomas. En cambio, cuando las células se tratan con un inhibidor de Eg5, después de evadir el SAC son poliploides debido a un fallo en la citocinesis por la formación de un huso monopolar. Al tratar las células con estos dos inhibidores, vieron que aquellas células en las que se generaban aneuploidías tenían más tendencia a morir después de la evasión del punto de chequeo del huso mientras las células poliploides tienen más tendencia a sobrevivir (Ohashi, 2016). Agentes que afectan directamente a los microtúbulos tienden a generar núcleos de restitución y micronúcleos con composición cromosómica muy variada (Bajer, 1964; Norppa & Falck, 2003).

1.3.2.2. Mecanismos de evasión del SAC

El cómo se produce esta evasión del SAC a nivel molecular no está del todo claro (véase el apartado 5.2 de la discusión) y se proponen varias posibilidades independientes o combinadas: evasión por 1) agotamiento del punto de chequeo, por ejemplo, degradación lenta de ciclina B (Balachandran et al., 2016; Brito & Rieder, 2006); 2) debilidad del punto de chequeo, por ejemplo, debilitamiento con el tiempo de componentes del SAC (Lok et al., 2020), mutaciones que debilitan algún componente o, en organismos completos, ratones heterocigotos para componentes esenciales del punto de chequeo son viables y fértiles, aunque presentan una ligera tasa de aneuploidía (Babu et al., 2003; Baker et al., 2004) o; 3) adaptación verdadera, es decir, la activación de una ruta alternativa que hace evadir el punto de chequeo (Vernieri et al., 2013) (Ruggiero et al., 2020).

1.3.3. Consecuencias de la evasión. Aberraciones nucleares: núcleos de restitución y micronúcleos. Paradoja de la tasa de proliferación.

En el apartado 1.3.2.1. se ha hablado de algunas de las consecuencias de la evasión o escape del punto de chequeo del huso y sobre los diferentes destinos que puede seguir una célula con su punto de chequeo del huso activado permanentemente por agentes antimitóticos. Este apartado trata de una consecuencia muy específica: la generación de aberraciones nucleares, entre las que se encuentran los micronúcleos (Antoccia et al., 1991) y su posible relevancia en tratamientos contra el cáncer (T. J. Mitchison et al., 2017).

La función del núcleo en las células eucariotas es la de contener el material genético durante la interfase celular, es decir, es la barrera física que separa el ADN del citoplasma. Además, es en el núcleo donde se da la replicación del ADN durante la fase S. Asimismo, en él también ocurre la transcripción de los distintos tipos de ARN, así como la maduración de los distintos ARNs mensajeros. La morfología nuclear no es trivial: los núcleos de células no transformadas tienen un tamaño estándar y una forma elipsoide; mientras que los núcleos de las células tumorales, sin embargo, son frecuentemente irregulares, con cambios en la forma, tamaño y constitución de la heterocromatina. Asimismo, el núcleo contiene el nucléolo, una estructura supramolecular sin envoltura, donde se da el proceso de transcripción de los ARNs ribosómicos y la biogénesis de los ribosomas (Dubois & Boisvert, 2016).

En la anafase, la envoltura nuclear ya empieza a reconstituirse, y en la citocinesis ya está completamente reorganizada en torno a los núcleos hijos (figura 13 A). Cuando hay problemas en la segregación cromosómica y algún cromosoma no se integra en los núcleos hijos también se reformará envoltura nuclear alrededor de él o alrededor de los puentes cromosómicos telofásicos cuando la disyunción no es completa o alrededor de fragmentos cromosómicos acéntricos (figura 13 B). Si el problema es masivo y hay total falta de segregación se reformará envoltura nuclear alrededor de un núcleo tetraploide, a menudo con morfología aberrante inicialmente llamado “núcleo de restitución” (Bajer, 1964). Los llamados núcleos de restitución no se restringen a la condición tetraploide, sino que, en general, se refieren a núcleos que contienen gran cantidad de cromosomas y que presentan morfologías aberrantes derivadas de la dispersión de los cromosomas que lo forman en el momento de comenzar la interfase. De igual manera, en c-mitosis provocadas por agentes antimitóticos los cromosomas quedan dispersos en el citoplasma y la envoltura nuclear, al escapar la célula del SAC, se reorganiza según la

proximidad de unos con otros. Grupos grandes darán núcleos de restitución, menores darán micronúcleos de gran tamaño, o de menor tamaño, hasta llegar a micronúcleos que contengan un solo cromosoma o fragmento (Norppa & Falck, 2003). Cabe destacar que la distinción entre micronúcleos y núcleos de restitución en ocasiones puede ser problemática, ya que depende de cómo la envoltura nuclear se haya reconstituido y del criterio del observador (figura 13 C).

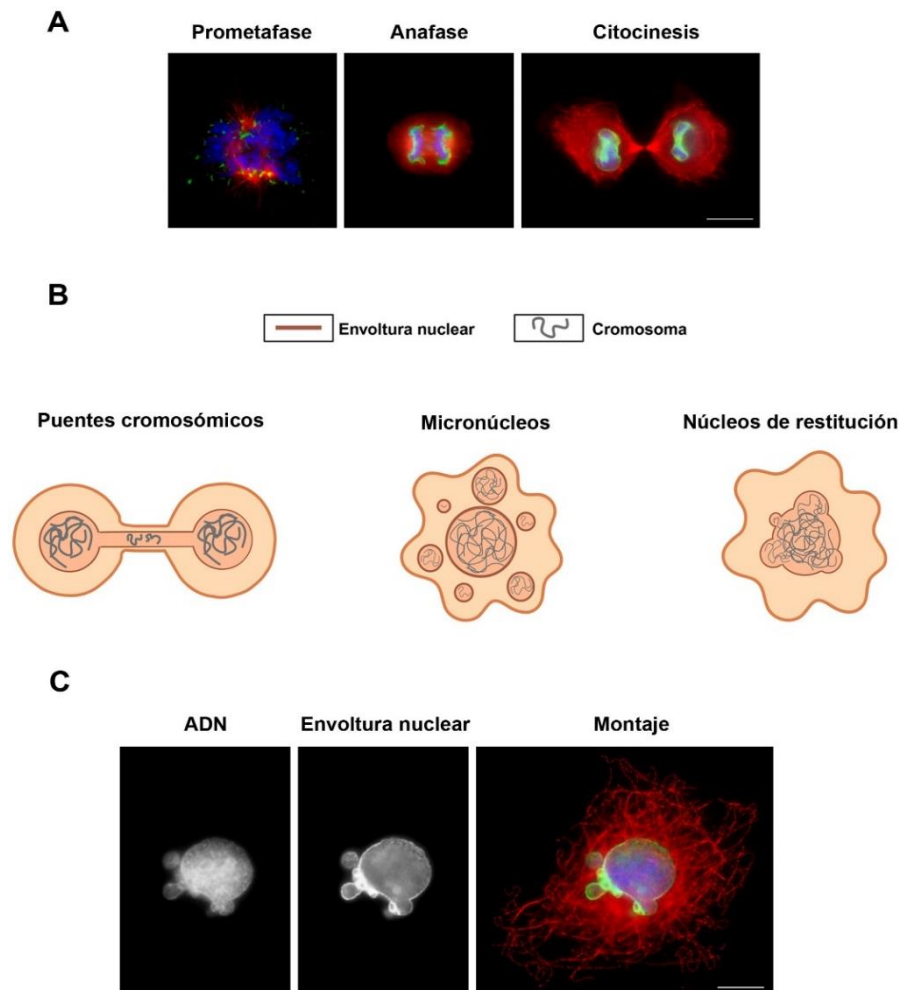


Figura 13. Representación de la generación de núcleos de restitución y micronúcleos. (A y C) Inmunofluorescencia indirecta en células A549: inmunomarcage de α -tubulina (rojo), ADN (azul) y lamina A (verde). (A) Estado de la envoltura nuclear en distintas fases de la mitosis. (B) Representación esquemática de aberraciones nucleares. (C) Problemática para diferenciar micronúcleos de núcleo de restitución. Barra de escala: 10 μ m.

Los micronúcleos son cromosomas o fragmentos de éstos encerrados por envoltura nuclear. El trabajo pionero “Sobre mitosis patológicas” de von Hansemann de finales del siglo XIX, es el primero en describir este tipo de aberraciones como “cromosomas perdidos” que se aíslan del resto del núcleo. Más tarde, en 1914, Theodor Boveri

propone la hipótesis de que las mitosis multipolares están detrás de la aparición de neoplasias humanas (Boveri, 2008; Di Bona et al., 2024). Desde entonces, cada vez han sido más las evidencias sobre la relación entre micronúcleos y tumorigénesis, ya que los micronúcleos son una fuente de inestabilidad cromosómica.

Cada micronúcleo tendrá una constitución cromosómica diferente (sea cromosoma completo o fragmento) lo cual deriva en que algunos micronúcleos sean capaces de organizar nucléolo y otros no. De igual manera algunos micronúcleos pueden ser incapaces de replicar o ser incapaces de condensar sus cromosomas en mitosis (Giménez-Martín et al., 1992; Panzera et al., 1997). En ocasiones, la aparición de estas estructuras nucleares aberrantes conlleva una replicación defectiva y asincrónica del ADN que contienen, lo que resulta en daño al ADN y en la fragmentación del cromosoma implicado. Además, los cromosomas contenidos en estos micronúcleos suelen pulverizarse lo que permite hipotetizar que estas estructuras aberrantes estarían detrás del fenómeno de cromotripsis (Crasta et al., 2012).

Otra de las características diferenciales de los micronúcleos es la mayor labilidad de su envoltura nuclear. En 2013, Hatch y colaboradores demostraron que la envoltura nuclear de los micronúcleos tiene una alta tendencia a romperse y colapsar debido a defectos en el ensamblaje de la lamina (Hatch et al., 2013). Esta disrupción reduciría las funciones nucleares, lo que generaría un daño al ADN masivo y expondría el ADN interfásico al citoplasma, hecho que veremos que tiene consecuencias. Asimismo, la envoltura nuclear de los micronúcleos también presenta menos poros lo cual puede afectar a la funcionalidad de la cromatina del micronúcleo. Los defectos en el transporte derivados de la menor presencia de poros nucleares pueden influir todavía más negativamente en la captación de proteínas nucleares y factores de transporte cuando el micronúcleo compite con el núcleo principal por ellos (Windner et al., 2019)

La paradoja de la tasa de proliferación se plantea el cómo y por qué los fármacos antimitóticos matan tan bien a las células tumorales. Hay tumores cuya tasa de proliferación es baja y que, por tanto, tienen un índice mitótico muy bajo, que difícilmente justifica el éxito de los antimitóticos, como el paclitaxel.

Para intentar comprender esta paradoja, se propusieron cuatro hipótesis: en primer lugar, las células tumorales pueden retener el fármaco en su interior. De esta forma, cuando las células vayan entrando en mitosis el fármaco las elimina. En segundo lugar, se propone que el paclitaxel también afecta a las células quiescentes del tumor. La

perturbación que el paclitaxel puede inducir en los microtúbulos en interfase puede alterar la homeostasis hacia un equilibrio de muerte celular. En tercer lugar, especulan que puede ser que ataque no solo a las células tumorales sino también a células no cancerígenas pero que son necesarias para el mantenimiento del microambiente tumoral. Por último, proponen el “asesinato de espectadores”. Cuando una célula tumoral muere por la acción del paclitaxel, se dispara una cascada de señalización que afecta también a las células vecinas (T. J. Mitchison, 2012).

Como se ha comentado con anterioridad, la envoltura nuclear de los micronúcleos es más frágil y tiende a colapsar. cGAS es una sintetasa de GMP-AMP cíclico que se localiza en el citoplasma, de tal forma que en el momento que la célula detecta que hay material genético libre en el citosol cGAS se une al ADN, cambiando de conformación y activándose. Una vez activa, cataliza la síntesis de un segundo mensajero a partir de GTP y ATP denominado cGAMP. Este segundo mensajero se une a STING (del inglés, *Stimulator of Interferon Genes*) que se activa, para poder reclutar a TBK1 (del inglés, *TANK-binding kinase 1*) que a su vez fosforila a IRF3 (del inglés, *Interferon Regulatory Factor 3*), el cual se trasloca al núcleo provocando la síntesis de interferón de tipo I y citoquinas proinflamatorias, de tal forma que el sistema inmune se activa (Sun et al., 2013).

En diversos estudios se ha demostrado que cGAS se recluta en los micronúcleos y por consiguiente observan síntesis de interferón de tipo I (Harding et al., 2017; MacDonald et al., 2023; MacKenzie et al., 2017). Esto podría explicar que la eficacia de los tratamientos antitumorales radica en el colapso de la envoltura nuclear de los micronúcleos que desencadena una cascada de señalización que conduce a la activación del sistema inmune, de tal forma que no solo muere esa célula, sino también las células vecinas, aunque esta idea genera controversia en la actualidad (véase el apartado 5.4 de la discusión).

Por otro lado, Beth Weaver propone que el éxito de fármacos antitumorales es debido a la formación de múltiples polos durante la división celular, lo que genera una mala segregación cromosómica provocando aneuploidías graves que llevan directamente a la muerte celular. En sus trabajos observa que células de cáncer de mama tratadas con concentraciones intratumorales de paclitaxel no generan el arresto en c-mitosis característico, sino que se generan husos multipolares que provocarían la letalidad (Scribano et al., 2021; Zasadil et al., 2014; Zhou et al., 2023).

1.4. Cáncer

La Organización Mundial de la Salud define el cáncer como un conjunto de enfermedades que se pueden originar en casi cualquier órgano o tejido del cuerpo cuando las células anormales crecen de forma descontrolada, sobrepasan sus límites habituales e invaden partes adyacentes del cuerpo y/o se propagan a otros órganos.

Según el Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos, en 2022 hubo 20 millones de casos nuevos de cáncer y 9,7 millones de muertes por cáncer en el mundo; situando a esta patología como la segunda causa de morbi-mortalidad en el mundo.

La transformación de una célula normal en una célula tumoral es un proceso en el que intervienen muchos factores tanto genéticos como epigenéticos que desregulan la homeostasis celular. Los tipos de cáncer que se conocen en la actualidad son muy diferentes entre sí, pero se han establecido una serie de características comunes en el desarrollo de un tumor. Éstas no tratan la complejidad de la regulación molecular y celular por las que una célula sana se transforma en una célula cancerosa, pero si dan una visión global de lo que sucede en el microambiente tumoral.

En la actualidad la principal característica que facilita o habilita para el desarrollo de un cáncer es la inestabilidad y mutación del genoma. Además, se han establecido otra serie de características necesarias para el crecimiento y progresión del tumor: mantenimiento de la señalización proliferativa, evasión de los genes supresores de tumores, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa, inducción o accesibilidad a la vasculatura, activación de la invasión y metástasis (Hanahan & Weinberg, 2000).

Asimismo, la inflamación promotora de tumores también posibilita el desarrollo de un tumor junto con la reprogramación del metabolismo celular y la evasión de la destrucción por parte del sistema inmune (Hanahan & Weinberg, 2011). Finalmente, se han instaurado cuatro características más que pueden contribuir a la formación de un tumor: desbloqueo de la plasticidad fenotípica, reprogramación epigenética no mutacional, existencia de microbiomas polimórficos y células senescentes (Hanahan, 2022).

1.4.1. Tratamientos del cáncer. Quimioterapia.

En la actualidad existen múltiples tratamientos para el cáncer: cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia dirigida, inmunoterapia, terapia hormonal y medicina personalizada.

La cirugía y la radioterapia son tratamientos físicos, en los que se extirpa el tumor o se usa radiación para eliminar las células cancerosas, respectivamente. La inmunoterapia consiste en la estimulación del sistema inmune para que destruya las células cancerosas. La terapia hormonal consiste en bloquear o modificar ciertas hormonas que fomentan el desarrollo de algunos tipos de cáncer, en cambio la terapia génica se basa en modificar el material genético de las células tumorales para que sean más susceptibles a otro tipo de tratamientos. Finalmente, la medicina personalizada adapta el tratamiento basándose en las características genéticas del tumor y del paciente (National Cancer Institute, 2025).

La quimioterapia consiste en la administración de sustancias químicas para el tratamiento de diferentes patologías. En sentido estricto, la quimioterapia contra el cáncer consiste en el tratamiento con fármacos antineoplásicos que impiden o afectan el desarrollo, crecimiento o proliferación de las células tumorales bien afectando el material genético, a la división celular o a la angiogénesis, por ejemplo.

1.4.2. Agentes clastogénicos y agentes aneugénicos

Los agentes que se utilizan en quimioterapia contra la proliferación de las células tumorales se clasifican en dos grandes grupos: agentes aneugénicos y agentes clastogénicos. Los primeros, del griego, *an-* (sin), *eu-* (bueno) y *-génico* (que genera) son agentes que afectan a la maquinaria de división celular ocasionando la pérdida o ganancia de cromosomas e induciendo aneuploidía. Los segundos del griego *klastos* (roto) y *-génico* (que genera) son agentes que provocan clastogénesis, es decir, dañan el ADN induciendo roturas en los cromosomas y, por tanto, la formación de fragmentos cromosómicos que pueden llevar a reordenamientos como deleciones, translocaciones o duplicaciones (Mishima, 2017). Estos agentes se describen en más detalle en el apartado 4.7 de resultados.

Dentro de cada grupo, se clasifican según su mecanismo de acción:

Clastogénicos (Anand et al., 2023):

- Agentes alquilantes: producen un grupo alquilo que reacciona con los ácidos nucleicos dañando el ADN.
- Antimetabolitos: Impiden la replicación del ADN.
- Antibióticos: producen roturas de ADN e inhiben la síntesis de ADN.
- Inhibidores de topoisomerasa I y II. Generan una acumulación de entrecruzamientos y superenrollamientos de ADN, roturas de hebra de ADN e interrupción de replicación, transcripción y, en su caso, segregación cromosómica.

Aneugénicos (Amjad et al., 2023):

- Inhibidores mitóticos. pueden afectar a la maquinaria implicada en el punto de chequeo del huso, a la congresión cromosómica o a la dinámica microtubular.

En la presente tesis doctoral la mayor parte de los experimentos se han llevado a cabo con tres compuestos aneugénicos. Dos de los cuales afectan a la dinámica de polimerización de la tubulina (paclitaxel y maytansina) y un agente que impide la congresión cromosómica al inhibir a la quinesina CENP-E (GSK923295).

El paclitaxel es un agente que se une a la subunidad β del dímero de α/β -tubulina (Díaz et al., 2003; Snyder et al., 2001). La tubulina es una proteína que forma los microtúbulos del citoesqueleto celular y es necesaria para numerosos procesos celulares como la división celular. El tratamiento con paclitaxel afecta a la dinámica de polimerización de tubulina, estabilizando los microtúbulos (Schiff et al., 1979), observándose un fenotipo muy característico durante la interfase, con haces gruesos y rígidos de microtúbulos, y husos aberrantes en mitosis (véase el apartado 4.3 de resultados). El paclitaxel se descubrió y aisló de la corteza del tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*) en la década de 1960 mediante un cribado de plantas para encontrar compuestos con actividad anticancerígena (Wani et al., 1971). Años más tarde, en 1992, la FDA (del inglés, *Food and Drug Administration*) lo aprobó por primera vez como tratamiento del cáncer de ovario. En la actualidad se utiliza en numerosos tipos de cáncer como ovario, mama, pulmón no microcítico y sarcoma de Kaposi (Amjad et al., 2023).

La maytansina, al igual que el paclitaxel, es un compuesto antimetabólico dirigido contra tubulina, concretamente también se une a la subunidad β del dímero de α/β tubulina (Steinmetz & Prota, 2018). Afecta a la dinámica de polimerización de los microtúbulos, pero con efecto contrario al del paclitaxel, puesto que actúa desestabilizándolos. Su fenotipo celular en interfase se caracteriza por una disminución en el número de microtúbulos y la generación de husos aberrantes más pequeños que los del tratamiento con paclitaxel en mitosis (véase el apartado 4.3 de resultados). La maytansina se descubrió en 1972 de un extracto de *Maytenus ovatus* (Kupchan et al., 1972), aunque en ensayos clínicos demostró una baja eficacia (Marzullo et al., 2022). Sin embargo, en la actualidad hay dos fármacos aprobados para su uso en el tratamiento del cáncer. Son derivados de maytansina conjugados a un anticuerpo (ADC, del inglés *Antibody-Drug Conjugate*), por un lado, emtansina-trastruzumab utilizado en el tratamiento del cáncer de mama HER2 positivo (Peddi & Hurvitz, 2014) y soravtansina-mirvetuximab aprobado para el tratamiento del cáncer de ovario FR α positivo (Moore et al., 2023).

La proteína CENP-E es una quinesina que participa principalmente en la congregación de los cromosomas en la placa metafásica durante la mitosis, puesto que se une a los microtúbulos y transporta los cromosomas desde los extremos positivos de los microtúbulos hasta la placa ecuatorial. Además, también interactúa con otras proteínas claves del punto de chequeo del huso como BubR1. Se demostró que la inhibición de CENP-E mediante ratones knockout o con ARNi en líneas celulares provoca aneuploidías por una mala segregación de los cromosomas durante la anafase (B. A. Weaver et al., 2003). GSK923295 es un inhibidor alostérico de CENP-E, que se une al dominio motor inhibiendo su actividad ATPasa (Qian et al., 2010), y se ha visto que hay diferencias entre murinos y humanos con respecto a la afinidad del compuesto por la proteína (Wood et al., 2010). En la actualidad el GSK923295 ha completado la fase 1 de investigación preclínica (Chung et al., 2012).

El estudio principal llevado a cabo en esta tesis ha sido la comparación de los efectos de los tres compuestos anteriormente descritos sobre líneas celulares humanas y líneas celulares de roedores. Los roedores son el principal modelo utilizado al comienzo de la experimentación preclínica destinada a la aprobación de un fármaco en humanos. En ocasiones pueden aparecer discrepancias entre la investigación *in vitro* en líneas celulares y la investigación *in vivo* en animales de experimentación; así como entre esta segunda y al pasar a los estudios con pacientes (Y. F. Li et al., 2018). Los ratones son animales que tienen un tiempo de vida más corto y poseen mayor propensión a desarrollar tumores que los humanos, lo que indica que pueden tener defectos en los

puntos de chequeo del ciclo celular. Dado el uso en quimioterapia de agentes antimetabólicos, se ha comparado y buscado diferencias en la cinética de evasión del punto de chequeo del huso empleando diferentes líneas celulares humanas y de roedores que puedan permitir interpretar mejor las discrepancias entre datos de los modelos animales y los datos tanto de investigaciones en cultivos celulares como datos de pacientes reales. A comienzos de la discusión ahondamos con más profundidad en este tema.

También, en esta tesis, se ha hecho una comparativa entre líneas celulares inmortalizadas y líneas transformadas. Las líneas celulares inmortalizadas, aunque no tumorales, pueden transformarse de manera espontánea o mediante condiciones que favorezcan este proceso en cultivo prolongado. Esta transformación implica la adquisición de características tumorales como la pérdida de la inhibición por contacto, la capacidad de crecer de forma independiente del anclaje o la proliferación en ausencia de factores de crecimiento (Stepanenko & Kaversusan, 2012; Voloshin et al., 2023).

Por último, además de estos tres compuestos recién nombrados (paclitaxel, maytansina, GSK923295), en la presente tesis, se ha realizado una comparativa entre cinco compuestos clastogénicos y un total de seis compuestos aneugénicos (incluidos los tres anteriores) para determinar si la generación de estructuras nucleares aberrantes (micronúcleos, núcleos de restitución) puede ser el denominador común entre ambos tipos de fármacos en lo relativo a matar el cáncer. Tanto la descripción de los compuestos utilizados como el razonamiento tras ello se describen más en detalle en el apartado 4.7 de resultados

2

OBJETIVOS

Los **objetivos** perseguidos en esta tesis han sido:

1. Analizar comparativamente la evasión del punto de chequeo del huso y sus consecuencias en líneas celulares de cuatro especies diferentes: *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* y *Cricetulus griseus*. Se han evaluado tres drogas antimitóticas: dos de ellas, paclitaxel y maytansina, afectan de forma opuesta a la dinámica de tubulina, mientras que el tercer compuesto, GSK923295, actúa impidiendo la congregación de los cromosomas durante la mitosis.

En esta parte, los **objetivos específicos** se han centrado en analizar:

- 1.1. Los efectos citológicos de cada uno de los compuestos, con énfasis en la evasión del punto de chequeo del huso, en células humanas en cultivo.
 - 1.2. La variación en la cinética de evasión del punto de chequeo del huso entre líneas celulares humanas *versus* de roedores, así como entre líneas transformadas *versus* inmortalizadas.
 - 1.3. La generación de micronúcleos y núcleos de restitución comparando entre las distintas líneas y en cómo es la dinámica de colapso-reconstitución de los mismos.
 - 1.4. La variación en la supervivencia y capacidad de completar un nuevo ciclo tras la evasión del punto de chequeo del huso, entre líneas celulares humanas *versus* de roedores.
2. Determinar si la generación de aberraciones nucleares al salir de mitosis es un denominador común entre los diferentes compuestos que se utilizan en el tratamiento del cáncer mediante quimioterapia. Para ello, en una línea celular transformada humana, se ha comparado entre diversos agentes clastogénicos y aneugénicos.

3

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Productos, líneas celulares, plásmidos, anticuerpos y drogas

3.1.1. Productos

El DMSO, DMSO-d6, isopropanol, ácido acético glacial, etanol absoluto, el medio de montaje Entellan[®], MgCl₂, NaCl, TRIS, glicerol 87% y la grasa de vacío se obtuvieron de Merck. El agente de tinción Giemsa, las pastillas de tampón Gurr[®], los antibióticos ampicilina y G-418, PEG 8000, Tritón X-100, PFA, PIPES, EGTA, DAPI y glicina provienen de Sigma-Aldrich. La BSA se adquirió en BioLaps. Los portaobjetos se adquirieron en Marienfeld y los cubre objetos de Menzel Gläser. La tripsina-EDTA, y los medios Opti-MEM y DMEM, así como todos los suplementos necesarios para el crecimiento de las líneas celulares: FCS, DBS, L-glutamina, penicilina, estreptomina y piruvato sódico (Gibco) y los crioviales de 1,5 mL (Nalgene[™]) se obtuvieron de Thermo Fisher. Las placas de cultivo, tubos y pipetas de 5 y 10 mL empleados provienen de Falcon[™]. Los cilindros de acero necesarios para el aislamiento clonal fueron fabricados por el servicio técnico del Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas. El kit de transfección Lipofectamina[™] 3000 se obtuvo de Invitrogen. El agente de transfección TransIT[®] X2 se obtuvo de Mirus Bio. La kanamicina se obtuvo de NZYTech. La higromicina y blasticidina se obtuvieron de InvivoGen. La puromicina proviene de Enzo Life Sciences. La agarosa se obtuvo de Conda. El bromuro de etidio, los casets de contaje celular y las cubetas de electroporación se adquirieron de Bio-Rad. Las placas de 12 pocillos con fondo de vidrio se adquirieron de Cellvis, y las μ -Dish de ibidi. Los kits para la purificación de ADN plasmídico Mini-prep y Midi-prep, así como el kit para la extracción de ADN de geles de agarosa se obtuvieron de Macherey Nagel. El kit de ligación 2.1 y la PrimeSTAR[®] HS ADN polimerasa se obtuvieron de Takara Bio. Las enzimas de restricción, el tampón de carga (Gel Loading Dye Purple 6X) y el tampón CutSmart[®] se obtuvieron de New England BioLabs. Los marcadores de peso molecular empleados provienen de NYZTech. La KOD Hot Start ADN polimerasa[®] se obtuvo de Novagen.

3.1.2. Líneas celulares

Las líneas celulares empleadas en este estudio derivan de cuatro especies distintas de mamíferos, principalmente del orden *Primates* y *Rodentia* (véase la tabla 1). Todas las líneas celulares parentales utilizadas se obtuvieron de la ATCC, excepto la línea celular NRK-52E que proviene de Cytion. Cada línea tiene un fenotipo característico en contraste de fases (figura 14).

Líneas celulares	Especie	Tipo
A549	<i>Homo sapiens</i>	Transformada
U-2 OS	<i>Homo sapiens</i>	Transformada
HeLa	<i>Homo sapiens</i>	Transformada
HCT-116	<i>Homo sapiens</i>	Transformada
hTERT RPE-1	<i>Homo sapiens</i>	Inmortal
CHO-K1	<i>Cricetulus griseus</i>	Transformada
BALB/c SV40	<i>Mus musculus</i>	Transformada
NIH/3T3	<i>Mus musculus</i>	Inmortal
NIH/3T3 T	<i>Mus musculus</i>	Transformada en esta tesis
L-929	<i>Mus musculus</i>	Transformada
NRK-52E	<i>Rattus norvegicus</i>	Inmortal

Tabla 1. Clasificación de las líneas celulares utilizadas según su especie y su estado de transformación. Las líneas celulares de roedores se muestran con sombreado.

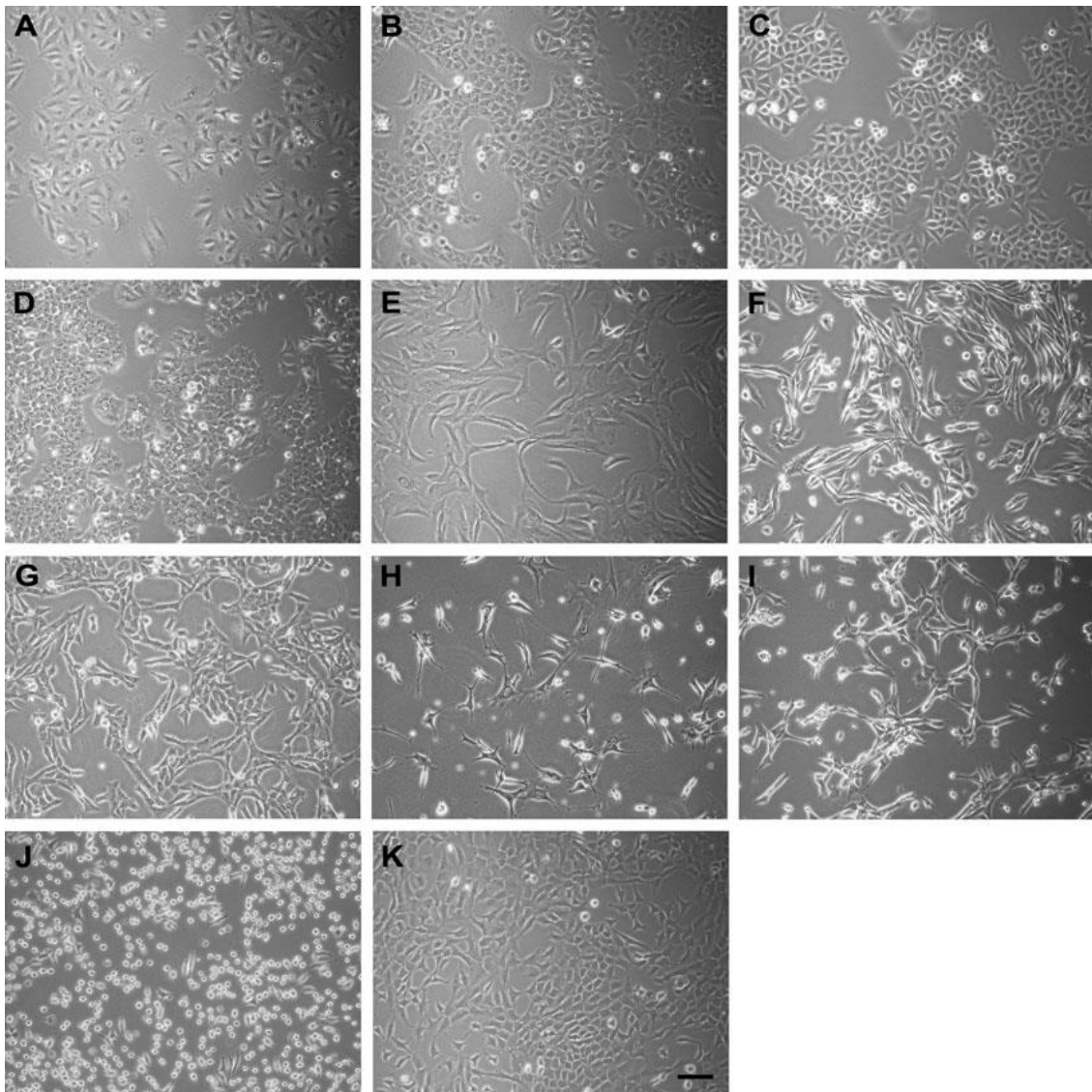


Figura 14. Observación del fenotipo celular en contraste de fase. (A-E) Líneas celulares humanas, (F-K) Líneas celulares de roedores. (A) A549, (B) U-2 OS, (C) HeLa, (D) HCT-116, (E) hTERT RPE-1, (F) CHO-K1, (G) BALB/c SV40, (H) NIH/3T3, (I) NIH/3T3 T, (H) L-929 y (K) NRK-52E. Barra de escala: 50 μ m.

3.1.3. Plásmidos y oligonucleótidos

Los plásmidos empleados para llevar a cabo este trabajo provienen de Addgene. Para la construcción de oligonucleótidos, manipulación y generación *in silico* de otros plásmidos necesarios se ha utilizado el software Geneious Prime versión 2022.2.1. Asimismo, los oligonucleótidos para la construcción de los plásmidos se obtuvieron de CondaLab.

Nombre	Fuente de origen
pIRESneo_eGFP-alpha-Tubulin	Patricia Wadsworth
pH2B-mCherry-IRES_puro2	Daniel Gerlich
H2B-GFP	Geoff Wahl
eGFP-LAP2beta_G-418R	Esta tesis
pEGFP-C1 EGFP-3xNLS	Dyche Mullins
H2B-mCherry_G418R	Esta tesis
pPyCAG-tagBFP-3xNLS-IRES_Hph	Sally Lowell
mCherry-3xNLS-IRES_hygR	Esta tesis
eGFP-3xNLS-IRES_bsdR	Esta tesis

Tabla 2. Plásmidos generados y empleados en el presente trabajo. Los plásmidos generados se muestran con sombreado.

Nombre	Secuencia
XhoI-	AAAAACTCGAGGCCGCCACCATGGTGAGCAAGGG
mCherry/eG FP Fw	
mCherry/eG FP Rv	GGACTACCTGTGGCGCCCTTGTACAGCTCGTCCATGCCG
3xNLS Fw	GGACGAGCTGTACAAGGGCGCCACAGGTAGTCCAAAAAAG
NotI-3xNLS Rv	AAAAAGCGGCCGCTTATAATACCTTTTCTC
KpnI-IRES Fw	CAGAAGGTACCCCATTGTATGGGATC
IRES Rv	CCTTGTGGGTTGTGGCAAGCTTATCATCGTGTTTTTCAAAGGAAAACCCAC
BSD Fw	CTTTGAAAAACACGATGATAAGCTTGCCACAACCCACAAGG
BSD Rv	GTTTAATAGATCATCAATTTCTCGATTAGCCCTCCCACACATAACCAG
3'UTR Fw	GTTATGTGTGGGAGGGCTAATCGAGAAATTGATGATCTATTAACAATAAA GATGTC
BamHI- 3'UTR Rv	AAAAAGGATCCGCTGGCACGACAGGTTTC

Tabla 3. Oligonucleótidos diseñados para la construcción de los plásmidos mCherry-3xNLS-IRES_hygR y eGFP-3xNLS-IRES_bsdR. Las secuencias se presentan en dirección 5'→3'.

3.1.4. Anticuerpos

En los experimentos de inmunofluorescencia como anticuerpos primarios se emplearon: para la visualización del citoesqueleto de α -tubulina el anticuerpo anti-alfa-Tubulin (DM1A) obtenido de Sigma-Aldrich. Para el marcaje de pericentrina el anticuerpo anti-Pericentrin y para la visualización de la envoltura nuclear el anticuerpo anti-Lamin A, ambos de abcam y para NuMA el anticuerpo anti-NuMA de Thermo-Fisher. Por otro lado, como anticuerpos secundarios se utilizaron los de la casa comercial Thermo-Fisher: Goat anti-Mouse Alexa Fluor Plus 488 y Goat anti-Rabbit Alexa Fluor 555.

3.1.5. Drogas

El paclitaxel (Taxol[®]) se obtuvo de Cayman Chemical, la maytansina fue cedida por el grupo del profesor Karl-Heinz Altmann (ETH Zurich, Suiza), el GSK923295 se adquirió de la casa comercial Selleckchem. El nocodazol y barasertib (Azd1152) se obtuvieron de Sigma-Aldrich. El cisplatino, bleomicina, 5-azacitidina, etopósido (VP-16), irinotecán (CPT-11) y alisertib (MLN8237) se compraron en MedChemexpress. Todos ellos se prepararon en DMSO-d₆, excepto cisplatino y bleomicina que se diluyeron en agua, siguiendo las instrucciones de la casa comercial en cada caso.

3.2. Tampones y fijadores

Para los experimentos de biología molecular:

- Tampón TAE 50X: 2 M TRIS, 1 M ácido acético, 50 mM EDTA pH 8,0.

Para los experimentos de inmunomarcaje:

- PEM: 0, 1 M PIPES, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA a pH 6,8.
- PEMP: 0,4% de PEG 8000 en PEM.
- PEMT: 0,2% Triton X-100 en PEM.
- Fijación (PEMF): 3,7% PFA comercial, 1% DMSO en PEM.
- PBS/BSA 3%: 3% BSA en PBS 1X.
- Tampón glicina: 0,13 M glicina, 0,2 M NaCl pH 8,6 en glicerol al 70%.

Para los experimentos de citología:

- Fijación con solución de Carnoy's: 3 partes de etanol absoluto (100%) y 1 parte de ácido acético 100% glacial, preparada siempre al momento de ir a ser utilizada. Puede prepararse también usando metanol absoluto (100%).

3.3. Biología molecular

3.3.1. Clonaje plasmídico

3.3.1.1. Purificación de ADN

Para la obtención del ADN plasmídico, se sembraron las bacterias con el plásmido de interés en placas de LB-agar junto con el antibiótico apropiado (50 µg/mL kanamicina o 100 µg/mL ampicilina), y se incubaron durante 16 horas a 37°C. A partir de la placa de siembra, se preparó un inóculo de 3 mL de bacterias en medio LB líquido con el antibiótico correspondiente y se dejó 16 horas a 37°C en baño con agitación. Pasado el periodo de incubación, mediante los kits de purificación de ADN plasmídico se realizaron mini-preps o midi-preps, en función de los requerimientos en cada caso, siguiendo los protocolos especificados por el fabricante.

3.3.1.2. Cuantificación de ADN plasmídico

Para cuantificar la concentración obtenida de ADN plasmídico, se empleó un espectrofotómetro de tipo NanoDrop (NanoDrop2000) y los plásmidos se almacenaron a -20°C.

3.3.1.3. Diseño *in silico* de oligonucleótidos

Por un lado, para la amplificación de los fragmentos de interés mediante PCR clásica, se diseñaron oligonucleótidos (oligos) específicos basados en la secuencia del plásmido molde. Para cada fragmento, se generaron dos oligos: uno en sentido directo (Fw) y otro en sentido inverso (Rv) correspondientes a la hebra directa y complementaria, respectivamente.

Los oligos se diseñaron siguiendo unos criterios básicos (Dieffenbach et al., 1993):

- **Longitud:** entre 20 y 25 pares de bases (pb) para una buena especificidad y eficiencia de hibridación.
- **Contenido en GC:** igual o superior al 50% siempre que fue posible, ya que un contenido elevado en GC incrementa la estabilidad de hibridación.
- **Temperatura de melting (T_m):** entre 60°C y 65°C, procurando que ambos oligos tuvieran una T_m similar con una diferencia máxima de entre 2-3°C.
- **Secuencia terminal:** se evitó que los oligos acabaran en timidina (T), favoreciendo bases más estables como citosina (C) o guanina (G).
- **Estructura secundaria:** se verificó en todos los casos la ausencia de estructuras secundarias desfavorables, como dímeros o formaciones en horquilla.
- **Inclusión de secuencias funcionales:** en el caso de que fuera necesario, se incorporaron sitios de restricción específicos, secuencias Kozak para la iniciación eficiente de la traducción, codón de inicio (ATG) y codones de parada (TAA, TGA y TAG).

Por otro lado, para la fusión de fragmentos de PCR clásica, los oligos constan de dos regiones. Una zona que hibrida con uno de los fragmentos a fusionar y una cola 5' que se corresponde con la región complementaria del segundo fragmento con el que se pretende realizar la fusión. Este diseño permite generar productos de PCR con solapamientos complementarios entre los fragmentos, facilitando su ensamblaje por recombinación o amplificación cruzada (Cha-Aim et al., 2012).

Además de las características anteriores, para este tipo de oligos se especificó en:

- **Longitud de la zona que hibrida:** entre 18-22 pb.
- **Longitud de la cola 5':** alrededor de 20 pb.
- **Contenido en GC:** entre un 40-60%, sin descartar valores superiores si eran necesarios.
- **T_m:** alrededor de 60°C.

En todos los casos, los oligos se solicitaron a la empresa CondaLab en formato seco y desalado. Para su preparación a 100 µM, se añadió el volumen de agua mili-Q especificado para cada oligo siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Finalmente, se prepararon stocks más diluidos a 10 µM.

3.3.1.4. PCR clásica

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) clásica se realizó con la KOD ADN polimerasa de alta fidelidad según el protocolo establecido por la casa comercial. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 50 μ L en los que se añadieron: 1X tampón KOD, 1,5 mM MgSO₄, 0,2 mM dNTPs, 0,3 μ M oligo Fw y 0,3 μ M oligo Rv, 10 ng plásmido y 0,02 U/ μ L KOD ADN polimerasa.

La amplificación se efectuó en un termociclador My Cycler (Bio-Rad) con un total de 30 ciclos con las siguientes condiciones de ciclado:

- **Activación de la polimerasa:** 95°C durante 2 minutos.
- **Desnaturalización:** 95°C durante 20 segundos.
- **Anillamiento:** la temperatura de anillamiento se ajustó para cada par de oligos en función de su T_m, lo que permitió modular la especificidad de la amplificación. El tiempo de anillamiento fue de 10 segundos.
- **Extensión:** el tiempo de extensión se adaptó proporcionalmente a la longitud del fragmento que se deseaba amplificar en cada momento, según las especificaciones de la casa comercial. La temperatura utilizada fue de 70°C.

3.3.1.5. PCR de fusión

La PCR de fusión es una estrategia molecular utilizada para generar un fragmento híbrido a partir de dos o más fragmentos de ADN que contienen regiones solapantes complementarias entre sí. Para este tipo de PCR, se empleó la enzima PrimeSTAR HS ADN siguiendo las indicaciones de la casa comercial y basándose en el protocolo establecido por Oakley (Berl R Oakley, 2006). En un volumen final de 50 μ L se añadieron: 1X tampón PrimeSTAR, 0,2 mM dNTPs, 0,3 μ M oligo Fw del primer fragmento y 0,3 μ M oligo Rv del último fragmento, los fragmentos que se querían fusionar a concentraciones equimolares y 1,25 U/50 μ L de PrimeSTAR ADN polimerasa.

La obtención del fragmento de fusión se realizó en dos pasos en un termociclador My Cycler (Bio-Rad). El primero, tiene una duración de 10 ciclos donde se fusionan los diferentes fragmentos y en el segundo, con una duración de 15 ciclos, se amplifica el fragmento fusionado con anterioridad.

Las condiciones que se emplearon fueron:

- **Activación de la polimerasa:** 98°C durante 2 minutos.
- **Paso 1 (10 ciclos):**
 - Desnaturalización: 98°C durante 10 segundos.
 - Anillamiento: Las temperaturas de anillamiento se ajustaron dependiendo de la T_m de los oligos empleados. Por lo general, se emplearon temperaturas entre 55-58°C durante 6 segundos.
 - Extensión: el tiempo de extensión varió en función de la longitud del fragmento resultante de la fusión, según las especificaciones de la casa comercial de 1 min/1 kb. La temperatura utilizada fue de 72°C.
- **Paso 2 (15 ciclos):**
 - Desnaturalización: 98°C durante 10 segundos.
 - Anillamiento: Por lo general se utilizaron temperaturas entre 58-60°C durante 6 segundos, reduciendo la temperatura en el paso 1 para favorecer la hibridación de las zonas solapantes.
 - Extensión: se empleó el mismo criterio que en el paso anterior (véase más arriba).
- **Extensión final:** 72°C durante 15 minutos.

3.3.1.6. Comprobación de fragmentos y digestión de ADN

Antes de la digestión, para comprobar el tamaño de los fragmentos de PCR, a las muestras se les añadió el tampón de carga 6X y se cargaron junto con el marcador de peso molecular correspondiente para realizar una electroforesis en gel de agarosa preparado con el tampón TAE y cuyo porcentaje varió en función del tamaño del fragmento que se quería analizar. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se tiñó en una solución con 1 µg/mL de bromuro de etidio durante 20 minutos. Para la visualización de los fragmentos y su posterior corte se empleó el documentador de geles Gel Doc XR (Bio-Rad). Para extraer el fragmento de ADN del gel de agarosa, se utilizó un kit comercial de extracción siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las digestiones se realizaron en un volumen final de 20 µL, empleando 1,5 µg de ADN plasmídico o de fragmentos de PCR, 2 µL del tampón CutSmart y 1 µL de las enzimas requeridas en cada caso, y se incubaron a 37°C durante 2 horas. Después, se siguió el mismo procedimiento descrito con anterioridad para purificar los fragmentos digeridos.

3.3.1.7. Ligación

Para la reacción de ligación se empleó el kit de Takara 2.1. Se prepararon dos reacciones de ligación. Por un lado, la ligación control que consta de 1 µL de ligasa, 1,5 µL de tampón de ligación 10X y 100 ng de vector, en un volumen final de 15 µL. Por otro lado, la ligación problema se preparó igual al control además de añadir la cantidad de inserto requerida. Para determinar la cantidad necesaria de inserto se utilizó la siguiente fórmula, empleando una relación inserto:vector de 3:1 en todos los casos:

$$\text{Masa de inserto (g)} = \text{relación molar} \frac{\text{inserto}}{\text{vector}} \times \text{masa del vector (g)} \times \frac{\text{longitud inserto (pb)}}{\text{longitud vector (pb)}}$$

Finalmente, las reacciones de ligación se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente.

3.3.1.8. Transformación bacteriana y siembra

La transformación se llevó a cabo utilizando dos cepas bacterianas de *Escherichia coli*, DH1α y DH5α, mediante dos métodos de transformación distintos: choque térmico y pulso eléctrico. El uso de bacterias termocompetentes se utilizó preferiblemente para las reacciones de ligación y las bacterias electrocompetentes para la amplificación de los plásmidos.

La transformación mediante choque térmico se llevó a cabo utilizando el método de Hanahan (Hanahan, 1983). Las bacterias termocompetentes (90 µL) se incubaron, con toda la reacción de ligación, en hielo durante 30 minutos. A continuación, se les aplicó un choque térmico a 37°C durante 2 minutos e inmediatamente después se volvieron a incubar en hielo durante otros 2 minutos. Después, se añadió 1 mL de LB líquido sin antibiótico y se dejaron recuperar las bacterias a 37°C en agitación durante 1 hora. Se sembraron en placas de LB-agar junto con el antibiótico adecuado y, finalmente, se incubaron a 37°C durante 16 horas.

La electroporación se llevó a cabo con 90 µL de bacterias electrocompetentes, que fueron incubadas en hielo junto con la reacción de ligación durante 10 minutos. Posteriormente, toda la mezcla se transfirió a cubetas de electroporación de 0,2 cm. La cubeta se introdujo en el MicroPulser de BioRad, dando un pulso de 2,5 Kv. Después

del pulso eléctrico, se añadió 1 mL de LB líquido sin antibiótico a la cubeta y todo el líquido se transfirió a un tubo eppendorf estéril y se dejaron recuperar las bacterias a 37°C con agitación durante 1 hora. Finalmente, se sembraron en placas de LB-agar junto con el antibiótico adecuado para su incubación durante 16 horas a 37°C.

3.3.1.9. Comprobación de colonias

En primer lugar, se comprobó la diferencia en el número de colonias entre las placas que contenían la ligación problema y el control. Para su posterior análisis, se picaron colonias de la placa de ligación problema en 3 mL de LB-líquido con el antibiótico apropiado. Los inóculos se incubaron en baño durante 16 horas a 37°C con agitación.

Para extraer el ADN plasmídico se realizaron mini-preps siguiendo el mismo procedimiento que en el apartado de purificación de ADN (véase más arriba). Para comprobar el resultado de la reacción de ligación, en un volumen final de 30 μ L se añadieron 10 μ L de las mini-preps previamente realizadas, 2 μ L del tampón CutSmart, 1 μ L de una enzima que corte el plásmido una vez para ver el tamaño linealizado, y para la comprobación del tamaño del vector e inserto se añadió 1 μ L de cada una de las enzimas necesarias. Las reacciones de digestión se realizaron de igual forma que en el apartado 3.3.1.6.

3.3.1.10. Secuenciación y amplificación

Una vez se comprobaron los tamaños de cada una de las mini-preps, se prepararon muestras para su secuenciación. Las muestras se prepararon siguiendo las indicaciones de la empresa Secugen en tubos con un volumen final de 15 μ L que contenían 100 ng/ μ L de plásmido y 5 μ M de oligonucleótido.

Los cromatogramas de cada una de las muestras, resultados de la secuenciación, se visualizaron con el software Chromas 2.6.6.

Finalmente, se eligió una de las colonias positivas para su amplificación. Para ello, se inocularon 100 mL de LB líquido con el antibiótico de selección correspondiente durante 16 horas a 37°C en baño con agitación. Para la extracción del ADN plasmídico y cuantificación, se siguió el mismo proceso que en los apartados 3.3.1.1 y 3.3.1.2.

3.4. Biología celular

3.4.1. Cultivo celular

Las líneas celulares se cultivaron en incubador a 37°C y 5% de CO₂, en medio DMEM suplementado con un 10% de FCS, (a excepción de la línea celular NIH/3T3 que requirió un 15% de DBS), 2 mM de L-glutamina, 100 UI/mL penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 1 mM de piruvato sódico. Para subcultivar, de cara al mantenimiento del cultivo celular, se eliminó el medio de cultivo, se lavó brevemente con tripsina-EDTA y se volvió a añadir 1-2 mL de tripsina-EDTA de nuevo, y se incubaron entre 1-5 minutos a 37°C, dependiendo de la línea celular. Tras pequeños golpes laterales a la placa, y comprobar en contraste de fases que las células se habían despegado, se tomó la cantidad estimada necesaria de células y se sembraron en una nueva placa con medio completo fresco. Dependiendo de la línea celular, el mantenimiento del cultivo se realizó cada 2-4 días y las células se diluyeron desde 1:3 en aquellas líneas celulares cuya proliferación es más lenta hasta 1:20 en líneas que proliferan más activamente.

3.4.2. Criopreservación y descongelación celular

La criopreservación se emplea para garantizar la reserva de líneas celulares viables durante largos periodos de tiempo. A partir de una placa con el 80-90% de densidad, se aspiró todo el medio, se realizó un lavado con 1 mL de tripsina-EDTA, se añadió de nuevo 1 mL y se incubó entre 1-5 minutos a 37°C. Durante este tiempo, se rotularon tantos crioviales de 1,5 mL como fueron necesarios dependiendo de la línea celular en cada caso. A modo de ejemplo, se quisieron obtener 3 viales por placa, de esta forma, a la placa que ya contenía 1 mL de suspensión celular, se añadieron 3,5 mL de una solución (crioprotector) de FCS y 10% de DMSO previamente preparada. A cada vial, se añadió 1,5 mL. Finalmente, los crioviales se introdujeron en el interior de un recipiente de criopreservación (del inglés, *cryo-safe*), que contiene en su interior isopropanol para asegurar una congelación gradual de las células. El *cryo-safe*, permaneció durante 24 horas a -80°C, y finalmente, los crioviales se almacenaron en nitrógeno líquido.

Para que las células recuperen sus condiciones de cultivo, es necesario eliminar el crioprotector. Previamente a sacar las células del nitrógeno líquido, se preparó una placa con 11 mL y un tubo con 4 mL de medio completo fresco a 37°C. El criovial se descongeló, y todo el contenido se añadió al tubo. Se centrifugó (Eppendorf 5810 R) a

1000 rpm durante 5 minutos, y se aspiró la máxima cantidad de sobrenadante posible. El *pellet* se resuspendió en 1 mL de medio completo fresco a 37°C, y todo el contenido se sembró en la placa que contenía los 11 mL para su incubación y crecimiento celular.

3.4.3. Clonaje celular

3.4.3.1. Titulación de antibióticos de selección

Todas las líneas celulares fueron tituladas con los antibióticos de selección eucariota correspondientes, cuyas resistencias estaban codificadas en los plásmidos utilizados (véase tabla 2), con el objetivo de poder posteriormente seleccionar los clones positivos que hubieran incorporado el plásmido de interés.

Para ello, las células se sembraron en placas de doce pocillos con una densidad inicial ajustada en función del antibiótico a testar, ya que su mecanismo de acción y velocidad de inducción de la muerte celular varía entre 3-12 días. Tras 24 horas de incubación, se añadió el antibiótico correspondiente en un rango creciente de concentraciones ajustado a cada antibiótico según lo descrito en la literatura. A partir de ese momento, las placas se monitorizaron cada día mediante microscopía de contraste de fase, hasta determinar la concentración mínima capaz de inducir la muerte del 95% de las células. Los resultados se muestran en la siguiente tabla y a menudo difirieron de lo descrito en la literatura.

Línea celular	Puromicina ($\mu\text{g/mL}$)	G-418 (mg/mL)	Higromicina ($\mu\text{g/mL}$)	Blasticidina ($\mu\text{g/mL}$)
A549	0,4	1,75	450	
U-2 OS	2	1	125	
HeLa	0,5	1,2	700	
HCT-116	1	2	150	
RPE-1		0,8		4
CHO-K1	10	0,8	400	
BALB/c SV40	2	2	300	
NIH/3T3	1,25	1	500	
L-929	5	0,4	200	
NRK-52E	6,5	0,5	200	

Tabla 4. Concentración mínima de antibióticos de selección capaz de inducir la muerte en el 95% de las células. Las células de roedores se muestran con un sombreado.

3.4.3.2. Transfección y dilución

La obtención de las líneas celulares estables se realizó mediante transfección química, utilizando dos agentes distintos en función de la línea celular, dado que difieren tanto en su mecanismo de acción como en su perfil biológico. Se empleó según la compatibilidad y eficiencia observada en cada tipo celular, TransIT-X2 (basado en polímeros catiónicos), o Lipofectamina 3000 (basada en lípidos catiónicos) (Chong et al., 2021).

Para la transfección con lipofectamina, se prepararon dos tubos con 750 μL de Opti-MEM. En uno de ellos se añadieron 25 μL de lipofectamina y se mezcló intensamente. En el segundo, se incorporaron 1,5 μg de ADN plasmídico y, a continuación, 25 μL de agente P3000, mezclando bien tras cada adición. Posteriormente, ambos tubos se combinaron mezclando intensamente y la mezcla se incubó durante 20 minutos en reposo a temperatura ambiente para permitir la formación de complejos. Transcurrido ese tiempo, a una placa de cultivo con un 70-80% de confluencia, se añadió la mezcla con suavidad. Las células se incubaron durante 24 horas bajo las condiciones estándar descritas en el apartado 3.4.1.

En el caso de la transfección con TransIT-X2, se reemplazó el medio de cultivo por un medio fresco sin antibióticos una hora antes del procedimiento. Se preparó un tubo con 1 mL de Opti-MEM al que se añadieron 10 μL de ADN plasmídico a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, mezclando intensamente. A continuación, se incorporaron 20 μL del reactivo de transfección, se volvió a mezclar y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 20 minutos. Finalizado este tiempo, la mezcla se añadió suavemente a una placa de cultivo con un 70-80% de confluencia. Las células se incubaron durante 24 horas bajo las condiciones estándar descritas en el apartado 3.4.1.

