



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

**CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO DE MUERTE CELULAR POR
CATÁSTROFE MITÓTICA INDUCIDO POR CURCUMINA EN LEUCEMIA
MIELOIDE CRÓNICA**

T E S I S

Que presenta

MACARIO MARTÍNEZ CASTILLO

**Para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOMEDICINA MOLECULAR**

Directores de la tesis:

Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda.

Dr. Emilio Joaquín Córdova Alarcón.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Biomedicina
Molecular del CINVESTAV

Agradecimientos

AI CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) por otorgarme la beca con número de registro 244953, para realizar mis estudios de Doctorado.

Agradezco:

Al Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda por permitirme trabajar en su laboratorio.

Al grupo de investigación del Dr. Villegas:

Biól. Raúl Bonilla Moreno

Dr. Job Alí Díaz Hernández

M. en C. Israel García Aguiar

Biól. Ivan Bautista Gaytan

QBP. Remberto Campos Conde

M. en C. Carolina Vaisman

Por su apoyo técnico a:

QFB. Leticia Alemán Lazarini

C. Víctor Manuel Ortiz Santiago

Al Dr. Emilio Joaquín Córdova Alarcón, por su asesoría y apoyo para la realización de esta tesis

Al comité tutorial:

Dra. Leticia Cedillo Barrón, Biomedicina Molecular, CINVESTAV.

Dra. Rosaura Hernández Rivas, Biomedicina Molecular, CINVESTAV.

Dr. Leopoldo Santos Argumedo, Biomedicina Molecular, CINVESTAV.

Dra. Araceli Hernández Zavala, Escuela Superior de Medicina-IPN.

Por el tiempo empleado para la asesoría y revisión de esta tesis

Dedicatoria

A mi madre, padre y hermana, muchas gracias por su infinita paciencia y apoyo.

1. ÍNDICE	1-4
2. ÍNDICE DE FIGURAS	5-6
3. ÍNDICE DE TABLAS	7
4. ABREVIATURAS	8-11
5. RESUMEN	12
6. ABSTRACT	13
7. INTRODUCCIÓN	14-33
7.1. Leucemias	
7.2. Curcumina	
7.3. Ciclo celular	
7.4. Mitosis	
<i>7.4.1. Etapas de la mitosis</i>	
<i>7.4.2. Astrina una proteína asociada a microtúbulos</i>	
7.5. Puntos de control del ciclo celular	
<i>7.5.1. Punto de control en G1/S</i>	
<i>7.5.2. Punto de control en la fase S</i>	
<i>7.5.3. Punto de control en G2/M</i>	
<i>7.5.4. Punto de control en Mitosis</i>	
7.6. Apoptosis	
<i>7.6.1. Vía extrínseca</i>	
<i>7.6.2. Vía intrínseca</i>	

7.7. Catástrofe mitótica

7.8. P73

7.8.1. Estructura de P73

7.8.2. Participación de P73 en el control de ciclo celular y apoptosis

8. ANTECEDENTES	34-39
9. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	40
10. HIPÓTESIS	41
11. OBJETIVO GENERAL	42
12. OBJETIVOS PARTICULARES	42
13. MATERIAL Y MÉTODOS	43-58
13.1. Cultivo celular y químicos	
13.2. Western blot	
13.3. fluorescencias	
13.4. Detección de H3S10-p y H3S10-p/Caspasa-3 por citometría de flujo	
13.5. LIVE/DEAD	
13.6. Fragmentación del DNA	
13.7. Ensayo de TUNEL	
13.8. Inmunoprecipitación	
13.9. Ensayos de digestión con Fosfatasas	
13.10. Extracción de RNA y obtención de Cdna	
13.11. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	
13.12. Ensayos de silenciamiento	

14.1. Arresto en Mitosis

14.1.1. Conteo de núcleos mitóticos

14.1.2. Niveles proteicos de H3S10-p

14.2. Alteraciones morfológicas en Mitosis

14.2.1. Efecto de la curcumina en el huso mitótico

14.2.2. Efecto de la curcumina en la segregación cromosómica

14.2.3. Efecto de la curcumina en proteínas de unión a microtúbulos

14.3. Muerte celular tipo apoptosis

14.3.1. Aumento de la permeabilidad de la membrana celular

14.3.2. Cambios en los niveles de proteínas promotoras de la apoptosis y anti-apoptóticas.

14.3.3. Efecto de curcumina en el procesamiento de las caspasas

14.3.4. Fragmentación del DNA

14.4. Muerte celular en mitosis

14.5. Puntos de control en G2 y Mitosis

14.5.1. Daño a DNA y marcadores de arresto en G2

14.5.2. Marcadores de activación del punto de control en Mitosis

14.6. P73 un posible regulador del arresto y muerte celular en mitosis

14.6.1. Localización de P73 en respuesta a curcumina

14.6.2. Modificaciones post-traduccionales de P73 inducidas por curcumina

14.6.3. Efecto de la curcumina en la expresión de algunos posibles genes blanco de P73

14.6.4. Asociación de P73 con BUBR1 en respuesta a curcumina

14.6.5. Efecto del silenciamiento parcial de P73 en la inducción de arresto celular en respuesta a curcumina

15. DISCUSIÓN	99-110
16. CONCLUSIÓN	111
17. PERSPECTIVAS	112
18. REFERENCIAS	113-123

2. ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Fases de la Mitosis.

Figura 2. Estructura de los miembros de la familia de P53.

Figura 3. En la línea celular K562, curcumina induce un arresto en la fase G2/M y muerte celular.

Figura 4. Curcumina induce un aumento en la cantidad de núcleos mitóticos.

Figura 5. Curcumina induce un aumento en el marcador de mitosis, H3S10-p.

Figura 6. Curcumina induce alteraciones en la arquitectura del huso mitótico.

Figura 7. Curcumina induce anormalidades nucleares.

Figura 8. Curcumina induce una localización polar de Astrina.

Figura 9. Curcumina promueve la fosforilación de Astrina.

Figura 10. Curcumina induce alteraciones en la permeabilidad celular.

Figura 11. Curcumina induce cambios en los niveles de proteínas anti-apoptóticas, procesamiento de caspasas y corte de PARP.

Figura 12. Curcumina induce la fragmentación del DNA.

Figura 13. Curcumina induce la muerte celular en mitosis.

Figura 14. Curcumina induce focos de daño a DNA.

Figura 15. Curcumina altera los niveles proteicos de algunos componentes del punto de control en G2.

Figura 16. Curcumina modifica los niveles proteicos de algunos componentes del punto de control en Mitosis.

Figura 17. La línea celular K562 no expresa P53

Figura 18. Curcumina induce la localización nuclear de P73.

Figura 19. Curcumina induce marcas de activación en P73 a nivel nuclear.

Figura 20. Efecto de la curcumina en la expresión de algunos de los genes regulados por P73.

Figura 21. Asociación de BUBR1 y P73 en condiciones de tratamiento con curcumina.

Figura 22. Silenciamiento de P73.

Figura 23. Efecto del silenciamiento de P73 en la distribución del ciclo celular en respuesta a curcumina.

Figura 24. Modelo de los mecanismos moleculares activados por curcumina en las células K562.

3. ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Porcentajes de núcleos mitóticos.

Tabla 2. Efecto de curcumina en el huso mitótico.

Tabla 3. Efecto de curcumina en la morfología nuclear.

Tabla 4. Porcentaje de muerte celular en respuesta a curcumina.

Tabla 5. Porcentaje de células TUNEL positivas.

Tabla 6. Porcentaje de células H3S10-p, Caspasa-3 y H3S10-p/Caspasa-3 positivas.

4. ABREVIATURAS.

APC/C	Complejo promotor de la Anafase/Ciclosoma (<i>Anaphase Promoting Complex/Cyclosome</i>).
ATM	Ataxia Telangiectasa Mutada (<i>Ataxia-Telangiectasia Mutated</i>).
ATP	Adenosina Trifosfato (<i>Adenosine triphosphate</i>).
ATR	Ataxia Telangiectasa relacionada a Rad3 (<i>Ataxia Telangiectasia and Rad3-related</i>).
AIF	Factor Inductor de Apoptosis (<i>Apoptosis-inducing factor</i>).
Apaf	Factor Activador de Proteínas Apoptóticas (<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>).
BH	Homología a Bcl-2 (<i>Bcl-2 Homology</i>)
BSA	Albúmina Sérica Bovina (<i>Bovine serum albumin</i>).
CAK	Cinasa activadora de Cdk (<i>CDK-activating kinase</i>).
CARD	Dominio de Reclutamiento de Caspasas (<i>Caspase activation and recruitment domain</i>).
CDK	Cinasa dependiente de ciclinas (<i>Cyclin-dependent kinase</i>)
CHK1, 2	Cinasa de punto de control 1 y 2 (<i>Checkpoint kinase 1, 2</i>).
Ctrl	Control
Cur	Curcumina
CKI	Inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor</i>).
DD	Dominio de muerte (<i>Death Domain</i>).
Desv. stn.	Desviación estándar
DED	Dominio efector de muerte (<i>Death effector domain</i>).
DISC	Dominio de Señalización Inductor de Muerte (<i>Death-Inducing Signaling Complex</i>).
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleotide acid</i>).

DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilendiaminotetra acético (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>).
FADD	Dominio de muerte asociados a Fas (<i>Fas Associated Via Death Domain</i>).
FASL	Ligando de Fas (<i>Fas ligand</i>).
G1	Gap 1
G2	Gap-2
h	Horas
IAPs	Proteínas inibidoras de la Apoptosis (<i>Inhibitors of apoptosis proteins</i>).
IP	Inmunoprecipitación (<i>Immunoprecipitation</i>).
kDa	Kilo Daltones
LMC	Leucemia Mieloide Crónica
M	Mitosis
MAPs	Proteínas Asociadas a Microtúbulos (<i>Microtubule-associated proteins</i>).
MCC	Complejo del punto de control mitótico (<i>Mitotic Checkpoint Complex</i>).
min	Minutos
mJ	miliJoules
mN	Multi/micronúcleos
MPF	Factor Promotor de la Mitosis (<i>Mitosis-promoting factor</i>).
N.I	Núcleo interfásico
Noco	Nocodazol

PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida (<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>).
PARP	Poly (ADP) Ribosa Polimerasa (<i>poly ADP ribose polymerase</i>).
pb	Pares de bases
PBS	Solución Salina amortiguadoras de Fosfatos (<i>Phosphate-buffered saline</i>).
PCNA	Antígeno nuclear de células proliferando (<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>).
PFA	Paraformaldehído
PLK	Cinasas tipo polo (<i>Polo-like kinase</i>).
PPasa	Fosfatasa (<i>Phosphatase</i>).
RB	Retinoblastoma
RNA	Ácido Ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>).
RPA	Proteína de Replicación A (<i>Replication protein A</i>).
s	segundos
S	Síntesis
SAC	Punto de control de ensamblaje del huso (<i>Spindle Assembly Checkpoint</i>).
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>).
Staur	Estaurosporina (<i>Staurosporine</i>).
T14	Treonina 14
TKIs	Inhibidores de tirosina cinasas (<i>Tyrosine kinase inhibitors</i>).
TNF	Factor de necrosis tumoral (<i>Tumor necrosis factor</i>)
TNFR	Receptor del Factor de necrosis tumoral (<i>Tumor necrosis factor receptor</i>).
TRADD	Dominio de muerte Asociado a TNFR (<i>(TNFR1)-associated death domain</i>).

TRAIL	Ligando Inductor de Apoptosis relacionado a TNF (<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>).
UV	Luz Ultravioleta
v/v	volumen/volumen
V	Volts
Y15	Tirosina 15

5. RESUMEN.

La curcumina es un fitoquímico proveniente de los rizomas de la planta *Curcuma longa* con capacidades tanto citostáticas como citotóxicas en diferentes líneas tumorales y modelos animales de carcinogénesis. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de la curcumina para activar un proceso de catástrofe mitótica en una línea celular derivada de Leucemia Mieloide Crónica (K562). Mediante morfología nuclear y análisis de marcadores mitóticos (H3S10-p) determinamos la capacidad del fitoquímico para inducir un arresto en mitosis. Las células arrestadas presentaron alteraciones en la arquitectura del huso mitótico, defectos en la segregación cromosómica y cambios en los patrones de localización de proteínas como Astrina. Analizamos los niveles proteicos de algunos componentes del punto de control en G2 (p-CHK1, 14-3-3 σ , P21) y del punto de control de ensamblaje del huso (BUBR1, Securina), encontrando que probablemente este último, pudiera estar activo y participando en el arresto en mitosis inducido por curcumina.

Adicionalmente, la curcumina activa un mecanismo de muerte celular tipo apoptosis, con un aumento en la permeabilidad de la membrana celular, reducción en los niveles de proteínas anti-apoptóticas (BCL-2, XIAP), procesamiento de caspasas y fragmentación del DNA, específicamente en la fase G2/M. Detectamos una población mitótica positiva para caspasa-3 activa, que posiblemente pudiera estar muriendo por catástrofe mitótica.

En un sistema carente de P53, como es K562, analizamos la localización nuclear y activación de P73, un posible regulador del proceso de catástrofe mitótica. No detectamos aumento en la expresión de genes asociados con arresto (P57, P21) y muerte celular (BAX, BIM), que pueden ser regulados por P73; ni tampoco su interacción con miembros del SAC (BUBR1). En conclusión la curcumina activa un mecanismo de catástrofe mitótica en K562.