Al día siguiente de la transfección, se procedió a realizar una dilución de las células transfectadas con el objetivo de facilitar el crecimiento aislado de clones. A modo de ejemplo, una de las combinaciones de diluciones más empleadas en este trabajo fue 1:10 y 1:30. En ocasiones se utilizó un tercer nivel de dilución (1:10, 1:30, 1:60).

Para ello, se prepararon doce placas de cultivo, seis para cada dilución, con 11 mL de medio completo por placa. Paralelamente, se prepararon dos tubos: uno con 9 mL de medio (para la dilución 1:10) y otro con 4 mL (para la dilución 1:30).

A continuación, a la placa transfectada se añadió 1 mL de tripsina-EDTA. Todo el volumen se añadió al tubo con 9 mL de medio, obteniéndose así la dilución 1:10. Después de mezclar bien, se tomaron 2 mL de esta dilución 1:10 y se transfirieron al tubo con 4 mL de medio, generando la dilución 1:30. De cada uno de estos tubos se distribuyó 1 mL por placa, completando así la siembra por dilución de las seis placas.

La dilución utilizada en cada caso, varió en función tanto de la línea celular como del plásmido introducido, ya que ambos factores influyen en la eficiencia de transfección y en la capacidad de generar clones viables. Algunas líneas celulares, como hTERT RPE-1, presentaron mayores dificultades, por lo que se requirió partir de un mayor número de placas transfectadas, y en lugar de diluciones elevadas se hizo una dilución más pequeña de 1:2 por placa junto con medio condicionado, entendiendo por medio condicionado el medio enriquecido con factores secretados por las células durante su crecimiento.

En cambio, líneas con especial facilidad para la incorporación del plásmido permitieron diluciones mucho mayores, llegándose a diluir hasta 1:1000. Además, el plásmido también condicionó la efectividad de la transfección. Por ejemplo, la expresión de tubulina marcada mostró una eficiencia global menor en comparación con plásmidos codificantes para la señal de localización nuclear (NLS), que resultaron ser más eficientes en términos de expresión.

Pasados unos días, cuando se observó la aparición de pequeños grupos de células en las placas, indicativo de que las células transfectadas estaban proliferando, se procedió a añadir la concentración de antibiótico determinada previamente en la titulación. Este paso permitió iniciar la selección de clones positivos, eliminando las células no transfectadas y favoreciendo el aislamiento de aquellos clones que habían incorporado el plásmido de interés.

3.4.3.3. Aislamiento y selección clonal

Tras la incorporación del antibiótico de selección correspondiente, las células que no habían incorporado el plásmido comenzaron a morir, dando lugar a *debris* celular en el medio de cultivo. Para favorecer el crecimiento de los clones resistentes, el medio se renovó periódicamente, manteniendo en todo momento la concentración óptima de antibiótico. Este proceso permitió limpiar el entorno celular y crear unas condiciones más favorables para la proliferación de los clones. En algunas líneas celulares el *debris*,

dependiendo de la línea y del antibiótico, desapareció con el cambio de medio mientras en otras permaneció adherido a la placa, lo que dificulta la identificación posterior de clones.

Transcurrido un tiempo variable (de dos semanas a dos meses) según la línea celular utilizada y el antibiótico, comenzaron a observarse agrupamientos celulares compatibles con clones individuales. En ese momento, se marcaron los clones en las placas por el exterior y se examinó cada uno de ellos mediante microscopía de fluorescencia en un microscopio Leica DM IL LED con el objetivo de identificar, de forma rápida, aquellos clones que presentaban el marcaje deseado. Es importante señalar que la resistencia al antibiótico no garantiza la presencia del marcador, ya que durante la integración del plásmido o por procesos de silenciamiento génico, algunos clones pueden perder la expresión del gen de interés. La comprobación de los clones al microscopio se realizó siempre a la máxima velocidad posible, procurando que nunca las células recibieran más de unas décimas de segundo de exposición. La intención de este proceso fue tan sólo hacer un cribado inicial para eliminar los clones sin marca o con marca heterogénea o débil.

Una vez identificados los clones positivos para el marcaje deseado, se procedió a su aislamiento y picado. Generalmente, se aislaron 48 clones por experimento, pero en algunos casos en los que la eficiencia de éxito del marcaje no era muy elevada, se seleccionaron más clones. Para ello, se prepararon tantas placas (de 12 o 24 pocillos, según la robustez de crecimiento de cada línea celular) como clones se deseaban recoger, siempre por duplicado: una placa destinada al crecimiento de los clones seleccionados sin perturbaciones, y otra idéntica para el seguimiento detallado por microscopía y su posterior análisis fenotípico.

Antes del aislamiento, se aspiró todo el medio de la placa original, dejando aproximadamente 1 mL. Sobre cada clon marcado se colocó un cilindro hueco de acero de 1 cm de diámetro, con paredes de 1 mm de espesor, embebido en un extremo en grasa de vacío para garantizar el aislamiento hídrico y su adhesión a la placa. A continuación, se añadió dentro de cada pocillo 120 μ L de tripsina-EDTA para desprender las células del clon. Una vez la placa tuvo todos los cilindros colocados, se incubaron a 37°C durante cinco minutos. El contenido completo de cada cilindro, tras pipetear cuidadosamente con punta amarilla en su interior para desprender las células, se transfirió a una de las placas duplicadas, previamente preparada con 3 mL de medio y antibiótico. De esta placa, se recogió 1 mL del cultivo, antes de que las células se

adhirieran al fondo, y se transfirió a su réplica correspondiente con 1 mL adicional de medio fresco y antibiótico.

Las placas de los clones aislados se incubaron en las condiciones estándar indicadas en el apartado 3.4.1. Tras varios días de cultivo, los clones fueron evaluados de nuevo en el microscopio Leica DM IL LED para confirmar su calidad, esta vez de forma más cuidadosa. Los criterios para la selección final de los clones incluyeron: tasa proliferativa, morfología celular, estabilidad y homogeneidad del marcaje, y ausencia de aberraciones cromosómicas evidentes (figura 15). En general se seleccionaban seis clones a los que se permitía crecer siempre en dúplicas y se repetía la observación y selección entre ellos. Por último, en todos los casos, se seleccionó un “clon vencedor” y, un “clon acompañante” como reserva. Finalmente, los clones seleccionados se escalaron y se criopreservaron en FBS suplementado con un 10% de DMSO en nitrógeno líquido. En general, dado que no siempre los clones resultan ser del todo estables (respecto a su marcaje) se congelaron 18 viales por clon.

Este procedimiento se repitió para cada uno de los clonajes realizados. La obtención de las líneas estables se realizó de forma secuencial. Primero se introdujo el marcaje para histona H2B, y posteriormente el resto de marcajes. En total, a lo largo de este trabajo se han llevado a cabo con éxito 28 clonajes (sin contabilizar los intentos fallidos), cuya durabilidad ha sido diferente en función de la línea celular, el plásmido y el antibiótico de selección. Se han obtenido un total de siete líneas celulares marcadas con la histona H2B y α -tubulina, además de diez líneas con marcaje de histona H2B y tres repeticiones de una señal de localización nuclear (3xNLS) en la que cada repetición es una secuencia de siete aminoácidos capaz de conducir proteínas al núcleo. Asimismo, se ha generado una línea celular con un triple marcaje de histona H2B, una isoforma de la proteína LAP2 (LAP2 β) que interacciona con proteínas de la envoltura nuclear y 3xNLS. Algunos clonajes requirieron un único intento, mientras que los más “difíciles” llegaron a requerir más (once en el peor de los casos). En general, podemos afirmar que dos intentos suelen ser suficientes: en el primero se obtiene información para ajustar la dilución seriada e información sobre la frecuencia de éxito de los clones; en el segundo se ajusta la dilución, tiempo de antibiótico, ajustes de concentración del mismo, etc., en función de los resultados obtenidos del primero.

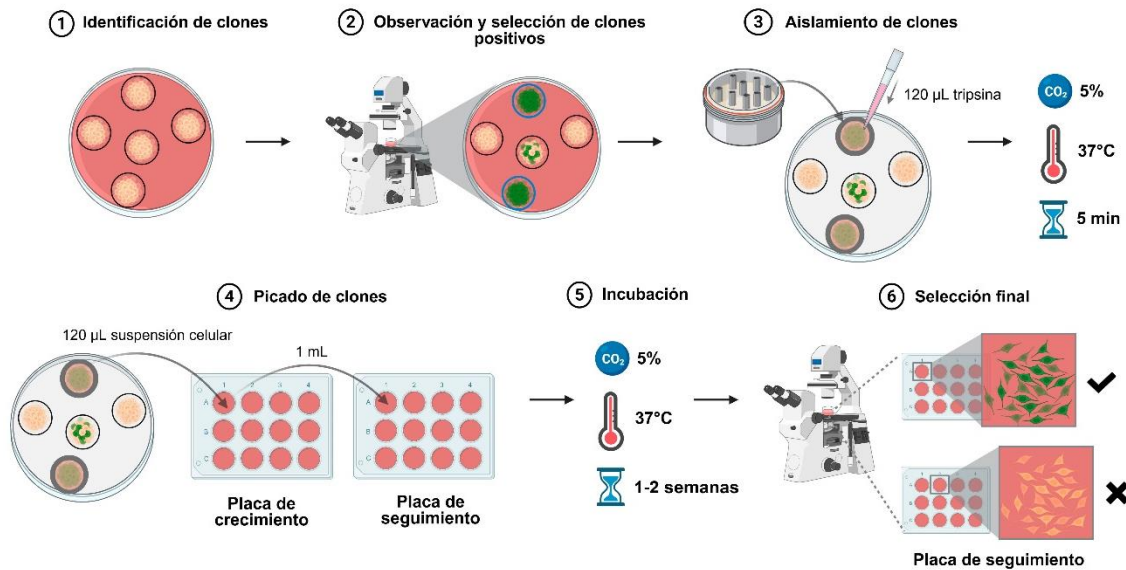


Figura 15. Representación esquemática y simplificada del procedimiento de aislamiento y selección clonal. (1) En la placa de dilución se identifican los clones, (2) se observan y seleccionan aquellos con el marcaje de interés para posteriormente aislarlos con cilindros (3) y picarlos para sembrarlos en placas de cultivo (4). Transcurrido un periodo de incubación variable (5), se procede a la selección final de los clones para escalarlos y criopreservarlos (6).

3.4.3.3.1. Obtención de la línea celular NIH/3T3 T

Las líneas celulares en cultivo, pueden transformarse de manera espontánea o mediante condiciones que favorecen dicha transformación. Entre los factores que pueden inducir este cambio se encuentra la pérdida de la inhibición por contacto, una característica que puede alterarse bajo condiciones de estrés o cultivo forzado (Stepanenko & Kaversusan, 2012; Voloshin et al., 2023).

En este trabajo se obtuvo una variante transformada de la línea celular NIH/3T3, que denominamos NIH/3T3 T, mediante la inducción de la pérdida de inhibición por contacto. En condiciones estándar, está descrito que la línea parental debe cultivarse sin superar el 60% de confluencia para mantener esa propiedad intacta. Sin embargo, se permitió que las células NIH/3T3 (con la histona H2B-mCherry) alcanzaran y sobrepasaran la confluencia (>100%) renovando el medio con frecuencia. Tras varios días, se observó la muerte progresiva de muchas de las células en cultivo, pero algunas sobrevivieron y comenzaron a formarse montículos celulares, indicativos de un crecimiento no controlado y una posible transformación.

Estos clones se aislaron individualmente utilizando el mismo protocolo de clonaje descrito en el apartado 3.4.3.3. Finalmente, se seleccionaron aquellos con características transformadas, con morfología normal y que mantuvieran el marcaje de la línea parental, estableciendo así la línea celular NIH/3T3 T empleada en este trabajo, a la que posteriormente se le introdujo el marcaje con α -tubulina por un lado y con 3xNLS por otro.

3.4.3.3.2. Dilución límite

En determinados clonajes, en la etapa de selección final cuando se eligieron el clon “vencedor” y “acompañante”, ocurrió que algunas células del clon habían perdido el marcaje deseado. Para finalmente obtener un clon estable, se realizó un re-clonaje mediante una “dilución límite”. Para favorecer el crecimiento y supervivencia de las células, los días previos a la realización de la dilución límite, se guardó medio condicionado.

La dilución límite consistió en sembrar una única célula por pocillo, para obtener clones que mantengan el marcaje deseado. Para ello, se prepararon dos tubos cada uno con 10 mL de medio condicionado y 10 mL de medio completo fresco. En el tubo 1, la concentración de células deseada fue de 0,6 células/pocillo, y en el tubo 2, de 0,3 células/pocillo. Se aspiró el medio de la placa de cultivo, y se añadió 1 mL de tripsina-EDTA para lavar. A continuación, se añadió de nuevo 1 mL de tripsina-EDTA y se incubaron las células entre 1-5 minutos a 37°C. En un tubo, previamente preparado con 4 mL de medio completo fresco, se añadió todo el volumen de la suspensión celular y se centrifugó (Eppendorf 5810 R) a 1000 rpm durante 5 minutos. Pasado ese tiempo, se eliminó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 1 mL de medio completo fresco. La concentración de la suspensión celular se determinó mediante un contador automático, y las células se diluyeron a la concentración deseada de 0,6 y 0,3 células/pocillo en los dos tubos que ya contenían los 20 mL de medio. Finalmente, en dos placas de 96 pocillos se sembraron 200 μ L de la suspensión celular por pocillo, y se incubaron siguiendo las condiciones estándar descritas en el apartado 3.4.1.

Transcurridas unas semanas, las placas de 96 se visualizaron en contraste de fases para determinar si en cada pocillo habían crecido clones, y se marcaron aquellos pocillos en los que solo había un único clon, eliminando los que tuvieran varios clones o carecieran de ellos. En el momento que se observó que los clones tenían un tamaño considerable, se picaron y se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente.

3.4.4. Inmunofluorescencia indirecta

La inmunofluorescencia indirecta se basa en el reconocimiento de un antígeno específico por parte de un anticuerpo primario, seguido de la detección de éste mediante un anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo.

Debido a su elevada proporción citoplasma/núcleo, se utilizó la línea celular A549, lo cual facilita la visualización de las estructuras celulares, especialmente el citoesqueleto de tubulina. En una placa de 12 pocillos se colocaron cubreobjetos de vidrio estériles de 18 mm de diámetro. La concentración celular se determinó mediante un contador automático, y las células se sembraron a una densidad de 30.000 células/mL para asegurar una distribución adecuada y permitir un análisis óptimo. Tras la siembra, las células se incubaron 24 horas en las condiciones estándar descritas previamente (apartado 3.4.1). Al día siguiente, se añadieron los tratamientos experimentales correspondientes manteniendo un 0.1% v/v de DMSO (vehículo), y se volvieron a incubar.

El protocolo empleado para el tipo de experimentos presentados en esta tesis doctoral fue optimizado tras múltiples pruebas, ajustando condiciones para maximizar la visualización de cada uno de los anticuerpos utilizados. Antes de la fijación, las células se trataron, por un lado, con polietilenglicol 8000 (PEG) que actúa como una matriz de soporte, que ayuda a mantener la integridad celular. Por otro lado, con un detergente (Triton X-100) para permeabilizar las células y que los anticuerpos puedan entrar al interior celular. Para preservar la morfología celular, las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 3,7% comercial (Im et al., 2019). El protocolo empleado se detalla a continuación: se prepararon los tampones PEMP, PEMT y PEMF descritos en la sección 3.2. Para conservar las células en mitosis, y que no se perdieran con los primeros cambios, la placa se centrifugó (Eppendorf 5810 R) suavemente a 500 rpm durante 5 minutos. A continuación, se aspiró el medio de cultivo y se añadió 1 mL/pocillo de tampón PEMP, volviendo a centrifugar con las mismas condiciones. Tras eliminar el PEMP, se añadieron 500 µL/pocillo de tampón PEMT durante 30 segundos. Se retiró el tampón y se añadieron 2 mL/pocillo de tampón PEMF, incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente, se realizó un lavado rápido con 1 mL/pocillo de PBS seguido de dos lavados de 5 minutos para eliminar el fijador. Luego, se añadieron 500 µL/pocillo de PBS/BSA 3% para bloquear uniones inespecíficas, incubando durante 30 minutos a

temperatura ambiente. Se eliminó el bloqueo realizando un lavado con 1 mL/pocillo de PBS. Se añadieron los anticuerpos primarios diluidos previamente en PBS/BSA 3% y se incubaron a 37°C durante 1 hora.

Tras la incubación con los anticuerpos primarios, se realizó un lavado rápido y dos lavados de 5 minutos, con PBS/BSA 3%, para eliminar el exceso de anticuerpo. A continuación, se añadieron los anticuerpos secundarios, también diluidos en PBS/BSA 3%, repitiendo las mismas condiciones de incubación y realizando un lavado más. Para la visualización de los núcleos celulares se usó, el agente intercalante de ADN, DAPI a 3 µM, también diluido en PBS/BSA 3%, que se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Finalmente, se realizaron tres lavados de 5 minutos.

Nombre	Tipo	Dilución empleada
anti- α -Tubulin (DM1A)	Primario	1:600
anti-Pericentrin	Primario	1:1000
anti-NuMA	Primario	1:1000
anti-Lamin A	Primario	1:1000
Goat anti-Mouse Alexa Fluor 488	Secundario	1:1000
Goat anti-Rabbit Alexa Fluor 555	Secundario	1:2500

Tabla 5. Anticuerpos utilizados en los ensayos de inmunofluorescencia indirecta. Se incluyen sus respectivas diluciones empleadas.

Para el montaje de las preparaciones, los cubreobjetos fueron extraídos de los pocillos cuidadosamente con la ayuda de una aguja con punta doblada en forma de gancho y pinzas de punta fina, y colocados sobre los portaobjetos con la cara celular hacia arriba. Encima de cada cubreobjetos, se añadieron 12 µL de tampón glicina como medio de montaje y conservación de las preparaciones. Finalmente, se colocó encima un cubreobjetos de 22x22 mm y el montaje se selló con esmalte de uñas transparente. Las preparaciones se almacenaron a -20°C para su análisis.

3.4.5. Fijación con Carnoy's y tinción con Giemsa

La tinción con Giemsa junto con tratamiento hipotónico y una fijación con solución de Carnoy's, es una técnica clásica utilizada para el análisis morfológico de los cromosomas y la identificación de posibles alteraciones.

Para el análisis cromosómico de las líneas celulares (véase el apartado 4.2 de resultados, figura 18), el día previo a la fijación, las células se trataron con 0,5 μ M de nocodazol durante 16 horas con el objetivo de acumular el máximo posible de células detenidas en c-mitosis. El nocodazol es un agente desestabilizante de microtúbulos e impide la formación del huso mitótico, de tal forma que las células quedan arrestadas en prometafase (Jordan & Wilson, 2004). Para la recolección de las células, se aspiró el medio de cultivo dejando aproximadamente 3 mL y, primero se realizó un *shake-off* para despegar e individualizar las células mitóticas, y segundo con un raspador se separaron del sustrato las células en interfase (*scrape-off*) con el objetivo posterior de tener un *pellet* mayor que no se perdiera durante los cambios de fijador. Para el análisis de la evasión del punto de chequeo del huso (véase la figura 26) se utilizó paclitaxel 150 nM durante 16 horas y el material fue recogido de la misma manera.

Para evaluar el efecto de los agentes clastogénicos y aneugénicos sobre la mitosis y la estructura de los cromosomas (véase el apartado 4.7 de resultados, figuras 42 y 43) se emplearon dos protocolos diferentes en función del tipo de fármaco. Los compuestos aneugénicos se incubaron durante 16 horas y para la recolección de las células se empleó el método de *shake-off* para obtener únicamente células en mitosis. Los compuestos clastogénicos se incubaron durante 3 horas, se lavaron las placas con 4 mL de medio fresco y se incubaron durante 10 minutos a 37°C, y se repitió el mismo proceso 3 veces. Finalmente, las placas se incubaron durante 40 horas. Transcurrido ese tiempo, se añadió 0,5 μ M de nocodazol durante 4 horas con el objetivo de acumular células en mitosis sin tener cromosomas hipercondensados en los que no se podrían distinguir bien las aberraciones. Pasado ese tiempo, para la recolección de las células se procedió realizando primero *shake-off* y segundo *scrape-off*.

Independientemente del modo de recolección de las células, se siguió el protocolo previamente descrito en (Giménez-Abián & Clarke, 2009): se prepararon por separado los dos componentes necesarios para la fijación (véase apartado 3.2), para ser mezclados justo antes de su uso y obtener la solución de Carnoy's (3:1). Se transfirieron

2 mL de la suspensión celular a un tubo de 15 mL para someterlas al tratamiento hipotónico, con el objetivo de hincharlas y mejorar la dispersión de los cromosomas.

El tratamiento hipotónico se realizó añadiendo rápidamente agua del grifo en el centro del tubo que contiene la suspensión celular siguiendo la siguiente relación: 60% de agua del grifo y 40% de la suspensión celular. El tratamiento hipotónico se llevó a cabo durante 5,5 minutos a temperatura ambiente. Para detener el efecto hipotónico, se mezclaron *in situ* los componentes del fijador, y se añadió Carnoy's hasta alcanzar un volumen total de 12 mL, mezclando suavemente para no dañar las células.

Los tubos se centrifugaron (Eppendorf 5810 R) a 1000 rpm durante 5 minutos. Se aspiró cuidadosamente el sobrenadante, eliminando la máxima cantidad de agua posible y prestando especial atención al *pellet*, ya que es extremadamente lábil. Se añadió nuevamente fijador (12 mL) y se repitió el proceso tres veces para una correcta fijación de las células. Después, los *pellets* se resuspendieron en un volumen adecuado de fijador en función del tamaño del sedimento celular. Este material, así fijado, puede conservarse a -20°C durante décadas, aunque, de pasar mucho tiempo, es recomendable hacer un nuevo cambio de fijador con fijador recién preparado.

Desde una altura aproximada de 4 cm, se dejaron caer tres gotas (con puntas amarillas) de suspensión celular sobre cada portaobjetos, en distintas zonas del mismo. El esparcido de las células fue suficiente actuando así; pero si no lo fuera por necesidades concretas del material o el trabajo a realizar, en el momento que se observa el reflejo irisado de la luz en la superficie húmeda a punto de secarse, se sopla suavemente con los labios humedecidos para facilitar una mejor dispersión celular.

Una vez secas, las preparaciones se introdujeron en una cubeta *Coplin* vertical y se sumergieron durante 2-2,5 minutos en una solución de Giemsa que se preparó al 2% en agua desionizada a pH 6,8 con la adición de pastillas de tampón Gurr. Transcurrido ese tiempo, las preparaciones se enjuagaron brevemente con agua y se dejaron secar completamente al aire.

Finalmente, se añadieron 30 μ L de medio de montaje Entellan sobre cada muestra, colocándose encima un cubreobjetos de 40x60 mm. Las preparaciones se almacenaron a temperatura ambiente hasta su análisis.

3.5. Microscopía

3.5.1. Microscopía *time-lapse in vivo*

Los experimentos multipocillo se realizaron en placas P12-1,5H y los experimentos individuales multiposición en μ -Dish, ambas con fondo de vidrio. Para la preparación de las placas multipocillo a partir de placas P100 con cada línea celular, se añadió 1 mL de tripsina-EDTA para lavar, y se añadió 1 mL de tripsina-EDTA a cada placa de cultivo que se incubaron a 37°C entre 1-5 minutos dependiendo de la línea. Tras la disgregación celular, todo el volumen se transfirió a un tubo de 15 mL con medio completo fresco y se centrifugó (Eppendorf 5810 R) a 1000 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante, y el *pellet* se resuspendió en 1 mL de medio para determinar la concentración celular empleando un contador automático.

En los experimentos en los que se compararon líneas celulares humanas *versus* de roedores y líneas celulares transformadas *versus* inmortalizadas, se sembró cada una de las líneas a una densidad ajustada a sus características de crecimiento: A549, U-2 OS, HCT-116, hTERT RPE-1, CHO-K1 y L-929 a 30.000 células/mL, NIH/3T3 NIH/3T3 T a 20.000 células/mL HeLa a 15.000 células/mL y BALB/c SV40 y NRK a 10.000 células/mL. A las 48 horas, se añadieron los compuestos correspondientes e inmediatamente después se inició la adquisición de las imágenes.

Para los experimentos multipocillo en los que se comparan las aberraciones nucleares generadas por agentes aneugénicos y clastogénicos se empleó la línea celular humana U-2 OS con triple marcaje, que se sembró a la misma densidad mencionada en el párrafo anterior. Los compuestos clastogénicos se añadieron a las concentraciones deseadas y se incubaron durante 3 horas. Transcurrido ese tiempo, se lavaron los pocillos con 1 mL de medio fresco y se incubaron durante 10 minutos a 37°C, y se repitió el mismo proceso tres veces. A continuación, en los pocillos correspondientes, se añadieron los compuestos aneugénicos a las concentraciones deseadas e inmediatamente después se inició la adquisición de las imágenes.

Los experimentos de *time-lapse* se han llevado a cabo en un microscopio Leica DMI8 equipado con una cámara Hamamatsu Flash 4.0 V3 utilizando el software LASX. Los experimentos multipocillo se realizaron con un objetivo de 20x (apertura numérica 0,80) en un único plano focal, y para evitar fototoxicidad la adquisición de las imágenes fue cada 5 minutos durante 48 horas cuando se comparó entre líneas celulares, y durante

72 horas cuando se comparó entre clastogénicos y aneugénicos. Por otro lado, los experimentos individuales se realizaron con un objetivo de 63x (apertura numérica 1,40) adquiriendo varios planos en z hasta un total de 12 μm , con una frecuencia de adquisición de 1 imagen cada 20-40 segundos durante 24 horas. Las condiciones de exposición para cada tipo de experimento se fijaron previamente buscando exposiciones inferiores en 3-5 veces a la mínima en la que se observó algún tipo de toxicidad. Las exposiciones de los experimentos multipocillo, fueron comprobadas después en experimentos de diez días de duración, sin observarse efectos tóxicos en las células.

3.5.2. Microscopía de campo claro y de epifluorescencia

Las imágenes de inmunofluorescencia y tinción de Giemsa se adquirieron utilizando un microscopio Leica DM6000B, equipado con dos sistemas de captura según el tipo de análisis. Para la microscopía de fluorescencia se empleó la cámara Leica DFC360 FX, controlada mediante el software LASAF. Las imágenes de epifluorescencia se tomaron en planos z ligeramente desplazados entre sí, pero cercanos, con el fin de optimizar el enfoque específico de cada marcador. Para la microscopía de campo claro, utilizada en las preparaciones teñidas con Giemsa, se empleó la cámara Leica DFC420 C, que recoge color real, con el software LAS v4.13. En ambos casos, para la adquisición de las imágenes se utilizó normalmente un objetivo de 100x con una apertura numérica de 1,46.

3.6. Análisis de datos

En los experimentos de microscopía *time-lapse in vivo*, los datos fueron adquiridos mediante el software LASX. Se seleccionaron a mano, en pantalla, 120 células, en cada línea celular y condición experimental, de las que se contabilizaron un total de 100 células en todos los casos. Los datos de seguimiento, medición temporal de eventos, clasificación y otros análisis se obtuvieron manualmente utilizando la interfaz del programa LASX y plantillas de Excel. Los experimentos realizados con líneas celulares que expresan H2B y α -tubulina, así como aquellos con H2B, LAP2 β y 3xNLS constan de tres réplicas biológicas. Los ensayos con marcaje de H2B y 3xNLS constan de 2 réplicas biológicas. La representación gráfica y el análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el software GraphPad Prism 8.0.2. Los gráficos representan las medias de los datos, exceptuando los gráficos de puntos que muestran la dispersión de cada una de las células, y las barras de error se corresponden con los errores estándar

de la media (SEM). Cuando los datos cumplieron con el supuesto de normalidad, se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y comparación múltiple con el test de Dunnett, mientras que en aquellos casos en los que los datos no mostraban una distribución normal, se utilizó el test de Kruskal-Wallis, seguido de comparaciones múltiples con el test de Dunn (n.s. = no significancia; **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

El procesado y montaje de los vídeos de microscopía se realizó con el software de procesamiento de imágenes FIJI (ImageJ), mientras que el tratamiento de imágenes, así como el diseño final de las figuras se efectuó mediante Adobe Photoshop CS5 (12.1 x64), para las fotografías del microscopio, y Adobe Illustrator CS5 (15.1.0) para los dibujos y esquemas.

4

RESULTADOS

4.1. Guía de resultados

Hoy en día está estandarizado el uso de ratones como principal animal de experimentación preclínica para la aprobación de un fármaco. Tienen similitudes genéticas y fisiológicas con los humanos, un ciclo de vida corto y una reproducción rápida de varias generaciones al año. Por otra parte, son animales de pequeño tamaño por lo que son fáciles de mantener ya que requieren poco espacio y son de fácil manejo; y, además, son un modelo de investigación más aceptado socialmente que primates u otros mamíferos (Justice & Dhillon, 2016; Rosenthal & Brown, 2007). Sin embargo, en muchas ocasiones puede no haber concordancia entre los resultados obtenidos en ratones y el tratamiento de los pacientes. Para evaluar la tasa de éxito y fracaso entre distintas especies de animales (ratón, rata, monos, conejos y perros) y humanos, Leenaars y colaboradores revisaron un total de 121 estudios que incluyeron 104 compuestos, 10 metodologías de estudio y 7 síntomas o eventos. Informaron que los modelos de no roedores predicen la toxicidad en humanos en un 63% mientras que los modelos roedores lo hacen en un 43% de las veces. Su conclusión fue que la translación de los resultados obtenidos en modelos animales a humanos es muy variable e impredecible (Leenaars et al., 2019).

En la mitosis, a partir de una célula madre se obtienen dos células hijas genéticamente idénticas (véase el apartado 1.2.1.2 de la introducción). Este proceso, está controlado por el punto de chequeo del huso (SAC), el cual se asegura de que las cromátidas hermanas de los cromosomas no se separen hasta que todos los cinetocoros de todos los cromosomas hayan anclado a microtúbulos del huso y biorientado en la placa ecuatorial. Al tratar las células con antimitóticos, quedan arrestadas en c-mitosis, y en muchas ocasiones pueden evadir el SAC originando células multinucleadas (para más detalle, véase el apartado 1.3 de la introducción). Como se ha comentado con anterioridad, los ratones desarrollan tumores con mucha más facilidad que los humanos, lo que podría indicar que los puntos de chequeo que regulan la correcta progresión del ciclo celular, especialmente la mitosis, son menos rigurosos pudiéndose generar aneuploidías con más facilidad, siendo origen a su vez del desarrollo de cánceres. Antes de pasar a la experimentación preclínica en modelos animales, los compuestos se analizan en cultivos celulares. Por todo ello, en la presente tesis, hemos buscado estudiar las principales diferencias entre líneas celulares humanas *versus* de roedores en su respuesta a los tratamientos con tres drogas antimitóticas, para ofrecer información a la comunidad científica y médica que permita ayudar a interpretar mejor los resultados en modelos animales y diseñar experimentos más precisos.

Los resultados de estos experimentos se muestran en las figuras 16-51 (exceptuando los esquemas de las figuras 36, 46 y 49). Los resultados mostrados en las figuras 16-28, 33 y 42-43 se han obtenido mediante material fijado, que permite una observación detallada de distintos aspectos citológicos ya sea mediante fijación en Carnoy's, tinción con Giemsa y observación en campo claro, para el estudio de los cromosomas; o mediante fijación con paraformaldehído, inmunofluorescencia indirecta y observación por microscopía de fluorescencia para la localización y el análisis de diferentes estructuras celulares, normalmente el citoesqueleto y el huso mitótico de tubulina, pero también otras como pericentrina, NuMA y lamina. Por otra parte, las figuras 29-32, 34-35, 38-41 y 44-51 muestran los resultados del seguimiento temporal, célula a célula, mediante microscopía *time-lapse* de su respuesta a los diferentes agentes. Para ello se han utilizado clones, generados *ex profeso*, que expresan de forma estable varias proteínas con marcaje fluorescente que permiten la visualización de la cromatina, la tubulina, la envoltura nuclear o la integridad de dicha envoltura nuclear, habiéndonos centrado en procesos como la entrada y salida de mitosis o la generación de núcleos aberrantes de diferentes tipos.

El tratamiento mediante quimioterapia se emplea en cánceres sistémicos como leucemias o linfomas, y en muchos tumores sólidos como tratamiento principal o junto a otras terapias. La quimioterapia tiene como fin destruir las células tumorales mediante la administración de fármacos citotóxicos que van dirigidos contra procesos celulares o su microambiente como por ejemplo la síntesis del material genético, la división celular o la angiogénesis. Con una batería de once compuestos empleados en quimioterapia o en diferentes fases de investigación preclínica, clasificados en clastogénicos (si provocan daño en el ADN) o aneugénicos (si provocan aneuploidías), se ha querido ver si el denominador común entre todos ellos para matar a las células tumorales es la generación de aberraciones nucleares en una línea humana transformada. Los resultados de estos experimentos se muestran en las figuras 42-48. Las dos primeras de esta sección muestran la citología de las aberraciones cromosómicas o de congregación cromosómica generadas por estos agentes y las figuras siguientes los datos extraídos del seguimiento celular mediante microscopía *time-lapse*.

En todos los experimentos realizados en la presente tesis doctoral, la concentración de cada compuesto utilizado se ha establecido empleando la mínima concentración que mostraba el máximo fenotipo. En la comparativa entre compuestos clastogénicos *versus* aneugénicos, la concentración utilizada fue determinada primero mediante una

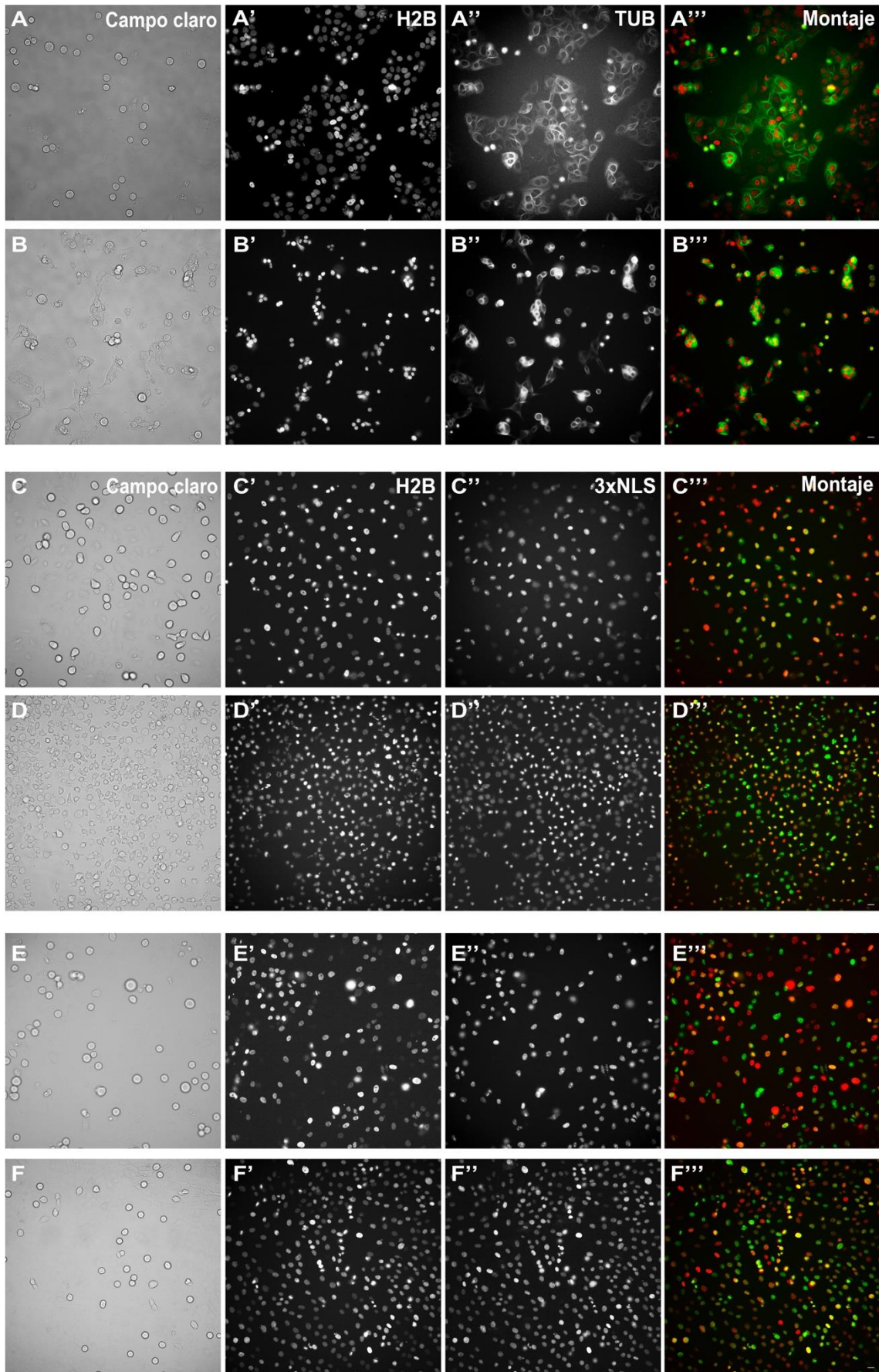
búsqueda bibliográfica exhaustiva para, posteriormente, analizar el efecto de un rango de concentraciones de cada agente en experimentos pilotos no mostrados.

Los resultados mostrados entre los apartados 4.4 y 4.7 se han obtenido mediante experimentos de microscopía *time-lapse in vivo* diseñando experimentos multipocillo de manera que la comparación entre líneas celulares (o en su caso entre compuestos) se realiza bajo las mismas condiciones experimentales de temperatura, concentración de CO₂ y exposiciones lumínicas. Para la adquisición de las imágenes, se ha utilizado un objetivo de 20x que aporta mayor profundidad de campo y elevada resolución relativa (A.N. de 0,8). En cada una de las réplicas realizadas para cada experimento, se han contabilizado un total de 100 células por pocillo y cada una de las células se ha seguido individualmente (para más detalle véase el apartado 3.5.1 de material y métodos).

La figura 16 es un ejemplo de cómo se han obtenido los datos de las figuras 29-41. Se trata de fotogramas *in vivo* tras 12 horas del tratamiento con paclitaxel, maytansina y GSK923295 con una línea celular humana y una línea celular de roedor, con marcaje de histona H2B y de α -tubulina, o bien de histona H2B y 3xNLS. Por otro lado, la figura 17 muestra un ejemplo de fotogramas *in vivo* (figuras 44-48) de la línea U-2 OS con triple marcaje (histona H2B, LAP2 β y 3xNLS) tras 48 horas del tratamiento con bleomicina y alisertib. La representación esquemática de las figuras 16 y 17 puede observarse en la figura 1 de anexos, así mismo los vídeos 7, 8 y 9 de anexos son ejemplos concretos de los *time-lapse* de dichas figuras.

Figura 16. Fotogramas de experimentos de microscopía *time-lapse in vivo*. Marcajes dobles. En cada panel, se muestra una línea celular humana (arriba) y una de roedor (abajo). En el panel superior (A-A'') U-2 OS y (B-B'') NIH/3T3 tratadas con 150 nM de paclitaxel muestran marcaje de histona H2B-mCherry y de α -tubulina-eGFP. En el panel central (C-C'') A549 presenta marcaje de H2B-mCherry y 3xNLS-eGFP y (D-D'') L-929 de H2B-eGFP y 3xNLS-mCherry tratadas con 25 nM de maytansina. En el panel inferior, (E-E'') RPE- 1 tiene marcaje de H2B-mCherry y 3xNLS-eGFP y (F-F'') NRK-52E marcaje de H2B-eGFP y 3xNLS-mCherry, tratadas con 50 nM y 1 μ M de GSK923295, respectivamente. La adquisición de las imágenes de los experimentos multipocillo se realizó tomando imágenes cada 5 minutos durante 48 horas con un objetivo de 20x. Para el análisis de los resultados se contabilizaron un total de 100 células por réplica en cada caso realizando el seguimiento temporal a cada una de las células individuales, apuntando en una plantilla Excel el momento de cada cambio de estado de cada célula. Los fotogramas de la figura muestran ejemplos representativos de los diferentes experimentos realizados tras 12 horas de tratamiento. Véanse los vídeos 7 (U-2 OS) y 8 (NRK-52E) de anexos. Barra de escala: 20 μ m.

Resultados



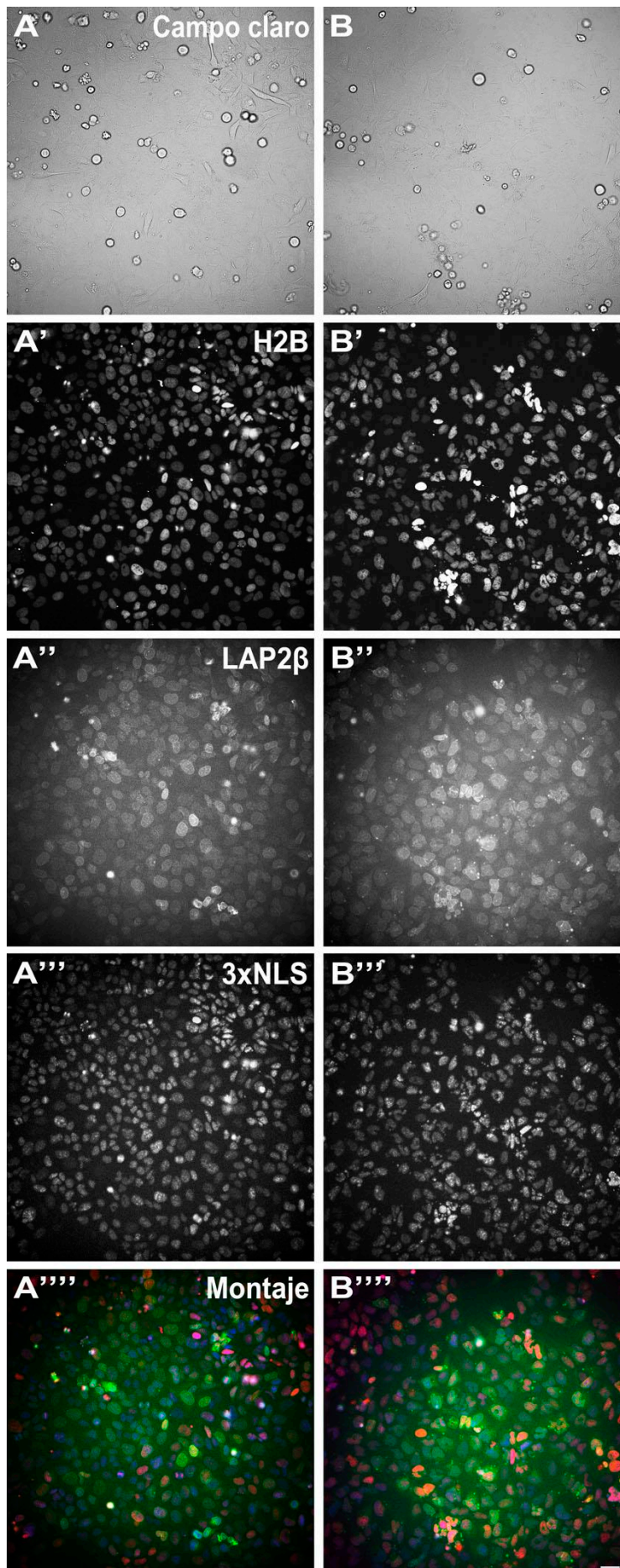


Figura 17. Fotogramas de experimentos de microscopía *time-lapse in vivo*. Marcaje triple. Los fotogramas de la figura muestran ejemplos representativos de los diferentes experimentos realizados tras 48 horas de tratamiento empleando la línea celular U-2 OS con marcaje de histona H2B-mCherry, LAP2 β -eGFP y 3xNLS BFP2. En el panel izquierdo (A-A''''') se muestra tratamiento con 20 μ M bleomicina y en el panel derecho (B-B''''') se muestra tratamiento con 250 nM de alisertib. La adquisición de las imágenes de los experimentos multipocillo se realizó tomando imágenes cada 5 minutos durante 72 horas con un objetivo de 20x. Para el análisis de los resultados se contabilizaron un total de 100 células por réplica en cada caso realizando el seguimiento temporal a cada una de las células individuales, apuntando en una plantilla Excel el momento de cambio de estado de cada célula. Véase el vídeo 9 (bleomicina) de anexos. Barra de escala: 20 μ m.

4.2. Análisis cromosómico de las líneas celulares

Al comenzar con los experimentos preliminares de microscopía *time-lapse in vivo* para valorar la viabilidad de la tesis y la veracidad o no de la hipótesis subyacente a la misma (líneas de roedores y humanas se comportan diferente ante el tratamiento con antimetabólicos), nos encontramos con un resultado sorprendente: la línea celular de ratón NIH/3T3 y la línea celular humana HeLa, al tratarlas con paclitaxel ambas tenían un comportamiento y un fenotipo muy similares, tanto al visualizar las células en fluorescencia como en contraste de fases. Este hecho presentaba dos posibilidades: o la hipótesis de partida era incorrecta o una de las líneas no correspondía con lo que creíamos que era.

Dadas estas observaciones se realizaron tinciones cromosómicas con Giemsa de ambas líneas celulares para poder comparar cariotipos. Mientras los cromosomas humanos son meta o submetacéntricos en su mayoría, los cromosomas de ratón son acrocéntricos (con un brazo pequeño casi inobservable por su tamaño mínimo). El resultado reveló que el 100% de las células de ambas líneas presentaban cromosomas de la especie humana. En ese momento decidimos repetir el mismo proceso con la línea parental original de “ratón” a partir de la cual se habían realizado todos los clonajes celulares para obtener las líneas estables con marcaje de las proteínas fluorescentes. Se detectó que el 90% de las células tenía cromosomas humanos, y un 10% tenía cromosomas propios de ratón. Estos resultados sugieren que hubo una contaminación cruzada previa cometida por un error humano en el momento de congelación de la línea celular, unos 20 años antes. Con las sucesivas divisiones necesarias para realizar los clonajes, las células humanas habían desplazado totalmente a las de ratón.

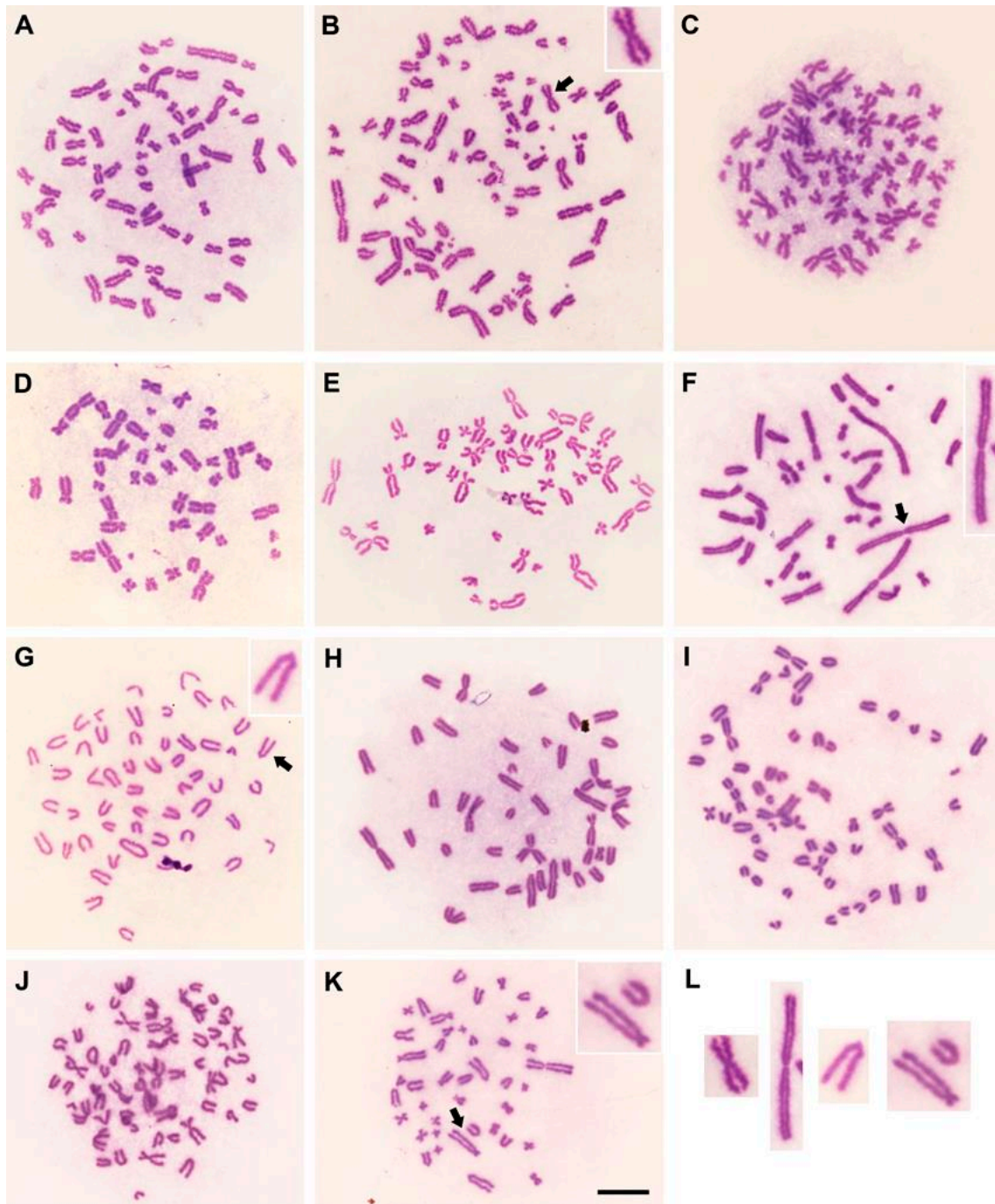
Las consecuencias de este hecho fueron que aumentamos el número de líneas a incluir en el estudio, el número de especies, y que, en todos los casos, comprobamos que los cromosomas del cariotipo correspondían a los de la especie teórica; así como nos aseguramos de la fiabilidad de la fuente de la línea. Los resultados no son comparables a un autenticado de las líneas, pero, afortunadamente, las cuatro especies utilizadas en el estudio poseen cromosomas claramente diferentes.

Por ello se realizó un análisis citogenético básico mediante tratamiento hipotónico, fijación con Carnoy's, esparcido y tinción con Giemsa de todas las líneas empleadas. Esto sirvió como control y verificación de identidad de cada especie para descartar otras posibles contaminaciones cruzadas o errores de identidad. Para este estudio hemos

empleado cuatro especies diferentes: *Homo sapiens* (humano), *Mus musculus* (ratón común), *Rattus norvegicus* (rata de alcantarilla) y *Cricetulus griseus* (hámster chino).

El cariotipo humano, como se visualiza en la figura 18 A, B, C, D y E, se caracteriza por la presencia mayoritaria de cromosomas metacéntricos y submetacéntricos, aunque también se observa un porcentaje muy reducido de cromosomas acrocéntricos. En cuanto a ratón, todos sus cromosomas son acrocéntricos como se observa en el panel G de la figura 18 (Arslan & Zima, 2014), aunque en algunas poblaciones se han observado fusiones robertsonianas (Gropp et al., 1972), en las que los cromosomas se fusionan para formar cromosomas metacéntricos como ocurre en algunos cromosomas de algunas líneas celulares de ratón: NIH/3T3, NIH/3T3 T y L-929 representadas en los paneles H, I y J de la figura 18. En el caso de la rata (figura 18 K), la morfología de los cromosomas es variable, presentando una mezcla de cromosomas metacéntricos, submetacéntricos y acrocéntricos, destacando algunos acrocéntricos de gran tamaño que la identifican (Yiğit et al., 1998). Con respecto a hámster-chino, se observa una combinación de morfologías cromosómicas, pero se caracteriza por la existencia de cromosomas metacéntricos extremadamente largos y finos en comparación con las otras especies, mostrados en el panel F de la figura 18, y que la han hecho la favorita de muchos citólogos en el pasado (Gamperl et al., 1976). El panel L presenta los cromosomas seleccionados en los recuadros, de cada una de las cuatro especies, para una comparación directa.

Figura 18. Análisis citogenético básico de las líneas utilizadas. (A) A549, (B) U-2 OS, (C) HeLa, (D) HCT-116, (E) hTERT RPE- 1, (F) CHO-K1, (G) BALB/c SV40, (H) NIH/3T3, (I) NIH/3T3 T, (J) L-929 y (K) NRK-52E. (L) de izquierda a derecha: cromosoma humano, de hámster chino, de ratón y de rata. Las células se trataron con 0,5 μ M de nocodazol durante 16 horas. Después, tras un tratamiento hipotónico, se fijaron con solución de Carnoy's y se tiñeron con Giemsa para verificar el cariotipo de las líneas celulares. (A-E) Líneas celulares humanas, todas muestran preponderancia de cromosomas meta o submetacéntricos. (F-K) Líneas celulares de roedores. El panel F muestra los típicos largos y finos cromosomas del hámster chino, G-J muestran líneas de ratón donde predominan los cromosomas acrocéntricos y K muestra cromosomas de rata que, aunque no muy diferentes a los humanos morfológicamente, muestran bastantes cromosomas acrocéntricos algunos de gran tamaño que son característicos de esta especie. Barra de escala: 10 μ m.



4.3. Alteraciones en interfase y mitosis inducidas por el tratamiento con paclitaxel, maytansina y GSK923295

La comparativa entre líneas celulares humanas *versus* de roedores se ha realizado tratando las células con tres compuestos antimitóticos: paclitaxel como agente estabilizante (polimerizante) de microtúbulos, maytansina como agente desestabilizante (despolimerizante) de microtúbulos y GSK923295 como perturbador de la congregación cromosómica al inhibir a la quinesina CENP-E. Para evaluar su efecto y alteraciones sobre el ciclo celular realizamos experimentos de inmunofluorescencia indirecta en la

línea celular A549, seleccionada por ser fenotípicamente bastante plana en interfase y por presentar una relación citoplasma/núcleo elevada, lo que la hace idónea para la visualización del citoesqueleto y otros componentes celulares.

Los microtúbulos (MTs), junto con los filamentos intermedios y la actina, constituyen el citoesqueleto celular. Los MTs, son cilindros huecos de 25 nm de diámetro formados por el ensamblaje de heterodímeros de α/β tubulina (Downing & Nogales, 1998). Intervienen en diferentes procesos biológicos como el tráfico intracelular mediado por motores celulares, el mantenimiento de la morfología celular y la división celular. Para su observación se ha utilizado un anticuerpo contra α -tubulina de uso frecuente en la literatura (véase la tabla 5).

Igualmente, se utilizaron otros dos anticuerpos para inmunolocalizar otras proteínas diferentes (véase la tabla 5). Por un lado, para la visualización de los centrosomas se usó pericentrina como proteína estructural del material pericentriolar. Pericentrina (PCNT) actúa como andamiaje fundamental ya que recluta complejos de γ -tubulina, facilitando la nucleación de microtúbulos y la formación del huso mitótico. (Dictenberg et al., 1998; Doxsey et al., 1994).

Por otro lado, NuMA (del inglés, *Nuclear Mitotic Apparatus*), la cual interviene en distintos procesos a lo largo del ciclo. En células en interfase, participa en la organización de la arquitectura nuclear, ya que si es eliminada al reensamblarse la envoltura nuclear se forman múltiples núcleos desorganizados o deformes (Serra-Marques et al., 2020). Con la ruptura de la envoltura nuclear al acabar la profase, NuMA se redistribuye desde el núcleo hacia los polos del huso mitótico, participando en la organización y estabilidad del huso. La inclusión de NuMA en este estudio se debe a que nos indica cuándo en un núcleo se ha reconstituido su envoltura nuclear al salir de mitosis, lo cual es útil dada las salidas aberrantes de mitosis (c-mitosis) que se producen con estos agentes antimitóticos, donde no siempre sería distinguible un grupo de cromosomas hipercondensados mitóticos de un núcleo de restitución con morfología aberrante o de un micronúcleo.