6. ABSTRACT.

Curcumin is a phytochemical from the rhizomes of the plant *Curcuma longa* with both cytostatic and cytotoxic effects in different cancer cells and animal models of carcinogenesis.

The aim of the study was to evaluate the effect of curcumin to induce mitotic catastrophe in a model of Chronic Myeloid Leukemia (K562). Nuclear morphology and mitotic markers (p-H3S10) were used to determine mitotic arrest. The arrested population exhibited mitotic spindle alterations, chromosome segregation defects and delocalization of microtubule associated proteins, like Astrin. After analyze protein levels of some components of G2 checkpoint (p-CHK1, 14-3-3 σ , P21) and Spindle Assembly Checkpoint (BubR1, Securin, Cyclin B1), our data suggested that possibly this system is active and participate in mitotic arrest.

Additionally, curcumin activates cell death mechanisms, like apoptosis with increased membrane cell permeability, reduction of anti-apoptotic proteins (BCL-2, XIAP), caspase cleavage and DNA fragmentation specifically in the G2/M phase. Our data suggest the presence of a mitotic cell population, which was positive for active caspase-3 that was dying by mitotic catastrophe.

We analyze the localization and activation of P73, a possible regulator of mitotic catastrophe in P53 deficient cells. No increase was detected in the expression of genes associated with cell cycle arrest (P57, P21) and cell death (BAX, BIM), that could be P73 regulated. Neither P73 interaction with BUBR1, a SAC member, was detected.

In conclusion, curcumin activates a mitotic catastrophe mechanism in K562 cells.

7. INTRODUCCIÓN.

7.1. Leucemias

La leucemia es un cáncer hematopoyético que involucra una maduración anormal de las células sanguíneas a partir de las células madre de la médula ósea. Como resultado, la sangre y la médula ósea de un paciente con leucemia contienen un gran número de células sanguíneas inmaduras y anormales que son incapaces de funcionar adecuadamente (blastos). Esto conduce a los síntomas típicos de la leucemia, que incluyen pérdida de peso, fiebre, dolor de hueso y articulaciones, malestar, fatiga, debilidad, sangrados anormales, un incremento en la susceptibilidad a infecciones y un agrandamiento del bazo y en algunas ocasiones del hígado [1]. En el 2012 se reportaron a nivel mundial, 200,676 nuevos casos de leucemia y 151,321 defunciones asociadas a dicho cáncer. En el mismo año en México hubo una incidencia de 6,325 casos y 4,264 muertes causadas por la leucemia [2].

Las leucemias pueden ser clasificadas de acuerdo al grado de diferenciación de las células anormales, así como de la estirpe celular de la cual provienen. De esta forma, las leucemias pueden ser agudas, cuando las células de la médula ósea no maduran o crónicas cuando solamente maduran de forma parcial [3]. Además, se clasifican en linfoides cuando se inician a partir de linfocitos o mieloides cuando se inician de células mieloides en etapa temprana, como eritrocitos y megacariocitos. Con base en lo anterior las leucemias se suelen dividir en cuatro grupos principales: Leucemia mieloide aguda (LMA), Leucemia mieloide crónica (LMC); Leucemia linfocítica aguda (LLA) y Leucemia linfocítica crónica (LLC) [3].

La LMC representa un desorden mieloproliferativo clonal que afecta el linaje mieloide, monocítico, eritroide, megacariocítico y de células B y explica el 15 % de todas las leucemias en adultos [4]. La LMC progresa a través de tres fases clínicas, una primer fase crónica que se caracteriza por la excesiva proliferación del linaje de las células mieloides en la médula ósea; una fase

acelerada y finalmente una etapa agresiva e inestable, conocida como crisis blástica donde se presenta una excesiva cantidad de blastos indiferenciados en la médula ósea y sangre periférica [5]. Otro criterio de clasificación se basa en la presencia de blastos en sangre periférica o en la médula ósea. La fase crónica, acelerada y de crisis blástica, se caracterizan por tener de 0-15%, 16-30% y > 30% de blastos [6].

La LMC se caracteriza por la presencia del cromosoma Filadelfia que resulta de una translocación recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22 t(9;22)(q34;q11). El producto de dicha translocación es el gen de fusión BCR-ABL, que codifica para una proteína híbrida, cuyo producto proteico más común es una proteína quimérica de 210 kDa, con función constitutiva de cinasa de tirosina. La actividad exacerbada de esta proteína es fundamental en la etiología de la enfermedad, ya que favorece la activación de rutas de proliferación y supervivencia [6, 7].

Un incremento en la expresión de BCR-ABL, es un evento causal en la progresión de la LMC de una fase acelerada a una crisis blástica. Además de BCR-ABL, en la evolución de la enfermedad se presentan otras anomalías cromosómicas tales como trisomía 8 (~40%), doble cromosoma Filadelfia (~ 38%) e isocromosoma 17q (~ 21%) [8]. Algunas de estas alteraciones, se traducen en eventos genéticos de carácter oncogénico, tales como la pérdida del supresor de tumores P53, amplificación de MYC, el rearrreglo/delección de los genes de Retinoblastoma y el inhibidor de CDK's, p16INK4A [6].

Inicialmente, para tratar los síntomas de la LMC, se utilizaron agentes citotóxicos como el arsénico, busulfan e hidroxiaurea, que sólo limitaban parcialmente la proliferación de los blastos, pero que no eliminaban la enfermedad. La introducción del trasplante alogénico permitió la eliminación de clones positivos para Filadelfia, lo que incrementó la supervivencia de los pacientes, pero tiene una clara limitante, la disponibilidad de donadores. Posteriormente, el uso de la terapia con interferon- α , permitió una respuesta

citogenética completa y una mayor supervivencia, pero no en todos los pacientes [9].

Sin embargo, el surgimiento de inhibidores para la función de tirosina cinasa (TKIs) de la proteína quimérica BCR-ABL, cambió significativamente la terapia para la LMC. El primero de estos compuestos fue el imatinib, el cual interfiere con la interacción entre BCR-ABL y el ATP. Es decir, que pese al éxito terapéutico que significaron los TKIs, se estima que aproximadamente un 20 a 30% de los pacientes con LMC, fracasan en responder a imatinib o experimentan una recaída, después de una respuesta inicial [11]. En la actualidad, múltiples TKIs han sido aprobados para el tratamiento de la LMC. En el caso de pacientes de reciente diagnóstico se utiliza con mayor frecuencia el imatinib, y en algunos casos el dasatinib y el nilotinib; mientras que para pacientes con recaída y enfermedad refractoria se utilizan el dasatinib, nilotinib, bosutinib y ponatinib [9, 10]. La existencia de estos fenotipos resistentes plantea la necesidad de continuar la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas.

7.2. Curcumina

En la búsqueda de alternativas para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer ha surgido el estudio de los quimiopreventores, sustancias de origen natural o sintético, capaces de retardar, detener o revertir el proceso de carcinogénesis. Sus efectos se deben en parte, a su capacidad para inducir diferentes sistemas celulares de detoxificación y antioxidación. Adicionalmente, los quimiopreventores tienen un impacto en la modulación de diversos eventos celulares, como la reparación del DNA, la progresión del ciclo celular, la diferenciación, la apoptosis y la angiogénesis y metástasis. Muchos de los quimiopreventores son fitoquímicos frecuentes en la dieta, como el resveratrol (uvas), el epigallocatequina-3-galato (té verde), el sulforafán (Brocolí) y la curcumina (Curry) [12].

La curcumina es un componente de la Cúrcuma, una especia que se obtiene de los rizomas secos de la planta *Curcuma longa*. La cúrcuma contiene tres principales curcuminoides: curcumina, dimetoxicurcumina y bisdimetoxicurcumina. Sin embargo, la curcumina es el más abundante, constituyendo aproximadamente 2- 5% de la cúrcuma [13].

La curcumina es un polifenol de coloración amarilla [1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona], también conocido como diferuloilmetano, de fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_6$ y un peso de 368.37 g/mol, soluble en solventes orgánicos como dimetilsulfóxido, acetona, etanol, ácido acético, cloroformo y diversos aceites [14]. Es una molécula poco estable, porque es sensible al pH alcalino, oxígeno y la irradiación con luz ultravioleta y visible [15]. Su principal desventaja es su baja biodisponibilidad, debido a que es pobremente absorbida, rápidamente metabolizada y eliminada de la circulación sistémica. A nivel de metabolismo, la curcumina es primero biotransformada a dihidrocurcumina y tetrahidrocurcumina por reductasas, posteriormente éstas especies son sustratos de la glucuronidasa que les conjuga monoglucoronidos. Así las principales metabolitos que se eliminan incluyen formas de curcumina conjugadas a glucoronidos o sulfatos [15, 16].

La curcumina se ha empleado como un componente importante de la medicina tradicional, principalmente en el sureste asiático. Sus propiedades anti-inflamatorias han sido aprovechadas en el tratamiento de desórdenes biliares, hepáticos; cólicos, dolores dentales, de cabeza; sinusitis, reumatismo, así como antiséptico y analgésico en procesos de cicatrización [17].

Complementariamente, estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado la capacidad de la curcumina para inhibir la proliferación y sobrevivencia de distintos tipos de cáncer [14]. Este potencial anti-tumoral de la curcumina, parece residir en su capacidad para modular una gran cantidad de blancos moleculares y vías relacionadas con el proceso carcinogénico. Entre estas se incluyen la activación de apoptosis, modulación de reguladores del cic

celular, inhibición de rutas de resistencia como NF- κ B, angiogénesis y procesos de invasión [17, 18].

7.3 Ciclo celular

El ciclo celular es el proceso por el cual una célula duplica su genoma, crece y se divide en dos células hijas. Este fenómeno se suele dividir en cuatro fases: un periodo de crecimiento (G1) donde las proteínas, RNA y membranas son sintetizadas. Seguida de una fase de síntesis o replicación del DNA (S). Después de un segundo periodo de crecimiento (G2), la célula se divide durante la Mitosis (M), en la cual el material genético es distribuido equitativamente entre las dos células hijas [19].

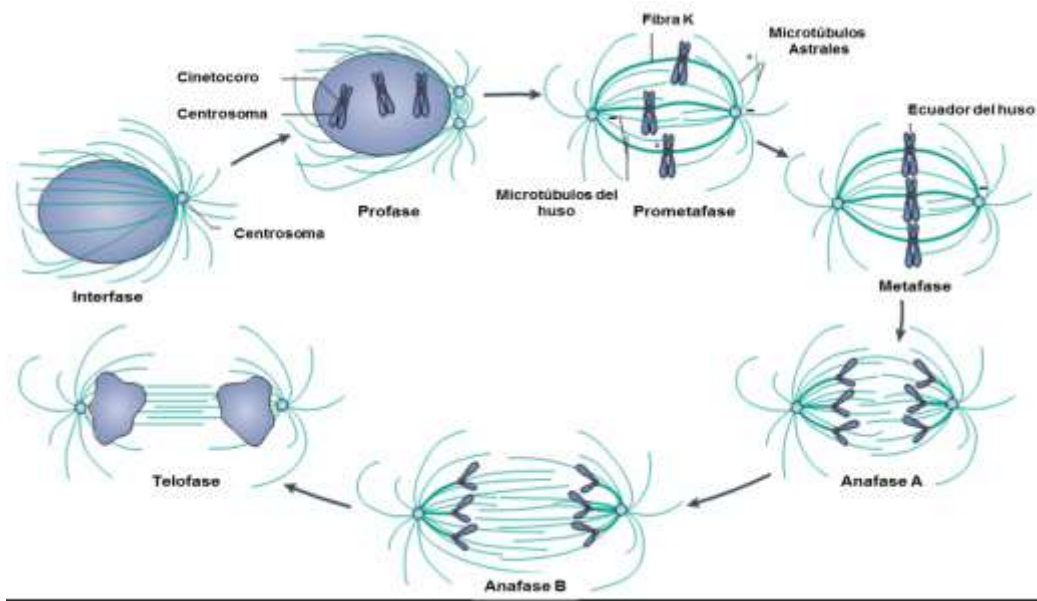
Este proceso se encuentra regulado por la formación, activación e inactivación de una serie de moléculas regulatorias que incluyen las ciclinas (subunidades regulatorias) y las Cinasas dependientes de Ciclinas, CDK's (subunidades catalíticas). Diferentes ciclinas se unen específicamente a diferentes CDK's para formar complejos que regulan fases específicas del ciclo y controlan la transición de una fase a otra. Por ejemplo, la presencia de factores de crecimiento, induce la expresión de Ciclina D, la cual forma complejos con la CDK4 o la CDK6, para controlar la progresión del ciclo celular a través de G1, mediante la fosforilación de sustratos, tales como miembros de la familia de Retinoblastoma (Rb). La proteína Rb es una de las proteínas *pocket* que en su forma hipofosforilada secuestra a factores de transcripción de la familia E2F. La hiperfosforilación de Rb mediada por el complejo ciclina D/CDK4, libera a E2F, permitiendo la expresión de genes necesarios para la síntesis de DNA y ciclina E. A continuación se forma el complejo ciclina E/CDK2, que es importante para la transición G1/S. Propiamente en la fase S la progresión es controlada por el complejo de ciclina A/CDK2; mientras que ciclina A/CDK1 y ciclina B/CDK1 son determinantes para el tránsito y control de la fase G2 y M, respectivamente [20].