4.3.1. Interfase

En células control (DMSO) se observa una red microtubular laxa y organizada, más densa en la región perinuclear, correspondiente al centro organizador de microtúbulos. Por el contrario, al añadir 150 nM de paclitaxel la cantidad de microtúbulos aumenta, son de aspecto más rígido y se observa la presencia de gruesos haces. En cuanto a maytansina hemos utilizado dos concentraciones diferentes. Los experimentos de microscopía *time-lapse* se realizaron a una concentración de 25 nM para asegurar una alteración completa de la dinámica de tubulina. Como se puede ver en las inmunofluorescencias, a esa concentración, la red microtubular ha desaparecido casi por completo. Por ello, para visualizar mejor un fenotipo más intermedio, las células también se trataron con 5 nM de maytansina, observándose una red microtubular mucho más laxa que en el control, con mucha menor cantidad de microtúbulos, los cuales presentan roturas en ocasiones. Por último, al tratar las células con 50 nM de GSK923295 la red de microtúbulos es indistinguible de las células control, ya que como se ha comentado anteriormente el inhibidor de CENP-E no tiene ningún efecto sobre tubulina. El ADN, teñido con DAPI, permite la observación de los núcleos celulares. Se observan núcleos con apariencia normal en todos los tratamientos, también se pueden distinguir zonas más intensas de heterocromatina, donde el ADN está más compactado, localizadas en la periferia nuclear y en torno al nucléolo (figuras 19 y 20).

En células en interfase, la pericentrina, como se puede observar en la figura 19, se ve en los centrosomas, y en algunos casos ese marcaje es doble, como en el caso del control, 25 nM maytansina y GSK923295, lo que indica que los centriolos ya se han duplicado. En cambio, NuMA (figura 20) aparece localizada en el núcleo, pero con una distribución granular diferente a la del DAPI, ya que NuMA está asociada a la matriz nuclear y no se une directamente al ADN (Merdes & Cleveland, 1998).

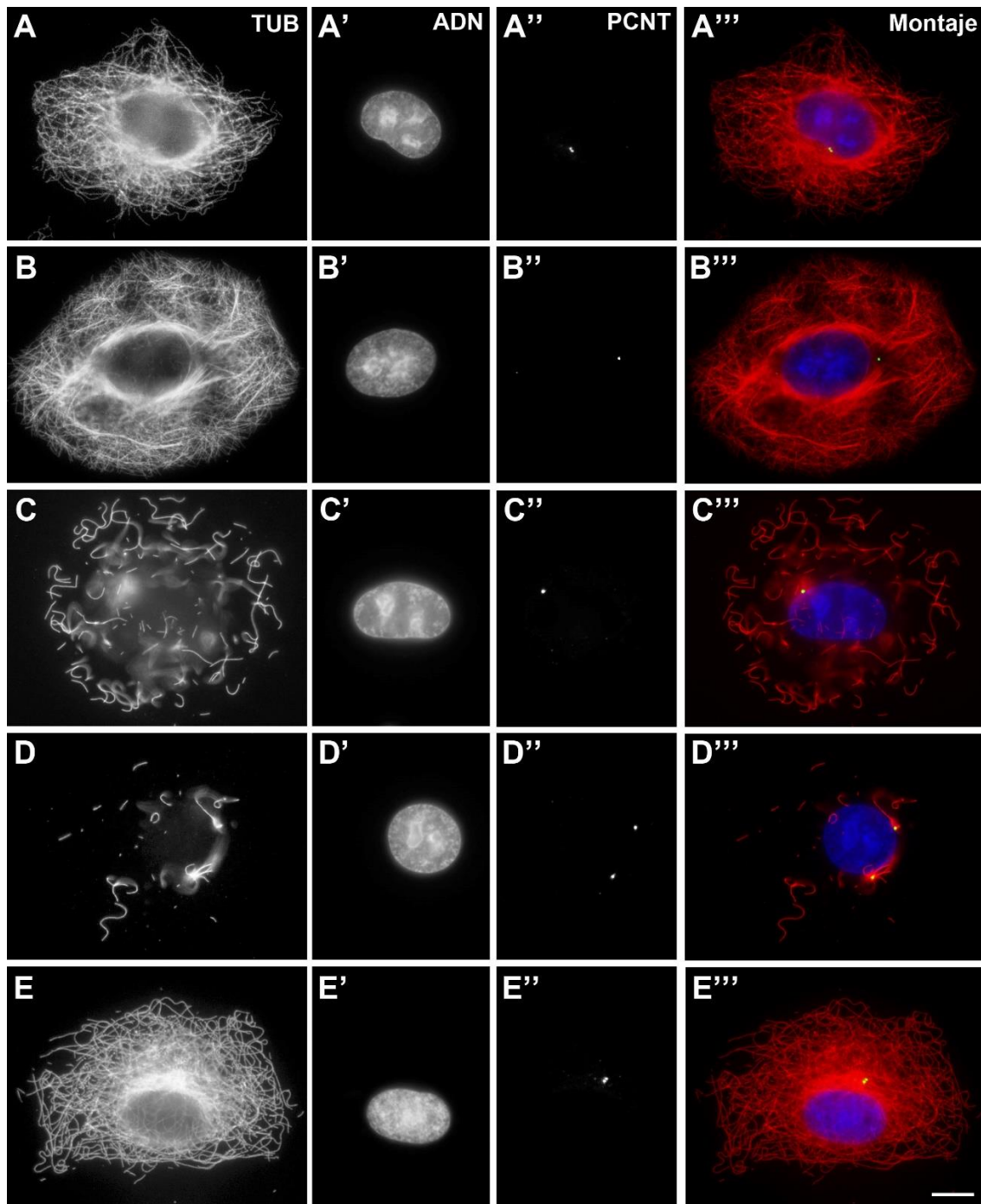


Figura 19. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta de células A549 en interfase: α -tubulina, DAPI y pericentrina. Los paneles A, B, C, D y E muestran la inmunolocalización de α -tubulina (TUB); A', B', C', D' y E' los núcleos celulares (ADN) y A'', B'', C'', D'' y E'' la señal de pericentrina (PCNT). El último panel de cada columna presenta la superposición en color de las anteriores (Montaje). De arriba hacia abajo, las filas corresponden a los siguientes tratamientos: (A) Control (DMSO), (B) 150 nM paclitaxel, (C) 5 nM maytansina, (D) 25 nM maytansina y (E) 50 nM GSK923295. A y E muestran una red microtubular laxa; B muestra una red microtubular con un exceso de microtúbulos, de aspecto rígido, y de gruesos haces, comparada con A y E. C y D muestran distintos grados de despolimerización de la red microtubular interfásica, aunque

todavía se observa la región donde se sitúa el centrosoma. Todas las imágenes fueron adquiridas con el mismo aumento (100x 1,46 A.N.). Barra de escala: 10 μ m.

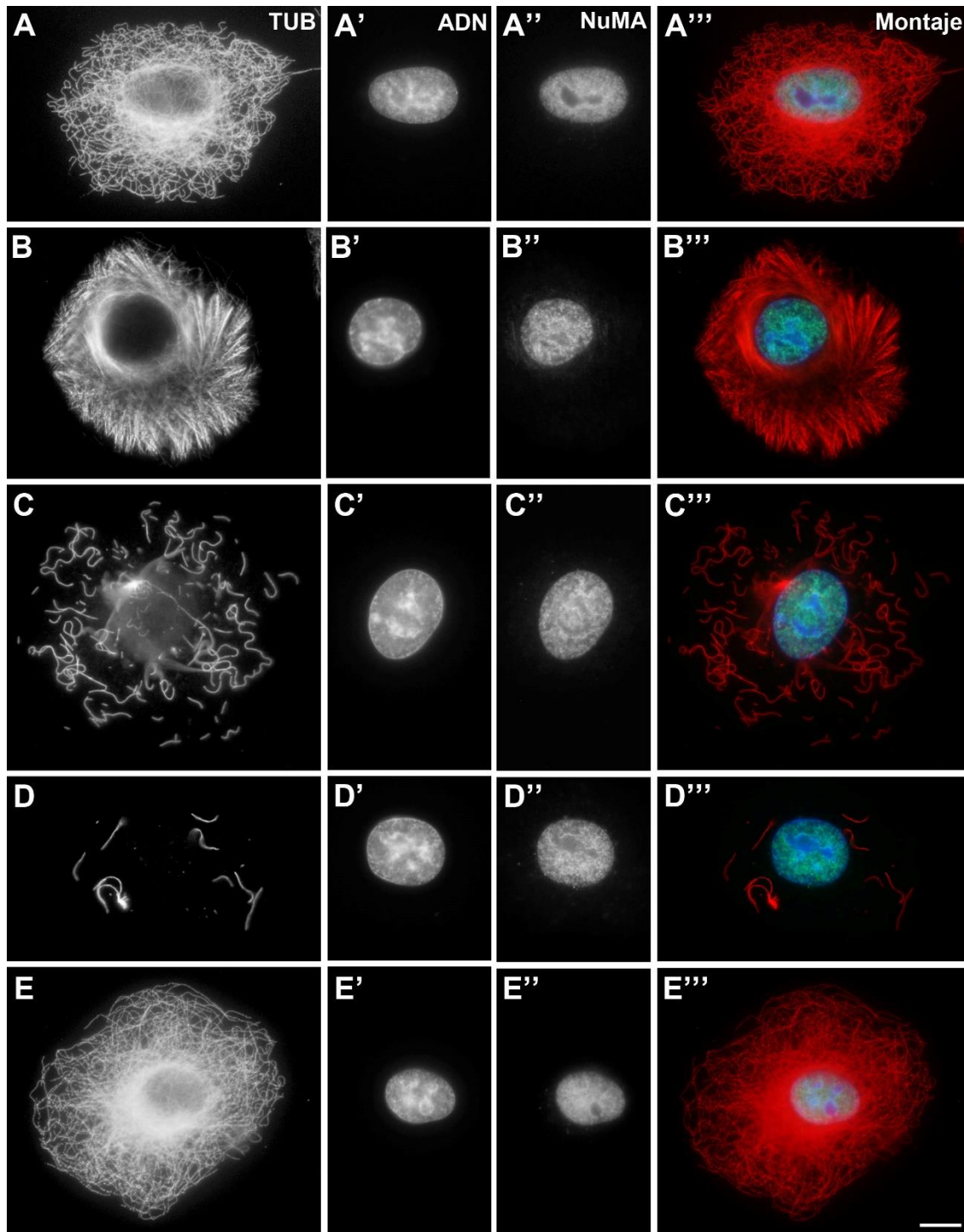


Figura 20. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta de células A549 en interfase: α -tubulina, DAPI y NuMA. Los paneles A, B, C, D y E muestran la inmunolocalización de α -tubulina (TUB); A', B', C', D' y E' los núcleos celulares (ADN) y A'', B'', C'', D'' y E'' la inmunolocalización de NuMA (NuMA). El último panel de cada columna presenta la superposición en color de las anteriores (Montaje). De arriba hacia abajo, las filas corresponden a los siguientes tratamientos:

(A) Control (DMSO), (B) 150 nM paclitaxel, (C) 5 nM maytansina, (D) 25 nM maytansina y (E) 50 nM GSK923295. A y E muestran una red microtubular laxa en la que la organización de la misma es indistinguible entre A (control) y E (inhibición de CENP-E). B muestra una red microtubular con un exceso de microtúbulos y de gruesos haces, de aspecto rígido, con menos curvas que el control; C y D muestran distintos grados de despolimerización de la red microtubular interfásica, aunque todavía se observa la región donde se sitúa el/los centrosomas. En los paneles con DAPI se observan las regiones heterocromáticas ricas en A-T y en la superposición de canales de la última columna se observa que la tinción con DAPI difiere de la inmunolocalización de NuMA. Todas las imágenes fueron adquiridas con el mismo aumento (100x, A.N. 1,46). Barra de escala: 10 μm .

4.3.2. Mitosis

Durante la mitosis, proceso por el cual una célula madre origina dos células hijas genéticamente idénticas, el citoesqueleto se desorganiza para formar una estructura totalmente diferente denominada huso bipolar mitótico.

En células control (DMSO), se observa un huso bipolar normal (figura 21) en el que se pueden diferenciar tres tipos de microtúbulos: los interdigitados que se extienden de un polo hacia el otro y se superponen en la región central del huso ayudando a estabilizar su estructura y, en anafase B, a separar activamente ambos polos, contribuyendo indirectamente a la segregación de las cromátidas. Las fibras K o fibras cinetocóricas son haces gruesos de microtúbulos que anclan a los cinetocoros de los cromosomas y participan directamente en la segregación de las cromátidas hermanas. Los astrales irradian desde los centrosomas hacia la periferia celular contribuyendo a la orientación del huso y a la estabilidad del conjunto (Petry, 2016).

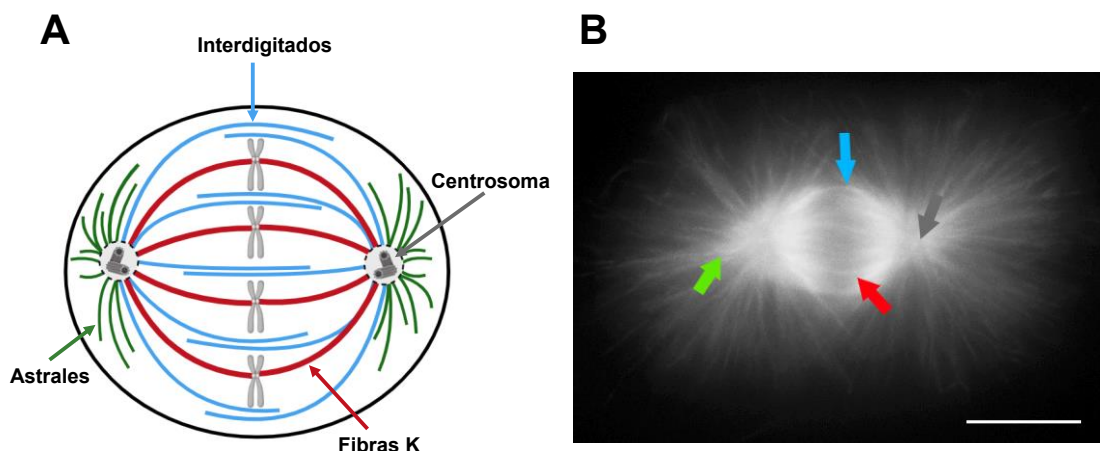


Figura 21. Tipos de microtúbulos en el huso mitótico. (A) Representación esquemática de la estructura de un huso bipolar en metafase. (B) Micrografía de inmunofluorescencia indirecta de una célula (A549) en metafase con inmunomarcaje de α -tubulina. Microtúbulos interdigitados (flecha azul), microtúbulos astrales (flecha verde) y fibras K o cinetocóricas (flecha roja). La flecha gris marca el polo del huso mitótico, donde se sitúa el centrosoma. Barra de escala: 10 μ m.

En células tratadas con paclitaxel, en c-mitosis, se generan múltiples polos afuncionales con más densidad de microtúbulos y una forma característica de cometa. Del mismo modo ocurre con 5 nM de maytansina, las células son multipolares, aunque los polos que se originan son más pequeños, discretos y con forma de estrella. A 25 nM de maytansina, apenas quedan restos de tubulina que parece localizarse en las regiones cinetocóricas de los cromosomas. En cambio, con el inhibidor de CENP-E el huso es completamente normal. Los cromosomas en células control biorientan formando la placa metafásica, por el contrario, con paclitaxel y maytansina éstos no siguen ningún tipo de organización adoptando una distribución aberrante, además de estar más condensados respecto al control. En el caso de GSK923295, aquellos cromosomas que en el momento de comenzar la mitosis se localizaban más próximos a la placa ecuatorial han conseguido biorientar, pero aquellos que se encontraban más alejados, al inhibir CENP-E, no pueden congresar quedando a ambos lados de la célula cercanos a los polos del huso bipolar (figuras 22 y 23).

En mitosis control, la pericentrina se localiza en los centrosomas de cada uno de los polos de la célula, al igual que ocurre con las células tratadas con GSK923295. En el caso del tratamiento con drogas que afectan a los microtúbulos, la formación de husos aberrantes conlleva la obtención de centrosomas deslocalizados. En el tratamiento con paclitaxel, en la célula mostrada, los polos más grandes tienen algo de marcaje de pericentrina, pero principalmente se localiza en un tercer polo de tamaño menor, al igual que ocurre con maytansina donde también se deslocaliza pericentrina y en la célula mostrada aparece únicamente en una zona (figura 22).

En células control, NuMA sale del núcleo y se redistribuye al huso mitótico, sobre todo en los puntos de anclaje de los microtúbulos a los polos (Lydersen & Pettijohn, 1980). De igual forma ocurre con el inhibidor de CENP-E. En el caso de paclitaxel y maytansina, NuMA se localiza dispersa en los múltiples polos que se generan, y en el caso de 25 nM de maytansina, NuMA se localiza en las regiones coincidentes de los restos de tubulina en regiones próximas a los cinetocoros lo que sugiere que la proteína sigue

desempeñando su papel como organizador del extremo menos de los microtúbulos (figura 23).

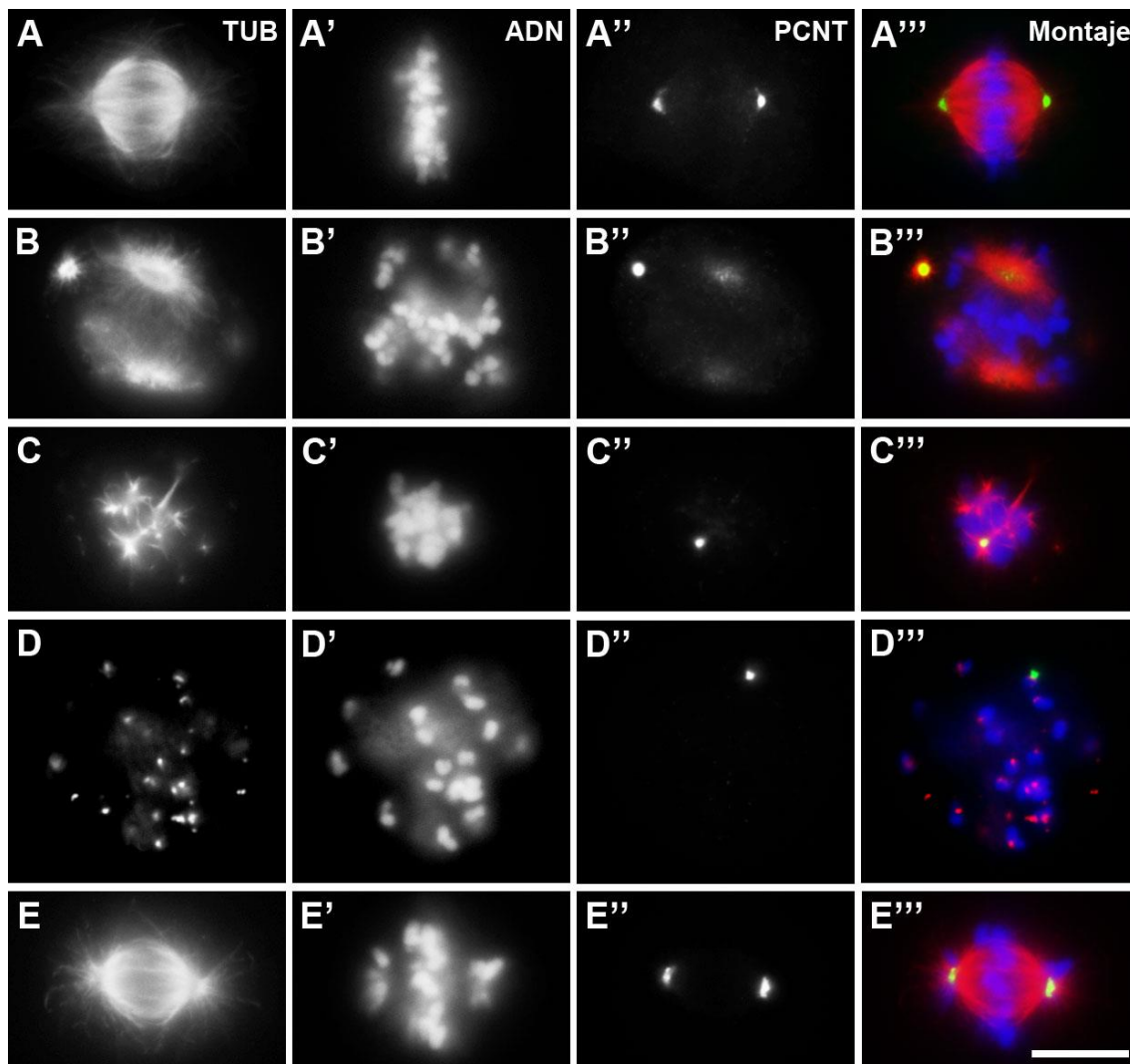


Figura 22. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta de células A549 en mitosis. α -tubulina, DAPI y pericentrina. Los paneles A, B, C, D y E muestran la inmunolocalización de α -tubulina (TUB); A', B', C', D' y E' los cromosomas mitóticos teñidos con DAPI (ADN) y A'', B'', C'', D'' y E'' la señal de pericentrina (PCNT). La última columna presenta la superposición en color de las anteriores (Montaje). De arriba hacia abajo, las filas corresponden a los siguientes tratamientos: (A) Control (DMSO), (B) 150 nM paclitaxel, (C) 5 nM maytansina, (D) 25 nM maytansina y (E) 50 nM GSK923295. A y E muestran un huso bipolar "control", pero mientras A' muestra todos los cromosomas en la placa ecuatorial, E' muestra, además de una pseudoplaqa ecuatorial, algunos cromosomas cercanos a los polos celulares, visualizados por su marcaje con pericentrina en A'' y E''. B y C muestran múltiples polos afuncionales, de gran tamaño en B (paclitaxel, estabilizante) y pequeño tamaño en C (maytansina 5 nM, desestabilizante); con mayor concentración de maytansina (25 nM) en D los polos desaparecen completamente y la tubulina aparece en puntos discretos que usualmente coinciden con las regiones centroméricas

de los cromosomas. Tanto en B' como en D', los cromosomas se visualizan dispersos por el citoplasma; en ocasiones (C') se agrupan en el centro de la célula. La PCNT, con los agentes que afectan tubulina (B'', C'' y D'') aparece deslocalizada respecto a los polos de tubulina. Todas las imágenes fueron adquiridas con el mismo aumento (100x, 1,46 de A.N.). Barra de escala: 10 μ m.

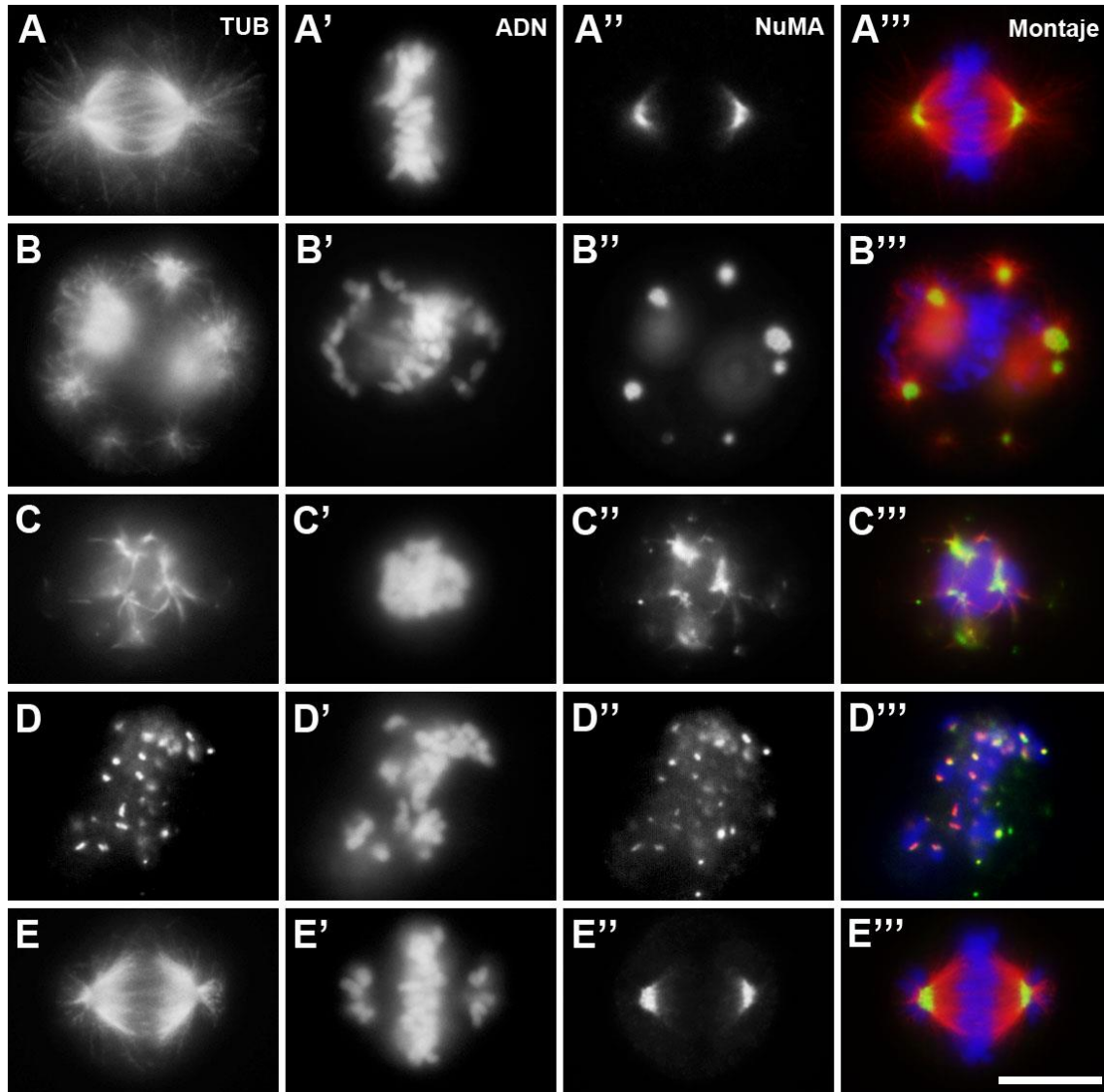


Figura 23. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta de células A549 en mitosis. α -tubulina, DAPI y NuMA. Los paneles A, B, C, D y E muestran la inmunolocalización de α -tubulina (TUB); A', B', C', D' y E' los cromosomas mitóticos teñidos con DAPI (ADN) y A'', B'', C'', D'' y E'' la inmunolocalización de NuMA (NuMA). La última columna presenta la superposición en color de las columnas anteriores (Montaje). De arriba hacia abajo, las filas corresponden a los siguientes tratamientos: (A) Control (DMSO), (B) 150 nM paclitaxel, (C) 5 nM maytansina, (D) 25 nM maytansina y (E) 50 nM GSK923295. Como en la figura 22, A y E muestran un huso mitótico bipolar normal en ambos casos. B muestra múltiples polos de diferentes tamaños en presencia de paclitaxel (seis en foco dos fuera de él); C muestra pequeños polos estrellados y D

pequeños focos discretos de tubulina que, en general, coinciden con los centrómeros cromosómicos (D'''). A' muestra los cromosomas en la placa ecuatorial, B', C' y D' los cromosomas hipercondensados, dispersos en el citoplasma (B' y D') o agrupados en la zona central (C') y E' los cromosomas en pseudoplaque ecuatorial excepto dos grupos cercanos a cada polo del huso bipolar. A'' y E'' muestra NuMA localizada en los polos del huso bipolar; B'' y C'' muestran a NuMA localizando en todos los polos afuncionales de tubulina y en D'' coincidiendo, en general, con los puntos discretos de tubulina. Todas las imágenes fueron adquiridas con el mismo aumento (100x, 1,46 A.N.). Barra de escala: 10 μ m.

4.3.3. Citología de la evasión del punto de chequeo del huso

Cuando todos los cinetocoros de los cromosomas están anclados a las fibras K del huso y biorientados en la placa metafásica, el punto de chequeo del huso se satisface. En ese momento, la cohesión entre cromátidas hermanas desaparece (corte de cohesina Scc1 (Hauf et al., 2001) y liberación de concatenaciones por topoisomerasa II (Giménez-Abián et al., 2002)), y las cromátidas hermanas empiezan a migrar con rapidez a los polos opuestos de la célula. Cuando la cariocinesis ha acabado, los cromosomas empiezan a descondensar y comienza a formarse el anillo contráctil de actina-miosina para la citocinesis que tendrá su reflejo en el "cuerpo medio" (del inglés, *midbody*) de tubulina que es el último punto visible de contacto entre las células hijas.

En células control, el resultado de una correcta cariocinesis es la reconstitución de los dos núcleos de las células hijas y el desensamblaje del huso mitótico para formar de nuevo el citoesqueleto. Esta decondensación cromosómica y la desaparición del huso mitótico son la consecuencia visible de que la célula abandona el estado mitótico y entra en interfase; la razón bioquímica está en la degradación de la ciclina B del MPF por parte del proteasoma, al haber sido ubiquitinada por el APC/C como la segunda de las dianas de la satisfacción del punto de chequeo del huso.

Al tratar las células con estas drogas antimitóticas el punto de chequeo del huso no puede satisfacerse y las células sufren un bloqueo prolongado en c-mitosis hasta que terminan por evadir el punto de chequeo (véase el apartado 1.3.2 de la introducción). En ese momento, está descrito que las células abandonan la mitosis sin citocinesis (Cheng & Crasta, 2017). Nosotros, sin embargo, observamos con independencia del agente utilizado para bloquear las células, que éstas realizan una citocinesis aberrante. En *time-lapse* observamos violentos movimientos y evolución de varios citoplasmas hijos uno de los cuales acaba reuniendo todo el material cromosómico siendo los otros

citoplasmas hijos reabsorbidos o separados del citoplasma “principal” sin material nuclear en su interior (vídeos 2, 3, 4 y 5 de anexos).

Es relevante que, en inmunofluorescencia observamos la presencia de uno o varios *midbodies* (cuerpos medios) al igual que en el control, aunque no consiguen separar el material genético que en la mayoría de los casos acaba reunido en uno sólo de los citoplasmas hijos. En cuanto al citoesqueleto con paclitaxel, la forma aberrante que se genera durante la evasión tiene la presencia de gruesos haces de microtúbulos, por el contrario, con 5 nM de maytansina el citoesqueleto es más laxo y con 25 nM casi inexistente. En cambio, con GSK923295 se asemeja más a la morfología del control (figuras 24 y 25).

En una división control, gracias al marcaje de la pericentrina se puede ver cómo los centrosomas se han segregado entre las dos células hijas. Con las células tratadas, puede ocurrir, como en el caso del tratamiento con 5 nM de maytansina y GSK923295, que la división aberrante genere dos células en las que una de las dos contiene los dos centrosomas. Otra opción, es que la célula finalmente no pueda dividirse y se reintegre todo en una única célula dando lugar a numerosos centrosomas aberrantes (figura 24).

En células control, cuando la mitosis llega a su fin, los cromosomas se han descondensado y la envoltura nuclear se reconstituye, de tal forma que NuMA se localiza de nuevo dentro de los núcleos de las células hijas. Es por ello, por lo que NuMA sirve como un marcador de reorganización nuclear. Las células con tratamientos que han evadido el punto de chequeo del huso no dividen bien su material genético y van a ir reconstruyendo la envoltura nuclear alrededor de estructuras aberrantes. Cómo se puede ver en la figura 25, NuMA va a ir incorporándose de nuevo a dichas estructuras progresivamente indicando que esas células ya han salido de mitosis. Es más, observamos que la intensidad del marcaje con NuMA puede ser muy diferente entre los distintos micronúcleos de las células resultantes.

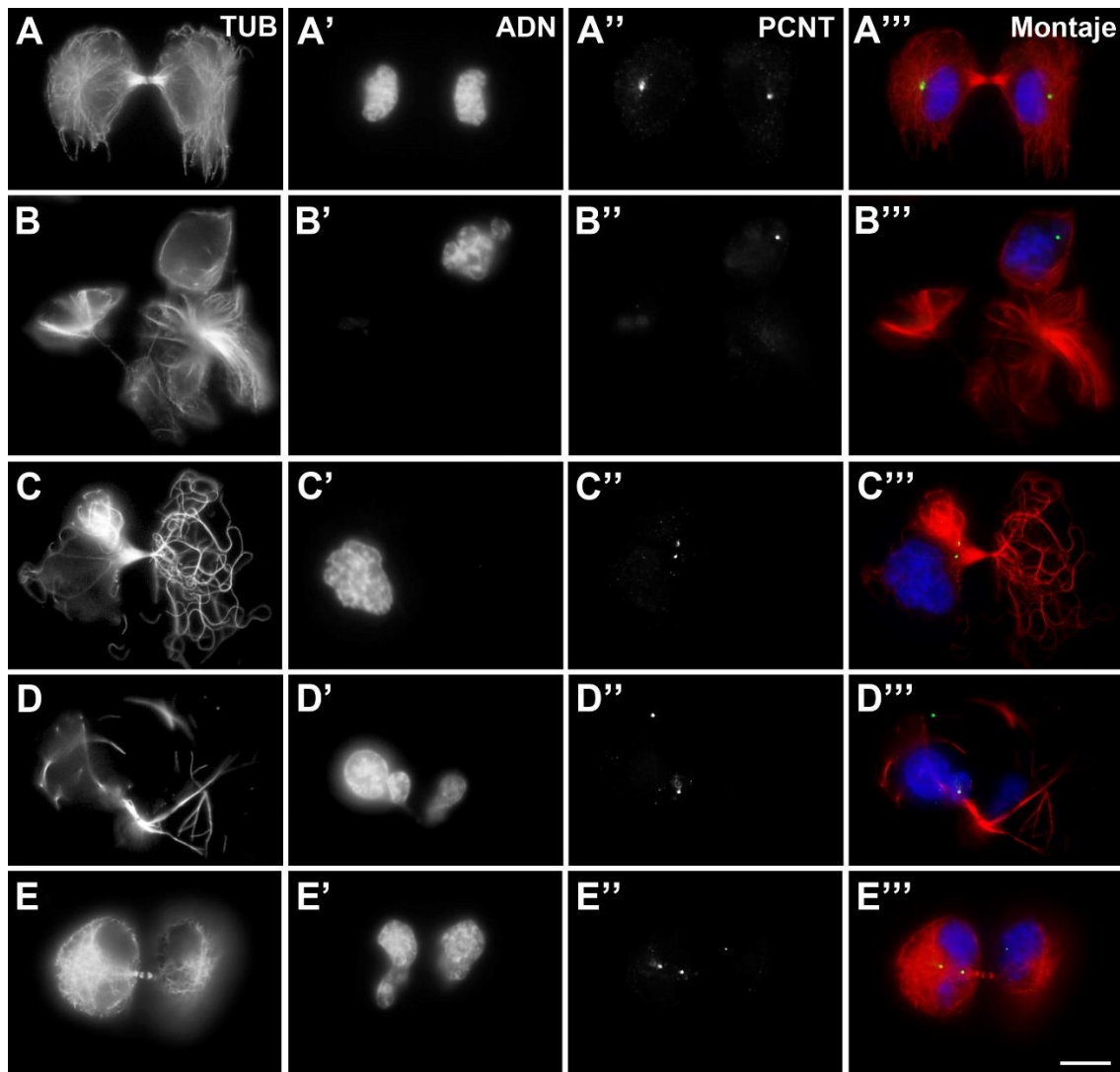


Figura 24. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta de células A549 de la evasión del punto de chequeo del huso: α -tubulina, DAPI y pericentrina. Los paneles A, B, C, D y E muestran la inmunolocalización de α -tubulina (TUB); A', B', C', D' y E' los núcleos celulares teñidos con DAPI (ADN) y A'', B'', C'', D'' y E'' la señal de pericentrina (PCTN). La última columna presenta la superposición en color de las columnas anteriores (Montaje). De arriba hacia abajo, las filas corresponden a los siguientes tratamientos: (A) Control (DMSO), (B) 150 nM paclitaxel, (C) 5 nM maytansina, (D) 25 nM maytansina y (E) 50 nM GSK923295. En la primera fila, control, se observa la correcta segregación de citoplasmas (A), de núcleos (A') y de centrosomas (A''). En la segunda, paclitaxel, se muestra la generación de 4-5 citoplasmas hijos con intentos de *midbody* poco claros (B) donde sólo el superior derecho obtiene material nuclear (B') y centrosoma (B''). En la tercera fila, maytansina 5 nM, observamos la división del citoplasma en dos, con un *midbody* central claro y con diferente organización del citoesqueleto entre los citoplasmas hijos (C); sólo uno de los citoplasmas recibe material nuclear y centrosoma (C' y C'', respectivamente). En la cuarta, maytansina 25 nM, de nuevo se generan varios citoplasmas, con varios *midbodies* (D) de los que dos obtienen material nuclear (D') y sólo uno obtiene centrosomas, ambos separados (D''). Finalmente, con GSK923295 la división en dos citoplasmas

es menos aberrante (E) y ambos reciben material nuclear, aunque no equitativamente (E') uno recibe ambos centrosomas (E''). Todas las imágenes fueron adquiridas con el mismo aumento (100x, 1,46 de A.N.). Barra de escala: 10 μ m.

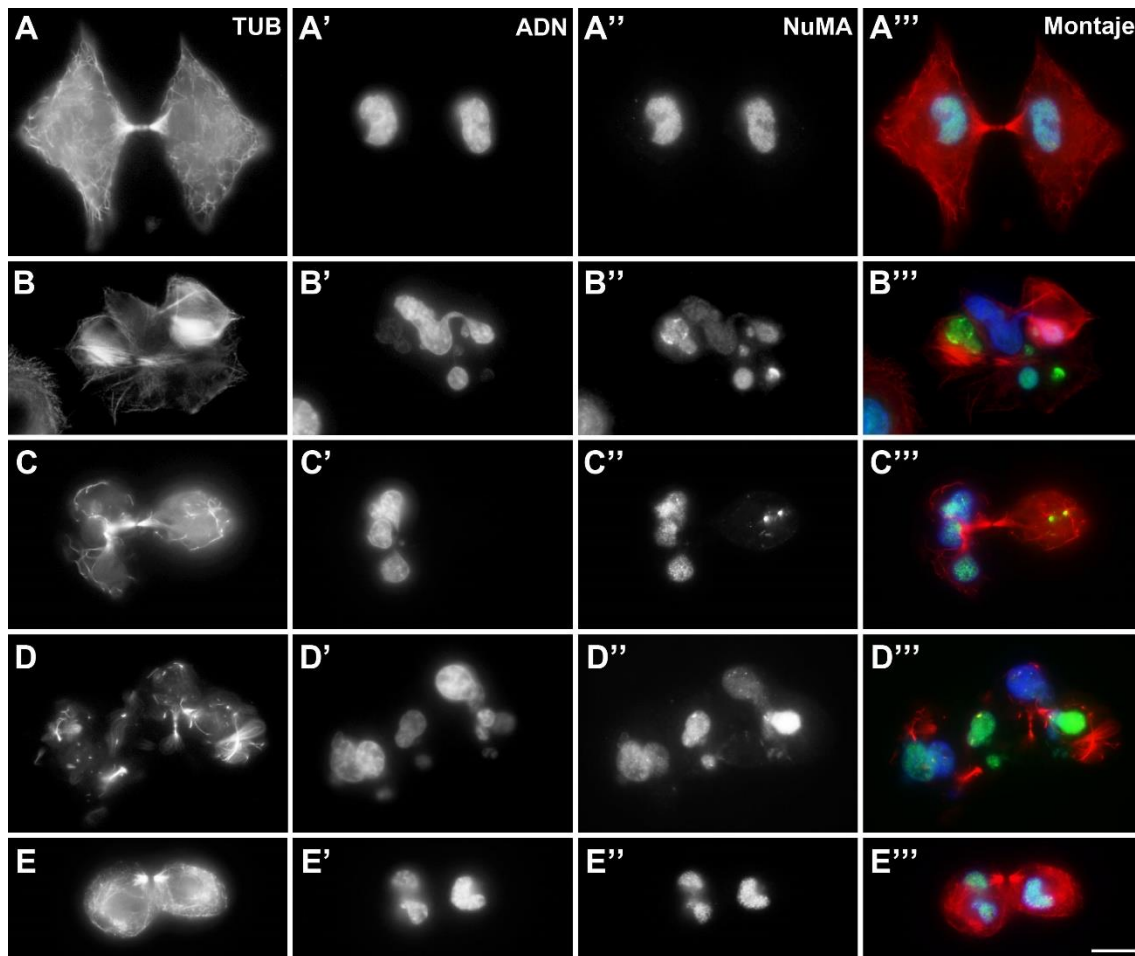


Figura 25. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta de células A549 de la evasión del punto de chequeo del huso: α -tubulina, DAPI y NuMA. Los paneles A, B, C, D y E muestran la inmunolocalización de α -tubulina (TUB); A', B', C', D' y E' los núcleos celulares teñidos con DAPI (ADN) y A'', B'', C'', D'' y E'' la señal de NuMA (NuMA). La última columna presenta la superposición en color de las anteriores (Montaje). De arriba hacia abajo, las filas corresponden a los siguientes tratamientos: (A) Control (DMSO), (B) 150 nM paclitaxel, (C) 5 nM maytansina, (D) 25 nM maytansina y (E) 50 nM GSK923295. En A observamos una citocinesis control típica, con separación de los dos núcleos hijos en citoplasmas hermanos todavía unidos por el midbody (A' y A''). En B observamos un intento de división entre varios citoplasmas hijos, con varios *midbodies* entre ellos, y cómo intentan recibir material nuclear de forma aberrante (B') y en B'' vemos que no todos los núcleos presentan la misma intensidad de NuMA. En C, maytansina 5 nM, observamos un intento de división en tres citoplasmas, con *midbody* triradial, del que los dos de la izquierda reciben material nuclear (C') y el citoplasma de la derecha, sin núcleo, recibe los centrosomas (C''). En D, maytansina 25 nM, vemos un intento de división en múltiples citoplasmas, con varios midbodies que, en este caso, reciben todos (en este estadio) material

nuclear (D') y que la señal de NuMA, de nuevo, es heterogénea (D''). En E, GSK, vemos un intento de división en dos citoplasmas únicamente, con un único midbody y con reparto aberrante del material nuclear (E' y E''). Todas las imágenes fueron adquiridas con el mismo aumento (100x, 1,46 de A.N.). Barra de escala: 10 μ m.

Así pues, cuando se evade el punto de chequeo del huso en presencia de agentes antimitóticos sí que ocurren intentos de citocinesis reales, aunque aberrantes, caracterizados por la presencia de uno o varios *midbodies*. Si eso ocurre a nivel citoplásmico, nos preguntamos si a nivel cromosómico existe algún equivalente que indique que la evasión, sin satisfacción del punto de chequeo del huso, conlleva también la pérdida de cohesión entre cromátidas hermanas o, por el contrario, los cromosomas abandonan la mitosis, descondensándose, con sus cromátidas hermanas unidas. Separación y segregación de las cromátidas hermanas son dos términos que a menudo se confunden, pero son diferentes. La separación de las cromátidas hermanas requiere, y es consecuencia, de la pérdida de cohesión entre las mismas, incluyendo tanto liberación de concatenaciones de ADN como corte de la cohesina Scc1 (Clarke & Giménez-Abián, 2000). Por otro lado, la segregación de las cromátidas hermanas es el movimiento de éstas hacia polos opuestos de la célula. Requiere tanto de la separación previa de las mismas como de la integridad funcional del aparato que las segrega (cinetocoros, microtúbulos, polos). No puede haber segregación sin separación, pero sí puede haber separación en ausencia de segregación.

La figura 26 muestra la evolución en distintas fases de la evasión del SAC a nivel cromosómico mediante fijación con Carnoy's y tinción con Giemsa, en células U-2 OS tratadas con paclitaxel. Los resultados con los otros dos agentes antimitóticos empleados en este estudio son similares (no mostrados). En células bloqueadas en c-mitosis los cromosomas incrementan su condensación en función del tiempo y, aunque los brazos cromosómicos pueden abrirse en los típicos cromosomas en X (Giménez-Abián et al., 2004), los centrómeros permanecen unidos (figura 26 A). Sin embargo, observamos células en las que la cohesión entre centrómeros se pierde (figura 26 B) y, posteriormente, las cromátidas acaban separándose ligeramente (figura 26 C y D) previamente a su decondensación (figura 26 E), que dará lugar a múltiples núcleos y micronúcleos (figura 26 F) según la distribución en el citoplasma de los cromosomas que den lugar a ellos. Al no existir un huso mitótico funcional la segregación de cromátidas hermanas a polos opuestos no tiene lugar, pero sí que las cromátidas hermanas pierden la cohesión que las mantiene unidas, justo antes de su reentrada en interfase. Esto explica el por qué, como fruto de la evasión del SAC con agentes

antimitóticos, se generan células poliploides, en lugar de células con diplocromosomas, como sería esperable si la cohesión no es eliminada.

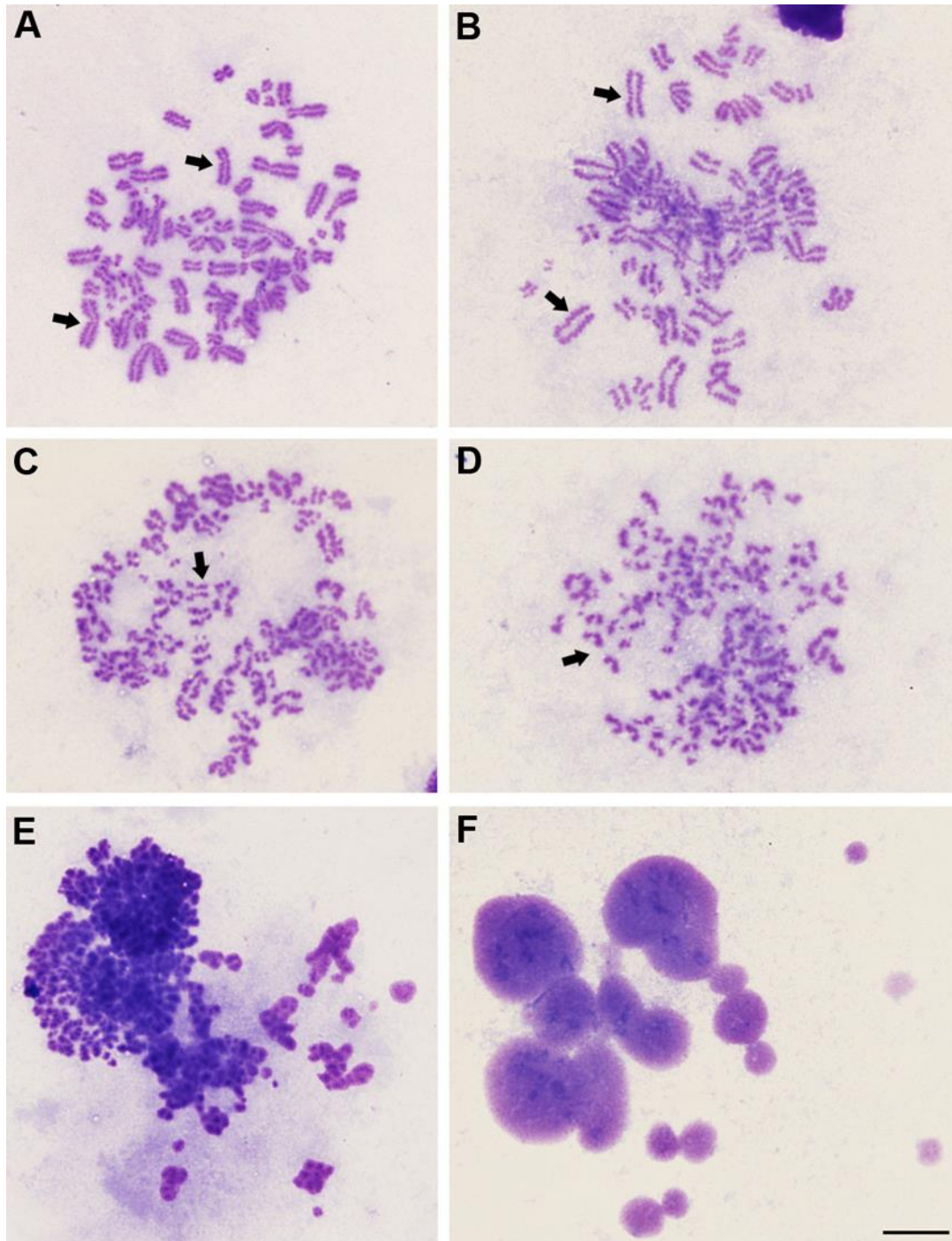


Figura 26. Evasión del SAC en tratamiento con paclitaxel. Las células U-2 OS se trataron con 150 nM paclitaxel durante 16 horas. Después, tras un tratamiento hipotónico, se fijaron con solución de Carnoy's, y se tiñeron con Giemsa. Los paneles muestran los supuestos progresivos estadios en la evasión del punto de chequeo del huso. (A) Célula bloqueada en c-mitosis con cromátidas hermanas apareadas mostrando claramente la constricción centromérica. (B) Célula en la que sus cromosomas muestran pérdida de la constricción centromérica y cromátidas

hermanas más separadas que en la célula anterior. (C y D) Las cromátidas hermanas terminan separándose, aunque son incapaces de segregarse (en C unas pocas cromátidas se están separando y en D son la mayoría). (E) Comienzo de la decondensación cromosómica al evadir el SAC y (F) formación de micronúcleos como resultado de la evasión del punto de chequeo del huso. Las flechas apuntan a los procesos descritos en el texto. Todas las imágenes fueron adquiridas con el mismo aumento (100x, 1,46 de A.N.). Barra de escala: 10 μm .

4.3.4. Resultado de la evasión del punto de chequeo del huso

Cuando finaliza la mitosis, cada una de las células hijas vuelve a entrar en interfase comenzando el ciclo de nuevo.

El efecto sobre el citoesqueleto de microtúbulos en células que han evadido el punto de chequeo, es similar al que se ha descrito en el apartado de interfase (véase más arriba): entramado laxo de microtúbulos en células control y células tratadas con GSK923295; citoesqueleto con exceso de microtúbulos de apariencia más rígida y gruesos haces de los mismos en el tratamiento con paclitaxel y citoesqueleto con muchos menos microtúbulos en los dos tratamientos con el desestabilizante maytansina. En el caso de los núcleos, en células control se observa un núcleo normal con regiones de heterocromatina más marcadas. En el caso de las células tratadas, se originan células multinucleadas con micronúcleos que, en función del compuesto, varían en tamaño y cantidad como es el caso de los tratamientos con paclitaxel y maytansina. También pueden generarse núcleos de restitución con formas aberrantes como en el caso del tratamiento con GSK923295 (figura 27 y 28).

Como se ha explicado en el apartado anterior, las células tras la evasión del punto de chequeo del huso intentan dividir su citoplasma, pero en la mayoría de los casos no lo consiguen de tal forma que todo queda reintegrado en la misma célula. Como se puede ver, la pericentrina marca los centrosomas que en algunos casos muestran un número erróneo (figura 27).

Como se puede observar en la figura 28, NuMA vuelve a reintegrarse en los micronúcleos. En ocasiones, como en el caso del tratamiento con paclitaxel puede ocurrir que NuMA no se visualice de forma uniforme en todos los micronúcleos. Esto puede deberse a un fallo en el restablecimiento de la envoltura nuclear de tal forma que el micronúcleo no es capaz de incorporar NuMA de nuevo o, a que una vez formada, la envoltura nuclear ha colapsado; pudiendo ocurrir que la incorrecta incorporación de

NuMA a algunos micronúcleos sea tanto causa como consecuencia de una funcionalidad deficiente de éstos; siendo su marcaje un indicador de ello.

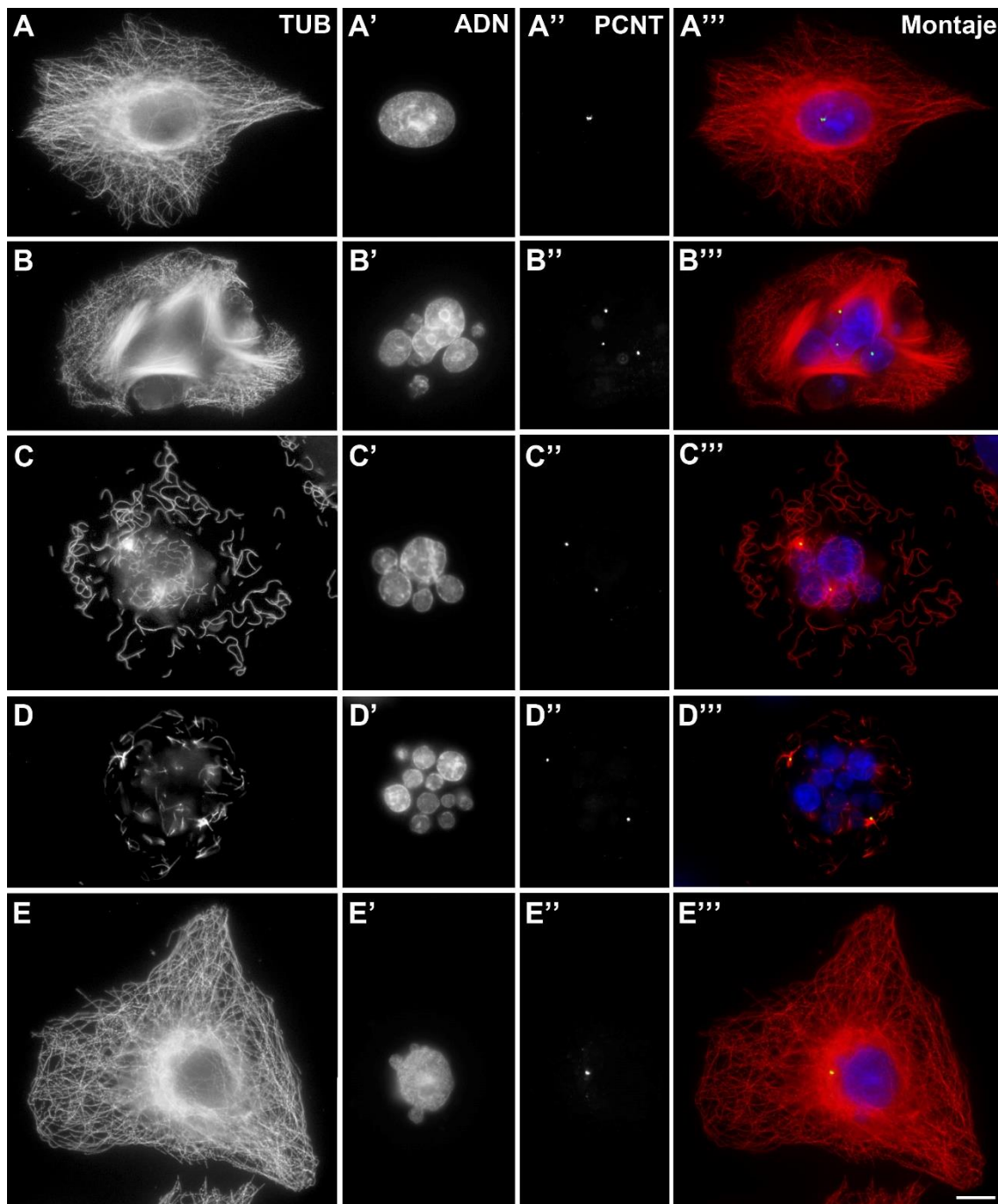


Figura 27. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta de células A549 como resultado de la evasión del punto de chequeo del huso: α -tubulina, DAPI y pericentrina. Los paneles A, B, C, D y E muestran la inmunolocalización de α -tubulina (TUB); A', B', C', D' y E' los núcleos celulares teñidos con DAPI (ADN) y A'', B'', C'', D'' y E'' la señal de pericentrina (PCNT). La última columna presenta la superposición en color de las anteriores (Montaje). De arriba hacia abajo, las filas corresponden a los siguientes tratamientos: (A) Control (DMSO), (B) 150 nM paclitaxel,

(C) 5 nM maytansina, (D) 25 nM maytansina y (E) 50nM GSK923295. En A y E observamos un citoesqueleto laxo de aspecto control, pero mientras en A' vemos un núcleo normal, en E' (GSK) vemos un núcleo de restitución con evaginaciones que pueden corresponder a micronúcleos que han quedado unidos al núcleo principal por la envoltura nuclear. En B, paclitaxel, observamos un citoesqueleto abundante, rígido y con gruesos haces de microtúbulos, en B' vemos la presencia de numerosos micronúcleos a los que corresponden tres centrosomas (B''). En C y D, maytansina, vemos diferentes grados de desorganización del citoesqueleto, cada vez más ausente, en C' y D' numerosos micronúcleos y en C'' y D'', en ambos casos, dos centrosomas por célula. Todas las imágenes fueron adquiridas con el mismo aumento (100x, 1,46 de A.N.) Barra de escala: 10 μ m.

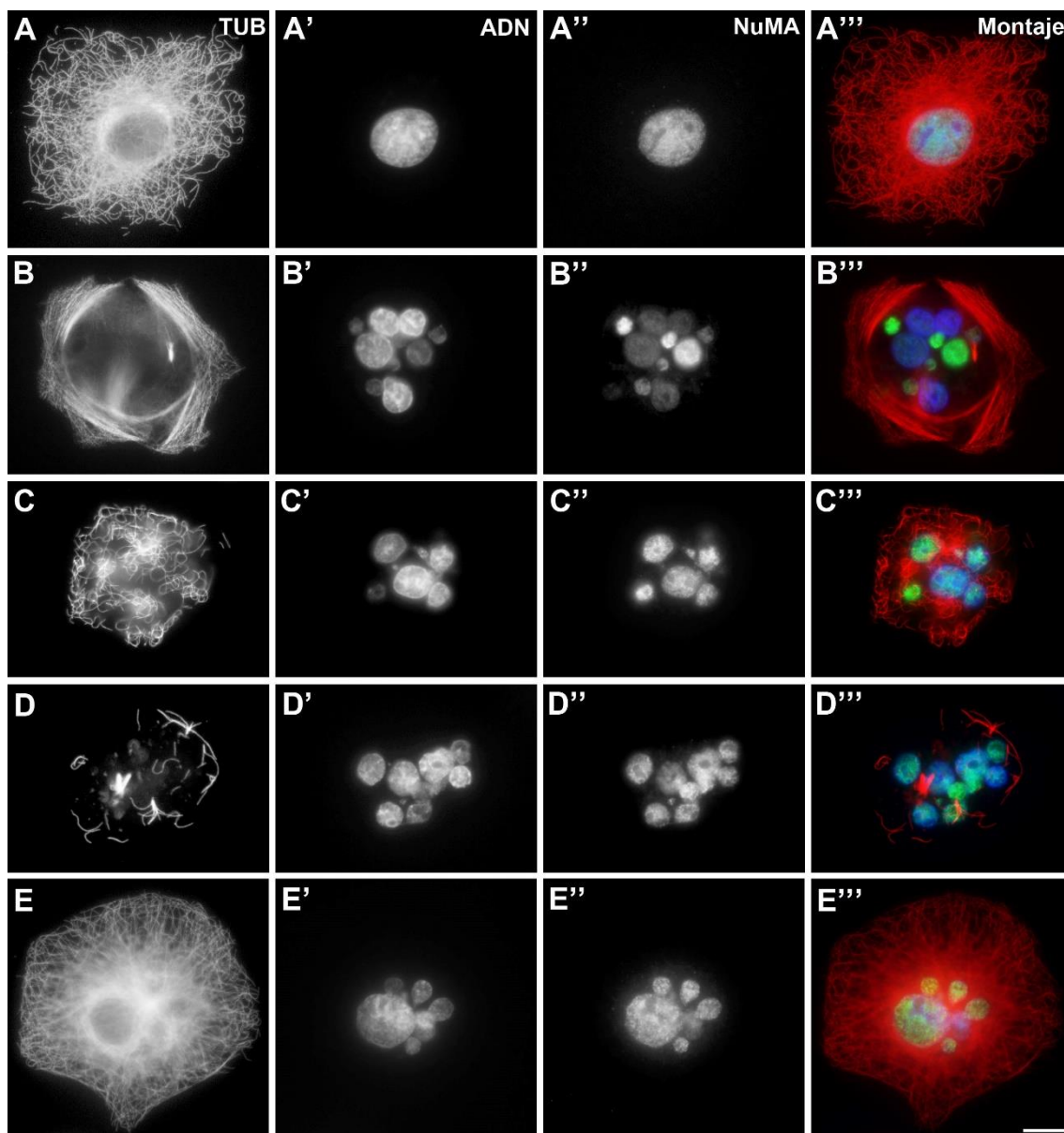


Figura 28. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta de células A549 como resultado de la evasión del punto de chequeo del huso: α -tubulina, DAPI y NuMA. Los paneles A, B, C, D y E muestran la inmunolocalización de α -tubulina (TUB); A', B', C', D' y E' los núcleos celulares teñidos con DAPI (ADN) y A'', B'', C'', D'' y E'' la inmunolocalización de NuMA (NuMA). La última columna presenta la superposición en color de las anteriores (Montaje). De arriba hacia abajo, las filas corresponden a los siguientes tratamientos: (A) Control (DMSO), (B) 150 nM paclitaxel, (C) 5 nM maytansina, (D) 25 nM maytansina y (E) 50 nM GSK923295. A y E presentan citoesqueletos normales, laxos; mientras A' y A'' muestran un núcleo normal, E' y E'' muestran micronúcleos. En B se observa un citoesqueleto típico tras tratamiento con drogas estabilizantes, con microtúbulos rígidos, abundantes y haces gruesos de microtúbulos en contraposición a citoesqueletos con escasos microtúbulos en C y D, tras el tratamiento con el desestabilizante maytansina. B', C' y D' muestran micronúcleos en células tras evadir el punto de chequeo del huso y B'', C'', D'' muestran NuMA con señal heterogénea en dichos micronúcleos. Todas las imágenes fueron adquiridas con el mismo aumento (100x, 1,46 de A.N.) Barra de escala: 10 μ m.

4.4. Evaluación proliferativa y estados celulares durante el tratamiento con paclitaxel, maytansina y GSK923295

El eje central de la tesis doctoral es estudiar las diferencias en el comportamiento entre líneas celulares humanas *versus* de roedores, tras el tratamiento con agentes antimitóticos, teniendo en cuenta también posibles discrepancias o no entre líneas celulares transformadas *versus* inmortalizadas. Con este fin, se utilizaron tres drogas antimitóticas, dos dirigidas contra los microtúbulos: paclitaxel (estabilizante) y maytansina (desestabilizante), y GSK923295, como inhibidor de la quinesina CENP-E, necesaria para la congregación cromosómica (Bennett et al., 2015). Con los plásmidos recopilados en la tabla 2, se desarrollaron una batería de líneas celulares que expresan de forma estable la histona H2B etiquetada con mCherry y α -tubulina marcada con eGFP entre las que se encuentran: por un lado, A549, U-2 OS, HeLa y HCT-116 como líneas humanas transformadas, por otro lado, CHO-K1 y NIH/3T3 T como líneas de roedores transformadas, de las cuales esta última deriva de su parental inmortal NIH/3T3 (véase sección 3.4.2.3.1 de material y métodos).

En el transcurso de este estudio, hemos observado otras diferencias, no buscadas inicialmente, entre los dos grupos de líneas celulares relacionadas con la generación de micronúcleos y su dinámica de colapso y reconstitución. Como consecuencia de ello, para analizarlo en más detalle, se generaron líneas celulares adicionales que también expresan la histona H2B (cuyo marcaje con mCherry y eGFP depende de la línea celular en cada caso), junto con tres señales de localización nuclear (3xNLS) con el marcaje en

el color complementario al de la histona H2B. El concepto de señales de localización nuclear se estableció en la década de los años 80 mediante el análisis del antígeno T del virus SV40, en el que se vio que una secuencia de siete aminoácidos era suficiente para dirigir proteínas de fusión al núcleo (Kalderon et al., 1984). Además de las líneas celulares anteriormente mencionadas, se incluyó hTERT RPE-1 como línea humana inmortalizada, BALB/c SV40 y L-929 como líneas de ratón transformadas y NRK-52E como línea celular de rata inmortalizada (véase la tabla 1 de material y métodos). De esta forma, el análisis de líneas con marcaje de cromatina y tubulina se ha realizado en 7 líneas celulares que engloban a tres especies, y el análisis de líneas con marcaje de cromatina y NLS se ha efectuado con 10 líneas celulares que comprenden cuatro especies.

En el apartado 3.4.3 de material y métodos se detallan el total de clonajes que se han realizado de forma exitosa en esta tesis doctoral, que ascienden a veintiséis para esta primera parte de los resultados. Aunque todas las parejas de líneas celulares (marcaje en tubulina o en NLS) derivan de una misma línea parental (con marcaje en cromatina), presentan marcajes distintos, son clones diferentes y pueden tener fondos genéticos dispares (véase el apartado 5.3 de la discusión). No se compara directamente entre las líneas celulares marcadas con α -tubulina y aquellas con 3xNLS, aunque detallamos los casos de disparidad, sino que las comparaciones se establecen entre líneas humanas *versus* de roedores, y líneas transformadas *versus* inmortalizadas que comparten el mismo tipo de marcaje.

Los primeros resultados que se muestran, tratan sobre la evaluación de la proliferación y estados celulares durante el tratamiento con las tres drogas antimetabólicas (figura 29). En un cultivo celular no todas las células se encuentran proliferando de forma activa, puesto que pueden haber sufrido o sufrir muerte celular, o estar en una fase de latencia celular llamada G0 como se describe en el apartado 1.2.1.1.2 de la introducción. Por tanto, dentro de un cultivo hay un porcentaje de células que están dividiendo activamente (conocido como fracción proliferante) que en nuestro caso hemos calculado como el porcentaje de células que entran en mitosis en el transcurso del experimento.

En el tratamiento control con DMSO, la línea celular HeLa tiene una fracción proliferante cercana al 100%, al igual que varias de las líneas de roedores (figura 29 A y B). Comparando humanos *versus* roedores, no parece que haya una clara diferencia entre especies, ya que hay líneas humanas que proliferan más que algunas de roedores y viceversa. Comparando entre las líneas humanas transformadas y la inmortalizada

hTERT RPE-1, se observa que la última tiene un menor porcentaje de células que proliferan, de igual forma la línea transformada de ratón NIH/3T3 T, derivada de su parental inmortalizada NIH/3T3, presenta un aumento en su fracción proliferante (figura 29 B). Estas observaciones apoyan la idea de que las células transformadas adquieren la capacidad de proliferar de manera descontrolada, a diferencia de las inmortalizadas, que mantienen la inhibición por contacto como mecanismo de control.

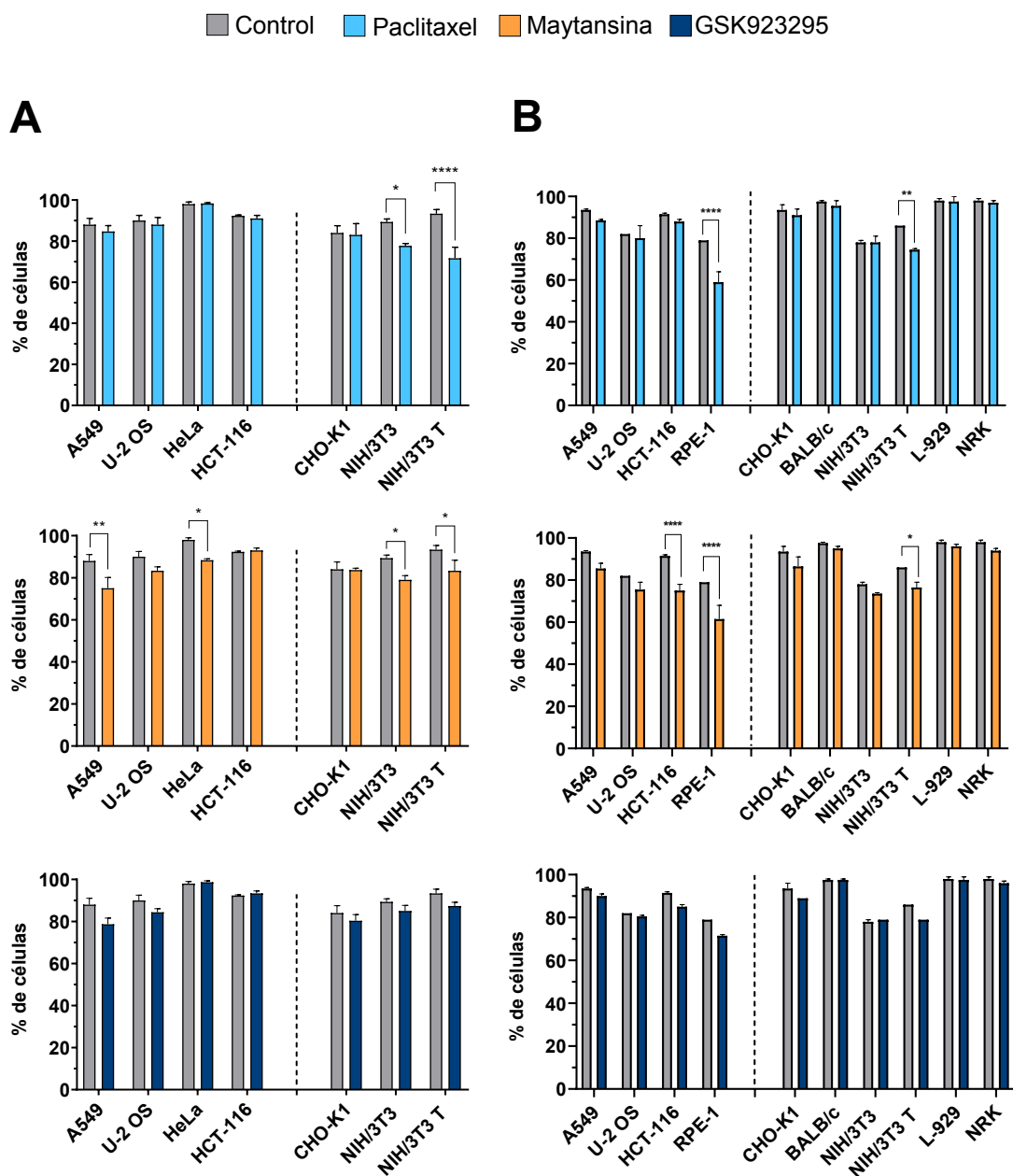


Figura 29. Fracción proliferante de células control (DMSO-gris) y tratamiento con paclitaxel (150 nM-azul), maytansina (25 nM-naranja) y GSK923295 (50 nM humanas, 250 nM CHO-K1, 1 μ M BALB/c, NIH/3T3, NIH/3T3 T, L-929 y NRK-azul oscuro). Como fracción proliferante representamos el porcentaje de células que entran en mitosis (ventana de observación) en el transcurso del experimento (48 horas). (A) Líneas celulares que expresan marcaje de histona

H2B y α -tubulina. (B) Líneas celulares que expresan marcaje de histona H2B y 3xNLS. (A) n=3, (B) n=2. En cada réplica y línea se han contabilizado 100 células. En cada gráfico: líneas humanas (izquierda) y líneas de roedores (derecha); (n.s. = no significancia; **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$). La fracción proliferante, en todos los casos, es superior al 80% destacando líneas como HeLa y NRK por ser próxima al 100%. Se observa que esta fracción proliferante disminuye ligeramente en cada una de las líneas con cada tratamiento.

La tasa de proliferación en células tratadas en la mayor parte de los casos es algo menor a la del control, aunque en algunas líneas celulares no se observa diferencia significativa entre el tratamiento y el control. Diferenciando entre los tres fármacos antimitóticos, con el inhibidor de CENP-E (GSK923295) la mayoría de las líneas tienen una tasa muy similar al control, mientras que con los agentes dirigidos contra tubulina el porcentaje de células que proliferan es menor, sobre todo con maytansina (figura 29 A y B). En cualquier caso, el descenso de la fracción proliferante en células tratadas frente al control es tan sólo moderado siendo siempre inferior al 15% y en la mayoría de los casos menor a un 5%.

Por consiguiente, la fracción proliferante tanto en las células control como en las tratadas varía según la línea celular y no depende de la especie, sino más bien de las características propias de cada línea.

Como se ha comentado con anterioridad, no todas las células de un cultivo están proliferando de forma activa, ya sea en células control o en células con tratamientos. Los estados celulares en un cultivo control se han clasificado como células que no proliferan, células que mueren en interfase o células que entran en fase de división (véase la figura 50 A y B del apartado de discusión). En las líneas celulares tratadas con los tres antimitóticos empleados en esta tesis, además de encontrar un porcentaje de células que no proliferan y mueren en interfase, como en células control, se ha observado que al entrar en mitosis pueden presentar a su vez diferentes estados durante el tiempo que permanecen arrestadas en c-mitosis (figura 30). Por un lado, pueden morir estando bloqueadas, pueden presentar un arresto que permanece durante el tiempo del experimento o bien evadir el punto de chequeo del huso, lo que resulta en una segregación errónea de los cromosomas y la generación de células multinucleadas o con núcleos de restitución (figuras 26-28).

Comparando entre líneas humanas y de roedores, tanto el porcentaje de células que no proliferan como el porcentaje de células que mueren en interfase con los tres

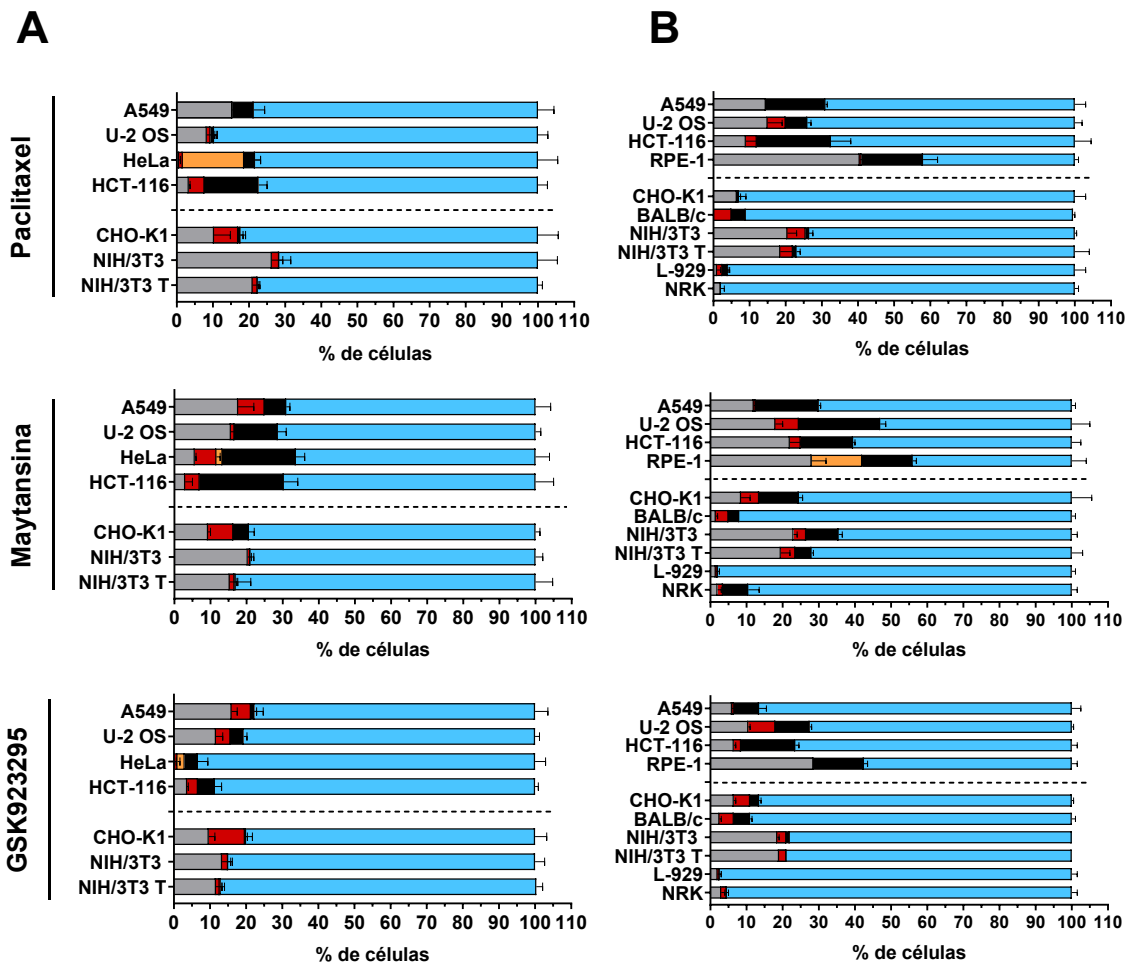
tratamientos varía entre las distintas líneas. Además, podría haber una diferencia entre líneas transformadas e inmortalizadas. Las líneas inmortalizadas, tanto hTERT-RPE1 (humana) como NIH/3T3 (ratón) tienen un porcentaje mayor de células que no proliferan respecto a las líneas transformadas. Sin embargo, la línea inmortalizada de rata (NRK-52E) presenta una de las mayores fracciones proliferantes entre las líneas celulares aquí estudiadas. En el transcurso de nuestros estudios no hemos observado diferencias de comportamiento entre líneas celulares inmortalizadas y líneas celulares transformadas que no tengan excepciones en alguna de ellas.

Con respecto a la supervivencia de las células durante el bloqueo en c-mitosis hay una clara diferencia entre líneas celulares humanas y de roedores. En todos los casos, las líneas celulares humanas presentan un mayor porcentaje de células que mueren en mitosis respecto a las de roedores, siendo notable con el tratamiento de maytansina.

En términos generales, el destino que predomina en todas las líneas celulares es escapar del bloqueo prolongado en mitosis, y es con estas células que evaden el bloqueo c-mitótico con las que se han obtenido los resultados posteriores. En los tres tratamientos, se ha observado que las líneas celulares transformadas humanas tienen mayor porcentaje de células que evaden el punto de chequeo del huso en comparación con la línea inmortal hTERT RPE- 1, que está en torno al 50% (véase la figura 30 B). De igual forma, la línea celular NIH/3T3 T con respecto a su parental inmortal NIH/3T3, tiene un porcentaje mayor de células que evaden el punto de chequeo con fármacos que afectan a la dinámica de tubulina. Igualmente, comparando entre líneas humanas *versus* de roedores, en términos generales las líneas de roedores tienen un mayor porcentaje de células que evaden el punto de chequeo del huso con los tres tratamientos.

Figura 30. Estados celulares durante los tratamientos con antimitóticos. Tratamiento con paclitaxel (150 nM), maytansina (25 nM) y GSK923295 (50 nM humanas, 250 nM CHO-K1, 1 μ M BALB/c, NIH/3T3, NIH/3T3 T, L-929 y NRK). (A) Líneas celulares que expresan marcaje de histona H2B y α -tubulina. (B) Líneas celulares que expresan marcaje de histona H2B y 3xNLS. Células que no proliferan (gris), muerte en interfase (rojo), bloqueo en c-mitosis (naranja), muerte en c-mitosis (negro), evasión mitótica (azul). (A) n=3, (B) n=2. En cada réplica se han contabilizado 100 células. En cada gráfico: líneas humanas (superior) y líneas de roedores (inferior). Se observa que las líneas celulares humanas presentan un porcentaje mayor de células que mueren en mitosis respecto a las líneas de roedores. Por otra parte, la mayor parte de las células evaden el punto de chequeo del huso en el tratamiento con antimitóticos.

■ No proliferación ■ Muerte en interfase ■ Bloqueo en c-mitosis ■ Muerte en c-mitosis ■ Evasión de c-mitosis



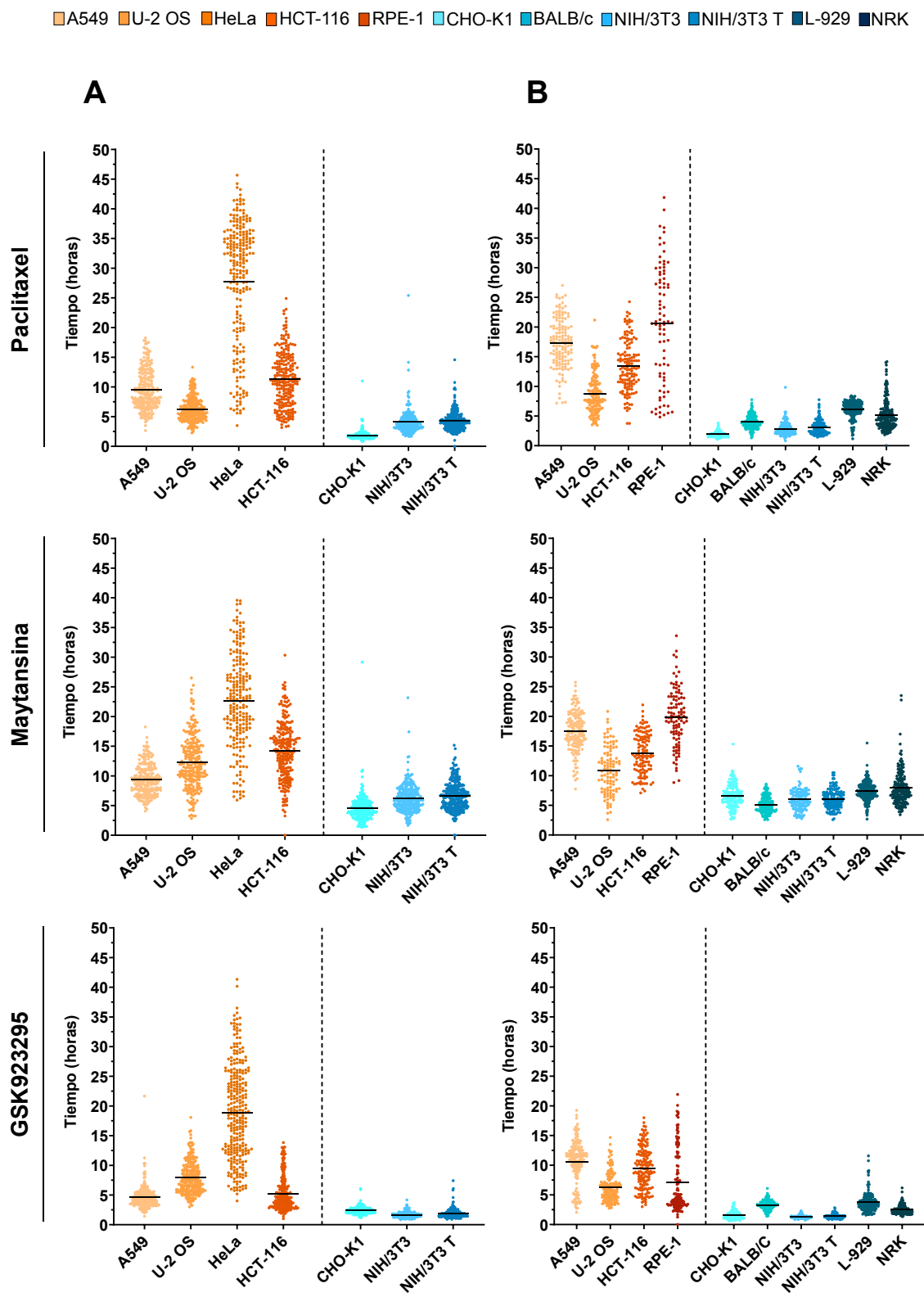
4.5. Análisis de la variación en la cinética de evasión del punto de chequeo del huso

Los roedores, principalmente ratones, son el modelo básico de mamífero empleado en investigación por su similitud biológica y genética con el genoma humano además de tener ciclos de vida más cortos y altas tasas de reproducción entre otras características (Justice & Dhillon, 2016; Rosenthal & Brown, 2007). En la praxis clínica, cuando un fármaco se prueba en cultivos celulares puede tener excelentes resultados, pero, al trasladarlo al modelo animal, no resultar tan efectivo y viceversa (Y. F. Li et al., 2018). Para arrojar luz sobre este asunto, se ha querido comparar la cinética de evasión del punto de chequeo del huso empleando diversas líneas humanas y de roedores (véase tabla 1 de material y métodos) tanto transformadas como inmortalizadas tratadas con dos agentes dirigidos contra tubulina, que estabilizan (paclitaxel) o desestabilizan (maytansina) la dinámica microtubular. El tercer compuesto es un inhibidor de CENP-E

(GSK923295), una quinesina que se encarga de la congregación de los cromosomas en la placa ecuatorial y que no tiene efecto sobre el heterodímero de tubulina.

A partir de las células que evaden el bloqueo prolongado en c-mitosis (figura 30) en la siguiente figura se muestra, para cada una de las células, el tiempo que tardan en realizar la evasión mitótica. Hemos elegido este tipo de gráfico de dispersión de puntos (figura 31) para resaltar la gran variabilidad que hay dentro de un mismo cultivo, línea celular y tratamiento experimental. Lo que mostramos es que no todas las células se comportan de forma idéntica, reflejando una diferencia intra- e interlineal similar a lo descrito en (Gascoigne & Taylor, 2008). Además, en términos generales se observa que las líneas celulares de roedores presentan una menor dispersión de los datos en comparación con las líneas humanas, sobre todo con el tratamiento de GSK923295 (figura 31). Sin embargo, por encima de todo, lo que más destaca en la primera aproximación a los datos es que las líneas celulares humanas bloquean en c-mitosis mucho más tiempo que las líneas de roedores. Si tomamos, por ejemplo, el panel de paclitaxel, con líneas marcadas con H2B y α -tubulina (figura 31), en términos muy generales podríamos decir que la línea de roedor más lenta en evadir el SAC (NIH/3T3 T) es un 50% más rápida que la línea humana más veloz (U-2 OS), mientras que la línea que más tarda de las humanas (HeLa) es 16 veces más lenta que la más rápida de roedores (CHO-K1). La variación entre líneas es grande, entre agentes antimitóticos también, pero podemos afirmar que las líneas de roedores son siempre más rápidas en evadir el punto de chequeo del huso que las líneas humanas y ello con independencia del tipo de droga antimitótica utilizada, del marcaje que posea la línea y de la línea misma. En la discusión volveremos con más detalle sobre ello.

Figura 31. Dispersión del tiempo (horas) en realizar la evasión mitótica. Tratamiento con paclitaxel (150 nM), maytansina (25 nM) y GSK923295 (50 nM humanas, 250 nM CHO-K1, 1 μ M BALB/c, NIH/3T3, NIH/3T3 T, L-929 y NRK). (A) Líneas celulares que expresan marcaje de histona H2B y α -tubulina. (B) Líneas celulares que expresan marcaje de histona H2B y 3xNLS. (A) n=3, (B) n=2. En cada gráfico: líneas humanas (izquierda-tonos cálidos) y líneas de roedores (derecha-tonos fríos). Pese a la gran variación entre líneas y agentes antimitóticos las líneas celulares de roedores evaden el bloqueo c-mitótico con considerable más rapidez que las líneas celulares humanas.



En mitosis, una vez que se ha roto la envoltura nuclear, los cromosomas empiezan a biorientar para formar la placa metafásica. El proceso de biorientación ocurre intrínsecamente al azar; algunas células pueden realizarlo de forma muy rápida, mientras que en otras es más lento; unos cromosomas biorientan casi instantáneamente mientras otros pueden demorarse decenas de minutos. El punto de chequeo del huso (SAC) es una ruta bioquímica en la que los cinetocoros que no han anclado a microtúbulos del huso mitótico (o, alternativamente, cinetocoros no sometidos a tensión) señalizan para impedir el paso a anafase y la salida prematura de mitosis. Solo cuando todas las cromátidas están correctamente ancladas a los microtúbulos del huso y, por tanto, todos los cromosomas están biorientados, el punto de chequeo se satisface licenciando la anafase.

Al tratar las células con paclitaxel, maytansina o GSK923295, aunque sus mecanismos de acción son diferentes –bien afectando la dinámica de la tubulina o a la congregación cromosómica–, la biorientación de los cromosomas resulta alterada. Como consecuencia, el punto de chequeo no se satisface y las células permanecen en una mitosis prolongada. Como se ha mencionado en el apartado 1.3.2 de la introducción, los puntos de chequeo no son infalibles y las células finalmente pueden evadir el punto de chequeo del huso, saliendo del arresto en mitosis. Los mecanismos subyacentes a la evasión del punto de chequeo del huso no están claros y se discuten en el apartado 5.2 de la discusión.

En la figura 32 se muestra, por un lado, la duración de la mitosis en células control y, por otro, el tiempo promedio de bloqueo en c-mitosis antes de evadir el punto de chequeo del huso tras el tratamiento. En las líneas humanas control, la duración de la mitosis en todos los casos es igual o superior a 1 hora. Esta observación contrasta con las líneas celulares de roedores, en las que en condiciones control se muestran diferencias significativas ($p < 0,0001$) en la duración de la mitosis con respecto a la mayoría de las líneas humanas, siendo en roedores control más corta que en humanas.

En cuanto al tiempo que las células permanecen bloqueadas en c-mitosis con los tratamientos experimentales, la diferencia es más clara y amplia. Con los tres fármacos antimitóticos empleados, paclitaxel, maytansina y GSK923295, se observa que las líneas celulares humanas presentan tiempos de bloqueo mitótico significativamente superiores ($p < 0,0001$) a los de las líneas de roedores (figura 32). Además, también se visualiza una diferencia entre drogas que afectan a los microtúbulos y el inhibidor de la

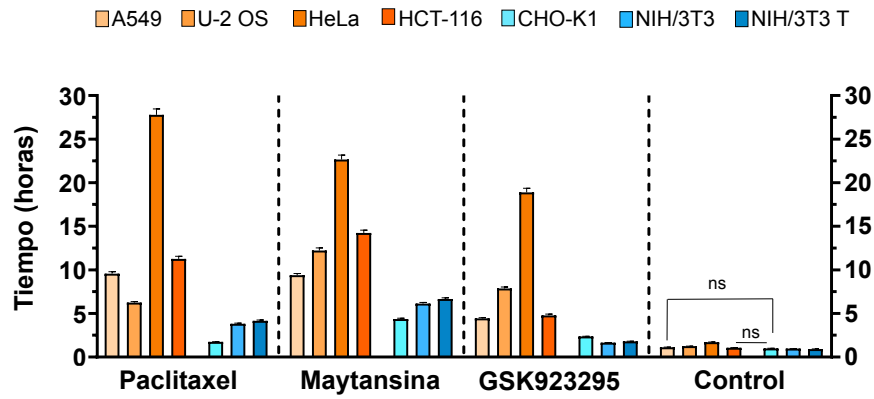
congresión cromosómica (GSK923295), ya que este último provoca el menor tiempo de bloqueo en todas las especies analizadas.

Si se analiza la línea celular humana más rápida y la más lenta de roedores en evadir el punto de chequeo del huso, entre los fármacos que afectan a la dinámica de tubulina el incremento de tiempo está en un 50% con paclitaxel, mientras que al tratarlas con GSK923295 la diferencia aumenta hasta un 70-90%. En el panel B, la línea celular U-2 OS tratada con paclitaxel es la línea humana más rápida, mientras que NIH/3T3 T es la más lenta de roedores y la diferencia entre ellas es de un 50%. De igual forma ocurre en el panel D con el tratamiento de maytansina, la diferencia entre U-2 OS y L-929 aumenta un 40%. Asimismo, si se compara el tratamiento con GSK923295 entre A549 y CHO-K1 (panel B), y U-2 OS y L-929 (panel D), el incremento es de un 88% y 78% respectivamente.

Cuando comparamos entre líneas transformadas e inmortalizadas, se observa que el tratamiento con fármacos que afectan a la dinámica de tubulina en la línea inmortalizada hTERT RPE-1 (figura 32 C y D), provocan que ésta permanezca más tiempo bloqueada en c-mitosis respecto al resto de líneas humanas transformadas, a diferencia de lo que ocurre con el tratamiento con GSK923295 cuyo tiempo de arresto disminuye más del doble que con los otros dos tratamientos. Por otro lado, la línea de ratón NIH/3T3 T presenta tiempos ligeramente superiores de bloqueo mitótico que su parental inmortalizada NIH/3T3 con los tres tratamientos. De igual forma que en las líneas humanas, en términos generales el tratamiento con GSK923295 presenta el menor tiempo de bloqueo y con maytansina se inducen arrestos más prolongados en las líneas de roedores.

Figura 32. Tiempo promedio (horas) de bloqueo en c-mitosis. Tratamiento con paclitaxel (150 nM), maytansina (25 nM) y GSK923295 (50 nM humanas, 250 nM CHO-K1, 1 μ M BALB/c, NIH/3T3, NIH/3T3 T, L-929 y NRK). (A y B) Líneas celulares que expresan marcaje de histona H2B y α -tubulina. (C y D) Líneas celulares que expresan marcaje de histona H2B y 3xNLS. (A) n=3, (B) n=2. En cada gráfico: líneas humanas (izquierda-tonos cálidos) y líneas de roedores (derecha-tonos fríos); (n.s. = no significancia; **** p < 0,0001; *** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05). En todos los casos, independientemente del marcaje de la línea celular y del tratamiento, las líneas celulares de roedores evaden el punto de chequeo del huso, es decir, salen de c-mitosis, mucho antes que las líneas celulares humanas.

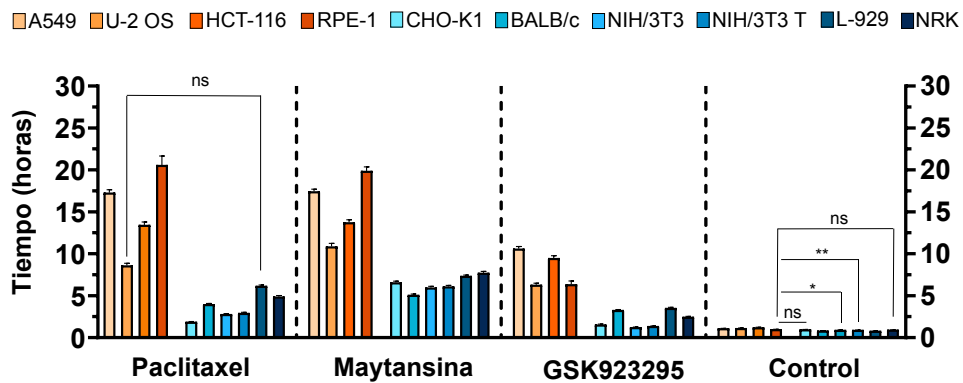
A



B

	A549	U-2 OS	HeLa	HCT-116	CHO-K1	NIH/3T3	NIH/3T3 T
Paclitaxel	9,57 ± 0,21	6,24 ± 0,12	27,79 ± 0,68	11,27 ± 0,30	1,74 ± 0,02	3,82 ± 0,07	4,16 ± 0,09
Maytansina	9,40 ± 0,17	12,23 ± 0,29	22,65 ± 0,52	14,23 ± 0,32	4,37 ± 0,09	6,14 ± 0,13	6,66 ± 0,14
GSK923295	4,44 ± 0,08	7,86 ± 0,17	18,89 ± 0,47	4,78 ± 0,14	2,36 ± 0,03	1,65 ± 0,03	1,79 ± 0,03
Control	1,13 ± 0,01	1,24 ± 0,01	1,70 ± 0,02	1,07 ± 0,01	0,99 ± 0,02	0,97 ± 0,00	0,91 ± 0,01

C



D

	A549	U-2 OS	HCT-116	RPE-1	CHO-K1	BALB/c	NIH/3T3	NIH/3T3 T	L-929	NRK
Paclitaxel	17,30 ± 0,35	8,61 ± 0,26	13,43 ± 0,37	20,59 ± 1,07	1,89 ± 0,03	4,00 ± 0,08	2,79 ± 0,07	2,94 ± 0,08	6,17 ± 0,09	4,88 ± 0,15
Maytansina	17,45 ± 0,26	10,87 ± 0,38	13,75 ± 0,30	19,89 ± 0,46	6,57 ± 0,15	5,09 ± 0,10	5,97 ± 0,15	6,09 ± 0,13	7,35 ± 0,10	7,73 ± 0,17
GSK923295	10,60 ± 0,27	6,30 ± 0,19	9,48 ± 0,28	6,37 ± 0,39	1,56 ± 0,05	3,29 ± 0,06	1,25 ± 0,02	1,37 ± 0,03	3,54 ± 0,08	2,48 ± 0,05
Control	1,10 ± 0,00	1,14 ± 0,01	1,22 ± 0,17	0,99 ± 0,01	0,97 ± 0,01	0,83 ± 0,01	0,92 ± 0,01	0,90 ± 0,01	0,80 ± 0,00	0,93 ± 0,00

4.6. Estudio de las consecuencias celulares tras la evasión mitótica con el tratamiento de paclitaxel, maytansina y GSK923295

Como se ha comentado previamente, la mayor parte de las células evaden el punto de chequeo del huso con los tres tratamientos antimitóticos empleados en prácticamente todos los casos (figura 30). Además, se ha observado una clara diferencia entre el tiempo de arresto mitótico antes de evadir el SAC entre líneas celulares humanas y de roedores (figuras 31 y 32), siendo el tiempo de bloqueo mayor en las líneas humanas. En los siguientes subapartados pasamos a estudiar los distintos parámetros de la post-evasión y las consecuencias de la misma.

4.6.1. Escasas diferencias en el número de células generadas

Al evadir la mitosis, las células intentan llevar a cabo la cariocinesis y citocinesis entre dos células hijas, pero estos dos procesos de segregación del material genético y división del citoplasma respectivamente, no ocurren de forma correcta (véanse las figuras 24-26). Se han observado dos tipos de anomalías: por un lado, la generación de una única célula desde el inicio o la generación inicial de varias con la reintegración posterior del citoplasma dividido en la misma célula. Por otro lado, se ha visto que pueden obtenerse dos células independientes con descompensación total o parcial del material genético. En la figura 33, se visualiza lo anteriormente descrito mediante una inmunofluorescencia de células A549 tratadas con 5 nM de maytansina. En los paneles A' (montaje con pericentrina) y B' (montaje con NuMA), se observa el intento de citocinesis entre las dos células hijas con la presencia del *midbody* y que, a pesar de ello, todo el material genético ha quedado en una de las células. En este punto, puede ocurrir que todo se reintegre en una única célula o como se observa en el panel C (marcaje de pericentrina), la unión entre ellas desaparece generando dos células, una de ellas anucleada que acabará degenerando (véanse los vídeos 2, 3, 4 y 5 de anexos) y otra que contiene todo el material genético, por lo que, inicialmente, sobrevivirá.

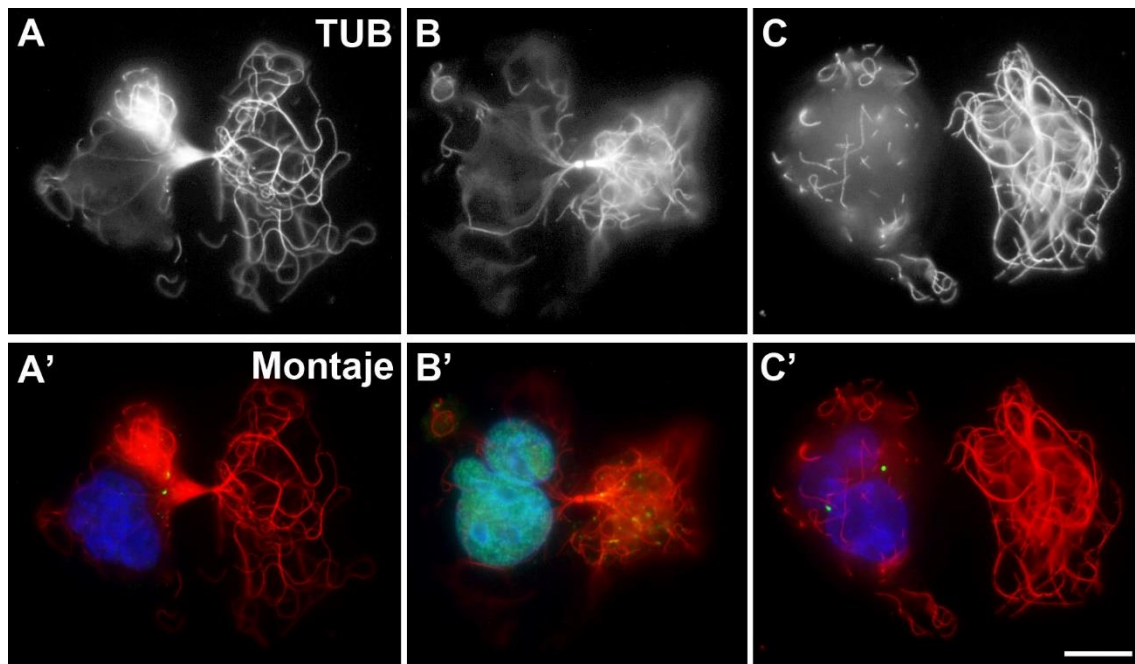


Figura 33. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta de células A549 realizando la evasión mitótica. Células tratadas con 5 nM de maytansina. Los paneles superiores muestran únicamente la inmunolocalización de α -tubulina y los inferiores el montaje del material genético teñido con DAPI (azul) y marcaje de pericentrina (A' y C', verde) o inmunolocalización de NuMA (B', verde). La figura muestra intentos exitosos de citocinesis que contrastan con la ausencia de cariocinesis. Todas las imágenes fueron adquiridas con el mismo aumento (100x, 1,46 de A.N.). Barra de escala: 10 μ m.

Por ello, se estudió el efecto de los tres fármacos presentados con anterioridad sobre el número de células generadas tras la evasión de mitosis (figura 34). En términos generales, con el tratamiento con fármacos dirigidos contra microtúbulos, los eventos de evasión mitótica dan lugar a una única célula tanto en líneas humanas como de roedores (constituyendo CHO-K1 en el tratamiento con paclitaxel y marcaje H2B/ α -tubulina, una llamativa excepción). Por el contrario, con el tratamiento de GSK923295 en roedores suelen generarse dos células. En las líneas humanas, los datos son más complejos y podemos decir que hay diferencias entre ellas y entre los dos tipos de marcajes. En la figura 34 panel A, gráfico inferior, correspondiente al marcaje de histona H2B y α -tubulina, la mayoría de las líneas humanas generan dos células, al igual que ocurre con las líneas de roedores (HeLa, de nuevo, distorsiona los resultados). Sin embargo, en la figura 34 panel B, inferior, correspondiente al marcaje de H2B/3xNLS, las líneas de roedores vuelven a generar dos células a diferencia de las humanas cuya tendencia, aunque mixta, es a generar una célula tras el bloqueo en c-mitosis. En general, en cuanto al número de células generadas tras la evasión

mitótica, podemos afirmar que no hay diferencias entre líneas humanas y líneas de roedores tras el tratamiento con agentes que afectan a tubulina y que sí las hay, sin dirección clara, cuando tratamos con GSK923295.

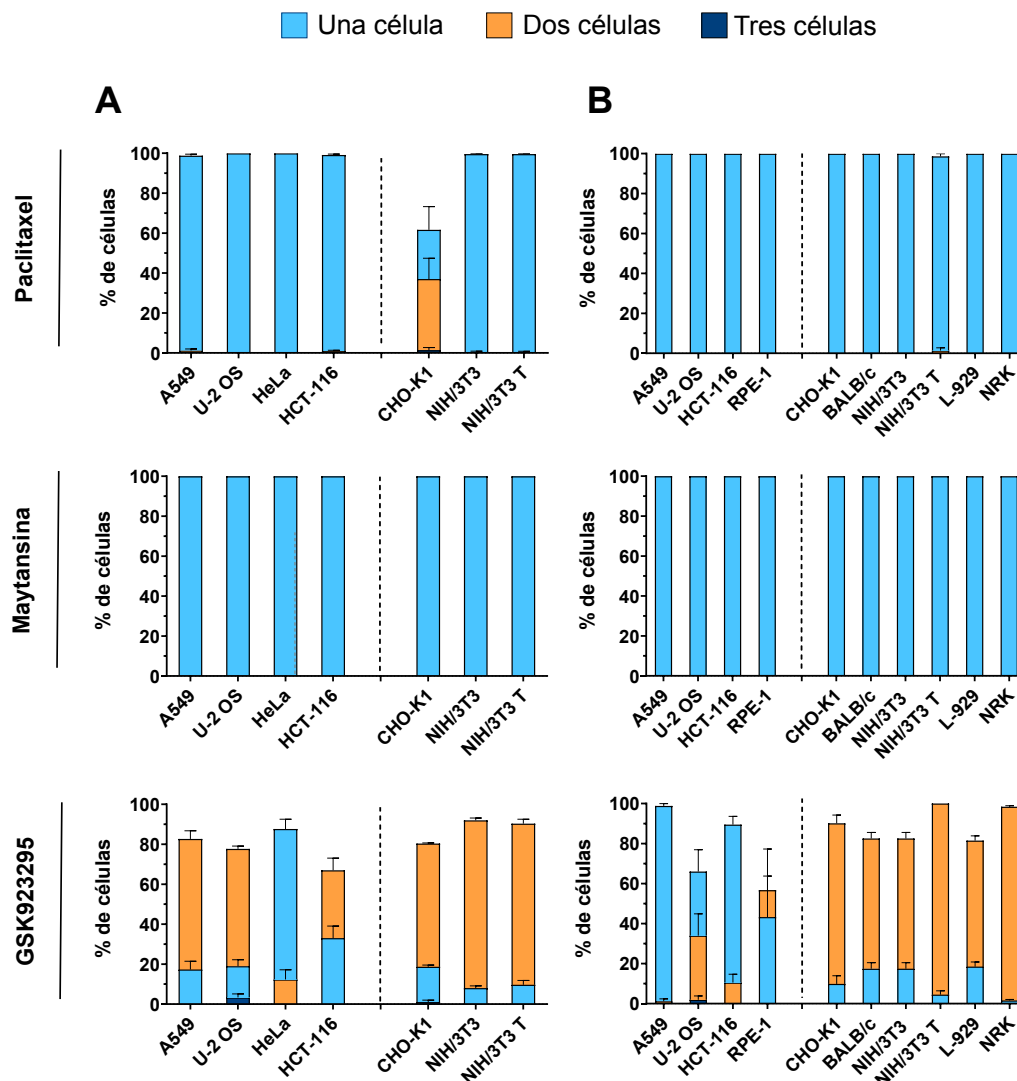


Figura 34. Número de células generadas durante el tratamiento con antimitóticos. Tratamiento con paclitaxel (150 nM), maytansina (25 nM) y GSK923295 (50 nM humanas, 250 nM CHO-K1, 1 μM Balb/c, NIH/3T3, NIH/3T3 T, L-929 y NRK). (A) Líneas celulares que expresan marcaje de histona H2B y α-tubulina. (B) Líneas celulares que expresan marcaje de histona H2B y 3xNLS. Generación de una célula (azul), generación de dos células (naranja) y generación de tres células (azul oscuro). (A) n=3, (B) n=2. En cada gráfico: líneas humanas (izquierda) y líneas de roedores (derecha). Con drogas dirigidas contra microtúbulos la tendencia general es a generar una única célula en los dos tipos de marcaje, mientras que con el tratamiento de GSK923295 hay discrepancias. Con el marcaje de H2B/α-tubulina en términos generales se obtienen dos células, y con el marcaje de H2B/3xNLS son las líneas de roedores las que tienen un mayor porcentaje en la obtención de dos células, mientras que las humanas generan una única célula.

4.6.2. Disparidad en la generación de células multinucleadas o con núcleos de restitución

Tras evadir el punto de chequeo del huso, dado que los cromosomas no se han segregado de forma adecuada (figura 26), se generan células multinucleadas o células con núcleos de restitución (figuras 27 y 28). La diferencia entre unos y otros en algunas ocasiones es muy evidente, pero en otras es tan sólo sutil pues la forma del núcleo de restitución puede indicar claramente la de los micronúcleos no separados de los que se compone (figura 27 E' y figura 13). Aun así, hemos pensado que la subdivisión entre ambos tipos es útil y la hemos mantenido también en la comparación de agentes aneugénicos y clastogénicos que se aborda en el apartado 4.7 de resultados en la que se revela como una diferencia potencialmente importante. La generación de un tipo de células u otro depende del tratamiento y de la especie.

En la figura 35, al tratar las células con paclitaxel, en todos los casos las líneas humanas, la de hámster y la de rata tienen un mayor porcentaje de células con micronúcleos que las de ratón, que se desmarca claramente de las otras dos especies de roedores.

Con maytansina, en términos generales, las líneas humanas tras evadir el punto de chequeo del huso generan células micronucleadas de igual forma que con el tratamiento con paclitaxel (con la excepción de HCT-116). Hámster y rata generan también células con micronúcleos y las líneas de ratón, de nuevo, se desmarcan al generar células con núcleos de restitución (con la excepción de L-929). No observamos diferencias destacables entre las líneas inmortalizadas y las transformadas con ninguno de los tratamientos.

Por último, con el inhibidor de CENP-E todas las líneas celulares mayoritariamente, generan células con núcleos de restitución. No obstante, se observa que todas las líneas humanas presentan un porcentaje apreciable de células micronucleadas que es mucho menor en roedores.

Existe, por tanto, una mayor tendencia en las líneas humanas, la de hámster y la de rata a generar micronúcleos que en las líneas de ratón (existiendo excepciones puntuales con maytansina). Nuestros datos pueden servir para seleccionar la línea y especie a utilizar dependiendo del tipo de análisis requerido en cada caso concreto.

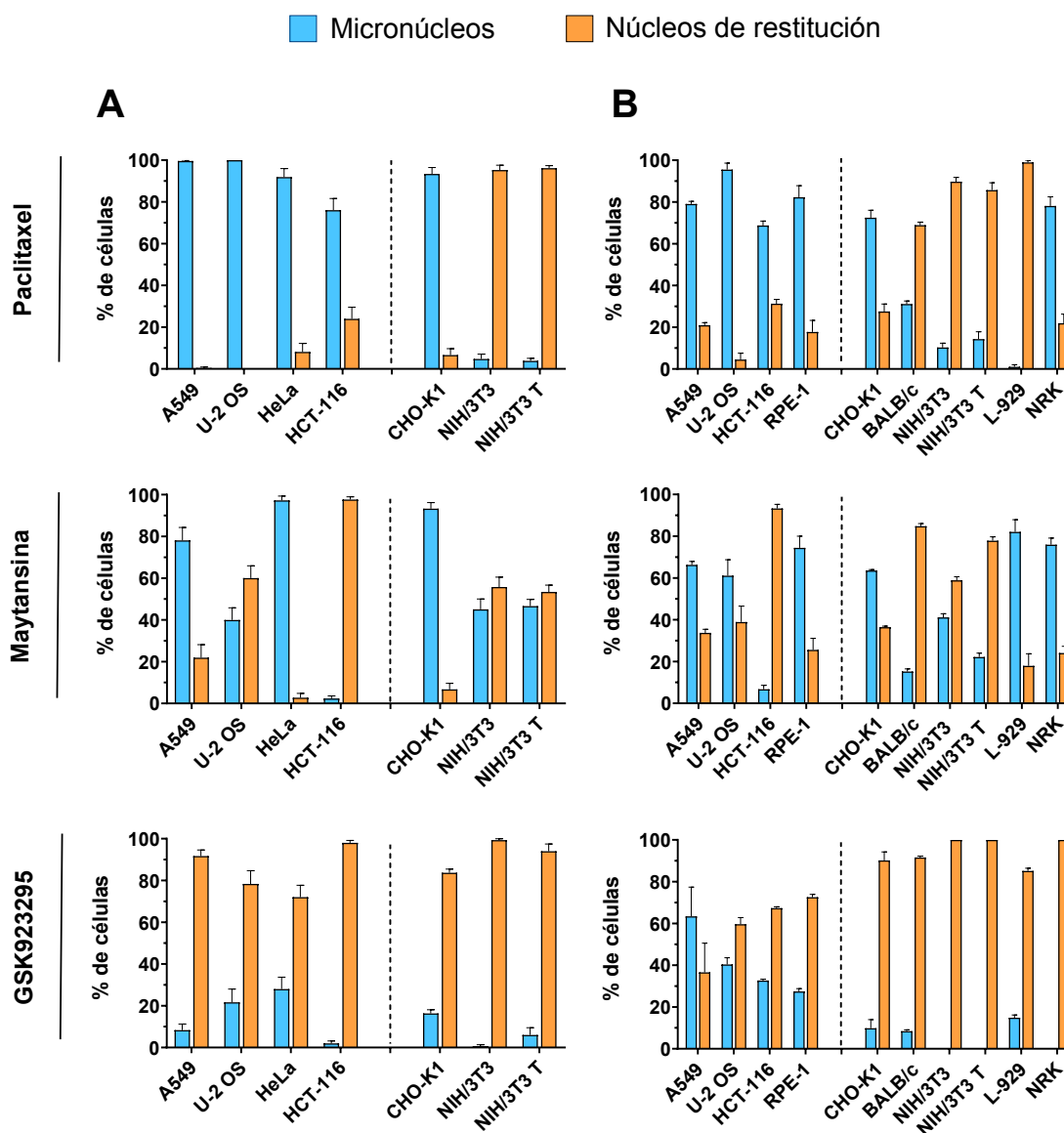


Figura 35. Generación de células micronucleadas durante el tratamiento con antimitóticos. Tratamiento con paclitaxel (150 nM), maytansina (25 nM) y GSK923295 (50 nM humanas, 250 nM CHO-K1, 1 μ M BALB/c, NIH/3T3, NIH/3T3 T, L-929 y NRK). (A) Líneas celulares que expresan marcaje de histona H2B y α -tubulina. (B) Líneas celulares que expresan marcaje de histona H2B y 3xNLS. Generación de células micronucleadas (azul), generación de núcleos de restitución (naranja). (A) n=3, (B) n=2. En cada gráfico: líneas humanas (izquierda) y líneas de roedores (derecha). Se observa que las líneas de ratón tienen más tendencia a generar núcleos de restitución, mientras el resto de líneas (humanas, hámster y rata) generan preferentemente células con micronúcleos.