Durante la progresión del ciclo celular la regulación de los complejos ciclina/CDK, depende de modificaciones post-traduccionales. Muchos miembros de la familia de las CDK's, poseen sitios de fosforilación inhibitorios (Treonina 14, T14; Tirosina 15, Y15 en CDK1) y activadores (Treonina 161, T161 en CDK1). La fosforilación en T14 y Y15 dentro del sitio de unión a ATP, por las cinasas inhibitorias WEE1 y MYT1, respectivamente, interfiere con el apropiado alineamiento del ATP. Mientras que la fosforilación en T161 en el loop-T por la cinasa activadora de CDK'S (CAK) mejora la unión al sustrato y la estabilidad del complejo [21]. En consecuencia, los residuos de T14 y Y15 deben ser defosforilados por la familia de fosfatasas CDC25 (A, B, C), para la total activación del complejo [22].

Otro nivel de regulación, lo constituyen los inhibidores de CDK (CKIs), que interaccionan con los diferentes complejos ciclina/CDKs y los inhiben. Los CKIs se dividen en dos clases: los miembros de la familia INK4 (p16INK4a, p15INK4b, p18INK4c y p19INK4d) y los miembros de la familia CIP/KIP (p21CIP1, p27KIP1 y p57KIP2). Los inhibidores del tipo INK4, bloquean la formación de los complejos de ciclina D/CDK4, 6; mientras que los CIP/KIP son más promiscuos e inhiben los distintos complejos de ciclina/CDK; al obstruir el sitio de unión a ATP en el dominio catalítico de la CDK [23].

7.4. Mitosis

La mitosis consiste de dos distintos procesos: división del núcleo o cariocinesis y división del citoplasma o citocinesis. La mitosis se ha dividido de forma clásica en cinco etapas: profase, prometafase, metafase, anafase y telofase (Figura 1) [24].



7.4.1. Etapas de la mitosis

En la profase la cromatina comienza a condensarse, para formar cromosomas claramente definidos. Conforme la profase progresa, aumenta la condensación de los cromosomas, el nucléolo se disipa, y los microtúbulos citoplasmáticos de interfase se reorganizan en dos arreglos focales, conocidos como ásteres, que emanan de los centrosomas, los principales centros organizadores de microtúbulos. Cuando los centrosomas han migrado a lados opuestos del núcleo, se inicia el ensamblaje de una estructura bipolar, conformada por microtúbulos, que se conoce como huso mitótico. Esta estructura es la responsable de la segregación cromosómica durante la mitosis [24, 25].

En vertebrados el final de la profase y el comienzo de la prometafase están marcados por la ruptura de la envoltura nuclear. Durante la prometafase

cada cromosoma inicialmente se orienta a un polo del huso, un proceso que está mediado por la unión de microtúbulos a los cinetócoros, una estructura proteica localizada en la superficie de los centrómeros. Posteriormente, microtúbulos derivados en su gran mayoría del polo opuesto se unen a otro cinetocoro hermano y los cromosomas se tornan biorientados e inician un proceso de congresión que involucra el movimiento de los cromosomas hacia el ecuador del huso [24].

Se considera que la célula está en metafase cuando todos los cromosomas están biorientados y posicionados cerca del ecuador del huso, formando la placa metafásica. También durante esta etapa la distancia entre los polos del huso se reduce, tornándose más compacto [25]. La Anafase, comienza cuando las cromátides hermanas de cada cromosoma replicado se separan y migran hacia los polos opuestos del huso. Esta etapa suele ser subdividida en anafase A y B. Durante la anafase A las dos cromátides de cada uno de los cromosomas pierden su cohesión, se separan y se mueven hacia los polos opuestos. Mientras que, durante la anafase B, el huso mitótico se alarga, incrementando la distancia entre los dos polos [24].

Finalmente, durante la telofase desaparecen los microtúbulos cinetócoricos y se alargan los microtúbulos polares; cada grupo de cromosomas se descondensa y se restablece la envoltura nuclear para formar dos núcleos hijos. Al final de esta etapa comienza a formarse una hendidura entre los núcleos separados, que empleando una fuerza de constricción proporcionada por un anillo de actinmiosina, se contrae dando origen a una estructura formada por microtúbulos agrupados que se conoce como cuerpo medio. Esta estructura participa en la división del citoplasma y la formación de dos células hijas durante la citocinesis [24, 25].

7.4.2. *Astrina* una proteína asociada a microtúbulos

La adecuada progresión de la mitosis no sólo depende de la polimerización de los dímeros de α/β - tubulina que constituyen los microtúbulos del huso mitótico; sino de la estabilidad y el comportamiento dinámico de dicha estructura. Para ello son importantes una amplia clase de proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs, *Microtubule Associated Proteins*) [24]. Las MAPs participan en la organización y mantenimiento del huso bipolar, la unión de los microtúbulos a los cinetócoros, el movimiento de los cromosomas y la formación de la hendidura de ruptura durante la citocinesis [24].

Una de dichas MAPs, es la *Astrina*, un componente del huso mitótico que estabiliza los microtúbulos, participa en el alineamiento de los cromosomas, la segregación de las cromátidas y la integridad de los centrosomas [27-29]. Además, la *Astrina* tiene un papel en promover la estabilidad de las uniones entre microtúbulos y cinetocoros, un evento que es clave para el silenciamiento de sistema que controla la transición de metafase a anafase [30].

7.5. Puntos de control de ciclo celular

Los puntos de control son vías de transducción de señales que permiten detectar DNA dañado o anormalmente estructurado y coordinar la progresión del ciclo celular con la reparación del DNA. La activación de un punto de control del ciclo celular retrasa o detiene la progresión del ciclo, confiriendo una ventana de tiempo para que los mecanismos de reparación del DNA corrijan el daño, antes de que pueda fijarse y heredarse a la siguiente generación de células hijas [31]. Los puntos de control del ciclo celular existen en la transición G1-S, G2-M, además en la fase S y la Mitosis.

7.5.1. Punto de control en G1/S

En respuesta al daño en el DNA, la cinasa ATM/ATR fosforila a la variante de histona H2AX (γ -H2AX) en el DNA adyacente al sitio de la lesión. Esta marca amplifica la señal y permite la activación de CHK2 que fosforila a CDC25A, marcándola para ubiquitilación y su posterior degradación proteosómica. La inactivación de la fosfatasa impide que se retiren las fosforilaciones inhibitorias en los residuos Thr14 y Tyr15 de CDK2, impidiendo su asociación con ciclina E, una etapa necesaria para la progresión G1/S [32, 33]. Además de esta ruta de respuesta rápida basada en modificaciones post-traduccionales, existe una lenta que involucra la estabilización de P53 y la activación de su programa transcripcional. En ella participan, ATM/ATR y CHK1/CHK2 que fosforilan a P53 induciendo su activación transcripcional y su estabilidad al reducir su afinidad por MDM2, su principal ubiquitina-ligasa. Esto reditúa en la inducción transcripcional de P21, que inhibe los complejos de CDK2-Ciclina E. Este bloqueo dependiente de P53 mantiene el arresto iniciado por la ruta de CDC25A, proporcionando el tiempo suficiente para la reparación del DNA dañado [32].

7.5.2. Punto de control en la fase S

Alteraciones en el proceso de síntesis del DNA, tales como el arresto de la horquilla de replicación, producen amplias regiones de cadena sencilla, que funcionan como señales de año, a las cuales se unen las proteínas RPA. A estas zonas son reclutados el complejo ATR-ATRIP y otros mediadores como el complejo tipo RFC (*Replication Factor C*), el complejo 9-1-1 y TOBP1 (*Topoisomerase-binding protein-1*). [34]. Estos elementos finalmente favorecen la activación de ATR que transduce la señal a CHK2, que fosforila dos factores que juegan un papel clave durante la iniciación de la replicación de cromosomas en cada origen: la subunidad DBF4 de la cinasa CDC7 y la proteína SLD3. La inhibición de estos factores previene la activación de la DNA helicasa replicativa en los orígenes y bloquea el establecimiento de las horquillas de replicación del DNA [35]. También CHK2 puede inactivar a

miembros de la familia de fosfatasa CDC25A, impidiendo la funcionalidad adecuada de los complejos CDK2/Ciclina A/E, que son claves para la activación del complejo de helicasa MCM 2-7 en los orígenes de replicación.

7.5.3. Punto de control en G2/M

De forma similar al punto de control en G1, el daño a DNA causa la activación de ATM/ATR, que produce la fosforilación de la cinasa CHK1, que regula negativamente a CDC25C al fosforilarla en Ser216 y crear un sitio de unión para las proteínas 14-3-3, que secuestran a la fosfatasa en el citoplasma. Dicha fosforilación inhibitoria también puede ser catalizada por la ruta $ATM \rightarrow CHK2$ y $ATM \rightarrow PLK3$.

También se ha descrito que el mismo eje $ATR/ATM \rightarrow CHK1/CHK2$, fosforila a cinasas como WEE1 y PLK1, promoviendo su funcionalidad e inactivación, respectivamente. Estas modificaciones aumentan la actividad inhibitoria de WEE1 sobre CDC2 e impiden que PLK1 promueva la entrada a Mitosis al fosforilar y activar a CDC25C [32].

Finalmente, a través de la ruta de $ATM/ATR \rightarrow CHK1/CHK2$ se promueve la estabilidad de P53 que induce la expresión de P21. Este CKI, puede inhibir directamente a ciclina B/CDC2 y es capaz de bloquear la fosforilación activadora en Thr 161, mediada por CAK. Indirectamente, P21 puede asociarse al complejo PCNA-ciclina B/CDC2, al que normalmente se une CDC25C para defosforilar a CDC2. Consecuentemente, de esta forma P21 permite que Ciclina B/CDC2 se mantenga en un estado inactivo [32].

7.5.4. Punto de control en Mitosis

Un mecanismo esencial para garantizar el establecimiento adecuado de uniones biorientadas en los cromosomas, lo constituye el punto de control de ensamble del huso (SAC, *Spindle Assembly Checkpoint*) o punto de control mitótico (MCC, *Mitotic Checkpoint Complex*). Este sistema detecta el estado de la interacción entre cinetócoros y microtúbulos y ante la pérdida de unión

o tensión entre dichas estructuras, posterga el inicio de la anafase hasta que todos los cromosomas estén biorientados [36]. Las proteínas del SAC conservadas en los eucariotas incluyen las Ser/Thr cinasas MPS1 y BUB1, una probable pseudo-cinasa, BUBR1 y otros componentes como MAD1, MAD2 y BUB3. Estas proteínas retrasan la segregación cromosómica errónea, a través de la inactivación de CDC20, un co-factor de la E3 ubiquitina ligasa, Complejo Promotor de la Anafase (APC/C, *Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*).

Normalmente, APC/C a través de CDC20 reconoce y promueve la ubiquitilación y posterior degradación por el proteosoma de la securina (un inhibidor de la enzima separasa, la cual corta proteolíticamente los complejos de cohesinas) y ciclina B (el regulador maestro de la progresión en mitosis); favoreciendo la segregación cromosómica y la salida de mitosis, respectivamente [37].

La subunidad APC10 de APC/C junto con CDC20, forman un sitio de reconocimiento de secuencias de destrucción (D-box, *Destruction-box*), presentes en securina y ciclina B. Cuando el SAC está activo se cataliza la formación de un complejo inhibitorio de CDC20, conocido como Complejo del punto de control mitótico (MCC, *Mitotic Checkpoint Complex*) que consiste en un heterotetrámero formado por CDC20, MAD2, BUBR1 y BUB3. Las consecuencias funcionales de este secuestro es que los sitios de reconocimiento de D-box, presentes en CDC20 son bloqueados por la unión a BUBR1; se impide la interacción de CDC20 con la subunidad APC10 y se promueve la autoubiquitilación de CDC20 por APC/C, que deriva en su degradación proteosómica [37].

El evento clave para la activación del SAC involucra el reclutamiento ordenado de los componentes del sistema a los cinetocoros no unidos a microtúbulos. Las primeras en ser reclutadas parecen ser las cinasasa Aurora B y MPS1, que se unen a las proteínas KNL1-NDC80 del cinetocoro. Seguido del reclutamiento del complejo BUB1-BUB3, posteriormente BUBR1-

BUB3 y finalmente un heterotetramero compuesto de MAD1-MAD2. Este último es clave al servir como molde para catalizar la conversión de las formas libres o conformacionalmente abiertas de MAD-2 (O-MAD-2, *Open-MAD2*) a su versión cerrada (C-MAD-2, *closed MAD-2*) que es la que se une y secuestra a CDC20 [36].

Después de que todas las cromátides se han unido apropiadamente a los cinetocoros, el punto de control de mitosis, debe ser apagado para permitir la activación del complejo APC/C y el avance hacia la Anafase. El silenciamiento del SAC se puede dar a través de varios mecanismos: 1) la remoción de sus componentes (MAD1, MAD2) de los cinetocoros, a través de proteínas motoras, tipo el complejo dineína/dinactina. 2) La unión de la proteína p31COMET a la forma activa, C- MAD-2, del cinetocoro, lo que impide que pueda seguir funcionando como molde para la conversión de la forma O-MAD-2 a C-MAD-2; 3) La fosforilación inhibitoria de MAD2 en múltiples sitios en su C-terminal, que posiblemente puede ser catalizada por MPS-1 y 4) un aumento en la actividad de PP1 que desfosforila en el cinetocoro varios blancos importantes para el SAC [38, 39].