4.6.3. Análisis de la dinámica de micronúcleos

La paradoja de la tasa de proliferación (T. J. Mitchison, 2012) plantea la incoherencia de por qué los fármacos antimitóticos son tan efectivos en tumores con tasas de proliferación bajas. Una posible explicación a ello es por la formación de micronúcleos tras el tratamiento con este tipo de fármacos. Los micronúcleos tienen una envoltura nuclear más lábil que los núcleos control, que tiende a colapsar más fácilmente que éstos. Al exponer el material genético al citosol, se desencadenaría una cascada de señalización mediada por cGAS-STING que provocaría la síntesis de interferón 1. Como consecuencia, el sistema inmune se activaría (MacDonald et al., 2023; MacKenzie et al., 2017) y no solo atacaría a la célula implicada sino al resto de células de su alrededor, lo que se conoce como “asesinato de espectadores” o efecto *bystander*, del inglés.

En el presente trabajo, mediante la batería de líneas con marcaje fluorescente de histona H2B y 3xNLS a partir de las células que generan micronúcleos (figura 35), se ha estudiado cómo es la dinámica de colapso y reconstitución de los mismos; entendiendo por “colapso” la pérdida de integridad de la envoltura nuclear y por “reconstitución” la recuperación de la integridad de la envoltura nuclear tras una pérdida previa de la misma. La señal de localización nuclear (NLS) es una secuencia de aminoácidos que, unida a una proteína reportera GFP, dirige la proteína fluorescente al núcleo, de tal forma que en cada núcleo y/o micronúcleo se puede observar el marcaje dual de la histona H2B y la señal 3xNLS. En el momento en el que un micronúcleo colapsa, el marcaje de NLS se pierde y por tanto solo es visible el marcaje de histona. Por el contrario, si el micronúcleo vuelve a reconstituir su envoltura nuclear, la señal de 3xNLS volverá a estar presente en el interior del micronúcleo (figura 36 y figura 37).

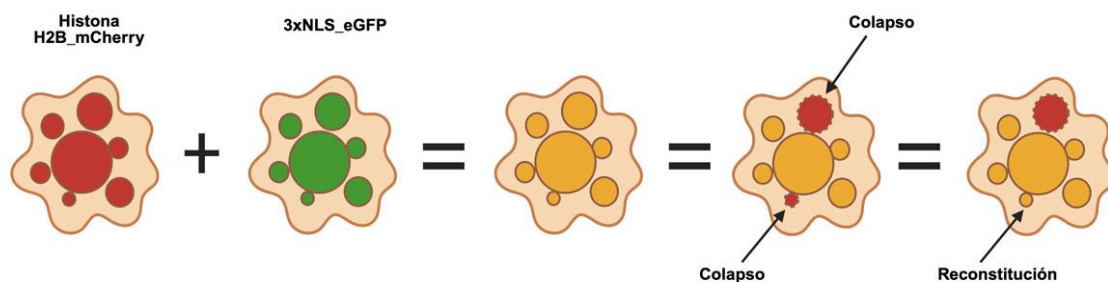


Figura 36. Representación esquemática de la dinámica de colapso y reconstitución de micronúcleos. Las líneas celulares cuentan con marcaje de histona H2B y 3xNLS.

La figura 37 (véase el vídeo 6 de anexos) es un fragmento de una secuencia de microscopía *time-lapse* en el que se observa una célula de la línea U-2 OS tratada con paclitaxel con marcaje de la histona H2B con mCherry y la señal 3xNLS con eGFP (los puntos más fuertes de marcaje con 3xNLS dentro de los núcleos/micronúcleos

corresponden a los nucléolos y son irrelevantes en este estudio). Dicha célula, ya ha evadido el punto de chequeo del huso y ha generado una célula multinucleada con micronúcleos de diverso tamaño. A lo largo del tiempo, se han marcado algunos de los micronúcleos que colapsan (flechas blancas) y solo se aprecia el marcaje de la histona H2B (flechas azules).

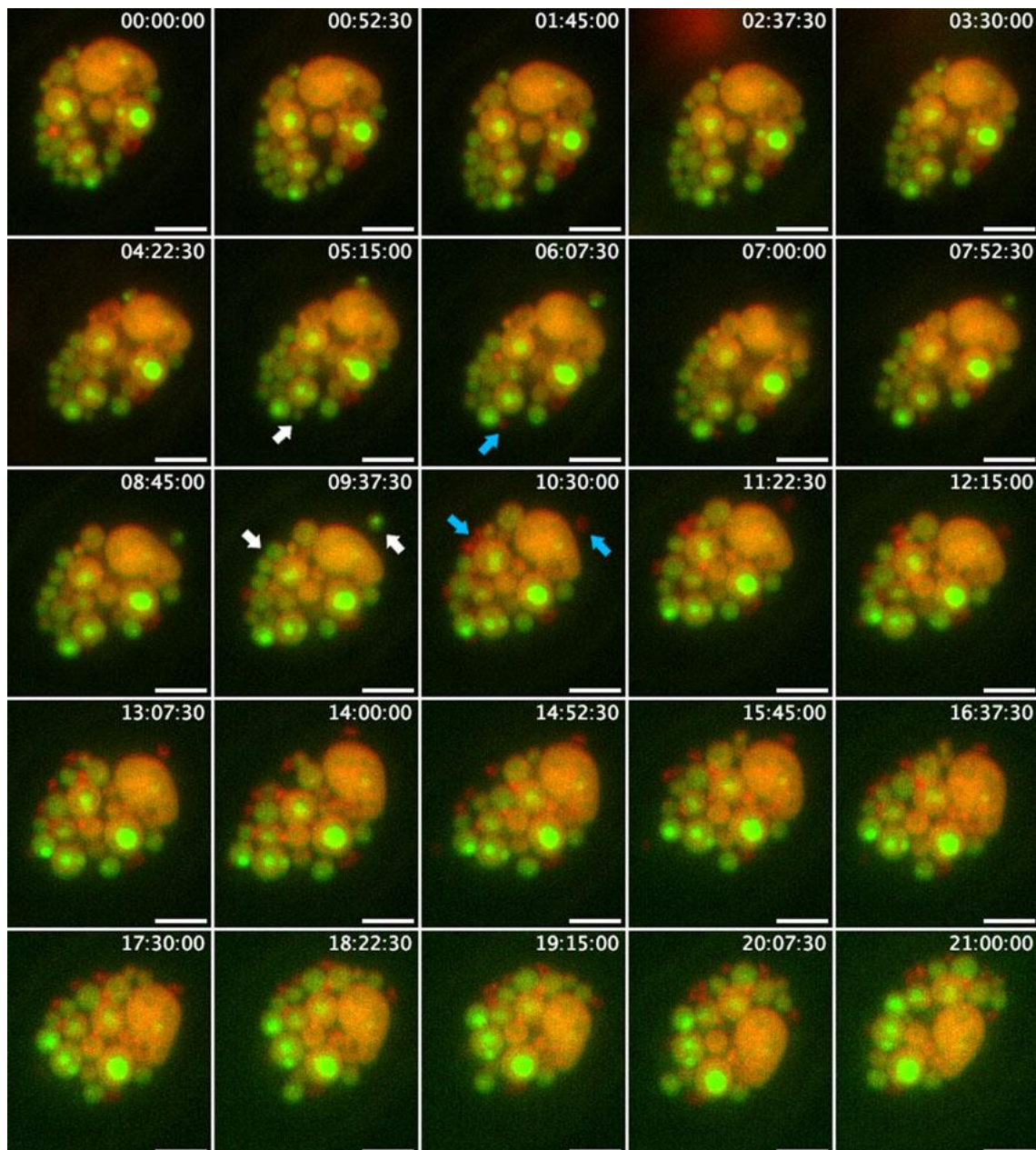


Figura 37. Fragmento de *time-lapse* mostrando el colapso de micronúcleos. Línea U-2 OS marcada con histona H2B-mCherry y 3xNLS-eGFP. Se muestra cómo los micronúcleos colapsan (flechas blancas), perdiendo la señal de 3xNLS y manteniendo la de la histona H2B (flechas azules). En algún caso los micronúcleos recuperan la envoltura nuclear y la señal de NLS. Barra de escala: 10 μm .

Cuando se estudió el número de micronúcleos generados por célula se observó que es muy variable, pero a grandes rasgos paclitaxel y maytansina forman más micronúcleos que GSK923295 (figura 38). Comparando entre líneas humanas y de roedores, con el tratamiento con paclitaxel y maytansina, las líneas humanas originan más micronúcleos por célula. Comparando entre líneas transformadas e inmortalizadas, la línea humana inmortalizada hTERT RPE-1, con maytansina y GSK923295, es la línea humana que genera más micronúcleos por célula. Por el contrario, al comparar la línea de ratón inmortal NIH/3T3 con su derivada transformada NIH/3T3 T no se observa una gran diferencia en la obtención de micronúcleos.

El número de micronúcleos que colapsan por célula es variado entre los distintos tratamientos y es variable dependiendo de la línea celular. Por dar una idea de la entidad del proceso, son dos los micronúcleos que colapsan, de media, por célula en las líneas humanas frente a menos de uno en las líneas de roedores. En el ejemplo concreto de la línea U-2 OS tratada con paclitaxel, que tiene un promedio de 15 micronúcleos por célula, la media de colapsos se sitúa en aproximadamente de 2,5 micronúcleos, es decir, un 16% de los micronúcleos generados en U-2 OS colapsan. Por otro lado, en el ejemplo de A549 tratada con GSK923295 se visualiza un promedio de 5 micronúcleos por célula, y el colapso es de 2 micronúcleos, es decir, un 40%. Respecto a la línea de hámster-chino CHO-K1 tratada con maytansina, genera una media de 5 micronúcleos por célula y únicamente el 6% colapsan. Destaca la línea inmortal de rata (NRK-52E) que con el tratamiento de paclitaxel o maytansina el porcentaje de micronúcleos que colapsan por célula en relación al total de micronúcleos generados por célula es del 50% (figura 38).

En cuanto a reconstitución de micronúcleos, con las drogas dirigidas contra tubulina, en la línea inmortal de rata NRK-52E casi el 60% de los micronúcleos totales colapsan y un gran porcentaje de ellos (60-70%) se reconstituyen (figura 39 A y B). En el resto de líneas de roedores el número de micronúcleos colapsados y reconstituidos respecto al total de generados es bajo. En cuanto a las líneas celulares humanas, el colapso es mayor en el tratamiento con paclitaxel y GSK923295, destacando A549 y RPE-1 por tener altos porcentajes de reconstitución (20-60%, figura 39 B).

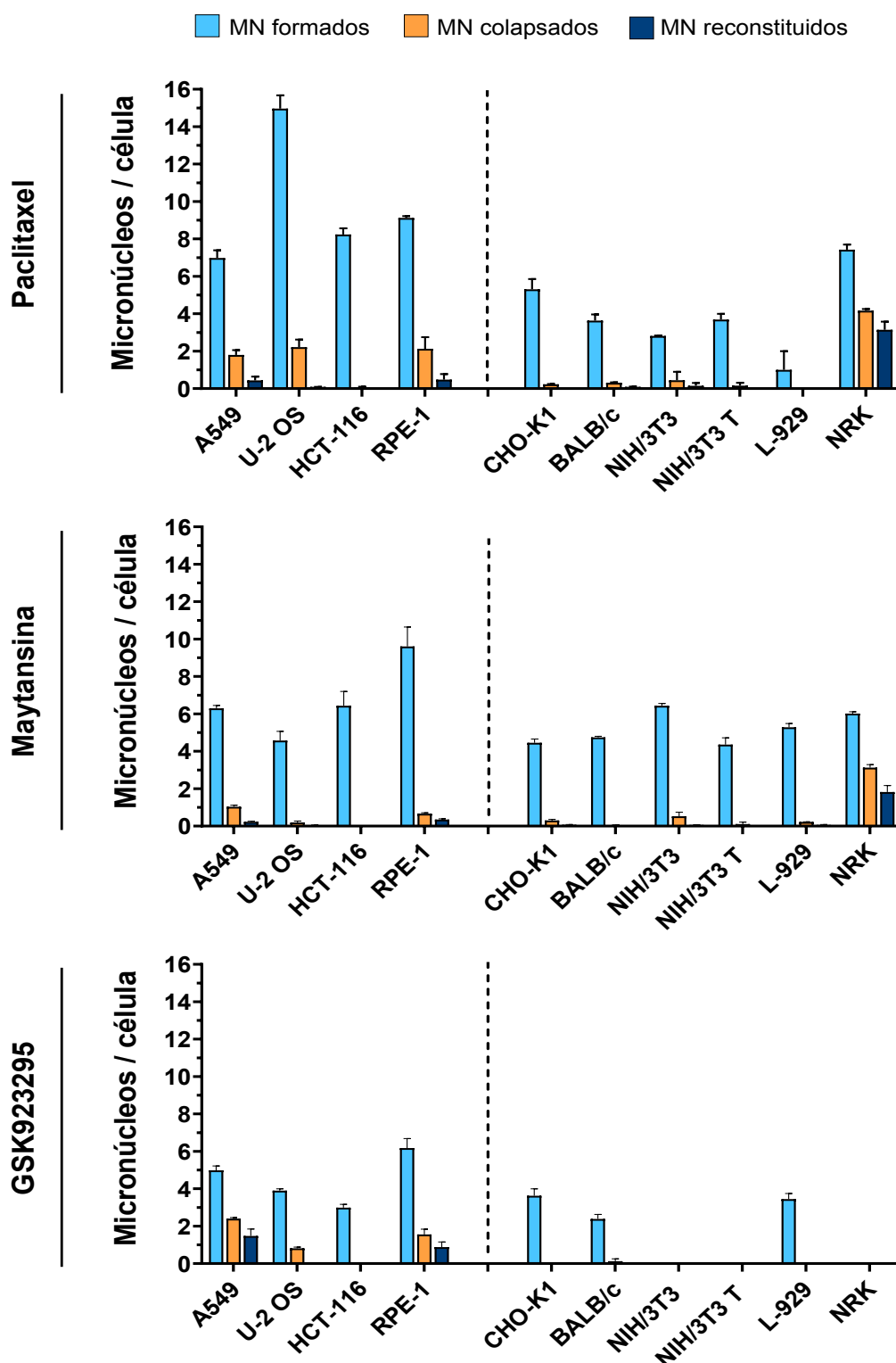


Figura 38. Generación, colapso y reconstitución de micronúcleos por célula durante el tratamiento con antimetabólicos. Tratamiento con paclitaxel (150 nM), maytansina (25 nM) y GSK923295 (50 nM humanas, 250 nM CHO-K1, 1 μ M Balb/c, NIH/3T3, NIH/3T3 T, L-929 y NRK) en líneas celulares que expresan marcaje de histona H2B y 3xNLS. Micronúcleos formados

(azul), micronúcleos colapsados (naranja) y micronúcleos reconstituídos (azul oscuro). n=2. En cada gráfico: líneas humanas (izquierda) y líneas de roedores (derecha).

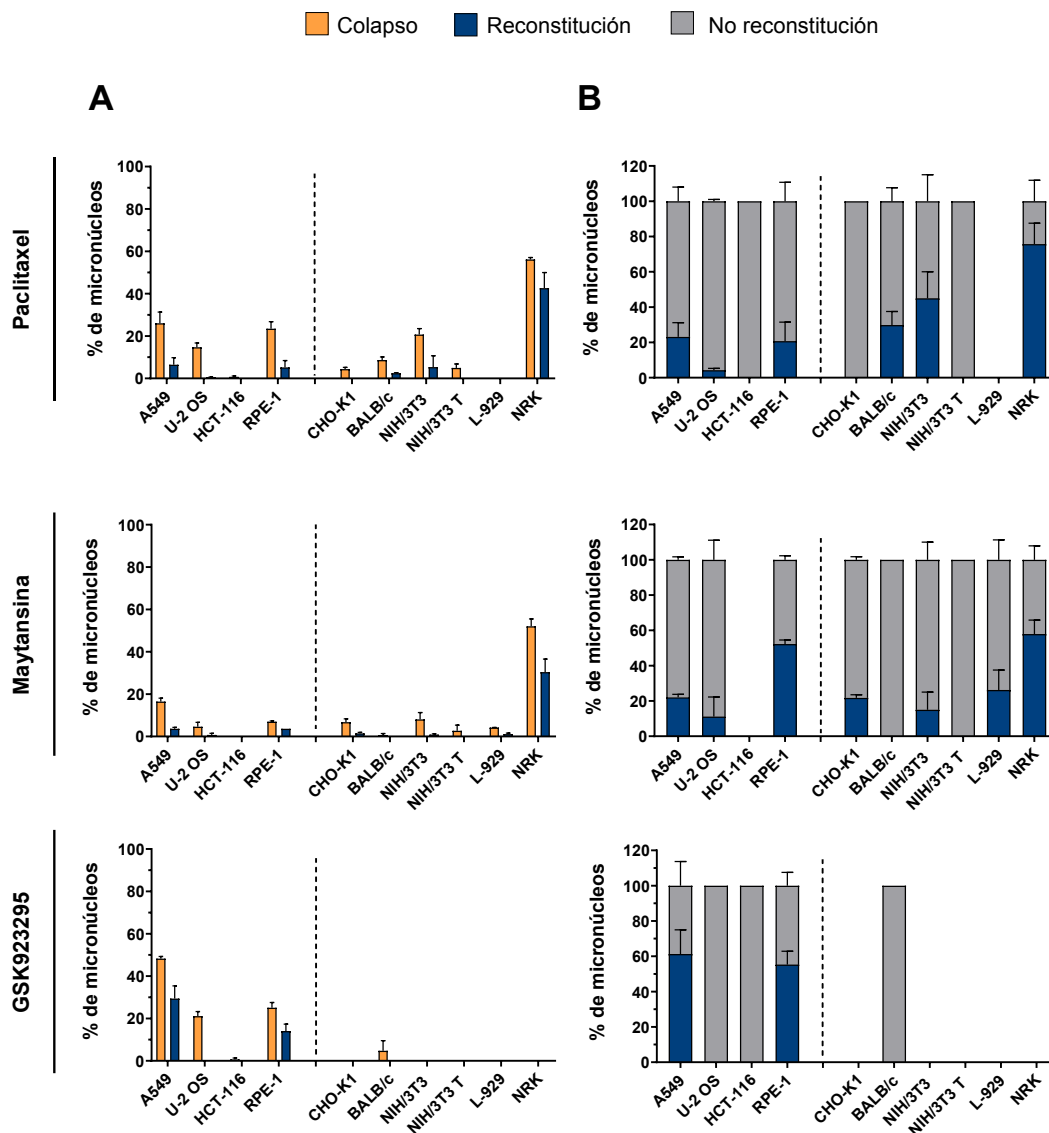


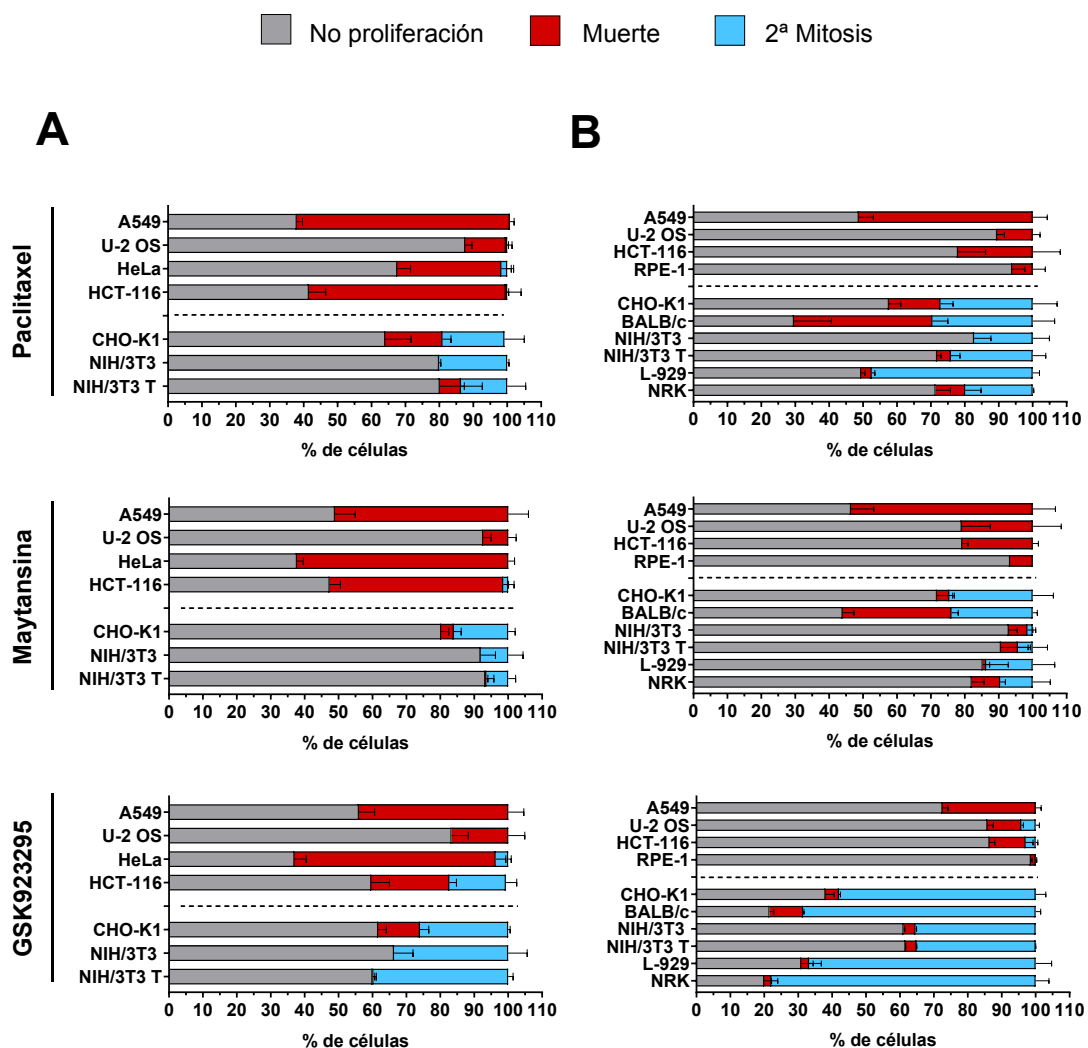
Figura 39. Colapso y reconstitución de micronúcleos totales. Tratamiento con paclitaxel (150 nM), maytansina (25 nM) y GSK923295 (50 nM humanas, 250 nM CHO-K1, 1 μ M Balb/c, NIH/3T3, NIH/3T3 T, L-929 y NRK) en líneas celulares que expresan marcaje de histona H2B y 3xNLS. (A) Porcentaje de colapso y reconstitución de los micronúcleos totales generados. (B) Porcentaje de reconstitución de los micronúcleos colapsados. Micronúcleos colapsados (naranja), micronúcleos reconstituídos (azul oscuro) y micronúcleos no reconstituídos (gris). n=2. En cada gráfico: líneas humanas (izquierda) y líneas de roedores (derecha).

4.6.4. Destinos celulares post evasión mitótica

Después de evadir el punto de chequeo del huso y generar células con micronúcleos o con núcleos de restitución, estas células pueden seguir diferentes destinos (véase el apartado 1.3.2.1. de la introducción). En este apartado de resultados, se ha analizado cómo difieren esos destinos en función del antimitótico empleado y de la especie. Distinguiremos entre células que, en el transcurso del experimento, (i) vuelven a entrar en mitosis tras la evasión del SAC, (ii) células que mueren tras la evasión y (iii) células que, en ese tiempo no hacen ni una cosa ni la otra. A estas últimas las calificamos como “no proliferación” aunque estrictamente hablando no hemos utilizado una ventana de observación en interfase que nos permita saber si avanzan en el ciclo o entran en ciclos de endorreduplicación.

En esta tesis, en los tres tratamientos antimitóticos aplicados, la mayoría de las líneas celulares humanas, no proliferan tras la evasión durante el tiempo del experimento; es decir, en las 48 horas de observación no detectamos que vuelven a entrar en mitosis; al contrario que las de roedores, siendo esta otra importante diferencia entre ambos grupos de líneas celulares. En realidad son dos las diferencias entre líneas celulares humanas *versus* de roedores: 1) las líneas celulares de roedores tras la evasión del SAC tienen la capacidad de volver a entrar en un nuevo ciclo, ya que tienen un porcentaje de células que son capaces de entrar de nuevo en mitosis, lo que no ocurre en las líneas humanas; y 2) se observa que el porcentaje de células que mueren tras la salida del bloqueo prolongado en c-mitosis es superior en las líneas humanas respecto a las de roedores (figura 40).

Figura 40. Destinos celulares tras la evasión mitótica. Tratamiento con paclitaxel (150 nM), maytansina (25 nM) y GSK923295 (50 nM humanas, 250 nM CHO-K1, 1 μ M Balb/c, NIH/3T3, NIH/3T3 T, L-929 y NRK). (A) Líneas celulares que expresan marcaje de histona H2B y α -tubulina. (B) Líneas celulares que expresan marcaje de histona H2B y 3xNLS. Células que no proliferan (gris), muerte en interfase (rojo), mitosis (azul). (A) n=3, (B) n=2. En cada gráfico: líneas humanas (superior) y líneas de roedores (inferior). Las líneas celulares de roedores tienen más capacidad para completar un segundo ciclo celular tras evadir el bloqueo c-mitótico, mientras que las líneas celulares humanas tienen más propensión a morir tras la evasión



Además, se ha medido el tiempo de duración del nuevo ciclo celular tomando como referencia desde la profase media, tanto en células control como con los tres tratamientos. La mayor parte de las líneas humanas no presentan datos con los tratamientos ya que como se ha mostrado en la figura 40, no vuelven a entrar en un nuevo ciclo. En roedores, que sí vuelven a entrar en ciclo, se observan diferencias significativas entre las células control y las tratadas. La duración del ciclo en las células de roedor que han sido tratadas y han evadido el SAC es mayor que en células control, sobre todo con el tratamiento de maytansina que en el caso concreto de la línea CHO-K1 aumenta hasta aproximadamente un 40% (figuras 41 A y B). Esto podría indicarnos que si bien las líneas de roedores, al contrario que las humanas, son capaces de sobrevivir al supuesto “daño” generado por la evasión del SAC, aun así, la duración de su ciclo celular se resiente, siendo la mayor de ellas con maytansina.

Por otra parte, monitorizamos el tiempo que tardan las células en morir tras la evasión mitótica. El tiempo es muy variable, pero en términos generales se observa que al tratar las células con paclitaxel o maytansina las líneas celulares de roedores tardan más tiempo en morir. A diferencia del tratamiento con GSK923295 que parece que ambos grupos de líneas tardan un tiempo similar hasta la muerte (véase figura 41 panel C y D).

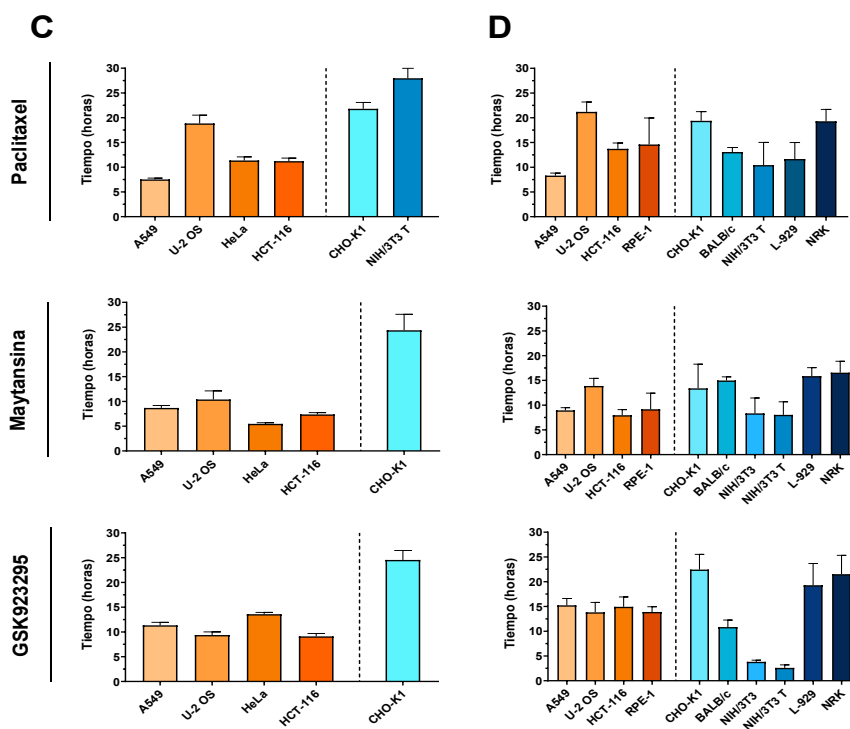
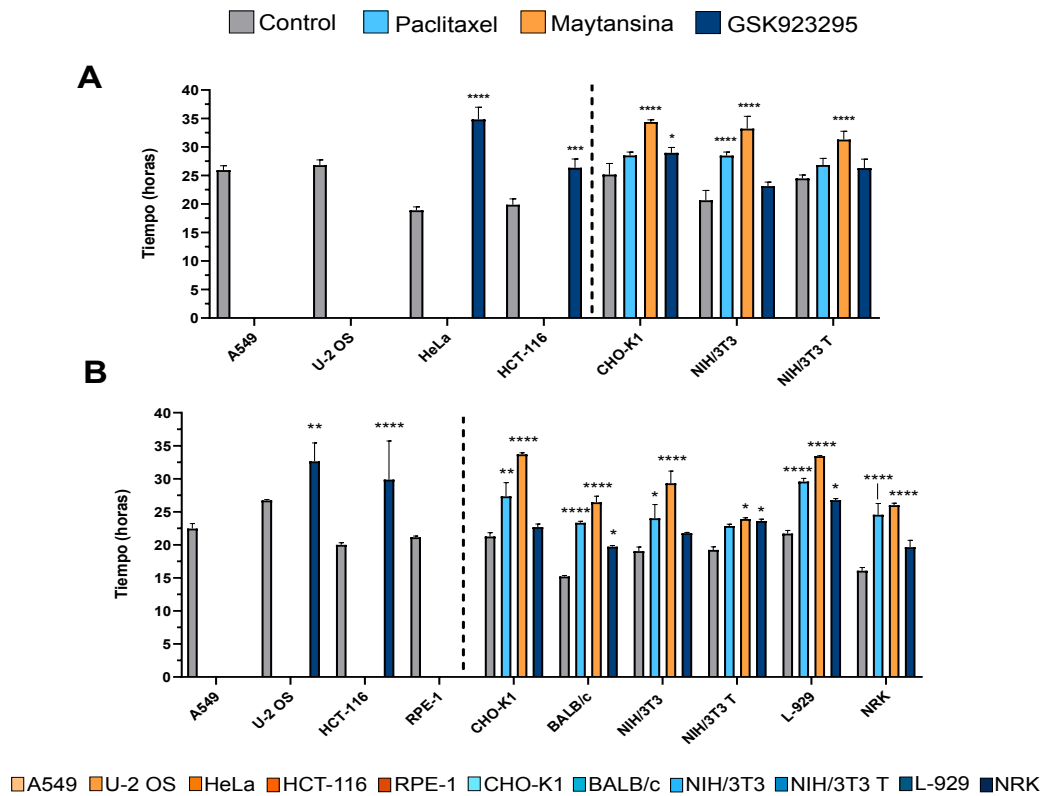


Figura 41. Duración ciclo celular y tiempo en morir tras la evasión del SAC. (A y B) Duración del ciclo celular en células control (DMSO-gris) y tratamiento con paclitaxel (150 nM-azul), maytansina (25 nM-naranja) y GSK923295 (50 nM humanas, 250 nM CHO-K1, 1 μ M BALB/c, NIH/3T3, NIH/3T3 T, L-929 y NRK-azul oscuro). En cada gráfico: líneas humanas (izquierda) y líneas de roedores (derecha). (C y D) Tiempo en morir tras la evasión mitótica con los tres tratamientos en líneas humanas (izquierda-tonos cálidos) y líneas de roedores (derecha-tonos fríos). (A y C) Líneas celulares que expresan marcaje de histona H2B y α -tubulina. (B y D) Líneas celulares que expresan marcaje de histona H2B y 3xNLS. (A y C) n=3, (B y D) n=2; (n.s. = no significancia; **** p < 0,0001; *** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05). Las líneas de roedores sobreviven a los tratamientos consiguiendo completar un nuevo ciclo, pero éste es de más duración que la del ciclo control. Aun así, hay células de roedores que también terminan muriendo, pero lo hacen a tiempos mayores que las líneas humanas.

4.7. Comparativa entre fármacos clastogénicos *versus* aneugénicos

El término quimioterapia surgió a principios del siglo XX de la mano de Paul Ehrlich y su concepto de “balas mágicas”, a las que definió como compuestos químicos capaces de eliminar agentes patógenos o células sin dañar tejidos sanos (Valent et al., 2016). La quimioterapia para el tratamiento del cáncer surgió de derivados de gas mostaza en la década de 1940 (Singh et al., 2018). Desde entonces hasta la actualidad, la quimioterapia ha avanzado en el desarrollo de fármacos específicos con diferentes dianas buscando que afecten preferencialmente a las células tumorales.

Los agentes quimioterapéuticos se clasifican en dos grandes grupos en función de si provocan daño al ADN, clastogénicos, o si provocan problemas en la mitosis, aneugénicos. Como se ha comentado con anterioridad, Tim Mitchison (T. J. Mitchison, 2012), propuso el asesinato de espectadores tras la señalización por colapso de micronúcleos generados como solución a la paradoja de la tasa de proliferación. Por otro lado, Beth Weaver ha demostrado en varios estudios (Scribano et al., 2021; Zasadil et al., 2014; Zhou et al., 2023) que, al tratar las células con fármacos antimitóticos, la segregación de los cromosomas es errónea provocando aneuploidías con la consiguiente generación de células micronucleadas y que son estas aneuploidías las que hacen inviables a las células tumorales afectadas. Aunque ambos autores atribuyan el éxito de los antimitóticos a causas muy diferentes, en ambos casos, citológicamente, las células coinciden en presentar una distribución anómala del genoma, compartimentalizada en micronúcleos y/o núcleos de restitución. En el presente trabajo, se ha querido comparar si entre fármacos clastogénicos y aneugénicos empleados en

la clínica del cáncer la generación de micronúcleos o, de forma más general, de aberraciones nucleares, es el denominador común que ayuda a la eliminación del tumor, sin profundizar en cuál es la causa real. De forma resumida los agentes clastogénicos provocan daño al ADN y los agentes aneugénicos provocan errores en la segregación del mismo. La lejanía de la introducción de esta tesis perjudicaría a la comprensión de esta parte de los resultados, por lo que se ha considerado explicar ahora, brevemente, cada uno de los agentes seleccionados para el estudio.

Según su mecanismo de acción, los agentes clastogénicos se clasifican en agentes alquilantes, antibióticos, antimetabolitos e inhibidores de topoisomerasas I y II. Como agente alquilante se ha seleccionado el cisplatino muy utilizado en quimioterapia para el tratamiento de cáncer de vejiga, cabeza y cuello, pulmón y testículo (Dasari & Bernard Tchounwou, 2014). Estrictamente, no es un agente alquilante pues químicamente hablando no contiene grupos alquilo, pero funcionalmente actúa como tal. El cisplatino mediante su grupo platino, forma enlaces covalentes con guanina y adenina (menos común), generando puentes intra- e intercatenarios que distorsionan la hebra de ADN provocando roturas.

Como antibiótico se escogió, la bleomicina, la cual deriva de *Streptomyces verticillus* y se utiliza en el tratamiento del cáncer testicular o el linfoma de Hodgkin (Chen & Stubbe, 2005). Se une a regiones GC del ADN, formando un complejo con el hierro molecular que reacciona con el oxígeno produciendo radicales libres, es decir, especies reactivas de oxígeno (ROS) que causan roturas de cadena simples y dobles.

Los antimetabolitos son agentes análogos de nucleósidos como es el caso de la 5-azacitidina, muy utilizada en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda. Es un análogo de citidina, que, al incorporarse al ADN, impide que se metile por inhibición de la ADN metiltransferasa de tal forma que el ADN queda hipometilado. En muchos tipos de cáncer, los genes supresores de tumores pueden estar hipermetilados provocando silenciamiento génico, de manera que el tratamiento con 5-azacitidina reduce la hipermetilación (Issa, 2007).

Las topoisomerasas son unas proteínas que se encargan de corregir el superenrollamiento de las hebras de ADN, concretamente la topoisomerasa I corta una hebra del ADN para aliviar el superenrollamiento y luego volver a religarla. La topoisomerasa II libera el superenrollamiento, cortando las dos hebras de ADN, pasa otra doble hebra a su través y vuelve a sellar la primera. El irinotecán (CPT-11)

(Pommier, 2006) y el etopósido (VP-16) (Clarke et al., 1993) son inhibidores de las topoisomerasas I y II, respectivamente. En ambos casos se unen a las proteínas una vez que ya han cortado las hebras de tal forma que impiden que se religuen, provocando roturas de cadena persistentes.

Todo este tipo de fármacos, actúan principalmente en la fase de replicación, es decir, la fase S del ciclo celular ya que necesitan que el ADN se esté sintetizando para inducir su efecto y, por tanto, las células pueden quedar bloqueadas en la fase G2 de corrección de errores de la replicación. Por el contrario, la bleomicina no necesita que el material genético este replicándose para actuar por lo que puede inducir roturas de ADN en cualquier fase del ciclo, pero se ha visto que su mayor efecto citotóxico es en la fase G2/M (Chen & Stubbe, 2005).

En las figuras 44 y 45 se presentan los resultados de los seguimientos *time-lapse*, pero previamente mostramos un pequeño estudio citológico (sin cuantificación) destinado a comprobar el efecto de estos agentes sobre el daño al ADN con resultado de aberraciones cromosómicas. La figura 42 muestra fotografías obtenidas en microscopía de campo claro sobre células fijadas con Carnoy's y teñidas con Giemsa. Los agentes clastogénicos se incubaron durante 3 horas, se lavaron y se mantuvieron las células en cultivo durante unas horas (para más detalle véase el apartado 3.4.5 de material y métodos). Posteriormente, se añadió nocodazol a 0,5 μ M durante 4 horas tanto para acumular células en mitosis (escasas en estos tratamientos) como para eliminar el huso mitótico que impediría observar con claridad cromosomas bien esparcidos portando aberraciones.

En la figura 42, en el panel A, correspondiente al control, se muestran los cromosomas de la línea utilizada (U-2 OS, con triple marcaje, pues es la empleada en los *time-lapse*) sin aberraciones detectables. El panel B muestra el resultado tras el uso de bleomicina y se observan diversas aberraciones cromosómicas: roturas cromatídicas (de una cromátida), fragmentos acéntricos (rotura de dos cromátidas), un quiasma con rotura de cromátida incluida y un cromosoma dicéntrico, fruto de evento recombinativo en ciclo anterior. De la misma forma, el panel C presenta cromosomas tras tratar con 5-azacitidina, D, con cisplatino, E, etopósido y F, irinotecán. Hemos buscado mostrar micrografías representativas del nivel de daño medio encontrado. Como se observa, tanto 5-azacitidina como cisplatino resultaron generar pocas aberraciones cromosómicas mientras etopósido e irinotecán presentaron numerosas aberraciones, tan variadas y abundantes como las obtenidas con bleomicina. Para terminar el panel G

presenta una célula con diplocromosomas (Mateos et al., 2005). Aunque el ejemplo mostrado corresponde a bleomicina, también se han observado con otros agentes, en especial etopósido e irinotecán (Pastor et al., 2005). Estos diplocromosomas, generados por endorreduplicación (dos interfases sin mediar mitosis entre ellas) explican que en el *time-lapse* se observen células que aumentan de forma continua el tamaño de sus núcleos interfásicos durante las 72 horas del experimento, sin mediar mitosis observables.

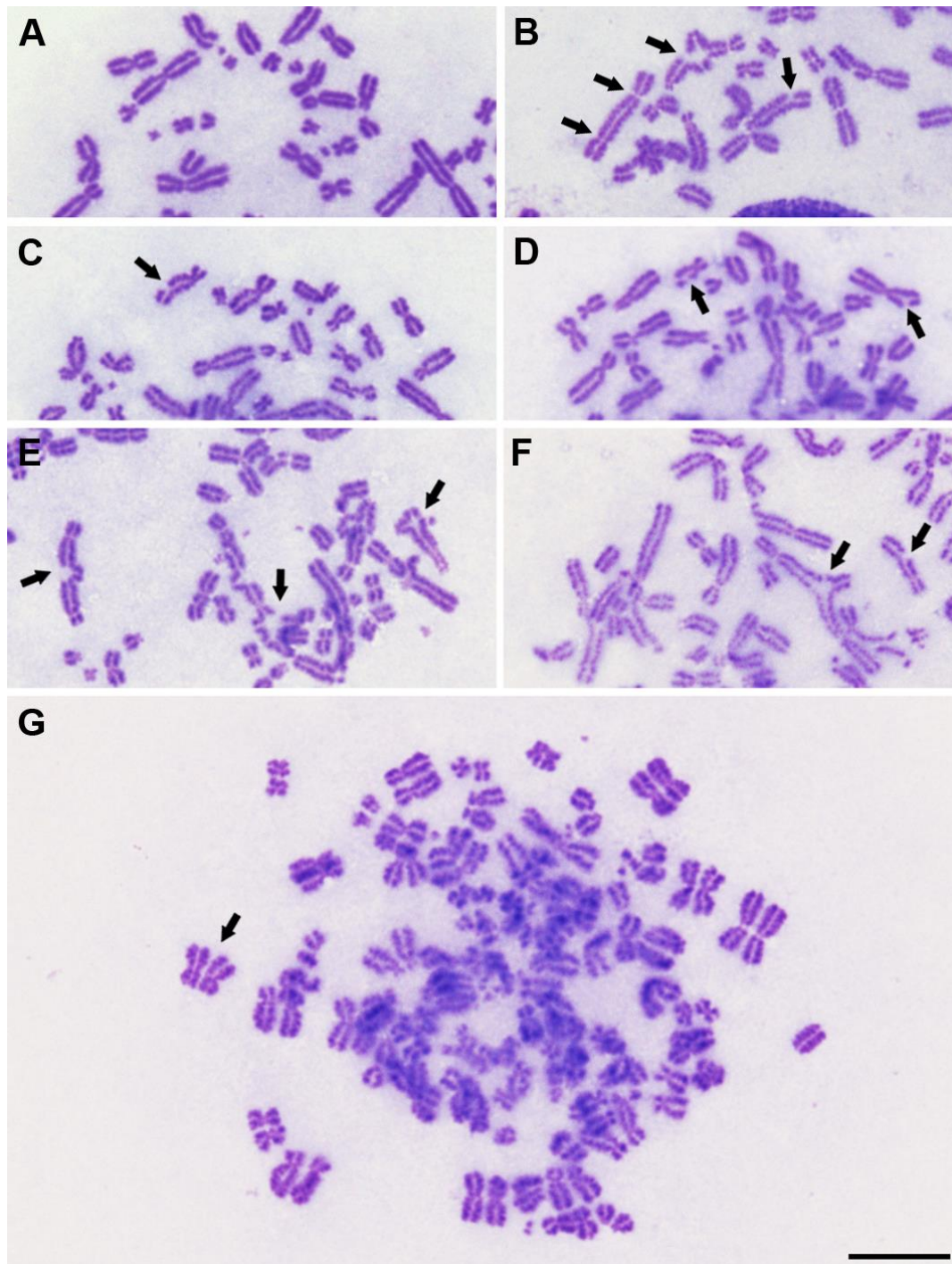


Figura 42. Aberraciones cromosómicas generadas con agentes clastogénicos. (A) Control, (B) 20 μ M bleomicina, (C) 30 μ M 5-azacitidina, (D) 0,75 μ M cisplatino, (E) 0,75 μ M etopósido, (F) 5 μ M irinotecán y (G) 20 μ M bleomicina. Las células U-2 OS se trataron con los diversos agentes clastogénicos durante 3 horas, se lavaron y se volvieron a incubar 40 horas. Previamente a la fijación con Carnoy's y tinción con Giemsa, se bloquearon con 0,5 μ M de nocodazol. En B-F se muestran distintos ejemplos de aberraciones cromosómicas que incluyen roturas de una o dos cromátidas (como fragmentos acéntricos en el segundo caso), quiasmas y cromosomas dicéntricos; algunas de ellas marcadas con flechas. El panel G muestra una célula con diplocromosomas. Todas las imágenes fueron adquiridas con el mismo aumento (100x, 1,46 de A.N.) Barra de escala: 10 μ m.

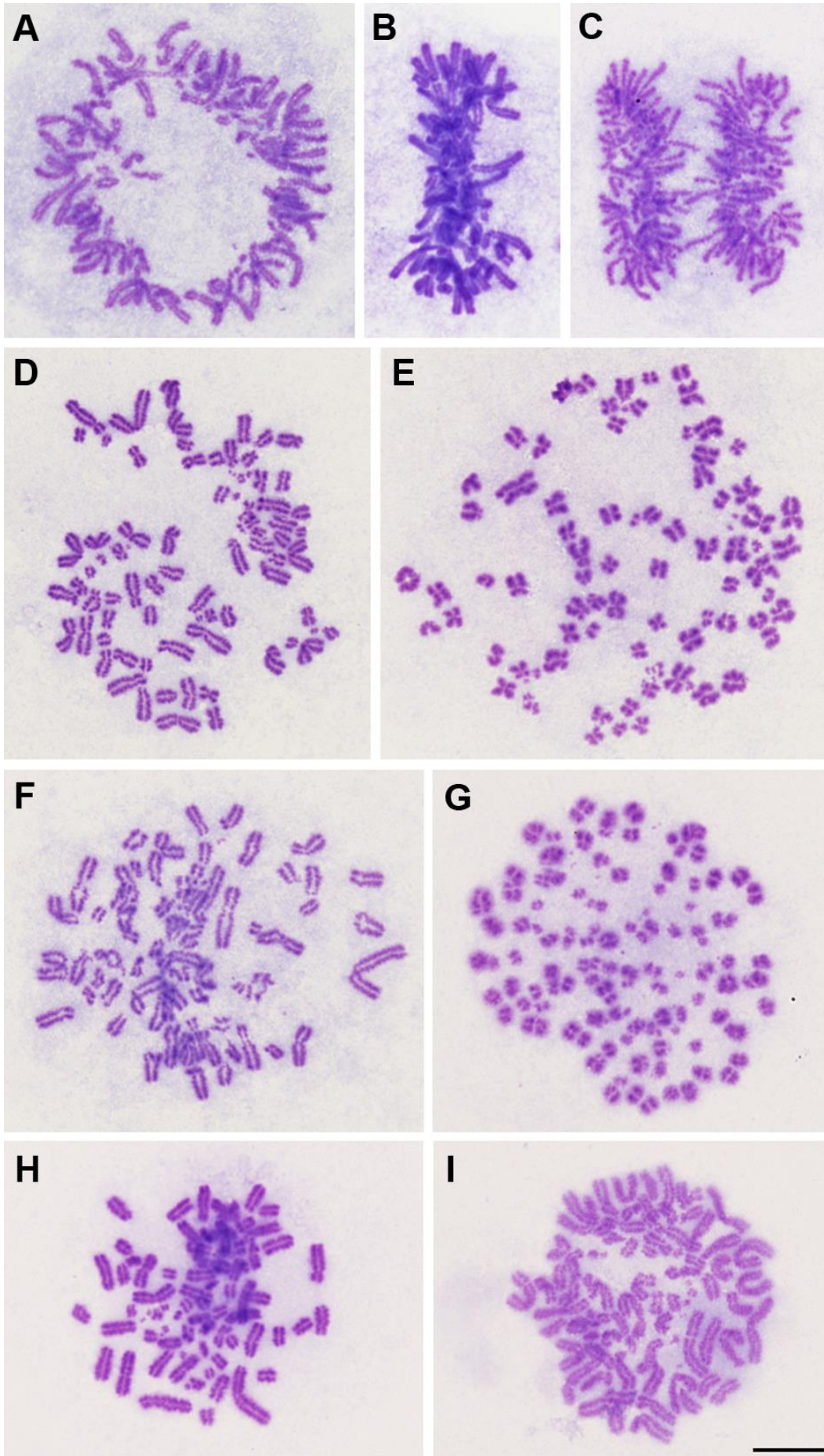
Los agentes aneugénicos empleados en este trabajo se clasifican en: inhibidores de quinasas mitóticas, de proteínas motoras y de la dinámica de tubulina. Los inhibidores que ejercen su efecto sobre proteínas mitóticas que son claves para la adecuada progresión de la división celular, interfieren en la correcta activación del punto de chequeo del huso. Alisertib (MLN8237), es un inhibidor selectivo de la quinasa aurora A. Es una serina/treonina quinasa que participa en la maduración y separación del centrosoma, el ensamblaje del huso y la alineación de los cromosomas en la placa ecuatorial (Agnese et al., 2007). Barasertib (AZD1152), es un inhibidor selectivo de la quinasa aurora B. Aurora B, que es fosforilada por aurora A, se encarga de corregir las uniones incorrectas de los cinetocoros al huso evitando una mala segregación de los mismos. Barasertib se encuentra en fase I y II para el tratamiento de la leucemia mieloide (Chieffi, 2018). Ambos inhibidores se ha publicado que inhiben al SAC impidiendo que responda a errores, aunque en nuestros experimentos sí observamos que dicha inhibición no debe ser completa por existir un pequeño retraso debido al SAC. BI2536 es un inhibidor de la quinasa PLK1 (del inglés, *Polo-like kinase 1*) (Stegmaier et al., 2007). PLK1 se considera un regulador maestro de la mitosis puesto que está involucrada desde que la célula entra en mitosis, en la condensación cromosómica y la congresión hasta la citocinesis (Van De Weerd & Medema, 2006). Como drogas que afectan a la dinámica de tubulina y a proteínas motoras, al igual que en los resultados previos, también se ha empleado paclitaxel, maytansina y GSK923295.

En la figura 43 se muestran algunos de los errores en la formación de la placa ecuatorial provocados por estos agentes (para inmunofluorescencia véanse las figuras 22 y 23). De igual forma que en la figura 42, se ha empleado fijación con Carnoy's y tinción con Giemsa (véase el apartado 3.4.5 de material y métodos para más detalle). En los paneles superiores (A, B y C) se muestran células control: en A se observa una placa metafásica en vista polar, en B una placa metafásica en vista lateral y C muestra una

anafase. Este tipo de configuraciones cromosómicas son indicativas de una correcta mitosis y están ausentes cuando las células son tratadas con agentes aneugénicos. Los siguientes paneles muestran defectos a la hora de formar una correcta placa metafásica. El panel D muestra cromosomas dispersos con paclitaxel; de igual forma, E los muestra (aún más hipercondensados) con maytansina sin ningún tipo de organización en placa. El panel F muestra un intento fallido de placa ecuatorial en vista lateral con GSK923295 en el que numerosos cromosomas aparecen cerca de los polos de la célula sin poder congresar; G muestra cromosomas hipercondensados en una placa ecuatorial deficiente en vista polar, con BI2536. El panel H, muestra un muy rudimentario y deficiente intento de placa ecuatorial en vista lateral con alisertib e I, muestra un intento fracasado similar, en vista polar en este caso, con barasertib. Como se observa, todos los agentes aneugénicos utilizados interfieren con la correcta congresión de los cromosomas y, por tanto, incapacitan a la célula para tener una adecuada segregación de cromátidas hermanas (véase la figura 26 como ejemplo de evasión del SAC con Giemsa o los vídeos 2, 3, 4 y 5 de anexos).

Para realizar los experimentos de *time-lapse*, se empleó la línea celular humana transformada U-2 OS, con un marcaje triple de histona H2B con mCherry, la señal de localización nuclear 3xNLS con BFP2 y LAP2 β con eGFP. LAP2 β es una isoforma de la proteína LAP2 (del inglés, *lamina-associated polypeptides*) que interacciona con las laminas, principalmente lamina B, ayudándolas a anclarse a la membrana interna de la envoltura nuclear.

Figura 43. Defectos en congresión cromosómica con agentes aneugénicos. (A-C) control (DMSO), (A y B) metafases y (C) anafase, (D) 150 nM paclitaxel, (E) 25 nM maytansina, (F) 50 nM GSK923295, (G) 5 nM BI2536, (H) 250 nM aliseritb y (I) 50 nM barasertib. Las células U-2 OS se trataron con los diversos agentes aneugénicos durante 16 horas. Después, tras un tratamiento hipotónico, se fijaron con solución de Carnoy's y se tiñeron con Giemsa. (D-I) distintos intentos fallidos de formar la placa metafásica que van desde la dispersión total de los cromosomas (D-E) hasta dispersiones parciales (F-I). Todas las imágenes fueron adquiridas con el mismo aumento (100x, 1,46 de A.N.) Barra de escala: 10 μ m.



4.7.1. Diferencias en la fracción proliferante y estados celulares

Como se ha comentado en el punto anterior (véase también el apartado 1.4.2 de la introducción), los fármacos clastogénicos provocan daño al ADN de tal forma que las células pueden quedar bloqueadas en la fase S del ciclo o en la fase G2. Como lo que se quería era comparar la formación de micronúcleos mediante el tratamiento con fármacos de ambos grupos, las células previamente tienen que realizar la mitosis, por lo que para el estudio con los agentes clastogénicos se probaron dos protocolos diferentes con las mismas concentraciones. El primer protocolo se basó en añadir los compuestos durante tres horas a las células en cultivo y después se realizaron lavados con medio fresco para comenzar el experimento de *time-lapse* (véase el apartado 3.5.1 de material y métodos). En el otro protocolo empleado se añadieron los compuestos sin lavarlos y directamente se comenzó el experimento. Como se observa en la figura 44 A hay diferencias significativas en la fracción proliferante entre los compuestos lavados y sin lavar, siendo el cisplatino el que menor diferencia presenta. Además, respecto al control, la fracción proliferante de los compuestos lavados también se reduce destacando la bleomicina en la que baja más de un 50%. El protocolo usado para los agentes aneugénicos ha sido el mismo que en los apartados anteriores de resultados. En la figura 44 B se puede observar que, respecto al control, la fracción proliferante varía, destacando que maytansina presenta la menor proliferación celular. Por el contrario, los inhibidores de aurora A (alisertib) y aurora B (barasertib) no presentan mucha diferencia respecto al control.

Además, se analizaron los distintos estados celulares acontecidos tras el tratamiento con agentes clastogénicos (figura 44 C). Tal y como se ve, existen diferencias en los estados celulares entre los protocolos con lavado y sin lavar. La endorreduplicación, es decir, el evento por el que el material genético se duplica sin dividirse, aumentando el contenido c de ADN sin incrementar la ploidía (valor n) (figura 42 G), es considerablemente mayor en todos los fármacos sin lavar en comparación con el lavado y con los aneugénicos (figura 44 D). Aunque directamente no se ha medido la endorreduplicación, en los *time-lapse* se observa un aumento del tamaño de los núcleos celulares como se ha comentado con anterioridad. También se observa que los clastogénicos *versus* los aneugénicos, tienen más muerte celular mientras las células están en interfase, al contrario que la muerte en mitosis que es mayor en los aneugénicos a excepción de alisertib y barasertib.

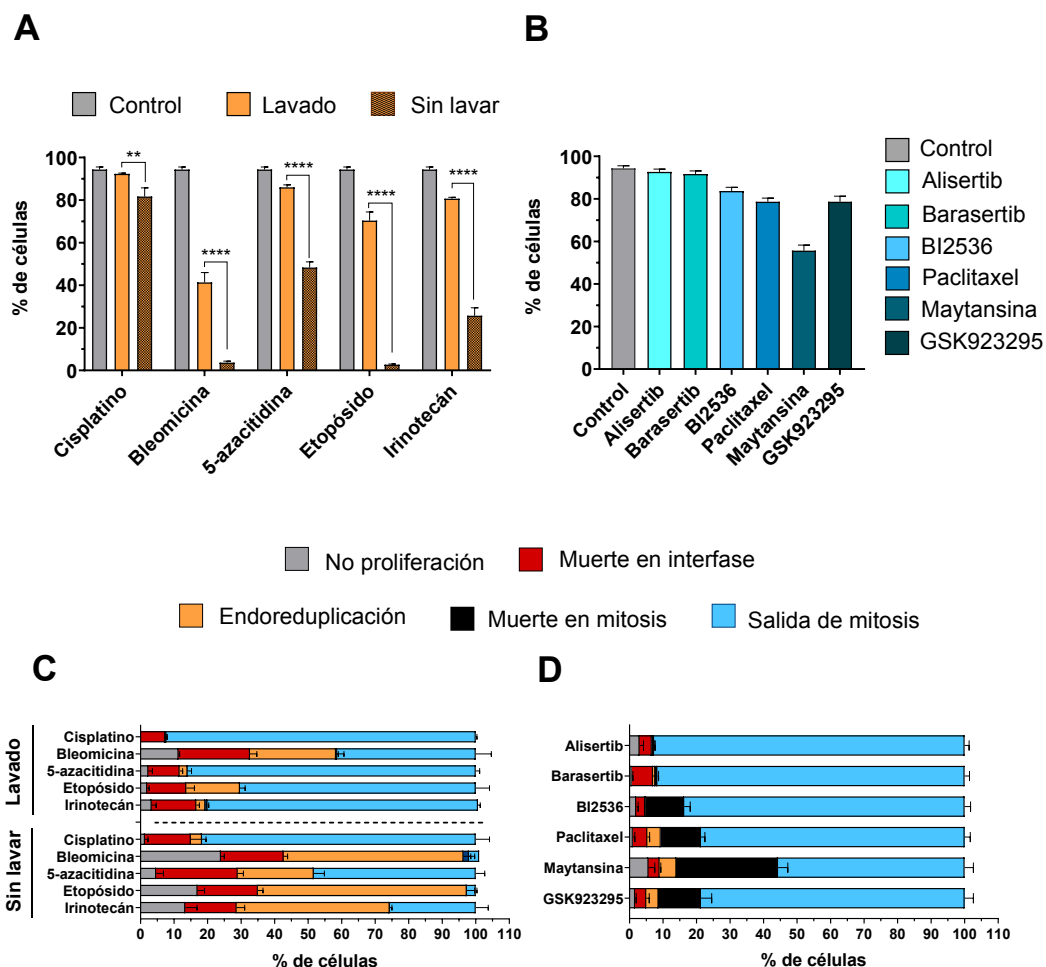


Figura 44. Parámetros de proliferación en agentes clastogénicos versus agentes aneugénicos. (A) Fracción proliferante de células control (DMSO) y tratamiento con cisplatino (0,75 μ M), bleomicina (20 μ M), 5-azacitidina (30 μ M), etopósido (0,75 μ M) e irinotecán (5 μ M). (B) Fracción proliferante de células control (DMSO) y tratamiento con alisertib (250 nM), barasertib (50 nM), BI2536 (5 nM), paclitaxel (150 nM), maytansina (25 nM) y GSK923295 (50 nM). (C y D) Estados celulares durante el tratamiento con fármacos clastogénicos y aneugénicos. (C) Clastogénicos lavados (superior) y sin lavar (inferior). En todos los casos n=3 y en cada réplica se han contabilizado 100 células. (n.s. = no significancia; **** p < 0,0001; *** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05).

4.7.2. Variación en la duración de la mitosis entre fármacos clastogénicos versus aneugénicos

Una vez se analizó comparativamente el efecto de los compuestos clastogénicos frente a los aneugénicos sobre la fracción proliferante y los estados células de la línea U-2 OS con triple marcaje, se estudió si existían diferencias en la duración de la mitosis entre estos dos grupos de fármacos sobre la misma línea celular.

Tal y como se ha mostrado en la figura 31 del apartado 4.5 de resultados, la variación entre células en respuesta a tratamientos en el mismo experimento es elevada. Partiendo de esa base, en este caso se observó que los agentes clastogénicos tienen una menor dispersión de las células, muy parecida al control, en comparación con los aneugénicos salvo alisertib y barasertib (figura 45 A). Además, como es de esperar con los fármacos clastogénicos, que no actúan en la mitosis, no hay diferencias significativas en la duración de la división respecto al control. En cambio, los aneugénicos sí tienen una mayor duración de la mitosis, ligeramente superior con los inhibidores de Aurora A y B respecto al control, y con diferencias mucho mayores con el resto de drogas, siendo de este grupo de cuatro, la maytansina la que mayor bloqueo en mitosis provoca, y el inhibidor de CENP-E el menor (figura 45 B y C).

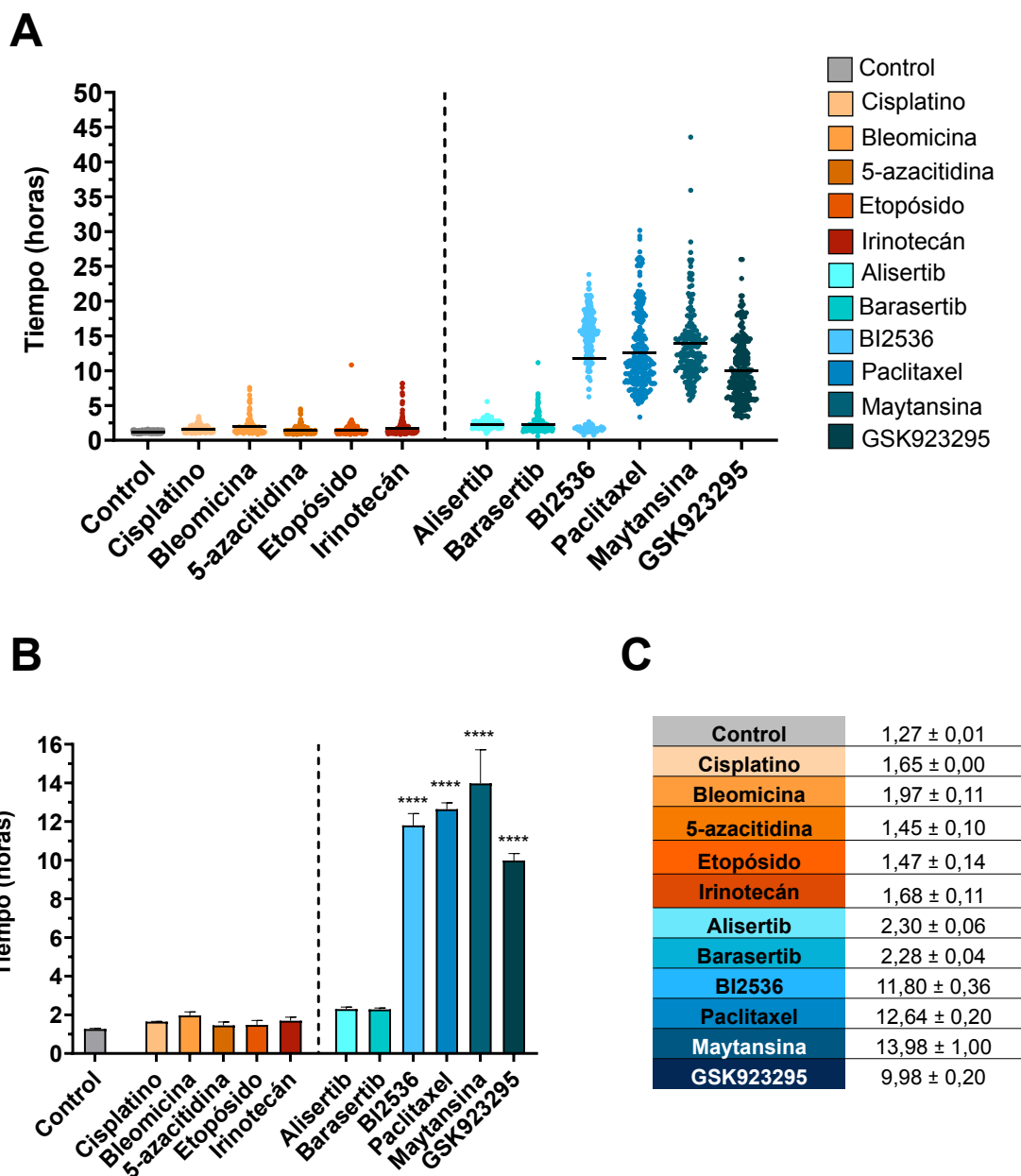


Figura 45. Duración de la mitosis con agentes clastogénicos versus agentes aneugénicos.

Duración de la mitosis en control (DMSO) y el tratamiento con cisplatino (0,75 μM), bleomicina (20 μM), 5-azacitidina (30 μM), etopósido (0,75 μM) e irinotecán (5 μM), alisertib (250 nM), barasertib (50 nM), BI2536 (5 nM), paclitaxel (150 nM), maytansina (25 nM) y GSK923295 (50 nM). (A) Dispersión de cada célula. (B) Promedio de tiempo de la división celular. (C) Promedio de tiempo (horas) de división celular y error estándar de la media. En todos los casos $n=3$ y en cada réplica se han contabilizado 100 células. (n. s. = no significancia; **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$). En cada gráfico: clastogénicos (izquierda-tonos cálidos) y aneugénicos (derecha-tonos fríos). Como era de esperar la duración de la mitosis presenta poca o nula alteración en los tratamientos con agentes clastogénicos. La duración de la mitosis (c-mitosis) se incrementa mucho con cuatro de los agentes aneugénicos y poco con los inhibidores de aurora A y B, que impiden la funcionalidad del punto de chequeo del huso.

4.7.3. Variación en la generación de aberraciones nucleares

Del mismo modo que se ha comentado en apartados anteriores, los agentes aneugénicos causan aneuploidías por interferir de una manera u otra en la correcta congregación (figura 43) y consiguiente segregación del material genético, de tal forma que los cromosomas dispersos pueden volver a reconstituir la envoltura nuclear generando micronúcleos o núcleos de restitución (figuras 26-28). Por otro lado, los clastogénicos inducen roturas en el ADN (figura 42), generando fragmentos cromosómicos, anillos y cromosomas dicéntricos que, de igual forma, pueden originar aberraciones nucleares. Por ello, se decidió comparar la generación de micronúcleos y núcleos de restitución entre ambos grupos de fármacos. Hemos incluido una tercera categoría, “fenotipo híbrido”, que representamos en el esquema de la figura 46. Este fenotipo consta de un núcleo principal y varios micronúcleos de muy pequeño tamaño a su alrededor.

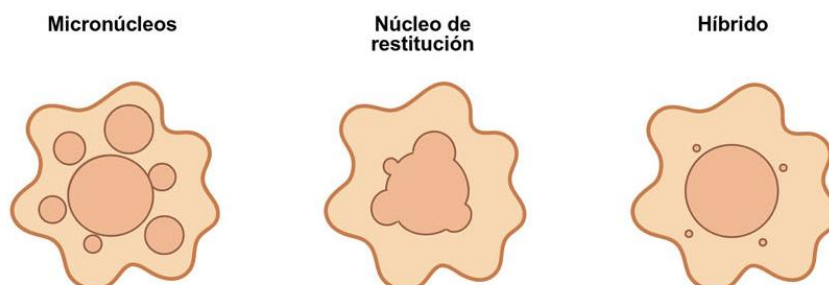


Figura 46. Representación esquemática de fenotipos nucleares en el tratamiento con agentes clastogénicos y aneugénicos.

En la figura 47 A se observa que, con el tratamiento con compuestos clastogénicos, al salir de la mitosis, la mayor parte de las células genera núcleos de restitución (40-80%), siendo menores los porcentajes de micronúcleos o fenotipo híbrido (10-30%). Esto contrasta con los aneugénicos que presentan preferentemente células micronucleadas (10-80%) y, en menor medida, núcleos de restitución (20-50%). Alisertib y barasertib, aun siendo aneugénicos, presentan porcentajes intermedios entre éstos y los clastogénicos. Se observa que los fármacos clastogénicos generan porcentajes elevados del fenotipo híbrido, destacando el tratamiento con bleomicina que además también tiene un porcentaje elevado de células micronucleadas. En cuanto a los aneugénicos, hay un porcentaje elevado de células con el fenotipo híbrido en los tratamientos de alisertib y barasertib.

Como ya hemos comentado alisertib y barasertib, siendo agentes aneugénicos presentan un fenotipo que se acerca más a los agentes clastogénicos. Es por ello que decidimos analizar el número de micronúcleos presente en cada fenotipo (figura 47 B). Observamos que en el fenotipo híbrido el número de micronúcleos por célula es inferior a tres (algo común a agentes clastogénicos y a alisertib y barasertib), mientras que en las células micronucleadas el número es superior, pudiendo llegar a diez por célula.

Evidentemente, la clasificación que hemos realizado dividiendo los fenotipos nucleares en: micronúcleos, núcleos de restitución y fenotipo híbrido es un tanto artificial. Los tres fenotipos responden a problemas en la segregación del material genético y la inclinación de la balanza hacia uno u otro responde al tamaño del material que no se incorpora al núcleo principal y a la distancia entre este material y el que conformará el núcleo principal. Cromosomas o grupos de cromosomas completos dispersos generarán micronúcleos de menor o mayor tamaño, respectivamente; fragmentos cromosómicos podrán generar los micronúcleos mínimos del fenotipo híbrido y, cuando estas masas de cromosomas o fragmentos se encuentran en la cercanía del grupo principal pueden quedar englobados por la misma envoltura nuclear quedando su morfología reflejada en formas aberrantes que, al fin y al cabo, constituyen los núcleos de restitución. Dado que la estabilidad de la envoltura nuclear puede depender de estas distintas formas y tener su relevancia en la señalización del sistema inmune (véase el apartado 5.4 de la discusión) hemos decidido mantener esta clasificación.

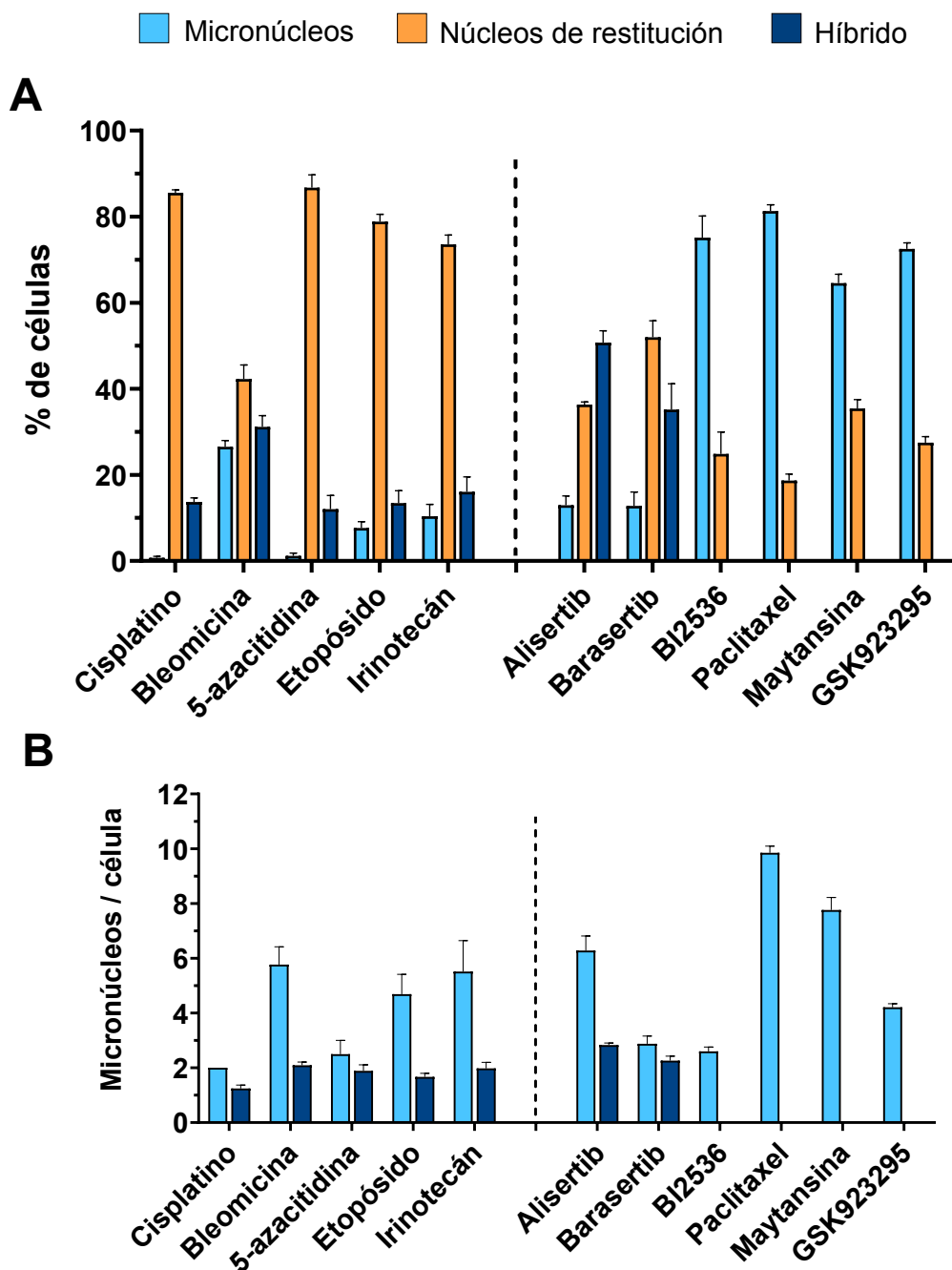


Figura 47. Generación de aberraciones nucleares en agentes clastogénicos versus agentes aneugénicos. Tratamiento con cisplatino (0,75 μ M), bleomicina (20 μ M), 5-azacitidina (30 μ M), etopósido (0,75 μ M) e irinotecán (5 μ M), alisertib (250 nM), barasertib (50 nM), BI2536 (5 nM), paclitaxel (150 nM), maytansina (25 nM) y GSK923295 (50 nM). (A) Porcentaje de células con aberraciones nucleares. (B) Cantidad de micronúcleos generados por célula. En todos los casos $n=3$ y en cada réplica se han contabilizado 100 células. En cada gráfico: clastogénicos (izquierda) y aneugénicos (derecha). Se observa una mayor preponderancia de núcleos de restitución en los agentes clastogénicos frente a más células micronucleadas en los aneugénicos. Bleomicina, del primer tipo y alisertib y barasertib, del segundo, presentan categorías intermedias.

4.7.4. Diferencias tras la salida de mitosis

Hay una diferencia clara entre el número de células que se generan después de la mitosis entre agentes clastogénicos y aneugénicos. Al tratar las células con los compuestos que provocan daño al ADN, cuando salen de mitosis mayoritariamente se generan dos células. Por el contrario, con el tratamiento de los aneugénicos al salir de la mitosis generan una única célula (figura 48 A).

En cuanto a los destinos celulares después de la salida de mitosis, se puede visualizar en la figura 48 B que los fármacos aneugénicos provocan una menor proliferación que los clastogénicos, pues con el tratamiento de fármacos que afectan al ADN las células tienen más capacidad de volver a entrar en ciclo.

La duración del ciclo celular tras el tratamiento con estos fármacos también se vio afectada respecto al control. Es con los fármacos aneugénicos cuando más diferencias significativas hay respecto al control, mientras que solo con la 5-azacitidina de los clastogénicos hay diferencias, aunque con los otros también hay un ligero aumento de la duración (figura 48 C).

En cuanto al tiempo que tardan en morir las células con estos agentes, no parece que haya mucha diferencia entre los dos grupos, ya que tras salir de mitosis la mayoría de las células tardan en morir alrededor de 20 horas, excepto con el inhibidor de PLK1 (BI2536) con el que el tiempo en morir aumenta un 50% respecto a los otros tratamientos (figura 48 D).

Nuestra comparación entre el efecto de los agentes clastogénicos y los aneugénicos en la duración del ciclo celular, supervivencia, generación de aberraciones nucleares, etc., exhibe marcadas diferencias entre ambos tipos de agentes: duración de la mitosis, generación de una o dos células y entrada o no en un nuevo ciclo; siendo lógicas y esperables muchas de estas diferencias. Lo que puede ser un poco sorprendente es que, con una morfología u otra, ambos tipos de agentes, con mecanismos de actuación marcadamente diferentes, coinciden en generar estructuras nucleares aberrantes tras pasar por la división mitótica.

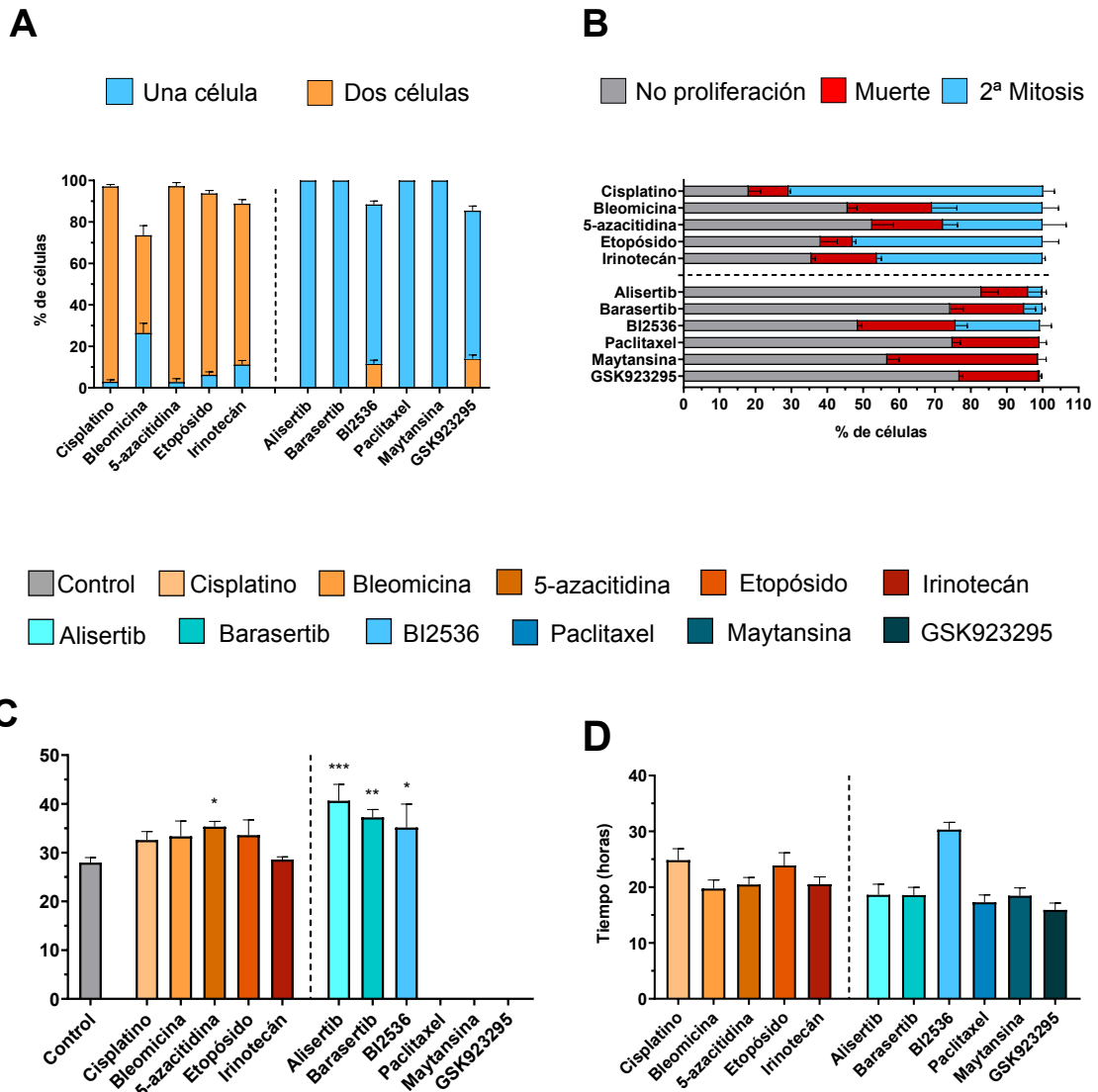


Figura 48. Destinos celulares en agentes clastogénicos versus aneugénicos. Tratamiento con cisplatino (0,75 μM), bleomicina (20 μM), 5-azacitidina (30 μM), etopósido (0,75 μM) e irinotecán (5 μM), alisertib (250 nM), barasertib (50 nM), BI2536 (5 nM), paclitaxel (150 nM), maytansina (25 nM) y GSK923295 (50 nM). (A) Número de células generadas tras la salida de mitosis. (B) Destinos celulares después de la división celular. (C) Duración del ciclo celular y (D) Tiempo en morir tras la salida de mitosis. En todos los casos $n=3$ y en cada réplica se han contabilizado 100 células. (n.s. = no significancia; **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$). (C y D) En cada gráfico: clastogénicos (izquierda-tonos cálidos) y aneugénicos (derecha-tonos fríos).

5

DISCUSIÓN

La aprobación de un fármaco como medicamento para uso humano se basa en unas directrices muy estrictas. El ICH (*International Council for Harmonisation of Thechnical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*) establece guías de consenso internacional para las diferentes agencias reguladoras de medicamentos, entre las que se incluyen la EMA (Europa), la FDA (Estados Unidos) y la PMDA (Japón), buscando unificar criterios entre países, lo cual no siempre ocurre.

Desde el descubrimiento de un fármaco, hasta su aprobación como tratamiento para la administración en el ser humano, la experimentación sigue distintas fases. En el primer paso, el descubrimiento del compuesto, se identifican y validan las posibles dianas terapéuticas para la búsqueda de moléculas activas. A continuación, en la experimentación preclínica se realizan ensayos *in vitro* mediante estudios en cultivos celulares antes de pasar a ensayos *in vivo* en modelos animales. Durante las siguientes fases (I, II y III) se dan los estudios en pacientes para determinar la eficacia y seguridad del posible medicamento (figura 49).



Figura 49. Esquema de las fases de evaluación de un fármaco.

Los ratones son por excelencia el modelo animal más utilizado en la experimentación preclínica. Los primeros modelos que se utilizaron se denominaron xenoinjertos (del inglés, *xenografts*). En ratones inmunodeficientes se inyectan, de forma subcutánea, células transformadas humanas establecidas en cultivos celulares. Este modelo ha evolucionado hasta tipos de xenoinjerto derivados de pacientes, en los que un explante de tumor humano se inserta en el ratón subcutáneamente (PDX) o en el mismo órgano de origen (PDOX). Más recientemente, además, se han desarrollado otro tipo de modelos. Por un lado, modelos sinérgicos que se caracterizan por el uso de líneas celulares transformadas de ratón que se trasplantan a ratones inmunocomprometidos. Por otro lado, modelos de ratones modificados genéticamente (GEMM) en los que se modifica el genoma del ratón para imitar las alteraciones observadas en tumores humanos (Gould et al., 2015).

En la actualidad, ningún modelo se ajusta a todos los programas de descubrimiento de fármacos ni ningún tipo de modelo es universalmente mejor. Todos los modelos mencionados anteriormente, cada uno con sus ventajas e inconvenientes, intentan ajustarse lo máximo posible a la recreación de un tumor dentro de la fisiología humana.

Pero, lo cierto es que, en muchas ocasiones, un compuesto puede tener resultados muy prometedores en ensayos *in vitro* en cultivos celulares que no se correlacionan con los observados en modelos animales y viceversa. En un estudio (Y. F. Li et al., 2018) compararon la farmacocinética en xenoinjertos de ratón del paclitaxel administrado con dos vehículos diferentes (KoEL-PTX y nab-PTX), con datos clínicos de pacientes y simulaciones. Observaron que los ratones eliminan más rápido el fármaco mientras que en los humanos se distribuye más en el organismo antes de su eliminación. Por ello, concluyen que hay una clara diferencia entre especies en cuanto a los resultados obtenidos entre el modelo animal y los pacientes.

Desde hace casi cien años (M. Levine, 1951), numerosas investigaciones contra el cáncer han llevado a cabo estudios de fármacos antimitóticos. En cultivos celulares se han utilizado líneas humanas o líneas de roedores, y sólo en muy contadas ocasiones se compara entre especies. Estas pocas comparaciones se suelen limitar a una única línea celular humana y una de roedor (Kung et al., 1990; Lopes et al., 1993; Schimke. R.T et al., 1991). En la mayoría de los casos, utilizan paclitaxel, un estabilizante de microtúbulos, empleado a día de hoy como tratamiento del cáncer, y nocodazol o colcemida, agentes despolimerizantes de microtúbulos. La colcemida es un derivado de colchicina, que se usa para la investigación científica o como antiinflamatorio en procesos agudos de gota. Debido a los efectos secundarios negativos de los venenos de MTs, se desarrollaron también drogas que afectaban al huso mitótico sin afectar a la tubulina, como inhibidores de Eg5 que impiden la separación de los centrosomas (Brito et al., 2008; Gascoigne & Taylor, 2008; Shi et al., 2008). Además, muchos de los datos de estos trabajos se obtuvieron mediante células fijadas (Gupta, 1985; Kung et al., 1990; Lopes et al., 1993; Michel et al., 2001; Parekh & Simpkins, 1996; Schimke. R.T et al., 1991; Steinmann et al., 1991; Yasuhira et al., 2016), y otros mediante microscopía *time-lapse* (Brito et al., 2008; Brito & Rieder, 2009; Gascoigne & Taylor, 2008; Shi et al., 2008) en los que, en la mayoría de los casos, el seguimiento de las células se realiza mediante luz transmitida en contraste de fases, lo cual no permite visualizar correctamente los eventos mitóticos. En muy pocas ocasiones las células presentaban algún tipo de marcaje celular para su seguimiento mediante microscopía de fluorescencia *time-lapse* (Brito et al., 2008; Gascoigne & Taylor, 2008).

5.1. La relevancia del material y metodología

En la presente tesis doctoral, hemos pretendido llevar a cabo un estudio más completo y unificado de los aspectos recién comentados. Para analizar las posibles diferencias en su respuesta a agentes antitumorales, entre líneas celulares humanas *versus* de roedores, se han empleado cuatro especies diferentes (*Homo sapiens* –ser humano–, *Mus musculus* –ratón común–, *Rattus norvegicus* –rata de alcantarilla– y *Cricetulus griseus* –hámster chino–) siendo las tres especies de roedores las más usadas tanto en experimentación clínica como en cultivos celulares. Entre estas líneas hemos incluido en nuestras comparaciones tanto líneas celulares transformadas como inmortalizadas, incluyendo entre las primeras a HeLa, una línea celular humana masivamente utilizada en investigación que, sin embargo, presenta particularidades frente a las restantes líneas de nuestro estudio, quizás por poseer un comportamiento deficiente del supresor de tumores p53 (Brito & Rieder, 2009) o por infraexpresar la proteína antiapoptótica Bcl-xL (Shi & Mitchison, 2017). En este sentido, HeLa ha resultado ser una línea celular a menudo no representativa del comportamiento de las otras líneas celulares humanas. Por no entrar en tediosos detalles, HeLa presenta un bloqueo en c-mitosis mucho más largo que las otras líneas humanas (figuras 31 y 32) y tiene menor tendencia a generar dos células con GSK923295 (figura 34 A). Eso no excluye que no haya habido más casos puntuales de líneas que en alguna ocasión se hayan comportado de manera diferente a las líneas con su mismo marcaje (CHO-K1 en figura 34 A, paclitaxel, HCT-116 en figura 35 A, maytansina).

Se han empleado tres drogas antimitóticas. Por un lado, dos de ellas actúan sobre la dinámica de tubulina: paclitaxel (estabilizante) (Díaz et al., 2003), empleado en la actualidad en quimioterapia (Amjad et al., 2023) y maytansina (desestabilizante) (Steinmetz & Prota, 2018) cuyos derivados como emtansina (Peddi & Hurvitz, 2014) y soravtansina (Moore et al., 2023) están aprobados para su uso clínico, ya que se conjugan a anticuerpos que van dirigidos contra antígenos tumorales. Por otro lado, GSK923295, es un inhibidor de la quinesina CENP-E (Qian et al., 2010) que participa en la congregación cromosómica y no tiene ningún efecto detectable sobre el citoesqueleto de microtúbulos ni el huso mitótico, y que se probó en ensayos clínicos (Chung et al., 2012).

Hemos usado técnicas citológicas con material fijado. Por un lado, fijaciones con Carnoy's, tras tratamiento hipotónico, y tinción con Giemsa, lo cual nos ha permitido una visualización detallada de cromosomas, núcleos, aberraciones de ambos y progresión

de la mitosis. Por otro lado, hemos realizado inmunofluorescencias indirectas para detección de α -tubulina, pericentrina, NuMA, lamina A, complementadas con tinción de ADN con DAPI. Esto nos ha permitido estudiar el citoesqueleto, el huso mitótico y, a destacar, el proceso de la evasión del punto de chequeo del huso a nivel citológico.

Sin embargo, el principal objetivo de esta tesis, comparar entre el comportamiento frente a la evasión del punto de chequeo entre líneas celulares humanas y de roedores, requería del seguimiento *in vivo* del comportamiento de células individuales a lo largo de períodos amplios de tiempo (48-72 horas) tras el tratamiento con diferentes drogas. Por ello, hemos empleado técnicas de videomicroscopía *time-lapse* para un seguimiento a tiempo real de cada una de las líneas incluidas en este estudio, lo que ha requerido de una inversión de tiempo considerable en generar la batería de líneas celulares clonales que expresan, de forma estable distintos marcajes fluorescentes combinados como histona H2B, α -tubulina y 3xNLS pudiendo así ser el análisis más exhaustivo e informativo (véase el apartado 3.4.3. de material y métodos). La histona H2B nos permite visualizar los núcleos interfásicos y los cromosomas mitóticos; la α -tubulina el citoesqueleto interfásico y el huso mitótico; mientras, el 3xNLS nos permite discriminar entre núcleos y micronúcleos con envoltura nuclear intacta de los que carecen de integridad en dicha envoltura, los cuales pierden el marcaje. Esto nos permite no sólo conseguir información diferente según la pareja de marcajes utilizada, sino poder conocer qué diferencias en comportamiento son atribuibles tan sólo a diferencias clonales, pues entre dos combinaciones distintas de la misma línea celular existe un antecesor cercano común en el clon que posee únicamente marcaje en la histona H2B. Para la comparativa entre agentes aneugénicos y clastogénicos hemos utilizado una única línea celular, proveniente de la línea humana U-2 OS, a la que hemos incorporado tres marcajes diferentes en tres rondas consecutivas de clonaje: H2B, 3xNLS y LAP2 β , permitiéndonos esta última observar la envoltura nuclear y su apariencia cuando se pierde el marcaje con 3xNLS por presunto colapso de la envoltura nuclear.

Estos tres tipos de marcajes para microscopía LED *in vivo* se complementan con la visualización simultánea de imágenes en campo claro que, en nuestro equipo de microscopía, ha resultado ofrecer una visualización mejorada frente al contraste de fase tanto de las células como de componentes de las mismas. Mientras que para los estudios citológicos en células fijadas utilizamos un objetivo de 100x (A.N. 1,46), para los experimentos *time-lapse* empleados para la obtención de los datos numéricos hemos utilizado un objetivo de 20x que, dada su excepcional apertura numérica (0,80) nos permite analizar en un solo campo un número elevado de células. Gracias a ello, se han

contabilizado un total de 100 células por réplica de cada tratamiento, a diferencia de otros estudios en los que el total de células contabilizado suele ser mucho menor. La mecanización tanto de la pletina del microscopio como del eje Z nos ha permitido comparar en experimentos multipocillo el comportamiento de las diferentes líneas celulares de forma real en el mismo experimento, en cada réplica del mismo, asegurando la igualdad de condiciones experimentales para todas las líneas celulares, hecho relevante en un estudio comparativo.

Al comparar las líneas bajo condiciones control (DMSO), se observa que en todas ellas hay una proporción pequeña de células que no proliferan y una fracción aún menor que mueren en interfase, aunque depende más de la línea celular que de la especie de origen (figura 50 A y B). En términos generales encontramos que la fracción proliferante es superior al 80% en todos los casos y se acerca al 100% en HeLa, L-929 y NRK, siendo la menor en A549, U-2 OS y NIH/3T3 T (figura 50 A y B). Este hecho, unido a las diferencias en la duración media del ciclo celular (BALB/c y NRK resultaron ser las más rápidas, entre 15 y 16 horas respectivamente, frente a U-2 OS que presenta el ciclo de más larga duración, 26 horas; conocidas líneas humanas como HeLa y HCT-116 tienen ciclos de aproximadamente 20 horas; figura 41 A y B) explica que, en la práctica, unas líneas proliferen en cultivo mucho más rápido que otras. Este hecho es evidente cuando observamos los porcentajes de células hijas control que entran de nuevo en mitosis en el transcurso del experimento (figura 50 E y F). Tanto líneas humanas como de roedores tienen un porcentaje de células con divisiones aberrantes (entendiendo como tal aquellas que generan células binucleadas, con puentes cromosómicos en anafase, cromátidas retrasadas, fragmentos acéntricos, husos multipolares, etc.), destacando la línea de hámster-chino, CHO-K1, en la que alrededor de un 10% de las células no segregan correctamente el material genético frente a frecuencias inferiores al 5% en las otras líneas (figura 50 C y D). Estos resultados indican que en controles hay diferencias entre las distintas líneas celulares pero que no son atribuibles a diferencias entre especies, sino intrínsecas de cada línea.

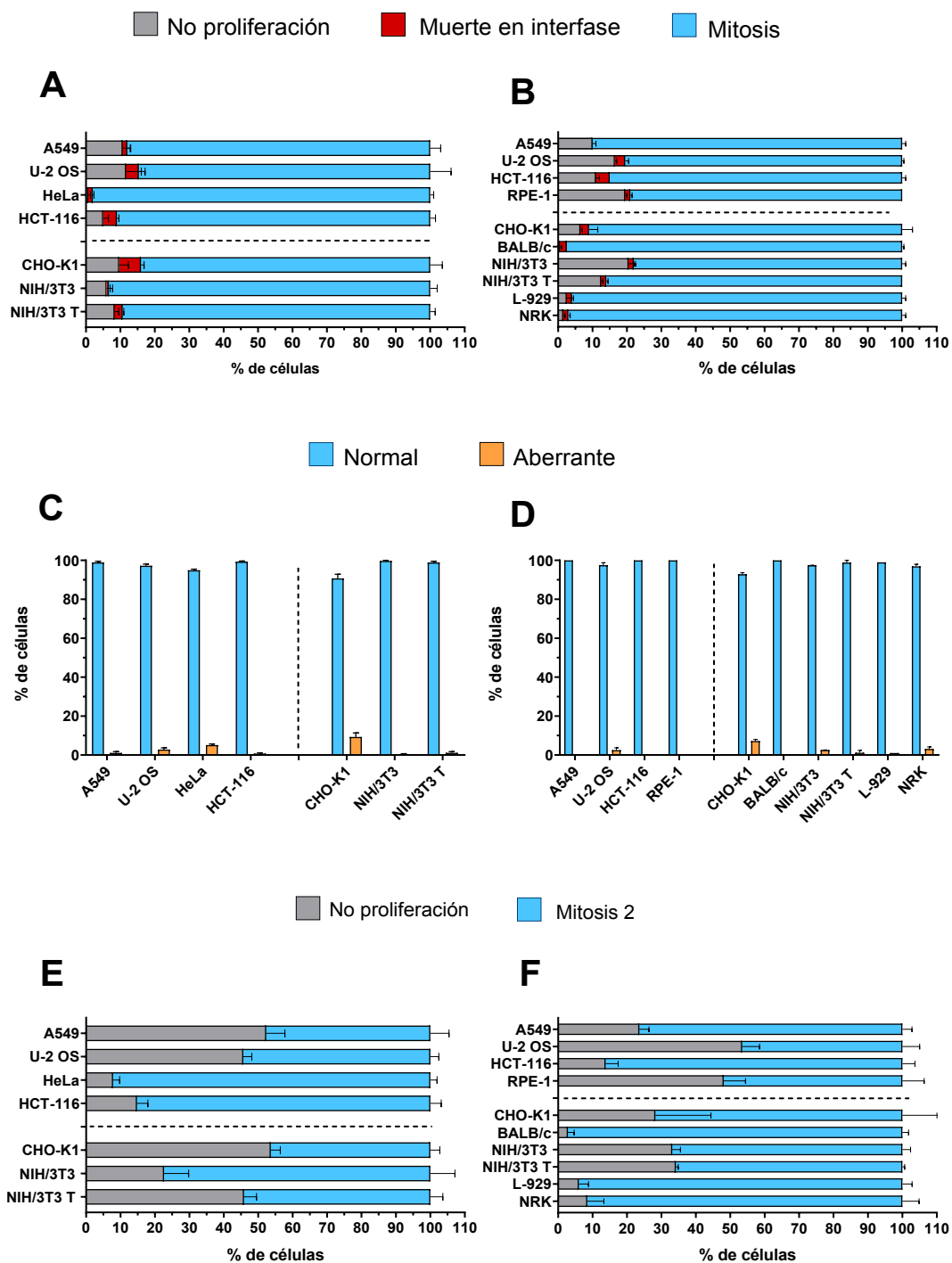
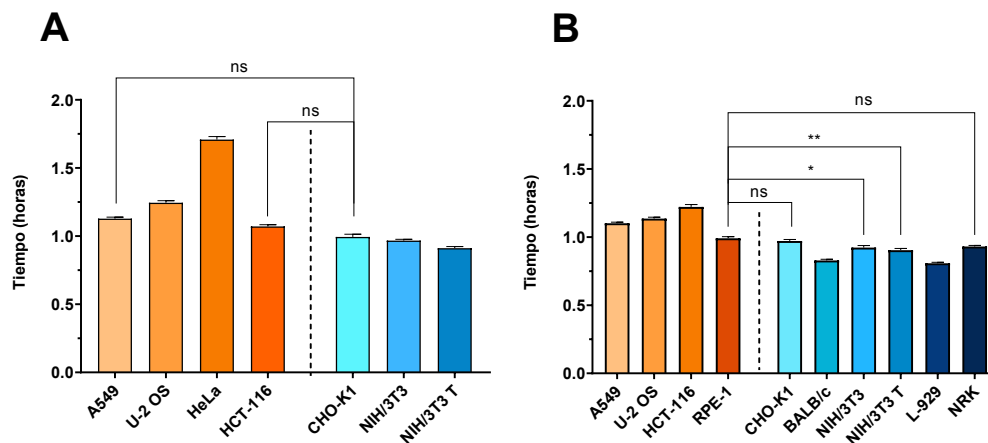


Figura 50. Comparación entre líneas celulares humanas *versus* de roedores bajo tratamiento control (DMSO). (A y B) Estados celulares. (C y D) Tipo de división. (E y F) Destino de las células hijas tras la salida de mitosis. (A, C y E) $n=3$. (B, D y F) $n=2$. Gráficos (A, B, E y F) Líneas humanas superior y de roedores inferior. Gráficos (C y D) líneas humanas izquierda y de roedores derecha. “Mitosis” implica que las células entraron en división en el transcurso del experimento. Los gráficos E y F indican que las células hijas vuelven a entrar en división una vez más. Estos datos (E y F) complementan los datos sobre duración del ciclo celular en células control de la figura 41.

Por el contrario, al tratarlas con los fármacos antimitóticos sí que se observan diferencias entre especies como se ha mostrado en el apartado de resultados. De entre todas las diferencias entre líneas celulares humanas *versus* de roedores, la que más destaca es la variación en la cinética de evasión del punto de chequeo del huso. Como se detalla en el apartado 4.5 de resultados, las líneas de roedores tardan mucho menos tiempo en salir de mitosis bajo los tres tratamientos en comparación con las células humanas que tienen un bloqueo c-mitótico más largo. Por poner varios ejemplos, extraídos todos de la figura 32 B, paclitaxel, la línea de roedor más lenta en evadir el punto de chequeo del huso es un 50% más rápida que la más rápida de las líneas humanas. La más rápida de las líneas de roedores lo es en 16 veces más que la más lenta de las humanas. La media de la c-mitosis, en las líneas de roedores dura 3,4 veces más que la mitosis control, mientras la duración media de la c-mitosis en las líneas humanas es 10,7 veces la duración de la mitosis control. Como media, la c-mitosis dura cuatro veces más en líneas humanas que en roedores. Este hecho ha sido comentado sólo esporádicamente y sin concreción en algunas publicaciones, pero hasta nuestro conocimiento nunca había sido ni probado ni detallado.

Nos ha sorprendido comprobar que esta diferencia entre especies no se restringe únicamente al tratamiento con las drogas, sino que, si se analizan los datos de las líneas en condiciones control (DMSO) se observa que en la mayor parte de los casos la duración de la mitosis en líneas humanas presenta diferencias pequeñas pero significativas ($p < 0,0001$) en comparación con las de roedores (figura 51). Estos datos sugieren que las discrepancias entre líneas humanas y las de roedores pueden deberse a diferencias en factores clave en la regulación de la mitosis, diferencias que ya existirían en controles y que se ponen de manifiesto y se acentúan más con los tratamientos que impiden la satisfacción natural del punto de chequeo del huso.

Figura 51. Representación de la duración promedio de la mitosis en líneas celulares control (DMSO). (A) Líneas celulares que expresan marcaje de histona H2B y α -tubulina. (B) Líneas celulares que expresan marcaje de histona H2B y 3xNLS. (A) $n=3$, (B) $n=2$. En cada gráfico: líneas humanas (izquierda-tonos cálidos) y líneas de roedores; (n.s. = no significancia; **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).



Defectos en la regulación del punto de chequeo del huso generan aneuploidías por la ganancia o pérdida de cromosomas las cuales se ha comprobado que pueden ser origen de cáncer, al igual que consecuencia del mismo, puesto que la aneuploidía promueve un incremento de la tumorigénesis espontánea y de tumores inducidos por carcinógenos revisado en (Holland & Cleveland, 2009), hecho propuesto por Boveri hace más de 100 años en sus estudios en embriones de erizo de mar que gracias a la traducción realizada por Henry Harris del alemán, son más accesibles (Boveri, 2008). Una regulación menos eficaz del punto de chequeo del huso podría, por tanto, estar tras la mayor tendencia de los roedores a generar tumores (Michel et al., 2001; Sotillo et al., 2007).

5.2. Posibles causas de las diferencias entre líneas celulares humanas *versus* de roedores

Richard Peto quiso determinar si la aparición de cáncer está asociada con la edad y el tamaño del organismo. Estableció que los ratones, a pesar de tener ciclos de vida cortos, tienen una incidencia de cáncer considerablemente mayor que los humanos (Peto et al., 1975). Así, nació la paradoja de Peto, la cual expone que los animales más grandes y más longevos deberían tener tasas de cáncer más altas que los animales más pequeños y de vida más corta, algo que en la práctica no ocurre. La idea es que cuantas más células tenga un organismo, mayor es la probabilidad de que una de ellas genere cáncer y cuanto más larga sea su vida, más tiempo tiene para que ello ocurra. Lo último es evidente porque tanto humanos como roedores tienen más predisposición a desarrollar cáncer en las etapas finales de su vida, los roedores entre 2-3 años y los humanos entre 70-80 años. La paradoja de Peto es consistente con los datos obtenidos en este trabajo, ya que las líneas de roedores evaden el punto de chequeo del huso mucho más rápido que las líneas celulares humanas, lo que sugiere que los humanos durante su evolución

han desarrollado mecanismos reguladores de la fidelidad de la mitosis más robustos. También se sabe que hay diferencias en cómo la tumorigénesis ocurre en humanos y roedores, tanto a nivel biológico, como por ejemplo diferencias en la longitud de los telómeros y telomerasa en ambas especies, como en el número de alteraciones genéticas necesarias para el proceso de transformación celular, siendo menores en roedores (Rangarajan & Weinberg, 2003).

En un estudio (Lorenzini et al., 2011), comparando fibroblastos de diferentes especies (vaca, perro, humano, conejo, ratón y murciélago) tratados con colcemida observaron, mediante citometría de flujo, que el porcentaje de células que duplican el contenido de ADN después del bloqueo mitótico es mayor en ratón, conejo y murciélago comparado con humano. Estos datos sugieren y se relacionan con los observados en la figura 40 del apartado 4.6.4. de resultados, y es que las líneas celulares de roedores tienen más capacidad de volver a entrar en ciclo en comparación con las líneas humanas siendo la segunda gran diferencia que encontramos entre los dos grupos de líneas celulares empleadas en nuestro estudio.

El gen TP53 codifica para el factor de transcripción p53 que regula multitud de genes relacionados con la proliferación, apoptosis y el metabolismo. Fue el primer gen supresor de tumores descrito, en 1989, aunque fue descubierto diez años antes como un oncogén. Se le conoce como “el guardián del genoma”, y también se descubrió que estaba mutado en la mayoría de los cánceres humanos (A. J. Levine & Oren, 2009).

Martin Fischer (Fischer, 2019) mediante meta análisis estudió qué tan conservada es la red reguladora del gen p53 entre humanos y ratones. Identificó un total de 595 dianas directas de p53 en ratón y 415 en humanos, de los cuales 86 son comunes entre ambas especies. De este modo, 509 dianas de p53 son específicas de ratón y 329 específicas de humanos, lo cual implica que aproximadamente solo el 15% de las dianas de p53 identificadas en ratón son coincidentes con las humanas, mientras que el 20% de las dianas humanas coinciden con las de ratón. En nuestro estudio hemos incluido una línea celular humana deficiente para p53 (HeLa) y es, con diferencia, la que presenta tiempos de bloqueo más largos, incluso entre las líneas humanas (figuras 31 y 32). Como ya se ha comentado, HeLa también ha presentado comportamientos peculiares en otros aspectos lo cual nos hace pensar que, a pesar de su uso masivo, no es una línea celular humana representativa del resto, aunque quizás su peculiaridad en cuanto a p53 la haga de uso necesario en ocasiones.

Cdc2 fue identificada por Paul Nurse en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*, como regulador necesario para la entrada en mitosis. Más tarde, determinaron su análogo en humanos (Lee & Nurse, 1987), hoy en día llamado Cdk1, que junto con la ciclina B forman el complejo MPF (del inglés, *mitotic promoting factor*) que controla la mitosis. En la década de los 90, trataron la línea celular humana HeLa S3 y la línea de roedor CHO-AA8 con colcemida, y analizaron las diferencias en los niveles de ciclina B y p34^{cdc2}, los cuales varían entre las dos especies. Observaron que las células humanas permanecían en un bloqueo constante, asociado a niveles altos de ciclina B y p34^{cdc2}, mientras que las células de roedor presentaban un bloqueo de tan sólo 2-4 horas antes de salir de mitosis. Concluyeron que debía existir un punto de chequeo que o, no está presente en todas las células o que varía en función de la especie (Kung et al., 1990). Estos datos están en concordancia con los nuestros, aunque a raíz de nuestro estudio queda claro que eligieron dos líneas extremas en sus comportamientos opuestos.

En consonancia con lo anterior, en otro estudio (Lopes et al., 1993) analizaron la sensibilidad de células CHO (hámster-chino) y A2780 (humana) al tratarlas con paclitaxel. Tras determinar que su toxicidad se correspondía con la mitosis, compararon su supervivencia, mostrando que las A2780 sobrevivían menos que las CHO, y es que, para alcanzar la máxima muerte celular, la dosis necesaria para CHO es 160 veces mayor que para A2780. Esto es consistente con nuestra observación de que las líneas de roedores tienen una frecuencia de entrada y compleción de un segundo ciclo mayor que las humanas (figura 40).

En otro estudio (Schimke. R.T et al., 1991) quisieron ver cómo células CHO y HeLa progresaban en el ciclo celular después del tratamiento con colcemida, rayos gamma (provocando daño en el ADN) o afidicolina (inhibiendo la síntesis de ADN). Respecto a los tres tratamientos, observaron que las líneas tenían respuestas muy diferentes, y concluyeron que HeLa presentaba un control estricto sobre su ciclo celular mitótico, mientras que el de CHO lo catalogaron como relajado, ya que, a pesar de haber afectado a la maquinaria del huso o haber provocado daño en el ADN, las células de hámster-chino eran capaces de continuar en el ciclo. En otro trabajo Steinmann y colaboradores (Steinmann et al., 1991), encontraron una diferencia entre células BHK (hámster-sirio), células NIH/3T3 (ratón) y HeLa (humana). Mediante experimentos de inmunoprecipitación observaron que al bloquear las células en fase S y añadir cafeína, las células de hámster entraban en mitosis sin haber completado la fase de síntesis de ADN, mientras que las de ratón y humano no. Por el contrario, al repetir el mismo

experimento pero con las células bloqueadas en G2, al añadir cafeína, los tres tipos celulares empezaban la mitosis. La conclusión general que uno puede extraer de los trabajos citados anteriormente es que la regulación del ciclo celular es más laxa en roedores que en humanos. Esto, en consonancia con nuestros resultados, incluye al punto de chequeo del huso.

En relación con los datos obtenidos en el presente trabajo sobre los tiempos de bloqueo en c-mitosis, al impedir la satisfacción del punto de chequeo del huso con tres estrategias diferentes (figuras 31 y 32), se observa que las líneas humanas demoran un tiempo considerablemente mayor en evadir el bloqueo. Aunque Kung y colaboradores (Kung et al., 1990) mencionan que ese bloqueo de las líneas humanas es permanente en el tiempo, lo que se ha observado en este trabajo comparando entre más líneas celulares es que sí que permanecen más tiempo bloqueadas en c-mitosis pero el bloqueo no es permanente. Las células humanas también terminan saliendo de mitosis originando células micronucleadas o con núcleos de restitución. Asimismo, en el trabajo realizado por (Lopes et al., 1993) vieron que las líneas de roedores son menos sensibles que las humanas al tratarlas con la misma concentración de paclitaxel. Nuestros estudios con líneas marcadas simultáneamente en cromatina y tubulina nos permiten excluir la posibilidad de que no hayamos utilizado suficiente concentración de cada droga. En relación a los resultados de Lopes, los de nuestro trabajo sugieren que las diferencias en comportamiento no son debidas al efecto de la concentración de paclitaxel, sino que esas variaciones en muerte celular son extensibles a diferentes drogas actuando por distintos mecanismos en el mismo proceso y que son comunes a más líneas humanas y más líneas de roedores. En diversos trabajos (Kung et al., 1990; Lopes et al., 1993; Schimke. R.T et al., 1991), se realizaron comparativas entre una línea humana y una línea de roedor con una única droga, siendo HeLa la línea empleada en los estudios publicados por (Kung et al., 1990; Schimke. R.T et al., 1991). Al aumentar el número de especies, líneas celulares, transformadas *versus* inmortalizadas y utilizar drogas diferentes con diversos mecanismos de acción (estabilizante de tubulina, desestabilizante de tubulina y un agente antimitótico inocuo para tubulina), nuestras conclusiones pueden generalizarse a diferencias intrínsecas en el comportamiento entre líneas humanas y de roedores.