7.6. Apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que se encuentra regulada a nivel genético; permite la eliminación ordenada y eficiente de células dañadas, sin la activación de procesos inflamatorios. Las células en apoptosis se caracterizan por una contracción del citoplasma celular; plegamiento de la membrana plasmática y exposición de fosfatidilserina en la cara extracelular. Además, pérdida de la integridad de la membrana, modificación ultraestructural de organelos, condensación de la cromatina y fragmentación del DNA en sus etapas tardías [40]. Los componentes clave para la evolución del proceso apoptótico lo constituyen una familia de cisteína proteasas conocidas como caspasas. Estas enzimas cortan sus sustratos blanco en una forma específica, después de un residuo de ácido aspártico, en un contexto de aminoácidos de un tetrapéptido corto (X-X-X-

Asp). Las caspasas se clasifican en iniciadoras (caspasa-2, -8, -9 y -10) que son responsables de comenzar la vía apoptótica y efectoras (caspasa-3, -6 y -7) que son las encargadas del corte definitivo de ciertas proteínas celulares [41]. Estas proteasas se producen inicialmente como procaspasas monoméricas inactivas, que requieren dimerizar y frecuentemente ser procesadas para su activación. Este proceso es regulado mediante dos vías: la vía extrínseca o de receptores de muerte y la vía intrínseca o mitocondrial.

7.6.1. Vía extrínseca

Esta ruta se enciende mediante la interacción de ligandos extracelulares, como el Factor de Necrosis Tumoral (TNF, *Tumor necrosis factor*), el ligando de Fas (FasL, *Fas Ligand*) o el ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF (TRAIL, *TNF-related apoptosis-inducing ligand*), con el dominio extracelular de receptores transmembranales de muerte, tales como: TNFR1, FAS (CD95/Apo-1) y TRAILR1 (DR4)/ TRAILR2 (DR5), respectivamente.

Los receptores de muerte se caracterizan estructuralmente por la presencia de un dominio intracelular de muerte (DD, *Death Domain*). Después de interactuar con sus ligandos, los receptores de muerte se oligomerizan y exponen sus dominios DD a través de los cuales son reclutadas las proteínas FADD o TRADD, dependiendo si el receptor activado es FasL o TNFR1. Estas proteínas adaptadoras, presentan otro dominio de interacción llamado dominio efector de muerte (DED, *Death Effector Domain*), que interacciona con el dominio DED presente en las pro-caspasas iniciadoras 8/10 [40, 42]. El resultado final es la formación de una plataforma de muerte conocida como Complejo de Señalización Inductor de Muerte (DISC, *Death-Inducing Signaling Complex*), que incrementa la concentración local de la pro-caspasa-8 y promueve su proximidad, procesamiento y auto-activación. La caspasa-8 activa cataliza el procesamiento de las caspasas efectoras -3, -6 y -7 y el correspondiente corte de diferentes sustratos celulares. En algunas circunstancias la señal de muerte es amplificada mediante el corte proteolítico de la proteína BID a través de la caspasa-8, generando el

fragmento activo, BID truncada (t-BID), que directamente activa a otras proteínas pro-apoptóticas, para inducir la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial y en consecuencia activar la vía intrínseca de la apoptosis [40].

7.6.2. Vía intrínseca

La vía apoptótica intrínseca o mitocondrial se activa en respuesta a una gran variedad de estímulos, tales como daño a DNA, ausencia de factores de crecimiento, hipoxia y estrés en el Retículo endoplasmático. Estas señales finalizan en la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, que comúnmente se encuentra regulada por interacciones proteína-proteína entre miembros de la familia BCL-2 que comparten uno o más dominios de homología a BCL-2 (BH, *Bcl-2 Homology*) [43]. Esta familia se clasifica en tres subtipos principales: los miembros antiapoptóticos que incluyen a BCL2, BCLXL, BCLW, MCL1 y BFL1/A1 que comparten homología estructural en los dominios BH1, 2, 3 y 4. Estas proteínas interactúan directamente con las proteínas proapoptóticas de la subfamilia only-BH3: BIM, PUMA, BAD, BID, BIK, BMF, HRK y NOXA. En respuesta a un estímulo apoptótico se incrementan los niveles de las proteínas only-BH3 y se disminuyen los de la subfamilia antiapoptótica, BCL-2. Las alteraciones en este equilibrio conducen a la activación de las proteínas efectoras proapoptóticas: BAK y BAX, que se ensamblan en grandes oligómeros que al insertarse en la membrana externa mitocondrial, favorecen su permeabilidad. Como resultado de estos cambios se libera de la mitocondria el citocromo c, el factor inductor de la apoptosis (AIF, *Apoptosis Inducing Factor*), endonucleasa G, Smac/DIABLO y la serina proteasa Omi/HtrA2 [44]. En el citosol el citocromo c se une a la molécula adaptadora APAF-1 para formar el apoptosoma, una estructura heptamérica en forma de rueda a la cual se recluta la pro-caspasa-9 y favorece su proximidad, autoprocésamiento y posterior activación. La caspasa-9 a su vez corta y activa a las caspasas efectoras -3, -6 y -7 [43, 45].

Otras proteínas proapoptóticas como Smac/DIABLO y Omi/HtrA2 potencian la actividad del apoptosoma al antagonizar a la proteína inhibidora de la Apoptosis (XIAP, *X-linked inhibitor apoptosis*). XIAP pertenece a una familia de proteínas que se caracterizan por la presencia de un dominio BIR (*Baculovirus IAP Repeat*) que es fundamental para su actividad antiapoptótica. XIAP cuenta con tres dominios BIR, de los cuales el segundo BIR y la región que lo precede se unen e inhiben a la caspasa-3 y -7; mientras que el tercer dominio BIR específicamente inhibe a la caspasa-9. Posterior a su interacción XIAP, promueve la ubiquitilación y posterior degradación proteosómica de las caspasas [46].

7.7. Catástrofe mitótica

La catástrofe mitótica es un mecanismo oncosupresor que evita la inestabilidad genómica al detectar un daño en mitosis y eliminar las células afectadas mediante apoptosis, necrosis o senescencia [47].

La catástrofe mitótica puede activarse mediante dos mecanismos, en uno de ellos las células con un deficiente punto de control en G2, entran de forma prematura a la Mitosis acarreando daño en el DNA, lo que produce que tengan defectos en la segregación cromosómica que deriva en su eliminación. En el segundo mecanismo las células con daño directo en el aparato mitótico o en la maquinaria requerida para la adecuada segregación cromosómica, activan el sistema del SAC y promueven un prolongado arresto en mitosis y finalmente la catástrofe mitótica [48].

De esta forma los principales inductores que activan este proceso, incluyen agentes que introducen alteraciones bioquímicas y estructurales en el DNA que a su vez favorecen la activación de los sistemas de reparación y arresto del ciclo celular (agentes alquilantes, radiación). Esto en un contexto de deficiencias funcionales en proteínas importantes para la activación de los puntos de control (ATM, ATR, CHK1, CHK2, P53 y P21) [49]. Un segundo grupo de inductores de este sistema lo constituyen agentes que afectan la

dinámica de los microtúbulos, al favorecer la hiperpolimerización (taxanos) o despolimerización (vinca alcaloides) de los dímeros de tubulina. Así como la inhibición de distintas proteínas que participan en el control de la adecuada segregación cromosómica, tales como: PLK1, Aurora cinasas, Survivina y CENPE [47, 50]. Es ampliamente aceptado que la catástrofe mitótica está siempre precedida por un arresto en mitosis; sin embargo, no se conocen con precisión los mecanismos que activan el proceso de muerte celular subsecuente [48].

Se sabe que una célula que experimenta un arresto mitótico prolongado puede tener tres posibles finales: 1) una muerte en mitosis en presencia de niveles elevados de ciclina B; 2) un proceso que se conoce como brinco mitótico y que consiste en que conforme los niveles de ciclina B van disminuyendo gradualmente; pese a la activación del SAC, las células salen de mitosis y subsecuentemente mueren en G1 y 3) las células que salen de mitosis y llegan a G1, pueden experimentar senescencia en lugar de muerte celular [47, 51]. Se ha propuesto que el mecanismo de muerte celular que se activa podría depender de la presencia de P53. En un contexto de funcionalidad del supresor de tumores el efecto final de la activación de la catástrofe mitótica sería la apoptosis, sin embargo, en su ausencia se promovería necrosis [48].

No obstante, también se ha sugerido que la catástrofe mitótica es un tipo de muerte celular, en sentido estricto, distinta de la apoptosis. Esta observación se basa principalmente en criterios morfológicos, ya que las células que sufren catástrofe mitótica exhiben principalmente micronúcleos/multinúcleos y una falta de condensación cromosómica a diferencia de las células apoptóticas que se caracterizan por una fragmentación nuclear y una condensación de la cromatina. Este criterio no parece ser lo suficientemente sólido, ya que a pesar de sus diferencias morfológicas, ambos procesos comparten características bioquímicas [50]. Por ejemplo, en modelos de catástrofe mitótica, se ha descrito la activación secuencial de caspasas,

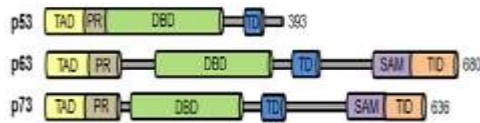
liberación mitocondrial de proteínas pro-apoptóticas (Citocromo c y AIF), fragmentación del DNA y condensación de la cromatina; características típicas de una apoptosis por vía intrínseca [52].

De hecho, a nivel molecular varios de los mecanismos que se han propuesto para explicar la muerte en mitosis incluyen la fosforilación por parte del complejo de ciclina B/ CDK1 de distintos miembros de la familia BCL-2, claves para la regulación de la apoptosis mitocondrial. Ciclina B/CDK1 fosforila directamente a BCL-2 y BCL-XL, evitando su asociación con BAX y BAK; mientras que fosforila y marca para ubiquitilación a MCL-1, promoviendo su degradación vía proteosoma. La consecuencia funcional de estas modificaciones es permitir la oligomerización de BAX-BAK en la membrana externa mitocondrial y consecuentemente la muerte celular [53].

7.8. P73

7.8.1. Estructura de P73

La proteína P73 pertenece a la familia de factores de transcripción de P53 que incluye también a P63. Los miembros de esta familia se caracterizan por la presencia de tres dominios estructurales: un dominio de transactivación (TAD, *Transactivation Domain*), seguido de un dominio rico en prolina en su N-terminal. También contienen un dominio de unión a DNA (DBD, *DNA-Binding Domain*) y uno de oligomerización o tetramerización (OD, *Oligomerization Domain*). A diferencia de P53, P63 y P73 tienen en su carboxilo terminal un dominio SAM (*Sterile alpha motif*), de interacción proteína/proteína y un dominio de inhibición transcripcional (TID, *Transcriptional-Inhibition Domain*) [54] (Figura 2).



Dentro de esta familia, los dominios comunes, comparten un significativo grado de homología de secuencia. Así por ejemplo, el dominio TAD, OD y DBD, de P73 comparte un 30%, 38 % y 63 % de identidad, con respecto a los dominios de P53. De hecho los residuos de P53 que directamente interactúan con el DNA, son idénticos en P63 y P73 [55]. Mediante una combinación de splicing alternativo y el uso de promotores internos se originan diferentes isoformas de P73. Se expresan por lo menos 35 variantes de RNAm que teóricamente codifican para 28 diferentes isoformas de P73. Se han documentado por lo menos siete isoformas producto de splicing alternativo del C-terminal (α , β , γ , ζ , δ , ϵ y η) y cuatro del N-terminal, que pueden ser agrupadas en dos clases: las que mantienen un dominio de transactivación competente (TAP73) y las isoformas truncadas en el N-terminal (Δ NP73, Δ N'P73, Ex2P73, Ex2/3 P73) [56]. Las formas completas exhiben actividad transcripcional; regulan la expresión de genes relacionados con la proliferación, diferenciación, apoptosis, autofagia y metabolismo. Mientras que las formas truncadas actúan como dominantes negativos de P53 y P73; al formar oligómeros inactivos con TAP73 o compitiendo por los sitios de unión a promotores regulados por P73 y P53 [57].

7.8.2. Participación de P73 en el control de ciclo celular y apoptosis

Debido a la elevada identidad que existe a nivel del dominio de unión a DNA entre las formas completas de P53 y P73, este último se puede unir a promotores canónicos de P53 y activar programas transcripcionales de arresto y muerte celular. Además, P73 es capaz de inducir arresto del ciclo celular en G1 y G2/M, a través de la regulación transcripcional de *P21*, *GADD45* y *P57^{Kip2}* [57, 58]; también puede funcionar como represor de diferentes reguladores de la transición G2/M, tales como: *CDC25B*, *CDC25C*, *CCNB1*, *CCNB2*, *CDC2* y *TOP2A*. Adicionalmente se sabe que P73 participa en el arresto en mitosis al interactuar con proteínas del SAC (BUB1, BUB3 y BUBR1) siendo importante en su localización y actividad [57, 58]. La capacidad de P73 para inducir apoptosis se atribuye a la posibilidad que tiene de transactivar genes pro-apoptóticos, tales como: *BAX*, *PUMA*, *NOXA*, *BAD* y *BIK* [57]. También, puede regular la transcripción de *GRAMD4*, una proteína que puede interactuar con BCL-2, favoreciendo la oligomerización de BAX y su translocación mitocondrial [54, 57]. A nivel de vía extrínseca P73 puede regular expresión de receptores de muerte, como *CD95* [58, 59]. Incluso se ha descrito que P73 y algunos productos de corte mediados por caspasa-8 y -3, pueden interactuar directamente con la mitocondria, probablemente afectando su permeabilidad [60]. Además de la apoptosis mitocondrial, P73 puede activar la muerte celular por estrés en el Retículo endoplásmico, al inducir la expresión de escotina, una proteína que afecta su permeabilidad [61].

8. ANTECEDENTES.

Existe una amplia evidencia en la literatura del potencial de la curcumina para inhibir la proliferación y favorecer la muerte celular de distintos tipos de tumores, como el colorectal [62], genitourinario [63, 64], pulmonar [65], neurológico [66], melanoma [67] y algunos tipos de leucemias [68].

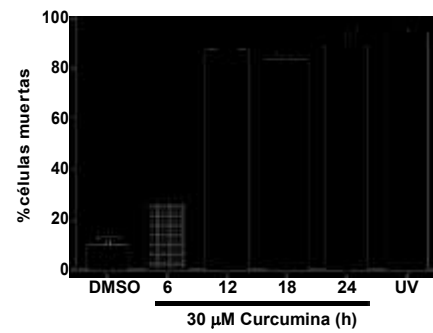
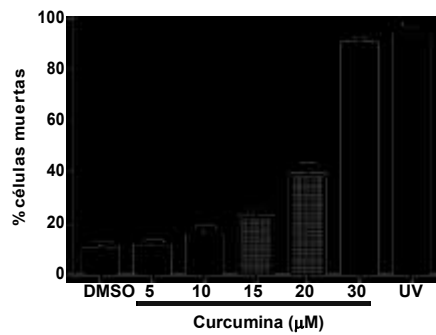
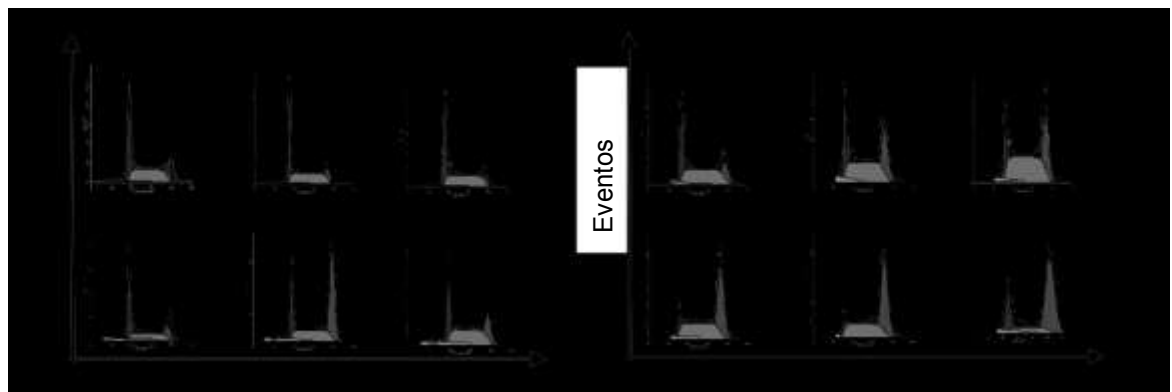
Particularmente, en modelos celulares de Leucemia Mieloide Crónica (LMC), el tratamiento con curcumina puede activar procesos de muerte celular tipo apoptosis; ya que ésta se abate significativamente en presencia de inhibidores de caspasas [69]. Se ha reportado que la curcumina induce distintos marcadores apoptóticos, como una mayor expresión de las proteínas pro-apoptóticas: BAX, FAS; un mayor corte de BID; liberación de Citocromo C; procesamiento de las caspasas-8, -9 y -3 y corte de PARP [70-73]. Otro efecto pro-apoptótico de la curcumina es la reducción de la expresión de moléculas anti-apoptóticas como BCL-2 y miembros de la familia de NF- κ B [72-74].

En cuanto a su efecto citostático, en modelos celulares de LMC se ha reportado que la curcumina induce una menor proliferación asociada a una reducción en la expresión y niveles proteicos de STAT-5 y un arresto en la fase G1, que conlleva un incremento en p21 [75, 76].

Datos del laboratorio empleando como modelo la línea celular K562, derivada de una crisis blástica de LMC [77] nos han permitido determinar que la curcumina es capaz de inducir un marcado arresto en la fase G2/M en forma dosis dependiente (Figura 3 A). Este arresto observa claramente a una dosis de 20 μ M; detectándose los máximos niveles a las 12, 18 y 24h de tratamiento (Figura 3B). Paralelamente, encontramos que a partir de 20 μ M, la curcumina es capaz de inducir muerte celular (Figura 3C), siendo la dosis de 30 μ M la que produce un claro efecto citotóxico, tiempo dependiente (Figura 3D). Encontramos que dicho proceso se veía acompañado de un

procesamiento parcial y actividad de las caspasas -8, -9 y -3; así como corte de PARP.

Una observación interesante es que las dosis y tiempos de exposición a curcumina en los que observamos un arresto significativo en G2/M correlacionan con los puntos en los que se detectan los mayores niveles de muerte celular (Figura 3).



Este dato sugiere que ambos eventos podrían estar relacionados y que la población enriquecida en G2/M podría ser la que estuviera experimentando el proceso de muerte celular. Las características de nuestro modelo se podrían ajustar al mecanismo oncosupresor de la catástrofe mitótica ya que este proceso se activa en células que presentan un arresto marcado pero transitorio en G2/M que deriva en una entrada prematura a mitosis o daño a la red de microtubulos del huso mitótico que finalmente llevan a la activación de los mecanismos de muerte celular [48].

Esto es factible, ya que se ha reportado que la curcumina es capaz de inducir un arresto tanto en la transición G2/M, como en mitosis, provocando husos mitóticos monopolares, defectos en la segregación cromosómica y la separación de los centrosomas, en líneas de cáncer colorectal [78]. De hecho en un modelo de cáncer de mama se ha descrito que el arresto en G2/M promovido por curcumina se debe a su efecto en el ensamblaje de los husos mitóticos, que promueve husos monopolares, los cuales derivan en alteraciones en la segregación cromosómica y consecuentemente células con micronúcleos [79].

La curcumina promovería directamente el arresto en mitosis, ya que se ha demostrado en cultivos primarios y células cancerosas que es capaz de unirse a la tubulina e inhibir la polimerización de los microtúbulos [80, 81]. Este efecto a su vez puede favorecer la activación del SAC. Se ha descrito en un modelo de cáncer de mama que el fitoquímico altera la adecuada interacción entre microtúbulos y cinetocoros, favoreciendo la acumulación de MAD2 y BUBR1 en los cinetocoros libres de tubulina. Funcionalmente esto deriva en un retraso en la progresión de metafase a anafase [82]. Complementariamente, la curcumina puede mimetizar los efectos del SAC, al inhibir la actividad del APC/C, mediante la unión a una de sus subunidades (Cdc27), lo que a su vez reduce su asociación con el co-activador CDC20. Esto provoca un arresto en mitosis al prevenir la degradación de ciclina B y securina [83].

Las alteraciones en mitosis producidas por la curcumina, pueden derivar en eventos de muerte celular. Se ha descrito que el fitoquímico es capaz de inducir eventos de catástrofe mitótica en células de cáncer de esófago, páncreas y leucemia promielocítica aguda [84-86].

El fitoquímico no solamente incrementa el número de células con características morfológicas típicas de la catástrofe mitótica (alteraciones cromosómicas y en el huso mitótico, multinúcleos, micronúcleos y células gigantes). Sino que también promueve la activación de marcadores de apoptosis tales como el procesamiento de caspasa-3 y el corte de PARP, además de la reducción de moléculas antiapoptóticas como BCL-2, XIAP y survivina [84-87].

Específicamente en un modelo de Leucemia Mieloide Crónica de mieloblastos murinos transfectados con BCR-ABL se demostró la capacidad de la curcumina para activar un mecanismo de catástrofe mitótica. Este evento se caracterizó por un arresto inicial en la fase G2/M, acompañado de un aumento en los niveles de P21; así como un incremento en el número de células multinucleadas arrestadas en mitosis y; que preceden la activación de las caspasas-3, -7 y la fragmentación del DNA. Adicionalmente, exhiben una reducción en survivina que impacta en la deslocalización de la Aurora cinasa B, un regulador clave en el control de la segregación cromosómica [87].

La catástrofe mitótica es un tipo de muerte característico de células deficientes en P53, que lo activan después de un arresto transitorio en G2 y ante la incapacidad para reparar un daño en su material genético [88]. Se ha propuesto que en ausencia de P53 un miembro de la misma familia, P73 podría participar en el control de la muerte celular en mitosis.

A diferencia de P53, la presencia de mutaciones en P73 es un evento poco frecuente, aproximadamente se ha detectado mutada en 0.6 % de los tumores primarios [89]. En contraste, en un amplio rango de tumores se ha

detectado la sobreexpresión del transcrito de P73 y de su producto proteico; particularmente en leucemias mieloide aguda y crónica se ha reportado la sobreexpresión de las isoformas γ , ϵ , δ y θ de P73 [90].

En nuestro modelo de LMC (K562) se ha descrito la ausencia de P53 debido a una inserción en el exón 5 de su gen, que provoca un cambio en el marco de lectura y finalmente un codón de paro prematuro [91]. Adicionalmente, en esta misma línea celular se ha descrito la expresión bialélica de P73 [92].

Se ha reportado en diferentes modelos *in vitro* que P73 puede participar en la regulación de procesos de muerte celular [93-95]. Particularmente en K562, se ha descrito su participación, tanto en el control del arresto en G2/M como la apoptosis en respuesta a agentes intercalantes del DNA. Este fenotipo se ve asociado a un incremento en P21 y BAX que junto con un aumento de Apaf-1; una reducción de en la localización nuclear de NF-kB y un nivel menor de BCL-2, derivan en la activación de caspasa-3 [96].

P73 participa en el control de la mitosis, al regular la expresión de P57 (KIP2), que es importante para la salida de dicha fase [97]. Además, puede ser regulada negativamente por cinasas mitóticas como CDK1/ciclina B, PLK1 y Aurora A cinasa [98-100]. Inclusive, P73 parece ser importante en el mantenimiento del estado diploide de las células; ya que su pérdida induce un rápido incremento en la ploidía celular [101]. Lo anterior, podría deberse a que se ha demostrado que P73 participa en la localización de miembros del SAC e interacciona con BUB1, BUB3 y BUBR1. Particularmente, la interacción con BUBR1 promueve una mayor funcionalidad del SAC [102].

Además de participar en la regulación del punto de control en mitosis, P73 tiene un papel en la activación de un proceso de muerte celular que evite la permanencia de células cromosómicamente inestables. En el contexto de mitosis se han descrito dos mecanismos de muerte celular dependientes de P73. Un primer sistema involucraría una muerte mitótica independiente de caspasas (*CIMD, Caspase Independent Mitotic Cell Death*), cuyos posibles

blancos serían AIF y EndoG que determinarían la fragmentación del DNA [103]. Se ha propuesto que la *CIMD* podría ocurrir como resultado de defectos en la interacción entre los cinetócoros y microtúbulos que activarían a BUB1, que fosforilaría a BUB3. Esta última puede liberarse de BUB1 e interactuar con una forma de P73 fosforilada (Y19) por c-ABL, activando su función transcripcional e induciendo la *CIMD* [104]. El segundo tipo de muerte mitótica inducida por P73 es dependiente de caspasas y se ha propuesto que su activación es inducida por un arresto prolongado en mitosis. En este modelo, P73 induce la expresión de la proteína proapoptótica BIM, favoreciendo la liberación del Citocromo C y la activación de caspasa-9. Estos efectos, incluido el nivel de muerte celular en mitosis se abaten significativamente cuando se silencia P73 [105]. Por lo cual dicha proteína podría participar en el contexto de catástrofe mitótica tanto en la inducción de arresto del ciclo como en la muerte celular.

9. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.

En la búsqueda de alternativas terapéuticas para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, los fitoquímicos se han constituido como una posible opción, dada su baja toxicidad en células sanas y el amplio rango de actividades biológicas en las que inciden. Dentro de los distintos tipos de fitoquímicos, la curcumina es un compuesto de baja toxicidad y con actividad anti-proliferativa y pro-apoptótica en contra de diferentes tipos de cáncer, incluida la leucemia.

El gen supresor de tumores P53 tiene un papel crítico en la regulación e integración de los sistemas que controlan la progresión del ciclo celular y la apoptosis. De esta forma, la ausencia de P53 incrementa la complejidad del tratamiento de muchos tumores con las quimioterapias convencionales, encaminadas a inducir muerte celular por apoptosis. Sin embargo, el proceso de muerte y arresto que observamos en nuestro modelo parece ser un evento de catástrofe mitótica independiente de P53 y posiblemente podría estar regulado por la inducción de un factor de transcripción relacionado a P53, como P73.

La caracterización de mecanismos independientes de P53, como la catástrofe mitótica nos permitirá identificar moléculas o procesos que pueden tener un potencial terapéutico para el tratamiento de tumores deficiente en p53 con resistencia a las quimioterapias convencionales.