Otros autores proponen que la diferencia entre líneas humanas y de roedores es debida a la acumulación de fármaco intracelular y no debido al tipo de microtúbulos de cada una de las células (Gupta, 1985). En un estudio compararon células CHO con células HeLa con agentes dirigidos contra microtúbulos empleando paclitaxel como

estabilizante y vinblastina como desestabilizante. Concluyeron que las células humanas son más sensibles pero que no era debido al tipo de microtúbulos sino a la captación intracelular del compuesto. Un estudio posterior (Parekh & Simpkins, 1996), reafirma esta idea ya que en varias líneas humanas y de roedores observaron que las células humanas acumulan más paclitaxel intracelular que las de roedores. Al tratar las células de roedores con verapamilo (un inhibidor de la bomba P-gp) vieron que la concentración intracelular de paclitaxel aumentaba. Nuestras líneas celulares que cuentan con marcaje de histona H2B y α -tubulina nos permiten observar *in vivo* la penetración de los diferentes fenotipos obtenidos (estabilizante, desestabilizante e inocuo) en el huso mitótico y en el proceso de congresión cromosómica, de tal forma que podemos descartar que las diferencias en las consecuencias del bloqueo por insatisfacción del SAC sean debidas a fenotipos más/menos penetrantes consecuencia de presuntas diferencias en concentraciones intracelulares de las drogas o por diferencias interespecíficas en los microtúbulos y su sensibilidad a las compuestos empleados. En cualquier caso, hemos utilizado concentraciones suficientemente elevadas de cada una de las drogas como para descartar que pueda deberse a una diferencia en la concentración intracelular. Por ejemplo, en células A549, en nuestros estudios *time-lapse* a 63x (vídeo 10 de anexos) la afectación de la mitosis es similar en la concentración de paclitaxel utilizada (150 nM) que con 20X menos o 100X más. Esa observación directa del fenotipo en nuestras líneas celulares marcadas con histona y tubulina es la que tuvo como consecuencia que hayamos utilizado concentraciones diferentes de GSK923295 en las diferentes líneas de roedores, concentraciones que no hemos necesitado ajustar para paclitaxel y maytansina. Posteriormente, respecto al GSK923295, se vio que estaba descrito en la literatura que los humanos tienen una constante de inhibición (Ki) más baja que los roedores, que son aproximadamente 20 veces menos sensibles, debido a una diferencia en dos residuos del dominio motor de la quinesina CENP-E (Wood et al., 2010).

Dentro de los mamíferos, aproximadamente el 40% de las especies son roedores, con una vida media de entre 3 y 4 años, excepto dos especies: la rata topo desnuda (*Heterocephalus glaber*) y la rata topo ciega (*Nannospalax galili* y *Spalax judaei*) que tienen una vida media de entre 30 y 21 años respectivamente. Además, desarrollan menos neoplasias que otras especies de su mismo orden. Esto es debido a que han desarrollado estrategias evolutivas de resistencia frente al cáncer que controlan la proliferación descontrolada, y en los últimos años se consideran como nuevas especies modelo para la investigación (Azpurua & Seluanov, 2013; Gorbunova et al., 2014).

Además, en un estudio que comparó secuencias codificantes entre varias especies de roedores y de humano, se observó que en especies como el ratón, la rata, el hámster y el jerbo (todas ellas de vida corta y altas tasas de proliferación), los genes implicados en la regulación del ciclo y proliferación celular muestran una evolución más acelerada en comparación con especies más longevas como las ratas topos, cuyas rutas se asemejan más a los humanos (Vinogradov, 2015).

Debido a todas las diferencias evidentes entre humanos y roedores, en los últimos años se ha cuestionado si los modelos de ratones empleados en la actualidad son los más acertados para la investigación del cáncer. Por ejemplo, algunas razas caninas desarrollan de forma espontánea diferentes tipos de sarcomas por su predisposición genética, a diferencia de los ratones que raramente desarrollan este tipo de tumores. Es por ello, por lo se podría pensar que otros organismos modelo diferentes a los ratones serían más adecuados en determinadas ocasiones para estudiar un tipo de tumor concreto.

5.2.1. Importancia de las proteínas Mad1 y Mad2

La proteína Mad1, forma parte de los componentes del sensor del punto de chequeo del huso. Se localiza en los cinetocoros no unidos de los cromosomas y se encarga de reclutar a Mad2 formando un complejo. Este complejo Mad1-Mad2 produce un cambio conformacional en Mad2 permitiendo la formación del complejo MCC, del inglés *Mitotic Checkpoint Complex*, que inhibirá al complejo promotor de anafase (APC/C) (figura 11) (Lara-Gonzalez et al., 2012). De esta manera, mientras haya cinetocoros no ocupados por microtúbulos y no sometidos a tensión la anafase será inhibida. Como se ha comentado con anterioridad, incluso en células control hay diferencias significativas entre líneas celulares humanas y de roedores en la duración de la mitosis. Para comprender a qué pueden deberse las diferencias observadas en Kung et al., sobre el bloqueo visto en una línea humana y una de roedor, Haller y colaboradores diseñaron una serie de experimentos que se basaban en la transfección de un plásmido que contiene Mad1-humano en una línea de ratón. Al tratar las células con nocodazol, observaron que las células presentaban un fenotipo mononucleado y asumieron que es debido a un arresto mitótico efectivo como el observado en líneas humanas, a diferencia de las células control que no contienen ese plásmido Mad1-humano que presentaban un fenotipo micronucleado. Puesto que Mad1 de humanos y Mad1 de roedores son entre un 81-84% idénticos, quisieron ver donde podría estar la diferencia entre ellos. Mediante experimentos de fusión de Mad1-humano y Mad1-ratón, observaron que la presencia

del extremo N-terminal de Mad1 humano era necesario para tener un punto de chequeo más estricto (Haller et al., 2006).

Los resultados de esta tesis doctoral, mediante microscopía *time-lapse*, obtenidos con el tratamiento de tres drogas antimitóticas en diferentes líneas humanas y de roedores abarcan desde: la observación de los estados celulares, las diferencias en el tiempo de evasión del SAC, la generación de micronúcleos u otras aberraciones nucleares y los destinos finales de las células que han salido del bloqueo en c-mitosis. En el trabajo anteriormente comentado, visualizan las células mediante experimentos de inmunofluorescencia de tal forma que las células están fijadas, y no es posible seguir su evolución en el tiempo. En el trabajo de Haller, argumentan que con la introducción de Mad1-humano, hay una reducción de las mitosis aberrantes por la observación de un fenotipo mononucleado, pero según lo observado en esta tesis doctoral, ese fenotipo podría deberse a la generación de células con núcleos de restitución que a todos los efectos sigue siendo resultado de una mitosis aberrante y, en cierto modo, son interpretables como células multinucleadas donde los micronúcleos han tenido poca separación entre sí en el momento de reorganizarse la envoltura nuclear. De hecho, células micronucleadas, al ser observadas con objetivo de 100x a menudo muestran algunos micronúcleos unidos entre sí por puentes cromosómicos que, según el plano focal, pueden pasar inadvertidos y que pueden tener gran relevancia fisiológica (Flynn et al., 2021).

Una de las posibles causas de por qué los roedores evaden el punto de chequeo antes que las líneas humanas al tratarlas con agentes antimitóticos, podría ser las diferencias en Mad1 comentadas anteriormente. Pero, además, también puede estar relacionado con Mad2, otra proteína esencial para el correcto funcionamiento del SAC ya que el punto de chequeo del huso debe estar altamente regulado, porque un fallo en su maquinaria provoca que alteraciones en la mitosis no sean detectadas. En un estudio, generaron células HCT-116 (humanas) y ratones haploinsuficientes para Mad2 (+/-). Observaron que al tratar las células con nocodazol había un menor arresto en mitosis, una separación prematura de las cromátidas hermanas y una mayor frecuencia de aneuploidía (Michel et al., 2001). Estas mismas observaciones, se corroboraron en un estudio posterior en el que mediante ARN de interferencia suprimían la expresión/acción de Mad2. Vieron que al tratar las células con paclitaxel, había un descenso de la acumulación mitótica en líneas celulares humanas y por tanto una función reducida del punto de chequeo del huso (Sudo et al., 2004). Además, se sabe que determinados tipos de cáncer tienen un punto de chequeo del huso defectivo por una baja expresión de

Mad2. Observaron que si sobreexpresaban Mad2 en esas líneas celulares la supervivencia celular tras el tratamiento con paclitaxel aumentaba por una mejora en el SAC. Posteriormente, se vio que, una sobreactivación del punto de chequeo, es decir, una mayor actividad, no asegura una mayor estabilidad cromosómica. Esto se demostró generando ratones transgénicos que sobreexpresaban Mad2. La sobreexpresión de Mad2 inducía una mayor inestabilidad cromosómica incrementando la aparición de aneuploidías lo que favoreció el desarrollo de neoplasias (Sotillo et al., 2007), lo cual nos da una idea de cuán delicado debe ser el equilibrio entre los componentes del SAC para que éste sea plenamente funcional.

5.2.2. ¿Por qué las células evaden el punto de chequeo del huso?

Existen diferencias entre líneas de roedores y humanos en la evasión del punto de chequeo del huso y en las consecuencias de dicha evasión, pero ¿por qué se termina evadiendo el punto de chequeo del huso en presencia de antimetabólicos?

El punto de chequeo del huso es una ruta bioquímica que conecta dos procesos independientes, de tal forma que une 1) el correcto anclaje de los cinetocoros hermanos de los cromosomas a microtúbulos provenientes de polos opuestos de la célula, al 2) licenciamiento de la anafase y la salida de mitosis. Los cinetocoros que no están correctamente biorientados (sensor) señalizan al SAC impidiendo la anafase, una vez que se ha satisfecho el punto de chequeo del huso el complejo promotor de anafase (APC/C) o ciclosoma se activa (transductor) y ubiquitina a ciclina B1 y securina (dianas) para su degradación por el proteasoma, de tal forma que se permite la pérdida de la cohesión entre cromátidas hermanas y la salida de mitosis (véase el apartado 1.3.1 de la introducción para más detalle).

El punto de chequeo del huso está activo desde el inicio de la mitosis hasta la entrada de la célula en anafase, momento en el que se silencia. Para ello tienen que ocurrir tres procesos fundamentales. En primer lugar, el cese de la producción del complejo MCC en los cinetocoros. Esto se consigue gracias a la acción de dineínas, que eliminan componentes del SAC de los cinetocoros, y a la proteína Spindly y el complejo RZZ, que evitan que Mad1 siga reclutando a Mad2, impidiendo la formación de nuevo MCC. En segundo lugar, la disminución de la señal del SAC. La señal del SAC está regulada por quinasas específicas como Aurora B, que es necesaria para mantener la señal de inhibición. La acción de fosfatasas como PP1 y PP2A hacen que la señal de inhibición disminuya. En tercer lugar, la inhibición del APC/C tiene que eliminarse. Para ello la

proteína p31^{comet} se une a la conformación cerrada de Mad2, provocando un cambio conformacional, liberando Cdc20 que activa el APC/C (Vleugel et al., 2012).

Está establecido que el SAC es un punto de chequeo muy robusto, es decir, es efectivo porque espera a que el último cromosoma esté correctamente biorientado, funcionando como un interruptor de encendido/apagado que se activa o desactiva de forma inmediata. Sin embargo, en un estudio (Dick & Gerlich, 2013) matizan algunas características del SAC. Mediante técnicas de microscopía láser desanclaron cromosomas que ya estaban alineados en la placa metafásica (con el SAC supuestamente satisfecho) y observaron que no es un mecanismo de “todo o nada”. El SAC puede ser ineficiente si el fallo se detecta tarde, es decir, si la célula ya está comprometida con la entrada en anafase. También indican que el SAC se activa de forma gradual y no de forma brusca, puesto que observaron un retraso en el tiempo desde que se detectó el error hasta que la activación del SAC fue efectiva. Además, el SAC es dependiente del número de errores que se detecten, por ejemplo, proponen que un único cromosoma no anclado genera una señal débil que no es suficiente para detener el ciclo, por el contrario, con más cinetocoros no unidos se genera una señal más fuerte y eficaz para detener la mitosis.

Con respecto a lo anterior, los mecanismos por los cuales las células logran evadir el punto de chequeo del huso (véase el apartado 1.3.2 de la introducción) no están completamente establecidos. Una de las hipótesis sugiere que el complejo MCC no bloquea completamente la actividad del APC/C, de tal forma que hay una actividad débil pero continua del APC/C, que va degradando de forma lenta y gradual la ciclina B hasta llegar por debajo de un umbral en el que permitiría que la célula evada el punto de chequeo del huso (McAinsh & Kops, 2023). Por otro lado, se ha descrito que una ubiquitina ligasa denominada CRL2^{ZYG11} perteneciente a la familia de las culinas también contribuye a la degradación de ciclina B. Se observó que en células humanas la inactivación de esta culina no tenía efectos sobre la progresión de la mitosis (puesto que el APC/C funcionaba con normalidad), sin embargo, ante la sobreexpresión de ciclina B o la inactivación del APC/C, sí que se detectaba una degradación de ciclina B por la culina CRL2^{ZYG11} (Balachandran et al., 2016).

Otro posible mecanismo está relacionado con la sobreexpresión de Mad1 en numerosos tipos de cáncer. Un estudio reciente ha demostrado que la sobreexpresión de Mad1 forma focos ectópicos de la proteína que favorecen la evasión del SAC. Determinan que esto es así, porque dichos agregados secuestran a Mad2, impidiendo que se forme el

complejo MCC. Como consecuencia, el APC/C no se inhibe y las células salen de mitosis, aunque haya errores en la congregación/biorientación/segregación cromosómica (Tones et al., 2025).

Otros estudios, proponen que la evasión del punto de chequeo del huso se ve favorecida por el debilitamiento o la insuficiencia de proteínas que son clave en el funcionamiento del SAC como BubR1, Bub3, Rae1 o Mad2, o por la sobreexpresión de p31^{comet}. Sin embargo, la supresión de p31^{comet} refuerza la acción del SAC (Babu et al., 2003; Baker et al., 2004; Lok et al., 2020). Finalmente, se ha planteado la existencia de rutas bioquímicas alternativas, diferentes al SAC, que permiten la salida de mitosis, como la acción de la fosfatasa PP2A que elimina las fosforilaciones realizadas por Cdc28/Clbs (análogo de CDK1/Ciclina B en mamíferos) facilitando la salida de mitosis (Vernieri et al., 2013), o la fosfatasa PP1, que promueve la evasión del SAC por la desfosforilación de BubR1/Mad3 (Ruggiero et al., 2020).

La principal diferencia observada en esta tesis doctoral entre líneas celulares humanas y de roedores en su comportamiento frente a antimitóticos es la cinética de evasión del punto de chequeo del huso. En concreto, las líneas de roedores escapan de la mitosis mucho antes que las líneas humanas, aunque haya errores en la segregación (véanse las figuras 31, 32 y 34). Anteriormente, se ha comentado que una de las posibles causas de las diferencias entre humanos y roedores es el extremo N-terminal de Mad1 humano, al igual que también se han descrito varios estudios en los que la proteína Mad2 también parece ser clave en la regulación del SAC. Estos estudios, y las teorías sobre agotamiento, debilidad o activación de rutas bioquímicas alternativas podría explicar que la diferencia entre especies es debido a diferencias en el punto de chequeo del huso, ya que todo apunta a que el SAC de roedores es mucho menos robusto o que tiene una activación más lenta de tal forma que se aumenta la probabilidad de evadir la mitosis en presencia de errores de segregación. En conjunto, los resultados sugieren que la variabilidad observada puede deberse a diferencias evolutivas y fisiológicas en los mecanismos de control mitótico entre organismos, ya que, como se ha comentado con anterioridad, las ratas topo desnudas (a pesar de ser roedores) tienen unos mecanismos de control celular más próximos a los humanos y son más longevas.

5.3. Diferencias entre líneas celulares, tratamientos y destinos tras la evasión del SAC

La línea celular humana HeLa es la línea celular por excelencia empleada en numerosas investigaciones para realizar estudios de mitosis, ciclo celular, proliferación, etc. (Brito et al., 2008). Al ser tratada con diferentes agentes dirigidos contra microtúbulos, estabilizantes y desestabilizantes, y al igual que en los datos obtenidos en esta tesis doctoral, HeLa siempre presenta un arresto en c-mitosis muy prolongado, que algunos autores como se ha comentado en la introducción indican que puede ser debido a que tienen una expresión reducida de Bcl-xL (Shi & Mitchison, 2017). Debido a ello, y como se ha recalado al inicio del apartado de discusión, los datos obtenidos en HeLa no pueden extrapolarse al resto de líneas celulares humanas puesto que en algunos de los aspectos que hemos estudiado no tiene un comportamiento representativo de otras líneas de su misma especie.

Existe un estudio en el que se compararon once líneas celulares humanas con tres compuestos, paclitaxel y nocodazol como agentes que perturban la dinámica de los microtúbulos y EMD534085, un inhibidor de la quinesina Eg5 cuya presencia impide la separación de los centrosomas necesaria para la generación de un huso mitótico bipolar. Al igual que en nuestros datos la mayor parte de las células con los tres tratamientos quedaron arrestadas en c-mitosis reforzando la idea de que el arresto mitótico inducido por el tratamiento con antimitóticos ocurre de forma general (Shi et al., 2008). Sin embargo, en este estudio concluyen que hay muy poca variación en la duración del arresto mitótico entre las líneas celulares, algo totalmente contradictorio con los datos mostrados en la presente tesis. Como se observa en las figuras 31 y 32, no solo hay diferencias entre líneas celulares humanas y de roedores en el tiempo que tardan en evadir el punto de chequeo del huso, sino que también hay diferencias entre las propias líneas celulares humanas. Esta discrepancia con nuestros datos podría deberse a variaciones intra- o interlineales o incluso a diferencias metodológicas en la cuantificación de la duración del arresto mitótico ya que emplean microscopía *time-lapse* únicamente con contraste de fase. Aun así, la absoluta homogeneidad en la duración del arresto que los autores describen nos sorprende no sólo al discrepar fuertemente con nuestro trabajo, sino con el resto de los publicados en la literatura. De hecho, pese a que los autores afirman en dos ocasiones que la duración del arresto en mitosis, entre las diferentes líneas utilizadas es indistinguible, en el trabajo no aportan ningún dato al respecto.

Brito y Rieder cuantificaron el tiempo de bloqueo en c-mitosis en la línea humana inmortalizada RPE-1 con agentes desestabilizantes de MTs e inhibidores de Eg5, y vieron que dicho arresto depende del compuesto. Al hacerlo con paclitaxel observaron que el arresto es más corto que con los desestabilizantes. La conclusión de su trabajo es que la evasión del SAC no depende de la presencia de microtúbulos, sino que depende de que el SAC se satisfaga. Esta conclusión es común a nuestro trabajo, pero sus resultados tan sólo se refieren a una única línea y carecen de marcaje para la visualización al microscopio (Brito et al., 2008). En nuestro estudio, la misma línea celular, que al ser inmortalizada no transformada presumiblemente tiene pocas variaciones intralineales, nosotros no observamos esa diferencia entre la duración del bloqueo entre agente estabilizante y desestabilizante (figura 31 B y 32 C y D).

Riffell et al., compararon el arresto mitótico y la evasión del SAC en tres líneas celulares transformadas humanas y al igual que en la presente tesis y en el trabajo de Gascoigne y Taylor, comprobaron que diferentes líneas, aunque sean de la misma especie, pueden responder diferente a un mismo tratamiento, es decir, existe una variación interlineal. En el trabajo publicado por Riffell y colaboradores demostraron que el arresto mitótico o la evasión mitótica se puede modular químicamente. Los agentes que favorecen el arresto mitótico junto al tratamiento con paclitaxel favorecen la supervivencia y proliferación celular, mientras que con los que favorecen la evasión mitótica aumenta la senescencia y la muerte celular. Esto último, lo observan con tratamientos con agentes dirigidos contra microtúbulos (paclitaxel y vinblastina), mientras que si se tratan con un inhibidor de Eg5 (KSP) no vieron muerte celular, pero si un aumento de la proliferación (Riffell et al., 2009). Esto puede tener relación con los datos obtenidos en la presente tesis, y es que con los agentes dirigidos contra microtúbulos la mayor parte de las células generan micronúcleos tras evadir el SAC, mientras que con el inhibidor de CENP-E se generan núcleos de restitución (figura 35). De tal forma que la generación de micronúcleos por los agentes de tubulina podría ser la causa de la observación de una mayor muerte celular en comparación con compuestos que no afectan a los microtúbulos. Existen trabajos, en los que se sugiere que la llave para acabar contra el cáncer mediante agentes antimitóticos estaría no en el bloqueo mitótico sino precisamente en la evasión de éste (Huang et al., 2009; Janssen et al., 2009), favoreciendo en general concentraciones intracelulares limitantemente pequeñas de los compuestos que supusieran bloqueos deficientes. En ese sentido ya hemos comentado que Mitchison propone que es la existencia de micronúcleos, o más bien la de estrechos puentes entre ellos, la que favorece la activación del sistema inmune mientras Beth Weaver apunta a que serían las mitosis multipolares, generadas en concentraciones bajas de

antimitóticos las que, al generar aneuploidías, tendrían efectos antitumorales (Flynn et al., 2021; Scribano et al., 2021; Zasadil et al., 2014; Zhou et al., 2023).

Respecto a lo anterior, también hay una concordancia con respecto a los destinos que las células sufren post evasión del SAC observados en la figura 40. Las líneas celulares de roedores tienen una mayor capacidad de volver a entrar en ciclo y completarlo después del arresto en c-mitosis, en comparación con las de humanos. Hemos observado que con el inhibidor de CENP-E, las líneas de roedores proliferan más que con los agentes dirigidos contra microtúbulos, y una proporción muy baja de líneas celulares humanas también pueden hacerlo en presencia de este inhibidor, pero no con paclitaxel o maytansina (figura 40). De tal forma que afectar directamente a los microtúbulos provoca menos supervivencia que la afectación a la congregación cromosómica sin afectar a tubulina.

En el trabajo de Shi et al., indican que tras la evasión mitótica la mayor parte de las células U-2 OS mueren (Shi et al., 2008). En los datos observados en la figura 40, observamos lo contrario. La línea celular U-2 OS, dentro de las líneas humanas, tiene el menor porcentaje de células que mueren post evasión mitótica. Resultados similares se observan en el estudio de Jakhar et al., que, tras 72 horas de tratamiento con nocodazol, alrededor de un 70% de células U-2 OS muestran un fenotipo de evasión mitótica puesto que desarrollan un fenotipo secretor senescente (SASP) que depende de la autofagia (Jakhar et al., 2018). En otro trabajo complementario del mismo grupo, proponen que las células tumorales después de evadir el SAC acumulan lípidos que favorecen la supervivencia post evasión (Wong et al., 2018).

La muerte celular puede ocurrir tanto mientras las células están bloqueadas en mitosis, como después de la evasión del punto de chequeo del huso. En el primer caso, los mecanismos de muerte no están claros, ya que hay autores que proponen que se debe a apoptosis dependiente de caspasas por la vía intrínseca (Shi & Mitchison, 2017) mientras que otros sugieren que dicha muerte es independiente de la activación de las caspasas (Bröker et al., 2004; Huisman et al., 2002) y diferente a la vía clásica de apoptosis ya que está mediada por una proteasa liposomal llamada catepsina B. De hecho, muestran que el tratamiento con un inhibidor de catepsina B, posterior al tratamiento con paclitaxel, reduce la generación de células con micronúcleos.

En el segundo caso, diferentes estudios coinciden en que la muerte provocada después de la evasión del punto de chequeo del huso se debe a daños en el ADN. Orth y

colaboradores, proponen que se debe a una activación parcial de las vías proapoptóticas lo que conduce a la activación de CAD (del inglés, *Caspase-Activated DNase*) que fragmenta el ADN (Orth et al., 2012). Hain y colaboradores, descubren que, en el bloqueo prolongado en mitosis, TRF2 (del inglés, *Telomeric Repeat-binding Factor 2*) se degrada desencadenando una respuesta celular de daño al ADN (Hain et al., 2016), y Hayshi y colaboradores, sugieren que los micronúcleos y puentes cromosómicos generados tras la incorrecta segregación del material genético provocan daños en la célula que la llevan a la muerte (Hayashi & Karlseder, 2013). Incluso se ha visto, que en líneas cuya función de p53 es defectiva, como es el caso de HeLa, las células mueren después de evadir el punto de chequeo del huso sin la activación de las vías de apoptosis clásicas (Yasuhira et al., 2016).

Como se ha comentado en la introducción, Brito y Rieder explican que aquellas células que tienen una menor expresión de Bcl-xL tienen una mayor tendencia a morir que las que tienen una expresión normal de esa proteína antiapoptótica. Numerosos estudios también apoyan esta idea sobre el papel de Bcl-xL en la regulación del destino celular después de la evasión del punto de chequeo del huso inducido por el tratamiento con agentes antimitóticos. En un estudio, analizaron las diferencias entre dos líneas de cáncer de mama tratadas con paclitaxel. Concluyeron que las discrepancias entre ambas líneas eran el resultado de poder o no interrumpir la interacción entre Bcl-xL/Bak (antiapoptótica/proapoptótica). En la línea celular en la que ocurrió la apoptosis indican que la interacción entre ambas proteínas se ha roto de tal forma que Bak se libera y puede fomentar la apoptosis, por el contrario, en la línea que hay evasión del SAC la interacción no se ha podido romper fomentando la supervivencia celular (Flores et al., 2012). En otro estudio, determinaron que la acción de Bcl-xL ocurre cuando el arresto en mitosis es prolongado. Al tratar células con agentes dirigidos contra microtúbulos el arresto en mitosis es prolongado, de tal forma que inhibieron Bcl-xL y las células murieron. En contraposición, al tratar las células con compuestos que favorecen la salida de mitosis porque actúan inhibiendo el punto de chequeo del huso (como inhibidores de aurora B o Mps1) al inhibir Bcl-xL, las células no tuvieron el suficiente tiempo para acumular señales apoptóticas (Bennett et al., 2016). Un estudio más reciente reafirma esta idea ya que al inhibir Bcl-xL, el tiempo de bloqueo en c-mitosis disminuye, aumenta la muerte celular y se reduce el número de células que pueden evadir el SAC (Suleimenov et al., 2022).

En los datos mostrados en la presente tesis doctoral, al tratar las células con los mismos compuestos, hay diferencias entre las líneas marcadas con histona H2B y α -tubulina y

las que tienen marcada histona H2B y 3xNLS. Cada una de las líneas celulares derivan de una parental a la que primero se le introdujo el marcaje de histona H2B. Una vez seleccionado el clon con histona H2B, por un lado, se introdujo el marcaje de α -tubulina y por otro lado el de 3xNLS. Si uno tiene en cuenta la duración media del ciclo celular (un día) y el número de días transcurridos en el primer y segundo clonaje hasta la congelación de cada uno de ellos podemos estimar que la diferencia, en número de divisiones celulares entre la célula original que recibió el plásmido de H2B marcado y la congelación del clon con el marcaje doble es de 30-60 divisiones, distancia que parece ser suficiente, en nuestro estudio, para que se observen diferencias en el comportamiento. Aunque no podemos descartar que las diferencias de comportamiento se deban a los diferentes plásmidos integrados, diferencias en toxicidad según la proteína fluorescente, la proteína afectada, etc. lo cierto es que no observamos una variación común a las marcadas con 3xNLS frente a las marcadas con α -tubulina por lo que pensamos que las diferencias son intrínsecamente intralineales. Estas diferencias intralineales se unen a las interlineales y a las interespecíficas. En un trabajo Gascoigne y Taylor (Gascoigne & Taylor, 2008) determinaron que incluso el destino de dos células hijas de la misma madre puede ser muy diferente y que, por tanto, no está siempre determinado genéticamente, sino que existen diferencias debidas al azar.

5.4. Comparación de los efectos de agentes aneugénicos y agentes clastogénicos. Generación y posible relevancia de los micronúcleos y núcleos de restitución

Es comúnmente aceptado que, al tratar las células con fármacos antimitóticos, la evasión del punto de chequeo del huso provoca la generación de células multinucleadas (Cheng & Crasta, 2017). Nuestros propios resultados (figuras 35 y 37) confirman este hecho y muestran, en las inmunofluorescencias con NuMA, que las características internas de los micronúcleos pueden ser diferentes entre sí (figura 28), algo para lo que carecemos de explicación. A lo largo de esta tesis, por motivos tanto de claridad como de necesidades inherentes a su cuantificación, hemos hablado de micronúcleos, núcleos de restitución y fenotipo híbrido. Sin embargo, estas subdivisiones, aunque representan la realidad, son un tanto artificiales.

Los micronúcleos se forman cuando, a la salida de una mitosis aberrante, la envoltura nuclear se reorganiza alrededor de masas de cromosomas, o fragmentos de ellos, separadas entre sí y la separación entre estas masas puede ser importante. En ocasiones una célula con numerosos micronúcleos muestra, a gran aumento, que algunos de estos micronúcleos pueden estar conectados por finos puentes cromatínicos

rodeados a su vez de envoltura nuclear (figura 13 C). Uno fácilmente puede imaginar que con puentes cromatínicos mayores o, simplemente, con una muy pequeña separación entre las masas de cromosomas, la envoltura nuclear se puede reorganizar englobando varias o todas estas masas bajo una envoltura única, lo cual genera una morfología aberrante, bizarra, lobulada o verrugosa en el núcleo que es lo que denominamos núcleo de restitución. La interfase de la figura 13 sería un ejemplo de esto último, siendo al menos discutible si lo que se observa es un núcleo de restitución o numerosos micronúcleos muy cercanos al núcleo principal, opinión que puede variar si uno observa el ADN o la inmunolocalización de lamina. Desconocemos qué factores inclinan la balanza hacia la generación de micronúcleos independientes o hacia núcleos de restitución. En películas *time-lapse* a mayor aumento (63x) observamos que no siempre la distribución de cromosomas en c-mitosis es la determinante de la generación del tipo de aberración nuclear, sino que los movimientos violentos al intentar la citocinesis aberrante (figura 25) son los que a menudo determinan la generación de núcleos de restitución, micronúcleos o la cantidad y tamaño de ellos (vídeos 2, 3, 4 y 5 de anexos).

La aparición de micronucleación puede ocurrir en células en ausencia de tratamiento químico, como se observó en ratones haploinsuficientes para BubR1, una proteína esencial que forma parte del complejo MCC que se encarga del correcto funcionamiento del SAC (Dai et al., 2004). Por lo tanto, la aparición de micronúcleos depende en gran medida de la afectación de la maquinaria del punto de chequeo del huso sea por defectos genéticos como el citado, por alteración de la maquinaria del huso (centrosomas, tubulina), de las interacciones cinetocoros/microtúbulos (aurora A, aurora B, Mps1, etc.) o defectos o inhibiciones de la ruta bioquímica del SAC, desde el sensor, al transductor o a la diana.

En el trabajo realizado por (Zhu et al., 2014), estudian por qué el paclitaxel es más citotóxico que otros fármacos dirigidos al huso como inhibidores de Eg5. Observaron que el paclitaxel tras la evasión del punto de chequeo del huso genera células micronucleadas en comparación con el otro inhibidor que genera núcleos de restitución. Esa multinucleación que visualizaron proponen que es lo que le confiere, al paclitaxel, su efecto antitumoral. Aunque en su estudio inicialmente analizaron los dos compuestos en once líneas celulares humanas, y vieron que el paclitaxel es más tóxico, los análisis posteriores solo fueron realizados con U-2 OS (Zhu et al., 2014). En la presente tesis doctoral, se compara siempre con la totalidad de líneas celulares para ver las diferencias entre ellas, tanto en la cinética de evasión como en las consecuencias de la misma.

Nuestros resultados confirman los del estudio citado ya que con los agentes dirigidos contra microtúbulos se generan, en términos generales, más células multinucleadas que con el GSK923295 cuyo resultado predominante es la generación de núcleos de restitución (figura 35). Esta afirmación, sin embargo, se ve modulada por la influencia que tiene la línea celular de la que se trate existiendo múltiples excepciones puntuales visibles en la figura 35. En general, si Zhu y colaboradores tienen razón y la cantidad de micronúcleos está relacionada con la toxicidad, nuestros resultados indican que las líneas de roedores no son las más adecuadas para estos estudios de toxicidad, exceptuando la línea de rata NRK-52E; de igual manera debería de excluirse la línea HCT-116 de entre las líneas humanas utilizadas para este tipo de análisis.

Tal y como se ha comentado en el apartado 1.3.3 de la introducción, Hatch y colaboradores argumentan que la envoltura nuclear de los micronúcleos es defectuosa y tiende a sufrir una ruptura física. Estudios posteriores (Liu et al., 2018) proponen que esas alteraciones en la envoltura nuclear son causa de defectos en el ensamblaje de proteínas de la envoltura nuclear como las laminas, de tal forma que hay ensamblaje incorrecto como consecuencia de los errores en la mitosis. Más recientemente, Di Bona y colaboradores han propuesto que el daño oxidativo mitocondrial es el responsable de la alteración de la membrana de los micronúcleos (Di Bona et al., 2024). En cualquier caso, el resultado es la ruptura de la envoltura de los micronúcleos de tal forma que se expone el material genético al citosol pudiendo sufrir cromotripsis (Stephens et al., 2011).

En la presente tesis doctoral a partir de las células con micronúcleos, se ha contabilizado el número de éstos que colapsan por célula y el porcentaje total de micronúcleos colapsados en función del total de micronúcleos generados en todas las líneas celulares con los tres tratamientos (figuras 38 y 39). En relación con los fármacos dirigidos contra microtúbulos, el colapso varía en función de la línea celular, aunque en términos generales el colapso es algo mayor en el tratamiento con paclitaxel (alrededor del 25% de los micronúcleos generados) que con maytansina (inferior al 20%). Una excepción llamativa dentro de las líneas de roedores es la línea inmortal de rata, en la que en ambos tratamientos colapsan el 50% de los micronúcleos, de tal forma que basándose en estos resultados sería la línea celular ideal para estudiar este fenómeno. Por el contrario, con el tratamiento de GSK923295 la línea celular idónea sería A549 que tiene un colapso del 50% de los micronúcleos, en comparación con otras líneas humanas que es aproximadamente del 20%.

En un estudio llevado a cabo por Sun y colaboradores identificaron que el material genético libre en el citosol se une a una sintasa cGAMP (cGAS) que se activa y cataliza la síntesis de GMP-AMP cíclico (segundo mensajero). cGAMP a su vez se une a STING y se desencadena una cascada de señalización que culmina con la síntesis de interferón de tipo I y por tanto con la activación del sistema inmune (Sun et al., 2013). Se ha demostrado que la envoltura de los micronúcleos es lábil y tiende a colapsar (figuras 37 y 38) (Hatch et al., 2013) lo cual expone el material genético al citosol. Diversos estudios observaron activación del sistema inmune vía cGAS-STING gracias a la formación y colapso de micronúcleos (Harding et al., 2017; MacDonald et al., 2023; MacKenzie et al., 2017). Todo ello refuerza la idea de que la actividad antitumoral de los tratamientos antimitóticos contra el cáncer podría ser explicada por el colapso de los micronúcleos generados que, conjuntamente con el asesinato de espectadores, podrían explicar la paradoja de la tasa de proliferación.

En la actualidad, esa idea es tema de controversia ya que otros autores proponen lo contrario. Por un lado, Tim J. Mitchison propone que no son los micronúcleos los responsables de la activación de la vía cGAS-STING sino que son los puentes cromosómicos generados por fallos en la citocinesis o que unen micronúcleos o adelgazamientos en núcleos de restitución, los responsables de la activación del sistema inmune al tener más facilidad para que su envoltura colapse (Flynn et al., 2021). Por otro lado, estudios más recientes (Sato & Hayashi, 2024; Takaki et al., 2024) parecen echar por tierra toda esta hipótesis porque a pesar de que sí observan que cGAS se localiza en los micronúcleos tras la ruptura de la envoltura nuclear, no observan activación de cGAMP, ni fosforilación de STING ni síntesis de interferón debido a esa localización de cGAS, sino que la activación se daría por el ADN mitocondrial liberado al inducir el daño o por la presencia de cromatina libre.

Tanto el colapso como la reconstitución de micronúcleos se observa con facilidad gracias al marcaje de las líneas celulares con la histona H2B y la señal de localización nuclear. Cuando el micronúcleo colapsa, la señal de localización nuclear se pierde con rapidez (unos 5-10 segundos, en experimentos con mayor frecuencia de microfotografías), de forma que solo se visualiza el marcaje de histona. En cambio, si el micronúcleo se reconstituye, se vuelven a visualizar los dos marcajes en su interior (figura 36 y 37). Hatch et al., en su estudio indican que el colapso de la envoltura nuclear de los micronúcleos es irreversible. Por el contrario, en la presente tesis, se ha determinado qué porcentaje de micronúcleos vuelven a reconstituirse respecto del total de colapsados (figuras 38 y 39). En la mayor parte de los casos, se observa un

porcentaje pequeño de micronúcleos que vuelven a recuperar la integridad de la envoltura nuclear, destacando la línea celular de rata con cerca de un 50% (paclitaxel y maytansina) y la humana A549 (GSK923295) como se observa en la figura 39. Hemos observado en los experimentos *time-lapse* que en micronúcleos que no se reconstituyen la envoltura nuclear se visualiza irregular, gruesa y arrugada mientras que en los micronúcleos que sí se reconstituyen la envoltura nuclear se observa intacta. Estas observaciones sugieren que en función de cuán dañada esté la envoltura nuclear, puede o no volver a reconstituirse.

Hasta el momento nos hemos limitado en nuestro estudio a tres agentes que afectan a la mitosis. Todos ellos son agentes aneugénicos, pues generan aneuploidías al impedir tanto la correcta congregación cromosómica en la placa ecuatorial como una anafase equilibrada. Dada la gran literatura existente (T. J. Mitchison et al., 2017) sobre agentes quimioterapéuticos y aberraciones nucleares (micronúcleos, núcleos de restitución, colapso de envolturas) que incluye tanto a agentes aneugénicos como a clastogénicos y dada la posible relevancia que la generación de aberraciones nucleares pueda tener en la efectividad de algunos tratamientos antitumorales, decidimos realizar una comparativa entre la efectividad al respecto de una batería de agentes aneugénicos y de clastogénicos en la misma línea celular.

Hemos querido dilucidar si el denominador común entre cinco fármacos clastogénicos (cisplatino, bleomicina, 5-azacitidina, etopósido e irinotecán) *versus* seis compuestos aneugénicos (alisertib, barasertib, BI2536, paclitaxel, maytansina y GSK923295) es la generación de aberraciones nucleares en general, o de micronúcleos en particular, a pesar de tener dianas diferentes (para una explicación más detallada de los agentes utilizados y de los motivos de su selección, ver el comienzo del apartado 4.7 de resultados). Para ello hemos elegido una línea celular humana transformada: U-2 OS, que cuenta con un triple marcaje, que en nuestros experimentos previos mostró una gran capacidad de generación de micronúcleos.

Una forma de detectar si un compuesto es genotóxico es observar si genera micronúcleos. Para ello, hay diferentes métodos y protocolos como el ensayo de micronúcleos en eritrocitos de mamíferos (EMn) en los que se utilizan eritroblastos de la médula ósea, y una vez que han completado su maduración y han perdido el núcleo principal observan la presencia o ausencia de micronúcleos; o el ensayo de micronúcleos de células bucales (BMm) en el que se detectan micronúcleos en células epiteliales de la mucosa oral. El método más utilizado se denomina ensayo de

micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN) (Doherty, 2012; Sommer et al., 2020). Este método se utilizó por primera vez en 1985 para medir micronúcleos en linfocitos al tratarlos con rayos X inhibiendo la citocinesis con citocalasina B, un inhibidor de actina (Fenech & Morley, 1985). Para que se generen micronúcleos es necesario que las células pasen por mitosis, al inhibir la actina, no puede formarse el anillo de citocinesis de tal forma que la célula no divide su citoplasma, pero sí su material genético originando una célula binucleada, de tal forma que este método asegura que las células que son binucleadas han pasado por la fase de división. Hoy en día combinado con otras técnicas de tinción, inmunomarcaje o FISH (hibridación *in situ* con fluorescencia) se utiliza para cuantificar la generación de micronúcleos con nanomateriales, plastificantes o antibióticos o cualquier compuesto (Farabaugh et al., 2023; Amadio et al., 2024; Catalán et al., 2024).

También se ha descrito en la literatura que una forma de identificar agentes clastogénicos y aneugénicos, de forma más rápida que por técnicas de inmunomarcaje o FISH, es por el tamaño de los micronúcleos generados. Los agentes que provocan daño al ADN generan roturas, de tal forma que los micronúcleos que se puedan generar son más pequeños ya que están formados por fragmentos cromosómicos, mientras que, en los aneugénicos debido a los errores en la división del material genético, los micronúcleos están formados por cromosomas completos o grupos de ellos (Hashimoto et al., 2010). En otro estudio, con una elegante metodología experimental utilizando un cromosoma artificial que contiene un gen de eGFP, midieron la inestabilidad de dicho cromosoma en una línea humana transformada durante varias generaciones. Utilizaron una batería de compuestos entre los que se incluían agentes aneugénicos y clastogénicos, algunos de los cuales también se han empleado en esta tesis. Respecto a ellos, el paclitaxel es el compuesto con mayor pérdida del cromosoma artificial, con una ratio de 0,6, seguido de cisplatino (0,4), bleomicina y alisertib (0,3), maytansina y camptotecina (0,2) y finalmente etopósido con un 10% de pérdida por división. Ambos tipos de compuestos, aneugénicos y clastogénicos, inducen inestabilidad cromosómica en mayor o menor medida (H. S. Lee et al., 2016).

Aunque en los diferentes trabajos emplean estas técnicas que están muy estandarizadas en la actualidad, todas ellas presentan una desventaja con respecto al trabajo que se ha llevado a cabo en esta tesis en todo lo referido a la cuantificación de micronúcleos o núcleos de restitución. En la presente tesis, se han realizado experimentos de microscopía *time-lapse*, es decir, experimentos que permiten seguir las células a tiempo real, por el contrario, con las técnicas comentadas anteriormente las

muestras están fijadas. Por otro lado, nosotros incluimos otras aberraciones nucleares en nuestro estudio pues, como hemos discutido previamente, pensamos que están relacionadas entre sí.

Con los datos obtenidos en esta tesis doctoral, respondiendo a la pregunta de si la generación de aberraciones nucleares es el denominador común entre fármacos clastogénicos y aneugénicos, la respuesta es que sí, aunque hay diferencias claras en el tipo de aberraciones que se forman entre los dos grupos. Como se ve en la figura 47, los clastogénicos tienen un porcentaje mayor de células con núcleos de restitución frente a los aneugénicos en los que en la mayoría el porcentaje de células que generan micronúcleos es igual o superior al 70%. Aquí está la primera diferencia, al salir de la mitosis el porcentaje de células multinucleadas es muy distinto.

Por tanto, nuestra conclusión en este punto es que tanto agentes clastogénicos como aneugénicos generan aberraciones nucleares con frecuencias elevadas (superiores al 50% de las células). Estas aberraciones, sin embargo, son de diferente tipo según el tipo de agente, inclinándose la balanza hacia núcleos de restitución en los agentes clastogénicos o hacia micronúcleos en los agentes aneugénicos. El fenotipo que hemos denominado híbrido actúa como una especie de zona tampón entre ambos grupos, siendo el segundo más frecuente en los agentes clastogénicos y muy relevante en los agentes aneugénicos que suprimen el SAC (alisertib y barasertib).

6

CONCLUSIONES

Respecto al primer objetivo propuesto, las conclusiones derivadas de esta tesis son:

1. Al evadir el punto de chequeo del huso las células separan cromátidas hermanas (sin segregar) e intentan llevar a cabo la citocinesis.
2. Las células de líneas humanas mueren durante el bloqueo c-mitótico en mayor porcentaje que las de líneas de roedores.
3. Tras evadir el punto de chequeo del huso, las células de líneas humanas mueren en mayor porcentaje que las de líneas de roedores, las cuales sobreviven hasta iniciar una segunda mitosis.
4. Las líneas celulares de roedores evaden el punto de chequeo del huso mucho antes que las líneas humanas. Sin embargo, no hay diferencias destacables entre líneas transformadas e inmortalizadas, ni en este ni en los otros puntos.
5. Con drogas dirigidas contra microtúbulos, las líneas celulares humanas, de hámster y de rata generan más células multinucleadas que las líneas de ratón, que tienden a generar núcleos de restitución.

Respecto al segundo objetivo propuesto, las conclusiones derivadas de esta tesis son:

6. Tanto el tratamiento con fármacos clastogénicos como con aneugénicos provocan un alto porcentaje de aberraciones nucleares, marcadamente de distinto tipo según el tratamiento.

7

BIBLIOGRAFÍA

- Agnese, V., Bazan, V., Fiorentino, F. P., Fanale, D., Badalamenti, G., Colucci, G., Adamo, V., Santini, D., & Russo, A. (2007). The role of Aurora-A inhibitors in cancer therapy. *Annals of Oncology*, 18. doi.org/10.1093/annonc/mdm224.
- Amadio, F., Bongiorno, S., Varalda, G. M., Marcon, F., & Meschini, R. (2024). Di (2-ethylhexyl) phthalate and chromosomal damage: Insight on aneugenicity from the cytochalasin-block micronucleus assay. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 898. doi.org/10.1016/j.mrgentox.2024.503791.
- Amjad, M., Chidharla, A., & Kasi, A. (2023). *Cancer Chemotherapy - PubMed*. PMID: 33232037 (accesso 16/06/2025).
- Anand, U., Dey, A., Chandel, A. K. S., Sanyal, R., Mishra, A., Pandey, D. K., De Falco, V., Upadhyay, A., Kandimalla, R., Chaudhary, A., Dhanjal, J. K., Dewanjee, S., Vallamkondu, J., & Pérez de la Lastra, J. M. (2023). Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. *Genes and Diseases*, 10. doi.org/10.1016/j.gendis.2022.02.007.
- Antoccia, A., Degrassi, F., Battistoni, A., Ciliutti, P., & Tanzarella, C. (1991). In vitro micronucleus test with kinetochore staining: evaluation of test performance. *Mutagenesis*, 6. doi.org/10.1093/MUTAGE/6.4.319.
- Arslan, A., & Zima, J. (2014). Karyotypes of the mammals of Turkey and neighbouring regions: A review. *Folia Zoologica*, 63. doi.org/10.25225/fozo.v63.i1.a1.2014.
- Azpurua, J., & Seluanov, A. (2013). Long-lived cancer-resistant rodents as new model species for cancer research. *Frontiers in Genetics*, 3. doi.org/10.3389/fgene.2012.00319.
- Babu, J. R., Jeganathan, K. B., Baker, D. J., Wu, X., Kang-Decker, N., & Van Deursen, J. M. (2003). Rae1 is an essential mitotic checkpoint regulator that cooperates with Bub3 to prevent chromosome missegregation. *The Journal of Cell Biology*, 160. doi.org/10.1083/JCB.200211048.
- Bai, Z., Zhou, Y., Peng, Y., Ye, X., & Ma, L. (2023). Perspectives and mechanisms for targeting mitotic catastrophe in cancer treatment. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1878. doi.org/10.1016/j.bbcan.2023.188965.
- Bajer, A. (1964). Cine-micrographic studies on dicentric chromosomes. *Chromosoma*, 15. doi.org/10.1007/BF00319996.
- Baker, D. J., Jeganathan, K. B., Cameron, J. D., Thompson, M., Juneja, S., Kopecka, A., Kumar, R., Jenkins, R. B., De Groen, P. C., Roche, P., & Van Deursen, J. M. (2004). BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice. *Nature Genetics*, 36. doi.org/10.1038/NG1382.
- Balachandran, R. S., Heighington, C. S., Starostina, N. G., Anderson, J. W., Owen, D. L., Vasudevan, S., & Kipreos, E. T. (2016). The ubiquitin ligase CRL2ZYG11 targets

- cyclin B1 for degradation in a conserved pathway that facilitates mitotic slippage. *Journal of Cell Biology*, 215. doi.org/10.1083/JCB.201601083.
- Barnum, K. J., & O'Connell, M. J. (2014). Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods in Molecular Biology*, 1170. doi.org/10.1007/978-1-4939-0888-2_2.
- Bennett, A., Bechi, B., Tighe, A., Thompson, S., Procter, D. J., & Taylor, S. S. (2015). Cenp-E inhibitor GSK923295: Novel synthetic route and use as a tool to generate aneuploidy. *Oncotarget*, 6. doi.org/10.18632/oncotarget.4879.
- Bennett, A., Sloss, O., Topham, C., Nelson, L., Tighe, A., & Taylor, S. S. (2016). Inhibition of Bcl-xL sensitizes cells to mitotic blockers, but not mitotic drivers. *Open Biology*, 6. doi.org/10.1098/rsob.160134.
- Berl R Oakley. (2006). Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nature Protocols*, 6. doi.org/10.1038/nprot.2006.405.
- Blagosklonny, M. V., & Pardee, A. B. (2002). The Restriction Point of the Cell Cycle. *Cell Cycle*, 1. doi.org/10.4161/cc.1.2.108.
- Blomen, V. A., & Boonstra, J. (2007). Cell fate determination during G1 phase progression. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64. doi.org/10.1007/s00018-007-7271-z.
- Bornens, M. (2012). The Centrosome in Cells and Organisms. *Science*, 335. doi.org/10.1126/science.1209037.
- Boveri, T. (2008). Concerning the Origin of Malignant Tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris. *Journal of Cell Science*, 121. doi.org/10.1242/jcs.025742.
- Brito, D. A., & Rieder, C. L. (2006). Mitotic Checkpoint Slippage in Humans Occurs via Cyclin B Destruction in the Presence of an Active Checkpoint. *Current Biology*, 16. doi.org/10.1016/J.CUB.2006.04.043.
- Brito, D. A., & Rieder, C. L. (2009). The ability to survive mitosis in the presence of microtubule poisons differs significantly between human nontransformed (RPE-1) and cancer (U2OS, HeLa) cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 66. doi.org/10.1002/cm.20316.
- Brito, D. A., Yang, Z., & Rieder, C. L. (2008). Microtubules do not promote mitotic slippage when the spindle assembly checkpoint cannot be satisfied. *Journal of Cell Biology*, 182. doi.org/10.1083/jcb.200805072.
- Bröker, L. E., Huisman, C., Span, S. W., Rodriguez, J. A., Kruyt, F. A. E., & Giaccone, G. (2004). Cathepsin B Mediates Caspase-Independent Cell Death Induced by Microtubule Stabilizing Agents in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Cancer Research*, 64. doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-3060.

- Burgers, P. M. J., & Kunkel, T. A. (2017). Eukaryotic DNA Replication Fork. *Annu Rev Biochem*, 86. doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044709.
- Catalán, J., Järventaus, H., Falck, G. C. M., Moreno, C., & Norppa, H. (2024). Chromosome-specific induction of micronuclei and chromosomal aberrations by mitomycin C: Involvement of human chromosomes 9, 1 and 16. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 896. doi.org/10.1016/j.mrgentox.2024.503753.
- Cha-Aim, K., Hoshida, H., Fukunaga, T., & Akada, R. (2012). Fusion PCR via novel overlap sequences. *Methods in Molecular Biology*, 852. doi.org/10.1007/978-1-61779-564-0_8.
- Chao, H. X., Poovey, C. E., Privette, A. A., Grant, G. D., Chao, H. Y., Cook, J. G., & Purvis, J. E. (2017). Orchestration of DNA Damage Checkpoint Dynamics across the Human Cell Cycle. *Cell Systems*, 5. doi.org/10.1016/J.CELS.2017.09.015.
- Cheeseman, I. M. (2014). The Kinetochore. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6. doi.org/10.1101/cshperspect.a015826.
- Chen, J., & Stubbe, J. A. (2005). Bleomycins: Towards better therapeutics. *Nature Reviews Cancer*, 5. doi.org/10.1038/nrc1547.
- Cheng, B., & Crasta, K. (2017). Consequences of mitotic slippage for antimicrotubule drug therapy. In *Endocrine-related cancer*, 24. doi.org/10.1530/ERC-17-0147.
- Chieffi, P. (2018). Aurora B: A new promising therapeutic target in cancer. *Intractable and Rare Diseases Research*, 7. doi.org/10.5582/iridr.2018.01018.
- Chong, Z. X., Yeap, S. K., & Ho, W. Y. (2021). Transfection types, methods and strategies: A technical review. *PeerJ*, 9. doi.org/10.7717/peerj.11165.
- Chu, L., Liang, Z., Mukhina, M., Fisher, J., Vincenten, N., Zhang, Z., Hutchinson, J., Zickler, D., & Kleckner, N. (2020). The 3D Topography of Mitotic Chromosomes. *Molecular Cell*, 79. doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2020.07.002.
- Chung, V., Heath, E. I., Schelman, W. R., Johnson, B. M., Kirby, L. C., Lynch, K. M., Botbyl, J. D., Lampkin, T. A., & Holen, K. D. (2012). First-time-in-human study of GSK923295, a novel antimitotic inhibitor of centromere-associated protein e (CENP-E), in patients with refractory cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 69. doi.org/10.1007/s00280-011-1756-z.
- Ciardo, D., Goldar, A., & Marheineke, K. (2019). On the interplay of the DNA replication program and the Intra-S phase checkpoint pathway. In *Genes* (Vol. 10, Issue 2). MDPI AG. doi.org/10.3390/genes10020094.
- Clarke, D. J., & Giménez-Abián, J. F. (2000). Checkpoints controlling mitosis. *BioEssays*, 22. doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(200004)22:4<351: AID-BIES5>3.0.CO; 2-W

- Clarke, D. J., Johnson, R. T., & Downes, C. S. (1993). Topoisomerase II inhibition prevents anaphase chromatid segregation in mammalian cells independently of the generation of DNA strand breaks. *Journal of Cell Science*, 105. doi.org/10.1242/jcs.105.2.563.
- Clarke, D. J., Vas, A. C., Andrews, C. A., Díaz-Martínez, L. A., & Giménez-Abián, J. F. (2006). Topoisomerase II Checkpoints: Universal Mechanisms that Regulate Mitosis. *Cell Cycle*, 5. doi.org/10.4161/CC.5.17.3200.
- Crasta, K., Ganem, N. J., Dagher, R., Lantermann, A. B., Ivanova, E. V., Pan, Y., Nezi, L., Protopopov, A., Chowdhury, D., & Pellman, D. (2012). DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. *Nature*, 482. doi.org/10.1038/nature10802.
- Dai, W., Wang, Q., Liu, T., Swamy, M., Fang, Y., Xie, S., Mahmood, R., Yang, Y.-M., Xu, M., & Rao, C. V. (2004). Slippage of Mitotic Arrest and Enhanced Tumor Development in Mice with BubR1 Haploinsufficiency. *Cancer Research*, 64. doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-3119.
- Dasari, S., & Bernard Tchounwou, P. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740. doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025.
- Di Bona, M., Chen, Y., Agustinus, A. S., Mazzagatti, A., Duran, M. A., Deyell, M., Bronder, D., Hickling, J., Hong, C., Scipioni, L., Tedeschi, G., Martin, S., Li, J., Ruzgaitė, A., Riaz, N., Shah, P., D'Souza, E. K., Brodtman, D. Z., Sidoli, S., ... Bakhoun, S. F. (2024). Micronuclear collapse from oxidative damage. *Science (New York, N.Y.)*, 385. doi.org/10.1126/science.adj8691.
- Díaz, J. F., Barasoain, I., & Andreu, J. M. (2003). Fast kinetics of Taxol binding to microtubules: Effects of solution variables and microtubule-associated proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 278. doi.org/10.1074/jbc.M211163200.
- Díaz-Martínez, L. A., Giménez-Abián, J. F., & Clarke, D. J. (2008). Chromosome cohesion - rings, knots, orcs and fellowship. *Journal of Cell Science*, 121. doi.org/10.1242/JCS.029132.
- Díaz-Martínez, L. A., Karamysheva, Z. N., Warrington, R., Li, B., Wei, S., Xie, X., Roth, M. G., & Yu, H. (2014). Genome-wide si RNA screen reveals coupling between mitotic apoptosis and adaptation. *The EMBO Journal*, 33. doi.org/10.15252/embj.201487826.
- Dick, A. E., & Gerlich, D. W. (2013). Kinetic framework of spindle assembly checkpoint signalling. *Nature Cell Biology*, 15. doi.org/10.1038/ncb2842.
- Dicthenberg, J. B., Zimmerman, W., Sparks, C. A., Young, A., Vidair, C., Zheng, Y., Carrington, W., Fay, F. S., & Doxsey, S. J. (1998). Pericentrin and-Tubulin Form a

- Protein Complex and Are Organized into a Novel Lattice at the Centrosome. *The Journal of Cell Biology*, 141. doi.org/10.1083/jcb.141.1.163.
- Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M. J., & Dveksler, G. S. (1993). General Concepts for PCR Primer Design. *PCR Methods and Applications*, 3. doi.org/10.1101/gr.3.3.s30.
- Doherty, A. T. (2012). The in vitro micronucleus assay. *Methods in Molecular Biology*, 817. doi.org/10.1007/978-1-61779-421-6_7.
- Downing, K., & Nogales, E. (1998). Tubulin structure: insights into microtubule properties and functions. *Current Opinion in Structural Biology*, 6. doi.org/10.1016/s0959-440x(98)80099-7.
- Doxsey, S. J., Steln, P., Evans, L., Calarco, P. D., & Kirschnefi, M. (1994). Pericentrin, a Highly Conserved Centrosome Protein Involved in Microtubule Organization. *Cell*, 76. doi.org/10.1016/0092-8674(94)90504-5.
- Dubois, M. L., & Boisvert, F. M. (2016). The nucleolus: Structure and function. *The Functional Nucleus*. doi.org/10.1007/978-3-319-38882-3_2.
- Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D., & Hunt, T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*, 33. doi.org/10.1016/0092-8674(83)90420-8.
- Farabaugh, C. S., Doak, S., Roy, S., & Elespuru, R. (2023). In vitro micronucleus assay: Method for assessment of nanomaterials using cytochalasin B. *Frontiers in Toxicology*, 5. doi.org/10.3389/ftox.2023.1171960.
- Fenech, M., & Morley, A. A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*, 147. doi.org/10.1016/0165-1161(85)90015-9.
- Ferreira, L. T., & Maiato, H. (2021). Prometaphase. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 117. doi.org/10.1016/j.semcd.2021.06.004.
- Fischer, M. (2019). Conservation and divergence of the p53 gene regulatory network between mice and humans. *Oncogene*, 38. doi.org/10.1038/s41388-019-0706-9.
- Flores, M. L., Castilla, C., Ávila, R., Ruiz-Borrego, M., Sáez, C., & Japón, M. A. (2012). Paclitaxel sensitivity of breast cancer cells requires efficient mitotic arrest and disruption of Bcl-xL/Bak interaction. *Breast Cancer Research and Treatment*, 133. doi.org/10.1007/s10549-011-1864-9.
- Flynn, P. J., Koch, P. D., & Mitchison, T. J. (2021). Chromatin bridges, not micronuclei, activate cGAS after drug-induced mitotic errors in human cells. *PNAS*, 118. doi.org/10.1073/pnas.2103585118.
- Fu, J., Hagan, I. M., & Glover, D. M. (2015). The centrosome and its duplication cycle. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5. doi.org/10.1101/cshperspect.a015800.