10. HIPÓTESIS.

En la línea celular K562 se activa un mecanismo de muerte celular tipo catástrofe mitótica en respuesta al tratamiento con curcumina

11. OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar en K562 el fenómeno de catástrofe mitótica inducido por curcumina

12. OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1.- Determinar si la curcumina induce un arresto en mitosis en la línea celular K562
- 2.- Evaluar en K562 la presencia de algunos marcadores de catástrofe mitótica y apoptosis, en respuesta a curcumina
- 3.- Determinar en las células K562 tratadas con curcumina el estado de activación del punto de control en G2 o Mitosis
- 4.- Evaluar la localización, niveles proteicos y de funcionalidad de P73 en respuesta al tratamiento con curcumina
- 5.- Evaluar si P73 participa en el arresto en G2/M y/o la muerte celular en K562 inducida por la curcumina

13. MATERIALES Y MÉTODOS.

13.1. Cultivo celular y químicos

El reactivo curcumina se obtuvo de Sigma Chemical Co., fue disuelto en DMSO (Sigma) a una concentración de 30 mM, se almacenó hasta su uso a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para los diferentes tratamientos, las alícuotas fueron diluidas a 20 mM con DMSO y la concentración final de 20 μM se obtuvo al diluir en el volumen final del medio de cultivo. La concentración final de DMSO, siempre se mantuvo en 0.1 % v/v; tanto en los grupos control como en los experimentales.

La línea celular de Leucemia Mieloide Crónica, K562, fue obtenida de la ATCC (CCL•243). Se creció en medio de cultivo RPMI 1640, suplementado con 10% de Suero fetal bovino, 1% (v/v) de penicilina-estreptomicina (10000 U/mL penicilina/10000 U/mL) y 1% (v/v) de aminoácidos no esenciales, todos obtenidos de Gibco, BRL. Las condiciones de cultivo fueron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, en una atmósfera húmeda con 5 % CO_2 .

13.2. Western blot

Las células K562 se crecieron en placas de 6 pozos a una densidad de 2.5×10^5 células/mL en 4 mL de RPMI 1640 suplementado. Después de 24 h de cultivo, fueron tratadas con 0.1 % DMSO y 20 μM de curcumina por 3, 6, 12, 18 y 24 h de tratamiento. Como control positivo, para enriquecer la fracción de células mitóticas, se utilizaron células K562 tratadas con 100 nM de Nocodazol por 24h. Al finalizar los tratamientos, las células fueron recuperadas y centrifugadas a $855 \times g$ por 5 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se lavaron una vez con PBS 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4) frío y para obtener los extractos totales; el botón celular fue resuspendido en 80-100 μL del buffer de lisis comercial ProteoJET™ (Fermentas) suplementado con un cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasa: Complete (Roche) y PhosStop (Roche), respectivamente. Las suspensiones celulares fueron agitadas en vórtex de forma vigorosa por 10 segundos y

mantenidas en hielo por 10 minutos. Esta acción se repitió tres veces y al final las muestras fueron centrifugadas a $16000 \times g$ por 20 min a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante que contiene las proteínas totales se recuperó en un tubo nuevo previamente enfriado. Para obtener las fracciones proteicas de núcleo y citoplasma, se utilizaron los reactivos de extracción NE-PER (Thermo Scientific). Básicamente después de los tratamientos, las células fueron centrifugadas a $500 \times g$ por 5 minutos a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, se lavaron una vez con PBS 1X y tras descartar el sobrenadante se le adicionó al botón celular ($\sim 5 \times 10^6$ células) $500 \text{ }\mu\text{L}$ del buffer CER I frío, suplementado con Complete y PhosStop. La suspensión celular se agitó vigorosamente en el vórtex por 15 s y se incubó en hielo por 10 min. Se adicionaron $27.5 \text{ }\mu\text{L}$ de CER II frío y se agitó en el vórtex por 5 s, se incubó en hielo 1 min, y se centrifugó a $855 \times g$ por 5 min a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Se recuperó el sobrenadante que corresponde al extracto citoplasmático y se centrifugó a $14000 \text{ g} \times 10 \text{ min}$ a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y se transfirió a un tubo nuevo, previamente enfriado. El botón de núcleos se resuspendió en $250 \text{ }\mu\text{L}$ de CER, suplementado con Complete y PhosStop y se agitó vigorosamente en vortex por 15 s seguido de una incubación de 10 min en hielo. Esta acción se repitió a lo largo de 40 minutos. Finalmente las muestras se centrifugaron a $14000 \times g \times 10 \text{ min}$ a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, transfiriéndose los sobrenadantes, que contienen la fracción nuclear, a tubos previamente enfriados. Tanto los extractos totales, como las fracciones núcleo/citoplasma se cuantificaron utilizando el reactivo Quick Start 1x Bradford (BioRad), en un espectro modelo Biophotometer (Eppendorf).

En los análisis por *western blot*, se usaron $30 \text{ }\mu\text{g}$ de proteína que fueron separados en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 8, 10, 12 y 15 %, según el peso de la proteína a analizar. A las muestras se les adicionó el volumen correspondiente de buffer Laemmli (62 mM Tris, 23% SDS, 10% glicerol, 5% β -mercaptoetanol, 0.1% bromofenol) 2X o 4X y fueron desnaturizadas a $96\text{-}98 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min. Se utilizó un marcador de peso molecular preteñido (PageRuler Prestained Protein Ladder # 26616, Thermo Scientific). Los geles se corrieron en una mini-cámara modelo Mighty Small II

(Amersham Biosciences) a 70-90 V con un amortiguador de corrida (25 mM Tris, 190 mM Glicina, 0.05% SDS). Posteriormente, las proteínas se electrotransfirieron a membranas PVDF (Perkin-Elmer) en una cámara Mini trans-Blot Cell (Bio-Rad), empleando un amortiguador de transferencia (25 mM Tris, 190 mM Glicina, 20 % metanol), durante 2 h a 200 mA. Las membranas fueron bloqueadas con una solución de TBS 1X-tween-20 (Tris 10 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, 0.1% Tween-20) con 5 % de leche descremada durante 1 h a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron toda la noche a 4 °C con anticuerpos primarios contra las siguientes proteínas: anti-caspasa-8 (1:1000), caspasa -9 (1:1000), caspasa -3 (1:1000), PARP (1:1000), Survivina (1:1000), BCL-2(1:1000) y XIAP (1:1000), obtenidos de Cell Signalling; anti- H3S10-p, P73, hnRNPA, BUBR1, SPAG-5, obtenidos de Santa Cruz Biotechnology; GAPDH (1:5000), Securina (1:5000) obtenido de Genetex y BAX (1:1000) obtenido de Invitrogen. Como control de carga, se utilizó anti- α actina (1:500), amablemente donado por el Dr. M. Hernández de Biología Celular-Cinvestav. Posterior a la incubación las membranas fueron lavadas 3 veces durante 5 min con TBS 1X-tween-20 e incubadas durante 1 h 30 min con anticuerpos secundarios anti-conejo-HRP (Invitrogen), anti-ratón-HRP (Invitrogen) y anti-cabra-HRP (Thermo Scientific) en una dilución 1:5000. Tanto los anticuerpos primarios como los secundarios fueron preparados en TBS 1X-tween-20 + 5% de leche descremada. Finalmente se hicieron 3 lavados de 5 min con TBS 1X y las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia con el *kit* de Super signal West femto Maximum sensitivity substrate (Thermo scientific) en un sistema de captura de imágenes, ChemiDoc (BioRad).

13.3. Inmunofluorescencias

Para las tinciones del núcleo y el citoesqueleto de actina, las células K562 fueron sembradas en placas de 12 pozos (Corning), a una densidad de 100,000 células/mL en 2 mL de RPMI-1640 suplementado. Se trataron con 0.1 % DMSO y 20 μ M de curcumina por 12, 18 y 24 h. Como control negativo

se emplearon células crecidas en medio completo. Después de los tratamientos, las células fueron recuperadas y se centrifugaron a $213 \times g$ por 5 min a temperatura ambiente. Fueron lavadas una vez con PBS 1X y se descartaron los sobrenadantes mediante una sola decantación. El botón celular fue resuspendido en 100 μL de PBS 1X con 0.06 U de faloidina-Rodaminada (Invitrogen) y se incubaron por 20 min en hielo cubierto de la luz. Las muestras se lavaron una vez con PBS 1X, se les adicionó 1 mL de Paraformaldehído al 4 % y se incubaron por 10 min en hielo. Se hicieron dos lavados con 1 mL de PBS 1X y el botón se resuspendió en 200 μL de PBS 1X y se distribuyó en el área de cubreobjetos previamente recubiertos con poli-L-Lisina (1:10 v/v). Se incubaron por 1 h a 37 °C para permitir que las células sedimentaran. Los cubreobjetos con las células adheridas fueron lavados con PBS1X y teñidas con 500 μL de una solución de DAPI (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Molecular Probes, Invitrogen) en PBS 1X. Se incubaron por 5 min a temperatura ambiente, cubierto de la luz y finalmente se lavaron dos veces con PBS 1 X, durante 5 min a temperatura ambiente y una vez con H₂O miliQ. Las muestras fueron montadas usando 3-5 μL de Vecta-shield (Roche) en cubreobjetos limpios.

Para las inmunodetecciones (α -tubulina, Astrina, H3S10-p/Caspasa-3 y P73) las células K562 fueron sembradas en placas de 12 pozos en las que previamente se colocaron cubreobjetos que fueron recubiertos con una solución de poli-L-Lisina (0.01 mg/mL) en PBS1X y que se incubaron toda la noche a 37 °C. Al día siguiente los pozos fueron lavados con PBS 1X y se sembraron 200,000 células en 2 mL de medio suplementado. El control negativo se creció solo en medio y los otros grupos fueron tratados con 0.1 % DMSO y 20 μM de curcumina por 12, 18 y 24 h.

Para las tinciones del huso mitótico, después de los tratamientos, el medio de cultivo fue retirado y se adicionaron 500 μL de PFA 4 %, incubándose a temperatura ambiente por 15 min. Se lavaron los pozos con 1 mL de PBS 1X y se permeabilizaron adicionando 500 μL de PBS 1X-Tritón 0.1 %, y se lavaron con PBS 1X.

incubándose a temperatura ambiente por 15 min. Se hizo un lavado con PBS 1X, y se bloqueó durante 15 min a temperatura ambiente con 0.5% de Gelatina y 1.5 % de Suero Fetal Bovino en PBS 1X. Después de un lavado con PBS 1X, los cubreobjetos se incubaron en una cámara húmeda con anti- α -tubulina (1:500 v/v) de Santa Cruz Biotechnology, durante 1 h a temperatura ambiente. Subsecuentemente, se realizó un lavado con PBS 1X y las muestras se incubaron durante 45 min a temperatura ambiente con una dilución 1:25 (v/v) de un anti-ratón acoplado a FITC (Jackson Immunoresearch). En el caso de las inmunofluorescencias de Astrina, se siguió el protocolo anterior, pero después de la incubación con el anticuerpo contra α -tubulina, las células se lavaron con PBS 1X por 5 min. Posteriormente, se incubaron por 1 h a temperatura ambiente, con anti-Astrina en una dilución 1:100 (v/v). Seguido de un lavado con PBS 1X por 10 min; las laminillas se incubaron con un anti-conejo acoplado a Alexa 594 (Invitrogen) en una dilución 1:100 (v/v), durante 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad.

Para las tinciones de H3S10-p/Caspasa-3 y P73 las células recuperadas fueron fijadas con PFA 4% durante 15 min a temperatura ambiente, se hicieron dos lavados de 5 min, con PBS 1X. Se permeabilizaron con PBS 1X-Tritón 0.25 % durante 10 min a temperatura ambiente, y se lavaron dos veces con PBS 1X. Las muestras fueron bloqueadas durante 30 min en agitación con una solución de PBS 1X + 2 % BSA. El exceso de solución de bloqueo, se retiró con dos lavados con PBS 1X y los cubreobjetos fueron incubados en cámara húmeda durante 1 h a temperatura ambiente con un anti-H3S10-p (1:50 v/v) o toda la noche con anti-P73 (1:50 v/v), ambos anticuerpos de Santa Cruz Biotechnology. Posteriormente, se lavaron dos veces con PBS 1X y se incubaron 1h a temperatura ambiente con un anti-conejo acoplado a FITC (Jackson Immunoresearch), en una dilución 1:100 (v/v) para H3S10-p y 1:200 (v/v) para P73 diluidos en PBS 1X. Se realizaron dos lavados con PBS 1X de 5 min en agitación. Particularmente para las inmunofluorescencias de H3S10-p/Caspasa-3, después de la inmunotinción

con H3S10-p, las muestras fueron incubadas con una dilución 1:100 en PBS 1X de un inhibidor de caspasa-3 acoplado a sulfo-rodamina (Calbiochem) durante 1 h a 37 °C en oscuridad.

En todas las inmunodetecciones, después de los anticuerpos secundarios, los cubreobjetos se lavaron durante 5 min en agitación con PBS 1X y se tiñó el núcleo con DAPI (1 µg/mL) (Molecular Probes, Invitrogen) durante 5 min a temperatura ambiente, en oscuridad. Después de dos lavados con PBS 1X y uno con H₂O miliQ, se montaron empleando el medio Vecta-shield (Roche), en portaobjetos esterilizados. Todas las laminillas fueron visualizadas en un microscopio confocal Olympus FV-300 (OLYMPUS).

13.4. Detección de H3S10-p y H3S10-p/Caspasa-3 por citometría de flujo

Para analizar el índice mitótico 1×10^6 células K562 fueron crecidas por 24 h en placas de 6 pozos (Corning), en 4 mL finales de medio de cultivo suplementado. Posteriormente, para el experimento de detección de H3S10-p, las células fueron tratadas con 0.1 % DMSO y 20 µM de curcumina a 12, 18 y 24 h. Mientras que para la tinción de H3S10-p/Caspasa-3 además del control de DMSO, se empleó sólo la condición de 20 µM de curcumina por 24 h. Como control positivo de arresto en mitosis (positivas para la marca H3S10-p) y de muerte celular (caspasa-3 activa) se emplearon células expuestas a 100 nM de Nocodazol y 1 µM de estaurosporina por 24 h, respectivamente.

Finalizados los tratamientos las células fueron teñidas conforme al protocolo descrito por Taylor W. [106]. Brevemente, las células fueron colectadas, centrifugadas y lavadas con 5 mL de PBS1X; se centrifugaron a 450 x g por 20 min y el botón celular se resuspendió en 400 µL de PBS 1X. La suspensión celular se fijó mediante la adición de 1 mL de etanol absoluto frío y se mantuvo a -20 °C, por lo menos una noche; subsecuentemente, se centrifugo a 1400 x g por 7 min a 4°C y se lavó una vez con PBS1X. El botón

celular se permeabilizó con 1.4 mL de PBS 1X + 0.25% Tritón X-100 y se incubó en hielo por 15 min. Tras una centrifugación a 1400 x g por 7 min a 4°C; el botón celular se resuspendió en 100 µL de PBS 1X + 1% BSA con 0.5 µg de anticuerpo anti-H3S10-p (Santa Cruz Biotechnology). Las muestras se incubaron con agitación lenta a temperatura ambiente por 2 h. Posteriormente se hizo un lavado con 1.3 mL de PBS 1X + 1% BSA y el botón celular se resuspendió en 100 µL de una dilución 1:200 (v/v) de un anti-conejo acoplado a FITC (Jackson ImmunoResearch) disuelto en PBS 1X + 1% BSA; se incubó en oscuridad por 30 min a temperatura ambiente, con agitación lenta. Se realizó un lavado con PBS 1X+ 1% BSA, y las células se resuspendieron en 500 µL de PBS 1X. Finalmente, se adicionó RNasa A, a una concentración final de 0.2-0.5 mg/mL y se incubó por 30 min a 37 °C; seguido de la adición de Ioduro de Propidio (Roche) a una concentración final de 10 µg/mL, incubándose por 15 min en hielo. Las muestras fueron leídas en un citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson). Se capturaron por lo menos 20000 eventos y los datos fueron analizados en el software Summit (Beckman Coulter).

Para la detección de H3S10-p/Caspasa-3, después del anticuerpo primario contra H3S10-p, las muestras se incubaron con un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a Alexa Fluor 594 (Invitrogen) disuelto 1:8000 en PBS 1X+ 1% BSA durante 1 h. Posteriormente las células fueron lavadas con PBS 1X y el botón resuspendido en 300 µL de PBS 1X. Las muestras se tiñeron con un inhibidor de caspasa-3 acoplado a Sulfo-Rodamina (Calbiochem) durante 30 min a 37 °C. Posteriormente se enjuagaron dos veces con un Buffer de Lavado proporcionado por el *kit*. Finalmente las muestras fueron resuspendidas en 300 µL de buffer de lavado y leídas en un citómetro BD LSRFortessa (Becton Dickinson). Se capturaron por lo menos 20000 eventos y los datos fueron analizados en el software Summit (Beckman Coulter).

13.5. LIVE/DEAD

Para determinar alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular que pudieran sugerir la evolución de procesos de muerte, se utilizó el *kit* de LIVE/DEAD® Fixable Dead Cell Stain (Molecular Probes, Invitrogen). Este ensayo se basa en la interacción de un reactivo fluorescente (*Red fluorescent reactive dye* $\lambda_{ex}= 595 \text{ nm}$; $\lambda_{em}= 615 \text{ nm}$) con los grupos amino de las proteínas celulares. En una célula con la membrana plasmática íntegra, el colorante sólo reacciona con los grupos amino presentes en las proteínas de la superficie celular. Sin embargo, en las células muertas la fluidez de la membrana plasmática se incrementa, por lo que el colorante puede difundir y reaccionar no sólo con las proteínas de superficie, sino con las proteínas citoplasmáticas. El resultado es que las células muertas emiten una mayor fluorescencia en comparación con las células vivas. Para realizar este ensayo, la línea celular K562 fue crecida en placas de 6 pozos (Corning) a una densidad de 250, 000 células/mL en 4 mL de RPMI suplementado. Se dejaron crecer por 24 h y se adicionaron los tratamientos:

0.1 % v/v de DMSO y 20 μM curcumina a 12, 18 y 24 h. Como control positivo de muerte celular, se emplearon células K562, irradiadas con 40 mJ/cm^2 de luz UV durante 2 min en una cámara de UV, *GS Gene linker-UV chamber* (Bio-Rad), que fueron cosechadas 24 h post-irradiación.

Una vez transcurrido el tiempo de los tratamientos, las células fueron recuperadas y centrifugadas a 3000 rpm durante 5 min a 4 °C. Se lavaron y resuspendieron en 1 mL de PBS 1X, ajustándose a una densidad de 1×10^6 células/mL. Esta suspensión celular se tiñó con 1 μL del compuesto fluorescente (*Red fluorescent reactive dye*) y se dejó incubar durante 30 minutos en hielo, protegida de la luz. Finalmente las células fueron lavadas dos veces con PBS 1X + 1 % BSA (Equitech-Bio) y se resuspendieron en 1 mL de la misma solución. Las muestras fueron leídas en un citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson), excitadas con un láser de ion argón y la fluorescencia se detectó en el canal FL-2. Se capturaron por lo menos 20000

eventos y los datos fueron analizados en el software Summit (Beckman Coulter).

13.6. Fragmentación del DNA

Un total de 1.5×10^6 células K562 fueron sembradas en cajas Petri de 60 mm (Corning), en 6 mL de RPMI-1640 suplementado. Se dejaron crecer por 24 h y se les adicionó 0.1 % de DMSO, 20 μ M de curcumina por 24 h. Como control positivo de fragmentación del DNA, se usaron células tratadas con 100 nM de Nocodazol por 24 h. Como en el resto de los experimentos, el control negativo fue crecido en medio completo sin ningún estímulo. Para estos ensayos se siguió el protocolo reportado por Matassov D. y cols. [107].

Brevemente, después de los tratamientos, $\sim 5-7 \times 10^6$ células fueron recuperadas y centrifugadas a 1000 x g por 5 min a 4°C. Se resuspendieron en 1 mL de PBS 1X frío y se centrifugaron a 1000 x g por 2 min a 4°C. El botón celular se liso con 500 μ L de buffer de lisis (0.2% Triton X-100; 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM EDTA) y se incubó por 15 min en hielo. Las muestras fueron centrifugadas a 12,000 x g por 20 min a 4°C; el botón celular contiene el DNA de alto peso molecular; mientras que el sobrenadante el de bajo peso molecular. Este último fue transferido a un nuevo tubo y se le adicionó RNAsa A, a una concentración final de 100 μ g/mL, incubándose a 37 °C por 1 h. Para la extracción del DNA se adicionó un volumen igual (500 μ L) de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) a la muestra y se agitó vigorosamente, mezclando las soluciones. Se centrifugó a 14000 x g x 3 min a temperatura ambiente y se retiró la fase superior (acuosa), transfiriéndose a un tubo nuevo. Al remanente de fenol cloroformo se le adicionaron 100 μ L de buffer de lisis y se centrifugo a 14000 x g por 3 min a temperatura ambiente y la nueva fase acuosa se combinó con la previamente obtenida. A este volumen final se le adicionaron 500 μ L de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se mezcló vigorosamente y se centrifugo a 14000 x g por 3 min a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa y para precipitar el DNA, se adicionaron 25 μ L de una solución 5M de NaCl y 2-2.5 volúmenes de

etanol absoluto frío. Las muestras se mantuvieron toda la noche a -20°C . Posteriormente fueron centrifugadas a $12000 \times g$ por 30 min a temperatura ambiente, se retiró el etanol y el botón celular fue lavado una vez con 1 mL de Etanol al 70 %. Finalmente, fueron centrifugadas a $12000 \times g$ por 20 min a temperatura ambiente, se descartó el etanol y el botón celular se secó por algunos minutos hasta eliminar el exceso de alcohol. Las muestras se resuspendieron en 18 μL de buffer TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA), incubándose a 45°C por 15 min. Posteriormente, fueron corridas en una electroforesis (2-3 h a 60 V) en geles de agarosa al 1.5 % disueltos en TAE1X (40 mM Tris acetate, 2 mM EDTA) y visualizadas en un transiluminador al teñir los geles con una solución de Bromuro de Etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 10 min.

En el control negativo y la muestra tratada con DMSO, dado que no hay un inductor de muerte, la cantidad de DNA fragmentado es mínima, siendo prevalente el DNA integro, de alto peso molecular. Para extraer este material se siguió el mismo protocolo de extracción con Fenol:cloroformo, solamente que el botón con DNA de alto peso molecular se liso con 500 μL de buffer sarcosil (10 mM EDTA, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ proteinasa K, 0.5% N-lauroil sarcosina de sodio, 50 mM Tris) y RNasa a una concentración final de 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a 50°C por 12–16 h. El DNA se precipito con 300 mM de NaCl y 2.5 volúmenes de etanol a 4°C durante toda la noche.

13.7. Ensayo de TUNEL

En placas de 6 pozos (Corning) se sembraron 1×10^6 células. Fueron tratadas con 0.1 % v/v DMSO y 20 μM de curcumina por 24 h. Un pozo se mantuvo solo con medio suplementado, como control negativo. Para este ensayo se utilizó el sistema APO-BrdU™ TUNEL Assay *Kit* (Molecular Probes, Invitrogen), que proporciona como control positivo de fragmentación del DNA, una suspensión de células fijadas de un linfoma humano. Posterior a los tratamientos las células fueron recuperadas y centrifugadas a $855 \times g$ por 5 min a 4°C y se lavaron una vez con 1 mL de PBS 1X. Se ajustó su

densidad a 1×10^6 células y se resuspendieron en 0.5 mL de PBS 1X. Se les adicionó 5 mL de paraformaldehído 1% (p/v) y se colocaron en hielo por 15 minutos. Las células fueron recuperadas por centrifugación a $300 \times g$ por 5 min, y se lavaron 2 veces con PBS 1X, el botón se resuspendió en 0.5 mL de PBS1X. A dicha solución se le adicionaron 5 mL de Etanol 70% (v/v) frío, manteniendo las muestras a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, por lo menos una noche. Posteriormente las células fueron centrifugadas a $300 \times g$ por 5 min y el etanol se retiró con cuidado de no tomar el botón, el cual fue lavado dos veces con 1 mL de buffer de lavado, proporcionado por el *kit*; recuperándose mediante centrifugaciones a $300 \times g$ por 5 min. El botón de cada uno de los grupos, se resuspendió en 50 μL de solución para marcaje del DNA, que se preparó, mezclando: 10 μL de buffer de reacción, 0.75 μL de enzima TdT, 8.0 μL de BrdUTP y 31.25 μL de dH_2O . La mezcla de reacción se incubó durante 60 min a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, agitando los tubos ocasionalmente para mantener las células en suspensión. Después de este periodo las células fueron lavadas dos veces con 1 mL de buffer de enjuague –proporcionado por el *kit*- y el botón se resuspendió en 100 μL de una solución preparada con 5 μL de un anticuerpo contra BrdU acoplado a Alexa Fluor® 488 y 95 μL de buffer de enjuague. Las muestras fueron incubadas durante 30 min a temperatura ambiente, protegidas de la luz. Finalmente para determinar el contenido de DNA, se adicionaron 0.5 mL por muestra de un buffer de tinción Ioduro de Propidio/RNAsa –proporcionado por el *kit*- y nuevamente se incubaron por 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Las muestras se leyeron en un citómetro BD LSR Fortessa (Becton Dickinson) y la fluorescencia de las células TUNEL positivas se detectó en el canal de FITC; mientras que la del Ioduro de Propidio se detectó en el canal PE. Se capturaron por lo menos 20000 eventos y los datos fueron analizados en el software Summit (Beckman Coulter).