- Gamperl, R., Vistorin, G., & Rosenkranz, W. (1976). A Comparative Analysis of the Karyotypes of *Cricetus cricetus* and *Cricetulus griseus*. *Chromosoma (Berl.)*, 55. doi.org/10.1007/BF00300392.
- Gascoigne, K. E., & Taylor, S. S. (2008). Cancer Cells Display Profound Intra- and Interline Variation following Prolonged Exposure to Antimitotic Drugs. *Cancer Cell*, 14. doi.org/10.1016/j.ccr.2008.07.002.
- Giménez-Abián, J. F., & Clarke, D. J. (2009). Cytological analysis of chromosome structural defects that result from topoisomerase II dysfunction. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 582. doi.org/10.1007/978-1-60761-340-4_15.
- Giménez-Abián, J. F., Clarke, D. J., Giménez-Martín, G., Weingartner, M., Inmaculada Giménez-Abián, M., Carballo, J. A., Moreno Díaz de la Espina, S., Bögre, L., & De la Torre, C. (2002). DNA catenations that link sister chromatids until the onset of anaphase are maintained by a checkpoint mechanism. *European Journal of Cell Biology*, 81. doi.org/10.1078/0171-9335-00226.
- Giménez-Abián, J. F., Clarke, D. J., Mullinger, A. M., Downes, C. S., & Johnson, R. T. (1995). A postprophase topoisomerase II-dependent chromatid core separation step in the formation of metaphase chromosomes. *The Journal of Cell Biology*, 131. doi.org/10.1083/JCB.131.1.7.
- Giménez-Abián, J. F., Sumara, I., Hirota, T., Hauf, S., Gerlich, D., de la Torre, C., Ellenberg, J., & Peters, J.-M. (2004). Regulation of Sister Chromatid Cohesion between Chromosome Arms. *Current Biology*, 14. doi.org/10.1016/j.cub.2004.06.052.
- Giménez-Martín, G., Panzera, F., Cánovas, J. L., de la Torre, C., & López-Sáez, J. F. (1992). A limited number of chromosomes makes a nucleus competent to respond to inducers of replication and mitosis in a plant. *European Journal of Cell Biology*, 58. PMID: 1644061.
- Glotzer, M. (2005). The molecular requirements for cytokinesis. *Science (New York, N.Y.)*, 307. doi.org/10.1126/SCIENCE.1096896.
- Gorbunova, V., Seluanov, A., Zhang, Z., Gladyshev, V. N., & Vijg, J. (2014). Comparative genetics of longevity and cancer: Insights from long-lived rodents. *Nature Reviews Genetics*, 15. doi.org/10.1038/nrg3728.
- Gould, S. E., Junttila, M. R., & De Sauvage, F. J. (2015). Translational value of mouse models in oncology drug development. *Nature Medicine*, 21. doi.org/10.1038/nm.3853.
- Gropp, A., Winking, H., & Miiller, H. (1972). Robertsonian Chromosomal Variation and Identification of Metacentric Chromosomes in Feral Mice. *Chromosoma (Berl.)*, 39. doi.org/10.1007/BF00290787.

- Gupta, R. S. (1985). Species-Specific Differences in Toxicity of Antimitotic Agents Toward Cultured Mammalian Cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 74. PMID: 3855475.
- Hain, K. O., Colin, D. J., Rastogi, S., Allan, L. A., & Clarke, P. R. (2016). Prolonged mitotic arrest induces a caspase-dependent DNA damage response at telomeres that determines cell survival. *Scientific Reports*, 6. doi.org/10.1038/srep26766.
- Haller, K., Kibler, K. V., Kasai, T., Chi, Y. H., Peloponese, J. M., Yedavalli, V. S. R. K., & Jeang, K. T. (2006). The N-terminus of rodent and human MAD1 confers species-specific stringency to spindle assembly checkpoint. *Oncogene*, 25. doi.org/10.1038/sj.onc.1209259.
- Hanahan, D. (1983). Studies on Transformation of Escherichia coli with Plasmids. *J. Mol. Biol*, 166. doi.org/10.1016/s0022-2836(83)80284-8.
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12. doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100. doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144. doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Harding, S. M., Benci, J. L., Irianto, J., Discher, D. E., Minn, A. J., & Greenberg, R. A. (2017). Mitotic progression following DNA damage enables pattern recognition within micronuclei. *Nature*, 548. doi.org/10.1038/nature23470.
- Hartwell, L. H., & Weinert, T. A. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science (New York, N.Y.)*, 246. doi.org/10.1126/SCIENCE.2683079.
- Hashimoto, K., Nakajima, Y., Matsumura, S., & Chatani, F. (2010). An in vitro micronucleus assay with size-classified micronucleus counting to discriminate aneugens from clastogens. *Toxicology in Vitro*, 24. doi.org/10.1016/j.tiv.2009.09.006.
- Hatch, E. M., Fischer, A. H., Deerinck, T. J., & Hetzer, M. W. (2013). Catastrophic Nuclear Envelope Collapse in Cancer Cell Micronuclei. *Cell*, 154. doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.007.
- Hauf, S., Waizenegger, I. C., & Peters, J.-M. (2001). Cohesin Cleavage by Separase Required for Anaphase and Cytokinesis in Human Cells. *Science*, 293. doi.org/10.1126/science.1061376.
- Hayashi, M. T., & Karlseder, J. (2013). DNA damage associated with mitosis and cytokinesis failure. *Oncogene*, 32. doi.org/10.1038/onc.2012.615.

- Hives, M., Jurecekova, J., Holeckova, K. H., Kliment, J., & Sivonova, M. K. (2023). The driving power of the cell cycle: cyclin-dependent kinases, cyclins and their inhibitors. *Bratislava Medical Journal*, 124. doi.org/10.4149/BLL_2023_039.
- Holland, A. J., & Cleveland, D. W. (2009). Boveri revisited: Chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10. doi.org/10.1038/nrm2718.
- Howard, A., & Pelc, S. R. (1953). Synthesis of Desoxyribonucleic Acid in Normal and Irradiated Cells and Its Relation to Chromosome Breakage. *Heredity*, 6. doi.org/10.1080/09553008514552501.
- Hoyt, M. A., Totis, L., & Roberts, B. T. (1991). S. cerevisiae genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell*, 66. doi.org/10.1016/0092-8674(81)90014-3.
- Huang, H.-C., Shi, J., Orth, J. D., & Mitchison, T. J. (2009). Evidence that Mitotic Exit Is a Better Cancer Therapeutic Target Than Spindle Assembly. *Cancer Cell*, 16. doi.org/10.1016/j.ccr.2009.08.020.
- Huisman, C., Ferreira, C. G., Bröker, L. E., Rodriguez, J. A., Smit, E. F., Postmus, P. E., Kruyt, F. A. E., Giaccone, G., & Diseases, P. (2002). Paclitaxel Triggers Cell Death Primarily via Caspase-independent Routes in the Non-Small Cell Lung Cancer Cell Line NCI-H460. *Clinical Cancer Research*, 8. PMID: 11839682.
- Im, K., Mareninov, S., Diaz, M. F. P., & Yong, W. H. (2019). An introduction to performing immunofluorescence staining. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1897, pp. 299–311). Humana Press Inc. doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_26.
- Issa, J. P. J. (2007). DNA methylation as a therapeutic target in cancer. *Clinical Cancer Research*, 13. doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2076.
- Jakhar, R., Luijten, M. N. H., Wong, A. X. F., Cheng, B., Guo, K., Neo, S. P., Au, B., Kulkarni, M., Lim, K. J., Maimaiti, J., Chong, H. C., Lim, E. H., Tan, T. B. K., Ong, K. W., Sim, Y., Wong, J. S. L., Khoo, J. B. K., Ho, J. T. S., Chua, B. T., ... Crasta, K. C. (2018). Autophagy governs protumorigenic effects of mitotic slippage-induced senescence. *Molecular Cancer Research*, 16. doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-18-0024.
- Janssen, A., Kops, G. J. P. L., & Medema, R. H. (2009). Elevating the frequency of chromosome mis-segregation as a strategy to kill tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106. doi.org/10.1073/pnas.0904343106.
- Jordan, M. A., & Wilson, L. (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer*, 4. doi.org/10.1038/nrc1317.

- Justice, M. J., & Dhillon, P. (2016). Using the mouse to model human disease: Increasing validity and reproducibility. *Disease Models and Mechanisms*, 9. doi.org/10.1242/dmm.024547.
- Kung, A. L., Sherwood, S. W., & Schimke, R. T. (1990). Cell line-specific differences in the control of cell cycle progression in the absence of mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87. doi.org/10.1073/PNAS.87.24.9553.
- Kupchan, S. M., Komoda, Y., Court, W. A., Thomas, G. J., Smith, R. M., Karim, A., Gilmore, C. J., Haltiwanger, R. C., & Bryan, R. F. (1972). Maytansine, a Novel Antileukemic Ansa Macrolide from *Maytenus ovatus*. *Acta Crystallogr*, 18. doi.org/10.1021/ja00759a054.
- Lajtha, L. G. (1963). On the concept of the cell cycle. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 62. PMID: 14067857.
- Lara-Gonzalez, P., Westhorpe, F. G., & Taylor, S. S. (2012). The spindle assembly checkpoint. *Current Biology*, 22. doi.org/10.1016/j.cub.2012.10.006.
- Lee, H. S., Lee, N. C. O., Kouprina, N., Kim, J. H., Kagansky, A., Bates, S., Trepel, J. B., Pommier, Y., Sackett, D., & Larionov, V. (2016). Effects of anticancer drugs on chromosome instability and new clinical implications for tumor-suppressing therapies. *Cancer Research*, 76. doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1617.
- Lee, M. G., & Nurse, P. (1987). Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature*, 327. doi.org/10.1038/327031a0.
- Leenaars, C. H. C., Kouwenaar, C., Stafleu, F. R., Bleich, A., Ritskes-Hoitinga, M., De Vries, R. B. M., & Meijboom, F. L. B. (2019). Animal to human translation: A systematic scoping review of reported concordance rates. *Journal of Translational Medicine*, 17. doi.org/10.1186/s12967-019-1976-2.
- Levine, A. J., & Oren, M. (2009). The first 30 years of p53: Growing ever more complex. *Nature Reviews Cancer*, 9. doi.org/10.1038/nrc2723.
- Levine, M. (1951). The action of colchicine on cell division in human cancer, animal, and plant tissues. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 51. doi.org/10.1111/j.1749-6632.1951.tb30070.x.
- Li, R., & Murray, A. W. (1991). Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell*, 66. doi.org/10.1016/0092-8674(81)90015-5.
- Li, X., & Nicklas, R. B. (1995). Mitotic forces control a cell-cycle checkpoint. *Nature* 1995 373:6515, 373(6515), 630–632. doi.org/10.1038/373630a0.
- Li, Y. F., Zhang, C., Zhou, S., He, M., Zhang, H., Chen, N., Li, F., Luan, X., Pai, M., Yuan, H., Sun, D., & Li, Y. (2018). Species difference in paclitaxel disposition correlated

- with poor pharmacological efficacy translation from mice to humans. *Clinical Pharmacology: Advances and Applications*, 10. doi.org/10.2147/CPAA.S185449
- Liu, S., Kwon, M., Mannino, M., Yang, N., Renda, F., Khodjakov, A., & Pellman, D. (2018). Nuclear envelope assembly defects link mitotic errors to chromothripsis. *Nature*, 561. doi.org/10.1038/s41586-018-0534-z.
- Lohka, M. I., & Maller, J. L. (1985). Induction of nuclear envelope breakdown, chromosome condensation, and spindle formation in cell-free extracts. *Journal of Cell Biology*, 101. doi.org/10.1083/JCB.101.2.518.
- Lohka, M. J., Hayes, M. K., & Maller, J. L. (1988). Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85. doi.org/10.1073/PNAS.85.9.3009.
- Lok, T. M., Wang, Y., Xu, W. K., Xie, S., Ma, H. T., & Poon, R. Y. C. (2020). Mitotic slippage is determined by p31^{comet} and the weakening of the spindle-assembly checkpoint. *Oncogene*, 39. doi.org/10.1038/s41388-020-1187-6.
- Lopes, N. M., Adams, E. G., Pitts, T. W., & Bhuyan, B. K. (1993). Cell kill kinetics and cell cycle effects of taxol on human and hamster ovarian cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol*, 32. doi.org/10.1007/BF00685842.
- Lorenzini, A., Fink, L. S., Stamato, T., Torres, C., & Sell, C. (2011). Relationship of spindle assembly checkpoint fidelity to species body mass, lifespan, and developmental rate. *Aging*, 3. doi.org/10.18632/aging.100416.
- Łukasik, P., Załuski, M., & Gutowska, I. (2021). Cyclin-dependent kinases (Cdk) and their role in diseases development—review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22. doi.org/10.3390/ijms22062935.
- Lydersen, B. K., & Pettijohn, D. E. (1980). Human-Specific Nuclear Protein That Associates with the Polar Region of the Mitotic Apparatus: Distribution in a Human/Hamster Hybrid Cell. *Cell*, 22. doi.org/10.1016/0092-8674(80)90359-1.
- MacDonald, K. M., Nicholson-Puthenveedu, S., Tageldein, M. M., Khasnis, S., Arrowsmith, C. H., & Harding, S. M. (2023). Antecedent chromatin organization determines cGAS recruitment to ruptured micronuclei. *Nature Communications*, 14. doi.org/10.1038/s41467-023-36195-8.
- MacKenzie, K. J., Carroll, P., Martin, C. A., Murina, O., Fluteau, A., Simpson, D. J., Olova, N., Sutcliffe, H., Rainger, J. K., Leitch, A., Osborn, R. T., Wheeler, A. P., Nowotny, M., Gilbert, N., Chandra, T., Reijns, M. A. M., & Jackson, A. P. (2017). CGAS surveillance of micronuclei links genome instability to innate immunity. *Nature*, 548. doi.org/10.1038/nature23449.

- Margolis, R. L., Lohez, O. D., & Andreassen, P. R. (2003). G1 tetraploidy checkpoint and the suppression of tumorigenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 88. doi.org/10.1002/JCB.10411.
- Martínez-Alonso, D., & Malumbres, M. (2020). Mammalian cell cycle cyclins. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 107. doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2020.03.009.
- Marzullo, P., Boiarska, Z., Pérez-Peña, H., Abel, A. C., Álvarez-Bernad, B., Lucena-Agell, D., Vasile, F., Sironi, M., Altmann, K. H., Prota, A. E., Díaz, J. F., Pieraccini, S., & Passarella, D. (2022). Maytansinol Derivatives: Side Reactions as a Chance for New Tubulin Binders. *Chemistry - A European Journal*, 28. doi.org/10.1002/chem.202103520.
- Mascanzoni, F., Ayala, I., & Colanzi, A. (2019). Organelle Inheritance Control of Mitotic Entry and Progression: Implications for Tissue Homeostasis and Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7:133. doi.org/10.3389/fcell.2019.00133.
- Mateos, S., Domínguez, I., Pastor, N., Cantero, G., & Cortés, F. (2005). The DNA demethylating 5-azaC induces endoreduplication in cultured Chinese hamster cells. *Mutation Research*, 578. doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.02.001.
- Matson, J. P., & Cook, J. G. (2017). Cell cycle proliferation decisions: the impact of single cell analyses. *FEBS Journal*, 284. doi.org/10.1111/febs.13898.
- McAinsh, A. D., & Kops, G. J. P. L. (2023). Principles and dynamics of spindle assembly checkpoint signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 24. doi.org/10.1038/s41580-023-00593-z.
- Merdes, A., & Cleveland, D. W. (1998). The role of NuMA in the interphase nucleus. *Journal of Cell Science*, 111. doi.org/10.1242/jcs.111.1.71.
- Michel, L. S., Liberal, V., Chatterjee, A., Kirchwegger, R., Paschek, B., Gerald, W., Dobles, M., Sorger, P. K., V S Murty, V. V., & Benezra, R. (2001). MAD2 haploinsufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nature*, 409. doi.org/10.1038/35053094.
- Mishima, M. (2017). Chromosomal aberrations, clastogens vs aneugens. *Frontiers in Bioscience*, 9. doi.org/10.2741/S468.
- Mitchison, J. (1971). *The biology of the cell cycle*. Cambridge University Press. ISBN-10: 0521096715.
- Mitchison, T. J. (2012). The proliferation rate paradox in antimetabolic chemotherapy. *Molecular Biology of the Cell*, 23. doi.org/10.1091/mbc.E10-04-0335.
- Mitchison, T. J., Pineda, J., Shi, J., & Florian, S. (2017). Is inflammatory micronucleation the key to a successful anti-mitotic cancer drug? *Open Biology*, 7. doi.org/10.1098/RSOB.170182.

- Molè-Bajer, J. (1957). Cine-micrographic analysis of c-mitosis in endosperm. *Chromosoma*, 9. doi.org/10.1007/BF02568085/METRICS.
- Moore, K. N., Angelergues, A., Konecny, G. E., García, Y., Banerjee, S., Lorusso, D., Lee, J.-Y., Moroney, J. W., Colombo, N., Roszak, A., Tromp, J., Myers, T., Lee, J.-W., Beiner, M., Cosgrove, C. M., Cibula, D., Martin, L. P., Sabatier, R., Buscema, J., ... Van Gorp, T. (2023). Mirvetuximab Soravtansine in FR α -Positive, Platinum-Resistant Ovarian Cancer. *New England Journal of Medicine*, 389. doi.org/10.1056/nejmoa2309169.
- Morgan O. D. (2007). The Cell Cycle: Principles of Control. In David O. Morgan and Eleanor Lawrence, *Cell Division*, 2. Oxford University Press, Primers in Biology Series. ISBN-10: 0-9539181-2-2.
- National Cancer Institute. *Types of cancer treatment*. National Cancer Institute. www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types (acceso 16/06/2025).
- Navarro, A. P., & Cheeseman, I. M. (2021). Kinetochore assembly throughout the cell cycle. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 117. doi.org/10.1016/j.semcd.2021.03.008.
- Nicklas, R. B., & Ward, S. C. (1994). Elements of error correction in mitosis: microtubule capture, release, and tension. *The Journal of Cell Biology*, 126. doi.org/10.1083/JCB.126.5.1241.
- Nicklas, R. B., Ward, S. C., & Gorbisky, G. J. (1995). Kinetochore chemistry is sensitive to tension and may link mitotic forces to a cell cycle checkpoint. *The Journal of Cell Biology*, 130. doi.org/10.1083/JCB.130.4.929.
- Noble, R. L., Beer, C. T., & Cutts, J. H. (1958). Role of chance observations in chemotherapy: *Vinca rosea*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 76. doi.org/10.1111/j.1749-6632.1958.tb54906.x.
- Norppa, H., & Falck, G. C. M. (2003). What do human micronuclei contain? *Mutagenesis*, 18. doi.org/10.1093/mutage/18.3.221.
- Nunes, V., & Ferreira, J. G. (2021). From the cytoskeleton to the nucleus: An integrated view on early spindle assembly. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 117. doi.org/10.1016/j.semcd.2021.03.006.
- Nurse, P. (2000). A Long Twentieth Century of Review the Cell Cycle and Beyond. *Cell*, 100. doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81684-0.
- O'Connell, M. J., Walworth, N. C., & Carr, A. M. (2000). The G2-phase DNA-damage checkpoint. *Trends in Cell Biology*, 10. doi.org/10.1016/S0962-8924(00)01773-6.
- Ohashi, A. (2016). Different cell fates after mitotic slippage: From aneuploidy to polyploidy. *Molecular and Cellular Oncology*, 3. doi.org/10.1080/23723556.2015.1088503.

- Orth, J. D., Loewer, A., Lahav, G., & Mitchison, T. J. (2012). Prolonged mitotic arrest triggers partial activation of apoptosis, resulting in DNA damage and p53 induction. *Molecular Biology of the Cell*, 23. doi.org/10.1091/mbc.E11-09-0781.
- Panzer, F., Giménez-Abián, M. I., López-Sáez, J. F., Giménez-Martín, G., Cuadrado, A., Cánovas, J. L., & De la Torre, C. (1997). Competence for nuclear replication and the NOR-chromosomes of *Allium cepa* L. *European Journal of Cell Biology*, 72. PMID: 9013720.
- Parekh, H., & Simpkins, H. (1996). Species-Specific Differences in Taxol Transport and Cytotoxicity Against Human and Rodent Tumor Cells Evidence for An Alternate Transport System? *Biochemical Pharmacology*, 51. doi.org/10.1016/0006-2952(95)02176-0.
- Pastor, N., Cantero, G., Campanella, C., & Cortés, F. (2005). Endoreduplication induced in cultured Chinese hamster cells by different anti-topoisomerase II chemicals. Evidence for the essential contribution of the enzyme to chromosome segregation. *Mutation Research*, 582. doi.org/10.1016/j.mrgentox.2004.12.006.
- Paulson, J. R., Hudson, D. F., Cisneros-Soberanis, F., & Earnshaw, W. C. (2021). Mitotic chromosomes. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 117. doi.org/10.1016/j.semcd.2021.03.014.
- Paweletz, N. (2001). Walther Flemming- pioneer of mitosis research. *Nat Rev Moll Cell Biol*. doi.org/10.1038/35048077.
- Peddi, P. F., & Hurvitz, S. A. (2014). Ado-trastuzumab emtansine (T-DM1) in human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive metastatic breast cancer: Latest evidence and clinical potential. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 6. doi.org/10.1177/1758834014539183.
- Peto, H., Roe, F. J. C., Lee, P. N., Levy, L., & Clack, J. (1975). CANCER AND AGEING IN MICE AND MEN. *Br. J. Cancer*, 32. doi.org/10.1038/bjc.1975.242.
- Petry, S. (2016). Mechanisms of Mitotic Spindle Assembly. *Annual Review of Biochemistry*, 85. doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014528.
- Petsalaki, E., & Zachos, G. (2021). The Abscission Checkpoint: A Guardian of Chromosomal Stability. *Cells*, 10. doi.org/10.3390/CELLS10123350.
- Pickett-Heaps, J. (1969). The evolution of the mitotic apparatus: an attempt at comparative ultrastructural cytology in dividing plant cells. *Cytobios*, 3. doi.org/10.1016/0303-2647(74)90009-4Getrightsandcontent.
- Pommier, Y. (2006). Topoisomerase I inhibitors: Camptothecins and beyond. *Nature Reviews Cancer*, 6. doi.org/10.1038/nrc1977.

- Prosser, S. L., & Pelletier, L. (2017). Mitotic spindle assembly in animal cells: A fine balancing act. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18. doi.org/10.1038/nrm.2016.162.
- Qian, X., McDonald, A., Zhou, H. J., Adams, N. D., Parrish, C. A., Duffy, K. J., Fitch, D. M., Tedesco, R., Ashcraft, L. W., Yao, B., Jiang, H., Huang, J. K., Marin, M. V., Aroyan, C. E., Wang, J., Ahmed, S., Burgess, J. L., Chaudhari, A. M., Donatelli, C. A., ... Knight, S. D. (2010). Discovery of the first potent and selective inhibitor of centromere-associated protein E: GSK923295. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 1. doi.org/10.1021/ml900018m.
- Rangarajan, A., & Weinberg, R. A. (2003). Comparative biology of mouse versus human cells: modelling human cancer in mice. *Nature Reviews. Cancer*, 3. doi.org/10.1038/nrc1235.
- Rao, P. N., & Johnson, R. T. (1970). Mammalian Cell Fusion: Studies on the Regulation of DNA Synthesis and Mitosis. *Nature*, 225. doi.org/10.1038/225159a0.
- Rieder, C. L. (2011). Mitosis in vertebrates: The G2/M and M/A transitions and their associated checkpoints. *Chromosome Research*, 19. doi.org/10.1007/s10577-010-9178-z.
- Rieder, C. L., & Salmon, E. D. (1998). The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis. *Trends in Cell Biology*, 8. doi.org/10.1016/S0962-8924(98)01299-9.
- Rieder, C. L., Schultz, A., Cole, R., & Sluder, G. (1994). Anaphase onset in vertebrate somatic cells is controlled by a checkpoint that monitors sister kinetochore attachment to the spindle. *The Journal of Cell Biology*, 127. doi.org/10.1083/JCB.127.5.1301.
- Riffell, J. L., Zimmerman, C., Khong, A., McHardy, L. M., & Roberge, M. (2009). Effects of chemical manipulation of mitotic arrest and slippage on cancer cell survival and proliferation. *Cell Cycle*, 8. doi.org/10.4161/cc.8.18.9623.
- Rosenthal, N., & Brown, S. (2007). The mouse ascending: perspectives for human-disease models. *Nature Cell Biology*, 9. doi.org/10.1038/ncb437.
- Rubin, S. M., Sage, J., & Skotheim, J. M. (2020). Integrating Old and New Paradigms of G1/S Control. *Molecular Cell*, 80. doi.org/10.1016/j.molcel.2020.08.020.
- Ruggiero, A., Katou, Y., Shirahige, K., Séveno, M., & Piatti, S. (2020). The Phosphatase PP1 Promotes Mitotic Slippage through Mad3 Dephosphorylation. *Current Biology*, 30. doi.org/10.1016/j.cub.2019.11.054.
- Sato, Y., & Hayashi, M. T. (2024). Micronucleus is not a potent inducer of the cGAS/STING pathway. *Life Science Alliance*, 7. doi.org/10.26508/lsa.202302424.

- Sazonova, E. V., Petrichuk, S. V., Kopeina, G. S., & Zhivotovsky, B. (2021). A link between mitotic defects and mitotic catastrophe: detection and cell fate. *Biology Direct*, 16:25. doi.org/10.1186/s13062-021-00313-7.
- Schiff, P. B., Fant, J., & Horwitz, S. B. (1979). Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature*, 277. doi.org/10.1038/277665a0.
- Schimke, R.T, Kung, A. L., Rush, D. F., & Sherwood, S. W. (1991). Differences in Mitotic Control among Mammalian Cells. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 56. doi.org/10.1101/sqb.1991.056.01.049.
- Scribano, C. M., Wan, J., Esbona, K., Tucker, J. B., Lasek, A., Zhou, A. S., Zasadil, L. M., Molini, R., Fitzgerald, J., Lager, A. M., Laffin, J. J., Correia-Staudt, K., Wisinski, K. B., Tevaarwerk, A. J., O'Regan, R., McGregor, S. M., Fowler, A. M., Chappell, R. J., Bugni, T. S., ... Weaver, B. A. (2021). Chromosomal instability sensitizes patient breast tumors to multipolar divisions induced by paclitaxel. *Science Translational Medicine*, 13. doi.org/10.1126/scitranslmed.abd4811.
- Serra-Marques, A., Houtekamer, R., Hintzen, D., Canty, J. T., Yildiz, A., & Dumont, S. (2020). The mitotic protein NuMA plays a spindle-independent role in nuclear formation and mechanics. *Journal of Cell Biology*, 219. doi.org/10.1083/JCB.202004202.
- Shaltiel, I. A., Krenning, L., Bruinsma, W., & Medema, R. H. (2015). The same, only different - DNA damage checkpoints and their reversal throughout the cell cycle. *Journal of Cell Science*, 128. doi.org/10.1242/jcs.163766.
- Shi, J., & Mitchison, T. J. (2017). Cell death response to anti-mitotic drug treatment in cell culture, mouse tumor model and the clinic. *Endocrine-Related Cancer*, 24. doi.org/10.1530/ERC-17-0003.
- Shi, J., Orth, J. D., & Mitchison, T. (2008). Cell type variation in responses to antimitotic drugs that target microtubules and kinesin-5. *Cancer Research*, 68. doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6699.
- Singh, R. K., Kumar, S., Prasad, D. N., & Bhardwaj, T. R. (2018). Therapeutic journey of nitrogen mustard as alkylating anticancer agents: Historic to future perspectives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 151. doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.04.001.
- Sloss, O., Topham, C., Diez, M., & Taylor, S. (2016). Mcl-1 dynamics influence mitotic slippage and death in mitosis. *Oncotarget*, 7. doi.org/10.18632/ONCOTARGET.6894.
- Snyder, J. P., Nettles, J. H., Cornett, B., Downing, K. H., & Nogales, E. (2001). The binding conformation of Taxol in-tubulin: A model based on electron crystallographic density. *PNAS*, 98. doi.org/10.1073/pnas.051309398.

- Soares-de-Oliveira, J., & Maiato, H. (2022). Mitosis: Kinetochores determined against random search-and-capture. *Current Biology*, 32. doi.org/10.1016/J.CUB.2022.02.003.
- Sommer, S., Buraczewska, I., & Kruszewski, M. (2020). Micronucleus assay: The state of art, and future directions. *International Journal of Molecular Sciences*, 21. doi.org/10.3390/ijms21041534.
- Song, G., Liu, J., Tang, X., Zhong, J., Zeng, Y., Zhang, X., Zhou, J., Zhou, J., Cao, L., Zhang, Q., & Li, Y. (2024). Cell cycle checkpoint revolution: targeted therapies in the fight against malignant tumors. *Frontiers in Pharmacology*, 15. doi.org/10.3389/FPHAR.2024.1459057.
- Sotillo, R., Hernando, E., Díaz-Rodríguez, E., Teruya-Feldstein, J., Cordón-Cardo, C., Lowe, S. W., & Benezra, R. (2007). Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice. *Cancer Cell*, 11. doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.019.
- Steinmann, K. E., Belinsky, G. S., Lee, D., & Schlegel, R. (1991). Chemically induced premature mitosis: Differential response in rodent and human cells and the relationship to cyclin B synthesis and p34cdc2/cyclin B complex formation. *PNAS*, 88. PMID: 52185.
- Steinmetz, M. O., & Prota, A. E. (2018). Microtubule-Targeting Agents: Strategies to Hijack the Cytoskeleton. *Trends in Cell Biology*, 28. doi.org/10.1016/j.tcb.2018.05.001.
- Stepanenko, A. A., & Kavsan, V. M. (2012). Immortalization and malignant transformation of eukaryotic cells. *Cytology and Genetics*, 46. doi.org/10.3103/S0095452712020041.
- Sudo, T., Nitta, M., Saya, H., & Ueno, N. T. (2004). Dependence of Paclitaxel Sensitivity on a Functional Spindle Assembly Checkpoint. *Cancer Research*, 64. doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-2013.
- Suleimenov, M., Bekbayev, S., Ten, M., Suleimenova, N., Tlegenova, M., Nurmagambetova, A., Kauanova, S., & Vorobjev, I. (2022). Bcl-xL activity influences outcome of the mitotic arrest. *Frontiers in Pharmacology*, 13. doi.org/10.3389/fphar.2022.933112.
- Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X., & Chen, Z. J. (2013). Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science*, 339. doi.org/10.1126/science.1232458.
- Takaki, T., Millar, R., Hiley, C. T., & Boulton, S. J. (2024). Micronuclei induced by radiation, replication stress, or chromosome segregation errors do not activate cGAS-STING. *Molecular Cell*, 84. doi.org/10.1016/j.molcel.2024.04.017.

- Tones, J., Jeffrey, J., Lackner, R. M., Chenoweth, D. M., & Zhang, H. (2025). Coiled-coil interactions drive ectopic condensation of overexpressed MAD1 to promote mitotic slippage in cancer cells. *BioRxiv*. doi.org/10.1101/2025.07.29.667513.
- Tyson, J. J., & Novak, B. (2008). Temporal Organization of the Cell Cycle. *Current Biology*, 18. doi.org/10.1016/j.cub.2008.07.001.
- Uzbekov, R., & Prigent, C. (2022). A Journey through Time on the Discovery of Cell Cycle Regulation. *Cells*, 11. doi.org/10.3390/cells11040704.
- Valent, P., Groner, B., Schumacher, U., Superti-Furga, G., Busslinger, M., Kralovics, R., Zielinski, C., Penninger, J. M., Kerjaschki, D., Stingl, G., Smolen, J. S., Valenta, R., Lassmann, H., Kovar, H., Jäger, U., Kornek, G., Müller, M., & Sörgel, F. (2016). Paul Ehrlich (1854-1915) and His Contributions to the Foundation and Birth of Translational Medicine. *Journal of Innate Immunity*, 8. doi.org/10.1159/000443526.
- Van De Weerd, B. C. M., & Medema, R. H. (2006). Polo-like kinases: A team in control of the division. *Cell Cycle*, 5. doi.org/10.4161/cc.5.8.2692.
- Vernieri, C., Chirolì, E., Francia, V., Gross, F., & Ciliberto, A. (2013). Adaptation to the spindle checkpoint is regulated by the interplay between Cdc28/Clbs and PP2A^{Cdc55}. *Journal of Cell Biology*, 202. doi.org/10.1083/JCB.201303033.
- Vinogradov, A. E. (2015). Accelerated pathway evolution in mouse-like rodents involves cell cycle control. *Mammalian Genome*, 26. doi.org/10.1007/s00335-015-9605-8.
- Visconti, R., Della Monica, R., & Grieco, D. (2016). Cell cycle checkpoint in cancer: A therapeutically targetable double-edged sword. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 35. doi.org/10.1186/s13046-016-0433-9.
- Vitale, I., Galluzzi, L., Castedo, M., & Kroemer, G. (2011). Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 12. doi.org/10.1038/nrm3115.
- Vleugel, M., Hoogendoorn, E., Snel, B., & Kops, G. J. P. L. (2012). Evolution and Function of the Mitotic Checkpoint. *Developmental Cell*, 23. doi.org/10.1016/j.devcel.2012.06.013.
- Voloshin, N., Tyurin-Kuzmin, P., Karagyaur, M., Akopyan, Z., & Kulebyakin, K. (2023). Practical Use of Immortalized Cells in Medicine: Current Advances and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 24. doi.org/10.3390/ijms241612716.
- Vukušić, K., & Tolić, I. M. (2021). Anaphase B: Long-standing models meet new concepts. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 117. doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.03.023.
- Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P., & McPhail, A. T. (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. doi.org/10.1021/ja00738a045.
- Weaver, B. A., Bonday, Z. Q., Putkey, F. R., Kops, G. J. P. L., Silk, A. D., & Cleveland, D. W. (2003). Centromere-associated protein-E is essential for the mammalian mitotic checkpoint to prevent aneuploidy due to single chromosome loss. *Journal of Cell Biology*, 162. doi.org/10.1083/jcb.200303167.
- Weaver, B. A., & Cleveland, D. W. (2006). Does aneuploidy cause cancer? *Current Opinion in Cell Biology*, 18. doi.org/10.1016/j.ceb.2006.10.002.
- Wilson, E. B. (1911). The cell in development and inheritance. In *The cell in development and inheritance* (2d ed., rev.enl.). Macmillan. doi.org/10.5962/bhl.title.6246.
- Windner, S. E., Manhart, A., Brown, A., Mogilner, A., & Baylies, M. K. (2019). Nuclear Scaling Is Coordinated among Individual Nuclei in Multinucleated Muscle Fibers. *Developmental Cell*, 49. doi.org/10.1016/j.devcel.2019.02.020.
- Wong, A., Chen, S., Yang, L. K., Kanagasundaram, Y., & Crasta, K. (2018). Lipid accumulation facilitates mitotic slippage-induced adaptation to anti-mitotic drug treatment. *Cell Death Discovery*, 4. doi.org/10.1038/s41420-018-0127-5.
- Wood, K. W., Lad, L., Luo, L., Qian, X., Knight, S. D., Nevins, N., Brejc, K., Sutton, D., Gilmartin, A. G., Chua, P. R., Desai, R., Schauer, S. P., McNulty, D. E., Annan, R. S., Belmont, L. D., Garcia, C., Lee, Y., Diamond, M. A., Faucette, L. F., ... Jackson, J. R. (2010). Antitumor activity of an allosteric inhibitor of centromere-associated protein-E. *PNAS*, 107. doi.org/10.1073/pnas.0915068107.
- Yam, C. Q. X., Lim, H. H., & Surana, U. (2022). DNA damage checkpoint execution and the rules of its disengagement. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10. doi.org/10.3389/fcell.2022.1020643.
- Yan, V. C., Butterfield, H. E., Poral, A. H., Yan, M. J., Yang, K. L., Pham, C. D., & Muller, F. L. (2020). Why Great Mitotic Inhibitors Make Poor Cancer Drugs. *Trends in Cancer*, 6. doi.org/10.1016/j.trecan.2020.05.010.
- Yanagida, M. (2014). The role of model organisms in the history of mitosis research. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6. doi.org/10.1101/cshperspect.a015768.
- Yasuhira, S., Shibazaki, M., Nishiya, M., & Maesawa, C. (2016). Paclitaxel-induced aberrant mitosis and mitotic slippage efficiently lead to proliferative death irrespective of canonical apoptosis and p53. *Cell Cycle*, 15. doi.org/10.1080/15384101.2016.1242537.
- Yiğit, N., Çolak, E., & Sözen, M. (1998). The Taxonomy and Karyology of *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) and *Rattus rattus* (Linnaeus, 1758) (Rodentia: Muridae) in Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 22.

-
- Zasadil, L. M., Andersen, K. A., Yeum, D., Rocque, G. B., Wilke, L. G., Tevaarwerk, A. J., Raines, R. T., Burkard, M. E., & Weaver, B. A. (2014). Cytotoxicity of paclitaxel in breast cancer is due to chromosome missegregation on multipolar spindles. *Science Translational Medicine*, 6. doi.org/10.1126/scitranslmed.3007965.
- Zhou, A. S., Tucker, J. B., Scribano, C. M., Lynch, A. R., Carlsen, C. L., Pop-Vicas, S. T., Pattaswamy, S. M., Burkard, M. E., & Weaver, B. A. (2023). Diverse microtubule-targeted anticancer agents kill cells by inducing chromosome missegregation on multipolar spindles. *PLoS Biology*, 21. doi.org/10.1371/journal.pbio.3002339.
- Zhu, Y., Zhou, Y., & Shi, J. (2014). Post-slippage multinucleation renders cytotoxic variation in anti-mitotic drugs that target the microtubules or mitotic spindle. *Cell Cycle*, 13. doi.org/10.4161/cc.28672.
- Zirkle, R. E. (1970). Ultraviolet-Microbeam Irradiation of Newt-Cell Cytoplasm: Spindle Destruction, False Anaphase, and Delay of True Anaphase. *Radiation Research*, 41. doi.org/https://doi.org/10.2307/3572841.

ANEXOS



<https://drive.google.com/file/d/1fla03zwDp87nDeOVpytP6H7dD-HZoerN/preview>

Vídeo 1. La mitosis. Vídeo de microscopía *time-lapse* de la línea celular A549 con marcaje de histona H2B-mCherry y α -tubulina-eGFP. El panel superior izquierdo se corresponde con la histona H2B, mientras que en el derecho se observa el marcaje de α -tubulina. El panel inferior izquierdo muestra el campo claro y el derecho el montaje de los dos paneles superiores. Las células se trataron con DMSO y la adquisición de las imágenes empezó inmediatamente después. La toma de imágenes se realizó cada 5 segundos con 2 planos en Z utilizando un objetivo de 63x (A.N. 1,40). El procesado se realizó con FIJI. Al comenzar el vídeo, la célula ya ha separado los centrosomas y la cromatina empieza a condensarse. Aproximadamente en el minuto 11, se rompe la envoltura nuclear y los microtúbulos del huso comienzan a anclarse a los cinetocoros de los cromosomas. En el minuto 37, la célula se ha redondeado por completo y está en metafase con los cromosomas biorientados. En el minuto 56, comienza la anafase hasta que finalmente se completa la cariocinesis y citocinesis dando lugar a dos células hijas genéticamente idénticas.



https://drive.google.com/file/d/1Sh4_XhhOyKNn9qXRA2hWglOSyXZlhxIz/preview

Vídeo 2. Evasión del punto de chequeo del huso con paclitaxel. Vídeo de microscopía *time-lapse* de la línea celular A549 con marcaje de histona H2B-mCherry y α -tubulina-eGFP. En el panel izquierdo se muestra la α -tubulina, en el panel central la histona H2B y en el panel de la derecha el montaje. Las células se trataron con 150 nM de paclitaxel y la adquisición de las imágenes empezó inmediatamente después de añadir la droga. La toma de imágenes se realizó cada 40 segundos con 6 planos en Z utilizando un objetivo de 63x (A.N. 1,40). El procesado se realizó con FIJI aplicando la proyección máxima. En el minuto 40 la célula ya ha entrado en mitosis y 15 minutos más tarde la envoltura nuclear se rompe. Se forman múltiples polos que se van agrupando hasta formar un número menor de polos con una arquitectura aberrante, quedando los cromosomas dispersos sin poder formar una placa ecuatorial. La célula permanece

bloqueada en c-mitosis aproximadamente 10 horas, momento en el cual (11:08:40) evade el punto de chequeo del huso. Mediante movimiento violentos la célula sale de mitosis, se descondensa la cromatina y vuelve el citoesqueleto interfásico. La célula intenta hacer una citocinesis aberrante, pudiendo observarse a las 12 horas y media una compartimentalización en 4 células, que se van fusionando. Finalmente, a las 14 horas y 20 minutos el material genético ha quedado englobado dentro de una única célula multinucleada.



https://drive.google.com/file/d/19iDPbs6hq4_et1Bf8BrA8vvXAsUe6GLZ/preview

Vídeo 3. Evasión del punto de chequeo del huso con maytansina. Vídeo de microscopía *time-lapse* de la línea celular A549 con marcaje de histona H2B-mCherry y α -tubulina-eGFP. En el panel izquierdo se muestra la α -tubulina, en el panel central la histona H2B y en el panel de la derecha el montaje. Las células se trataron con 5 nM de maytansina, y la adquisición de las imágenes empezó inmediatamente después de añadir la droga. La toma de imágenes se realizó cada 40 segundos con 6 planos en Z utilizando un objetivo de 63x (A.N. 1,40). El procesado se realizó con FIJI aplicando la proyección máxima. Casi dos horas después de haber comenzado la adquisición de las imágenes, la célula se encuentra en profase media (01:48:40) y 10 minutos más tarde, la envoltura nuclear se rompe. Puesto que es un tratamiento con un agente desestabilizante de microtúbulos, los polos que se forman son casi inapreciables, aunque si se observa el montaje se pueden distinguir polos muy pequeños localizados con los cromosomas que son incapaces de biorientar. La célula permanece bloqueada durante 10 horas, momento en el cual evade el SAC (11:50:40). En el intento de citocinesis y descondensación de los cromosomas, se forman 3 particiones, siendo 1 de ellas la que contiene todo el material genético (13:06:40). Las otras dos, son fragmentos celulares anucleares que se fusionan (13:44:40) y finalmente muere (19:52:40), puesto que no es viable.



<https://drive.google.com/file/d/1ziqGcqim2UJi6bAtGbD8W5WYN9hrMv2C/preview>

Vídeo 4. Evasión del punto de chequeo del huso con GSK923295. Vídeo de microscopía *time-lapse* de la línea celular A549 con marcaje de histona H2B-mCherry y α -tubulina-eGFP. En el panel izquierdo se muestra la α -tubulina, en el panel central la histona H2B y en el panel de la derecha el montaje. Las células se trataron con 50 nM de GSK923295, y la adquisición de las

imágenes empezó inmediatamente después de añadir la droga. La toma de imágenes se realizó cada 40 segundos con 6 planos en Z utilizando un objetivo de 63x (A.N. 1,40). El procesado se realizó con FIJI aplicando la proyección máxima. A la hora y media de comenzar la adquisición de las imágenes la célula ya ha entrado en mitosis y 12 minutos después la envoltura nuclear se rompe. Puede observarse la formación de un huso bipolar normal y el fenotipo característico del inhibidor GSK923295, en el que la mayor parte de los cromosomas han biorientado, pero aquellos más rezagados no pueden hacerlo (02:42:00). La célula permanece bloqueada en c-mitosis 4 horas y media aproximadamente, y realiza una anafase con una segregación incorrecta de los cromosomas entre las dos células (06:04:00). Finalmente se completa la citocinesis (06:34:40) originando dos células hijas con aberraciones nucleares.



https://drive.google.com/file/d/1pyk5_ZLDsZByNbB8jhGx-OV3qF6NtcbR/preview

Vídeo 5. Evasión del punto de chequeo del huso con GSK923295. Vídeo de microscopía *time-lapse* de la línea celular A549 con marcaje de histona H2B-mCherry y α -tubulina-eGFP. En el panel izquierdo se muestra la α -tubulina, en el panel central la histona H2B y en el panel de la derecha el montaje. Las células se trataron con 50 nM de GSK923295, y la adquisición de las imágenes empezó inmediatamente después de añadir la droga. La toma de imágenes se realizó cada 40 segundos con 6 planos en Z utilizando un objetivo de 63x (A.N. 1,40). El procesado se realizó con FIJI aplicando la proyección máxima. A los 20 minutos de comenzar la adquisición de las imágenes, la célula entra en mitosis y aproximadamente 15 minutos después la envoltura nuclear se rompe. Puede observarse la formación de un huso bipolar normal y el fenotipo característico del inhibidor GSK923295, en el que la mayor parte de los cromosomas han biorientado, pero aquellos más rezagados no pueden hacerlo (01:28:40). La célula permanece bloqueada en c-mitosis 4 horas aproximadamente. A las 4 horas y media de comenzar el *time-lapse*, la célula realiza una citocinesis aberrante, formando 4 fragmentos celulares (04:36:00), que finalmente se fusionan para formar una única célula con aberraciones nucleares (06:32:40).



<https://drive.google.com/file/d/1JXiDWLnY1KKdw0k78c1vZHR3cd3ZvVzH/preview>

Vídeo 6. Colapso de micronúcleos (figura 37). Vídeo de microscopía *time-lapse* de la línea celular U-2 OS con marcaje de histona H2B-mCherry y 3xNLS-eGFP. En el panel izquierdo se muestra la histona H2B, en el panel central la señal de 3xNLS y en el panel de la derecha el montaje. Las células se trataron con 150 nM de paclitaxel, y la adquisición de las imágenes empezó 10 horas después de añadir la droga. La toma de imágenes se realizó cada 45 segundos con 1 plano en Z utilizando un objetivo de 63x (A.N. 1,40). El procesado se realizó con FIJI. Partiendo de una célula que ha evadido el punto de chequeo del huso y se ha originado una célula con múltiples micronúcleos a lo largo del *time-lapse* se observan cómo los micronúcleos colapsan y, en un caso, como pueden volver a reconstituirse.



https://drive.google.com/file/d/1L4BXC0xbKC8eG6LbG_PBG7aHb2b_qrSf/preview

Vídeo 7. Ejemplo guía de resultados de U-2 OS con paclitaxel. Vídeo de microscopía *time-lapse* de la línea celular U-2 OS con marcaje de histona H2B-mCherry y α -tubulina-eGFP. En el panel izquierdo se muestra el marcaje de α -tubulina, en el panel central la histona H2B y el panel de la derecha el montaje. Las células se trataron con 150 nM de paclitaxel, y la adquisición de las imágenes empezó inmediatamente después. La toma de imágenes se realizó cada 5 minutos, con 1 plano en Z durante 48 horas utilizando un objetivo de 20x (A.N. 0,8). El procesado se realizó con FIJI. En el campo inicial se seleccionaron 100 células y se fue realizando el seguimiento temporal de cada una de ellas. Al comenzar el *time-lapse*, se observa cómo el citoesqueleto de microtúbulos va cambiando por el efecto del paclitaxel. Las células que entran en mitosis, permanecen un tiempo bloqueadas en c-mitosis y las que consiguen evadir el SAC originan células multinucleadas con muchos micronúcleos de pequeño tamaño. En el caso de la línea U-2 OS la mayor parte de las células que hacen el *mitotic slippage* permanecen después sin proliferar hasta la finalización del experimento.



<https://drive.google.com/file/d/1mUMxcfFOkt3l21mElqkUo5a8vt3YFw2k/preview>

Vídeo 8. Ejemplo guía de resultados de NRK-52E con GSK923295. Vídeo de microscopía *time-lapse* de la línea celular U-2 OS con marcaje de histona H2B-eGFP y 3xNLS-mCherry. En el panel izquierdo se muestra el marcaje de histona H2B, en el panel central 3xNLS y el panel de la derecha el montaje. Las células se trataron con 1 μ M de GSK923295, y la adquisición de las imágenes empezó inmediatamente después. La toma de imágenes se realizó cada 5 minutos, con 1 plano en Z durante 48 horas utilizando un objetivo de 20x (A.N. 0,8). El procesado se realizó con FIJI. En el campo inicial se seleccionaron 100 células y se fue realizando el seguimiento temporal de cada una de ellas. Al comenzar el *time-lapse*, las células van entrando en mitosis, no permanecen apenas tiempo bloqueadas en c-mitosis y se originan dos células con núcleos de restitución. En este caso, la mayor parte de las células que hacen el *mitotic slippage* permanecen después sin proliferar hasta la finalización del experimento.



<https://drive.google.com/file/d/1FsCp0oRGto0INGQYSs7ghANBV7fhfU-f/preview>

Vídeo 9. Ejemplo guía de resultados de U-2 OS con bleomicina. Vídeo de microscopía *time-lapse* de la línea celular U-2 OS con marcaje de histona H2B-mCherry, LAP2 β -eGFP y 3xNLS-BFP2. De izquierda a derecha se muestra en cada panel: histona H2B, LAP2 β , 3xNLS y el montaje. Las células se trataron con 20 μ M de bleomicina y la adquisición de las imágenes empezó inmediatamente después. La toma de imágenes se realizó cada 5 minutos, con 1 plano en Z durante 72 horas utilizando un objetivo de 20x (A.N. 0,8). El procesado se realizó con FIJI. En el campo inicial se seleccionaron 100 células y se fue realizando el seguimiento temporal de cada una de ellas. Durante el tiempo del *time-lapse*, en su mayoría pueden observarse células que mueren, células que endorreduplican porque hay núcleos que aumentan su tamaño y células que entran en fase de división. Aquellas células que salen de la mitosis, generan células con núcleos de restitución, células con fenotipo híbrido y células multinucleadas. Posteriormente, la mayor parte de las células no prolifera hasta la finalización del experimento, pero algunas mueren o vuelven a entrar en una segunda mitosis.

A				B			
Paclitaxel	Humano	Campo claro	Histona H2B	α -tubulina	Montaje de H2B y tubulina	<u>Bleomicina</u>	<u>Alisertib</u>
	Roedor	Campo claro	Histona H2B	α -tubulina	Montaje de H2B y tubulina	Campo claro	Campo claro
Maytansina	Humano	Campo claro	Histona H2B	3xNLS	Montaje de H2B y 3xNLS	Histona H2B	Histona H2B
	Roedor	Campo claro	Histona H2B	3xNLS	Montaje de H2B y 3xNLS	LAP2 β	LAP2 β
GSK923295	Humano	Campo claro	Histona H2B	3xNLS	Montaje de H2B y 3xNLS	3xNLS	3xNLS
	Roedor	Campo claro	Histona H2B	3xNLS	Montaje de H2B y 3xNLS	Montaje de H2B, LAP2 β y 3xNLS	Montaje de H2B, LAP2 β y 3xNLS

Figura 1-Anexos. Representación esquemática correspondiente a la figura 16 (panel A) y la figura 17 (panel B).



https://drive.google.com/file/d/159mmkELKoL4W2Lj_Q4veITS4rivY9EX2/preview

Vídeo 10. Afectación de la mitosis con diferentes concentraciones de paclitaxel. Vídeo de microscopía *time-lapse* de la línea celular A549 con marcaje de histona H2B-mCherry y α -tubulina-eGFP. En el panel superior se muestra la α -tubulina y en el panel inferior el montaje junto con la histona H2B. Los experimentos de paclitaxel de la presente tesis se han realizado a 150 nM (panel central). Dicha concentración es suficiente para observar el fenotipo mitótico, porque el mismo efecto se observa a 7,5 nM (20X menos – panel izquierdo) y a 15 μ M (100X – panel derecho). Las diferencias observadas entre las líneas celulares no se deben a problemas de concentración intracelular, sino a las características biológicas de cada especie. La toma de imágenes se realizó cada 30 segundos con 8 planos en Z utilizando un objetivo de 63x (A.N 1,40). El procesado se realizó con FIJI aplicando la proyección máxima. Tras 1,5 horas del comienzo de adquisición de las imágenes, las células tratadas con 7,5 nM y 150 nM entran en mitosis, mientras que la célula tratada con 15 μ M lo hace media hora más tarde aproximadamente. En los tres casos, antes al romperse la envoltura nuclear se observa una corona de polos alrededor del núcleo y otra corona en la periferia. Dichos polos conforme avanza el vídeo se van fusionando unos con otros reduciéndose el número. Finalmente, todas las células evaden el punto de chequeo del huso, y han permanecido bloqueadas en c-mitosis durante aproximadamente 5,5, 7 y 6,5 horas respectivamente, originando células micronucleadas.