13.8. Inmunoprecipitación

Un total de 6×10^6 células K562 fueron tratadas con DMSO y 8×10^6 fueron expuestas a $20 \mu\text{M}$ curcumina por 24 h. Después de los tratamientos, un total de $12 - 14 \times 10^6$ células fueron recuperadas por centrifugación a $855 \times g$ por 5 min a 4°C . El botón se lavó 2 veces con PBS 1X frío y se le adicionaron de 500-800 μl de la solución de lisis Mammalian Protein Extraction Reagent, M-PER (Thermo Scientific) suplementado con inhibidor de proteasas, Complete (Roche) e inhibidor de fosfatasa, PhosStop (Roche). Las células se lisaron haciéndolas pasar repetidamente por una aguja de insulina. La suspensión celular se agitó vigorosamente por 10 s y se incubó en hielo por 10 min, esto se repitió dos veces. Los extractos se centrifugaron a $16000 \times g$ por 20 min a 4°C para precipitar el debris celular. Se recuperó el sobrenadante y se cuantificó utilizando el reactivo de Quick Start 1x Bradford (BioRad). A un total de 500 μg de proteína se le adicionaron 40 μL de perlas de agarosa acopladas a proteína G (Thermo Scientific), dejándose incubar en rotación por 2 h a 4°C , para eliminar proteínas que se unen de manera inespecífica. Posteriormente la mezcla fue centrifugada a $95 \times g$ por 4 min a 4°C para bajar las perlas. Se recuperó el sobrenadante y se le adiciono 1 μg de anticuerpo primario (anti-SPAG5 H-300 y anti-BubR1 C-20, de Santa Cruz Biothecnology). La misma cantidad de isotipo se adicionó de IgG de conejo (Santa Cruz Biothecnology) y para control de isotipo de las inmunoprecipitaciones de BubR1 se utilizó un anticuerpo no relacionado (anti-GFP), hecho en cabra (Rockland). Las muestras se colocaron en rotación toda la noche a 4°C . Finalizada la incubación se adicionaron 40 μL de perlas de agarosa acopladas a proteína G y las muestras se incubaron en agitación por 4 h a 4°C . Posteriormente, se centrifugaron a $95 \times g$ por 3 min a 4°C , descartándose el sobrenadante y se lavaron las perlas dos veces con 300 μL de buffer de lisis. Finalmente las perlas fueron lavadas con 300 μL de PBS 1X frío y el botón se mezcló con 65 μL de buffer Laemmli 1X, hirviéndose por 10 min a 95°C . Se recuperaron los sobrenadantes tras

centrifugar a 16000 x *g* por 10 min a temperatura ambiente. Estas muestras fueron analizadas por *Western blot*.

13.9. Ensayos de digestión con Fosfatasas

Las células K562 fueron crecidas en medio RPMI suplementado y se dejaron crecer por 24 h antes de los tratamientos. Se sembraron en placas Petri de 60 mm, 1×10^6 células para las condiciones de Medio y DMSO. Mientras que para las tratadas con 20 μ M de curcumina y 100 nM de Nocodazol por 24 h, se sembraron 2×10^6 células. Después de estos periodos, las células fueron recuperadas, centrifugadas a 855 x *g* por 5 min a 4°C. Al botón celular se le adicionaron 100-200 μ L de buffer de lisis (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH= 8, 0.1 % Tritón X-100), suplementado con Complete (Roche). Para obtener un control de máxima preservación del estado fosforilado de las proteínas analizadas, se hizo una extracción con el buffer de lisis suplementado con Complete y el inhibidor de fosfatasas, PhosStop. Los extractos fueron cuantificados con el reactivo de Quick Start 1X Bradford (BioRad). Se utilizaron 50 μ g de proteína para los ensayos de digestión con la Fosfatasa. Las mezclas de reacción se prepararon adicionando 400U de la Proteína Fosfatasa Lambda, 1X NEBuffer para Proteínas tipo Metalofosfatasas (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 0.01% Brij 35 pH= 7.5), suplementado con 1 mM MnCl₂, todos obtenidos de New England, BioLabs. Todas las reacciones se llevaron a un volumen final de 50 μ L con agua libre de nucleasas (Ambion). Se incubaron durante 30 min a 30 °C y las reacciones se detuvieron adicionando 20 μ L de Buffer Laemli 4X (0.250 M Tris-HCl pH= 6.8, 8 % SDS, 40 % v/v glicerol, 0.4 M DTT, 0.02 % Azul de Bromofenol, pH= 6.8). Las muestras fueron hervidas por 10 min a 95-96 °C y se corrieron en un gel de poliacrilamida para definir por *Western blot* si los retardamientos electroforéticos que asociamos a fosforilación, desaparecen después de la digestión con fosfatasas.

13.10. Extracción de RNA y obtención de cDNA

Las células K562 fueron crecidas en cajas Petri de 60 mm a una densidad de 250,000 células/mL. Después de 24 h en cultivo, fueron tratadas con 0.1% DMSO y 20 μ M de curcumina por 12, 18 y 24 h. Posterior a los tratamientos, se recuperaron $\sim 2-4 \times 10^6$ células, se lavaron con PBS1X y fueron lisadas con 0.5 mL del reactivo Trizol (Ambion). Las muestras se mezclaron con ayuda del vórtex por 20-30 s y se mantuvieron en hielo durante 5 min. Se adicionaron 100 μ L de cloroformo y se agitó vigorosamente en el vórtex durante 1 min hasta que la suspensión exhibiera una apariencia blanquecina. Las muestras se dejaron incubar por 2 min a temperatura ambiente (15-30 °C) y fueron centrifugadas a 16000 x g por 15 min a 4 °C. Posteriormente se recuperó la fase superior cuidando de no tomar nada de la interfase y a este sobrenadante se le adicionaron 500 μ L de isopropanol. Las mezclas fueron agitadas en el vórtex de forma intermitentemente durante 1 min para evitar que se calentaran y precipitadas por lo menos una noche a -70 °C. Después se centrifugaron a 16000 x g por 15 min a 4 °C y se decantaron las muestras procurando que no se moviera el botón celular. Las muestras fueron lavadas con 500 μ L de Etanol al 70 % frío y se centrifugaron a 16000 x g por 10 min a 4 °C. Posteriormente se les retiró la mayor cantidad posible de etanol, cuidando de no tocar el botón con la punta de la micropipeta y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 30 min. Finalmente, se resuspendieron en 50 μ L de agua libre de nucleasas y se cuantificaron en un espectro modelo Biophotomer (Eppendorf). Para eliminar la contaminación de DNA de las extracciones de RNA, se utilizó el *kit* DNA-free (Ambion). Brevemente alícuotas de 50 μ L fueron tratadas con 2 U de DNasa I, 5 μ L de buffer de rDNasa I 10X (Ambion) e incubadas por 1 h a 37 °C. Después de ese tiempo se adicionó 0.2 U DNasa I y se incubaron por una hora más a 37 °C. Posterior a la incubación se adicionó 5 μ L del reactivo de inactivación proporcionado por el *kit* y las muestras se mantuvieron durante 2 min a temperatura ambiente, con agitación intermitente a lo largo de ese periodo.

Finalmente se centrifugaron a 13000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente y los sobrenadantes se recuperaron, verificándose la integridad del RNA, mediante una electroforesis en geles de agarosa al 1 %. Una vez confirmada la integridad, se preparó el cDNA a partir de 5 µg de RNA. A las mezclas de reacción se le adicionaron 10 µL de dNTP's (Thermo Scientific) + 3 µL oligo dT (Thermo Scientific) y se llevaron a un volumen final de 25 µL de agua libre de nucleasas (Ambion). Posteriormente se colocaron a 70 °C durante 5 min, se pasaron a hielo por 1 min y se les dio una breve centrifugación durante 30 s. A esta mezcla se le adiciono 10 µL de amortiguador para síntesis de la primera cadena de cDNA (*5X First-Strand Buffer* + 5 µL de 0.1 M DTT). Las mezclas finales se colocaron durante 2 min a 42 °C y se recuperaron 5 µL de cada reacción como controles (RT-). A los 45 µL restantes se le adicionaron 2 µL de *Superscript II* y se incubaron por 90 min a 42 °C. Finalmente las reacciones se inactivaron por calor, incubando las muestras a 70 °C por 5 min.

13.11. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se analizaron los cDNAs de las muestras Medio, DMSO y tratadas con 20 µM de Curcumina a 12, 18 y 24 h. Las mezclas de reacción fueron de 50 µL y las concentraciones finales de los componentes fueron: 0.2 µM Oligos, 0.25 µM dNTP's (Thermo Scientific), 2 µM MgCl₂ (Invitrogen), 0.02 U/µL Taq DNA pol (Invitrogen), 1X PCR Buffer 10X (Invitrogen). Para todos los *primers* se utilizaron las siguientes temperaturas: pre-desnaturalización, 92°C-10s; desnaturalización, 92°C-20s; alineamiento, 50°C-20s y extensión 72°C con variaciones en los tiempos, que junto con el ciclaje se especifican para cada par de *primers*.

Se utilizaron los siguientes pares de *primers* para amplificar los transcritos de interés: *P21* sentido 5' – TGT CCG TCA GAA CCC ATG C– 3' y antisentido 5' – AAA GTC GAA GTT CCA TCG CTC– 3' (72°C-30s x 50 ciclos); *P57* sentido 5' – ACA TCC ACG ATG GAG CGT CTT G – 3' y antisentido 5' –

TGT CCT GCT GGA AGT CGT AAT CC – 3'(72°C-40s x 40 ciclos); *BIM*
sentido 5' – CAA GGT AAT CCT GAA GGC AAT CAC GG – 3' y antisentido
5' – TCG AGA CAG CAG GGA GGA TCT TCT C– 3'(72°C-35s x 35 ciclos);
BAX sentido 5' – CCC GAG AGG TCT TTT TCC GAG– 3' y antisentido 5' –
CCA GCC CAT GAT GGT TCT GAT– 3'(72°C-30s x 30 ciclos). *GAPDH*
sentido 5' – CAA GGT AAT CCT GAA GGC AAT CAC GG – 3' y antisentido
5' – TCG AGA CAG CAG GGA GGA TCT TCT C– 3'(72°C-30s x 25 ciclos).
Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en geles de
agarosa al 2% y se tiñieron con Bromuro de Etidio al 0.05 %.

13.12. Ensayos de silenciamiento

Las células K562, fueron sembradas en placas de 24 pozos (Corning), un total de 100,000 células en 1 mL de RPMI suplementado. Después de 24 h, las células fueron recuperadas y lavadas dos veces con 1 mL de RPMI. El botón celular se resuspendió en 100 µL de RPMI y se distribuyó homogéneamente en toda el área del pozo. La mezcla de transfección se preparó adicionando en el siguiente orden: 100 µL de RPMI + 50 nM de siRNA (p73 siRNA, Santa Cruz Biothecnology) + 6 µL del reactivo de transfección Hiperfect (QIAGEN), mezclándose mediante vortex por 10 sec. Se dejó incubar durante 10 min a temperatura ambiente, para permitir la formación de los complejos de transfección. La mezcla se adicionó gota a gota, en toda el área del pozo, garantizando una distribución uniforme y se incubaron las células durante 6 h en condiciones normales de cultivo (37 °C, en una atmósfera húmeda con 5 % CO₂). Finalmente se adicionaron 800 µL de RPMI + 10 % SFB+ 1% (v/v) de aminoácidos no esenciales (Gibco BRL) y se cosecharon las células 24 h post-transfección. Se obtuvieron extractos totales de proteínas, utilizando el buffer de lisis comercial, M-PER (Thermo Scientific) suplementado con inhibidor de proteasas, Complete (Roche) e inhibidor de fosfatasas, PhosStop (Roche).

14. RESULTADOS.

14.1. Arresto en Mitosis

Con base en el trabajo previo, en donde se había detectado que la curcumina induce un claro arresto en la fase G2/M, mediante citometría de flujo; decidimos definir si parte de ese arresto correspondía a un enriquecimiento de células en mitosis. Con dicho objetivo, se realizaron tinciones nucleares para identificar núcleos mitóticos (cromosomas condensados) y se evaluó por *western blot* y citometría de flujo los niveles de Histona 3 fosforilada en Serina 10 (H3S10-p), un marcador que se enriquece en mitosis.

14.1.1. *Conteo de núcleos mitóticos*

Para determinar la cantidad de células mitóticas evaluamos la presencia de núcleos con cromosomas condensados. En las células control o sin tratamiento con curcumina, observamos principalmente núcleos interfásicos, con cromatina no condensada (Figura 4A). Sin embargo, al tratarse de cultivos asincrónicos, sólo se detectó una población entre un 2 y 3.4 % de núcleos mitóticos, en las células sin tratamiento y expuestas a DMSO, respectivamente (Figura 4B). En respuesta a una dosis de 20 μ M de curcumina por 12, 18 y 24 h, observamos un incremento en la frecuencia de núcleos mitóticos, del 15, 20 y 26 %, respectivamente (Figura 4B, Tabla 1). Principalmente con morfologías típicas de etapas tempranas de la mitosis, tales como profase y prometafase. Estos datos sugieren que el fitoquímico favorece un incremento tiempo dependiente en la población de células con núcleos mitóticos.

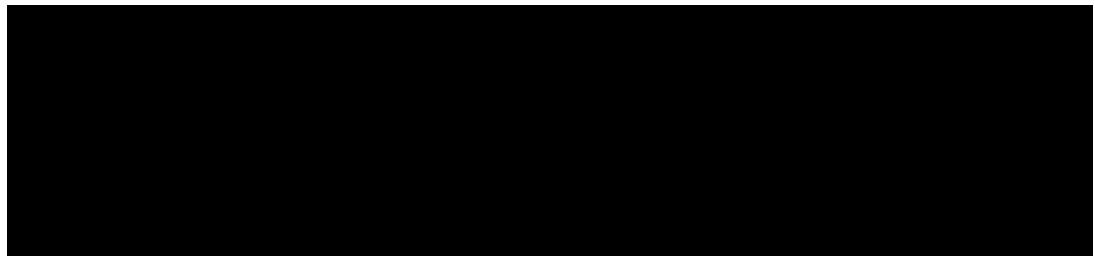
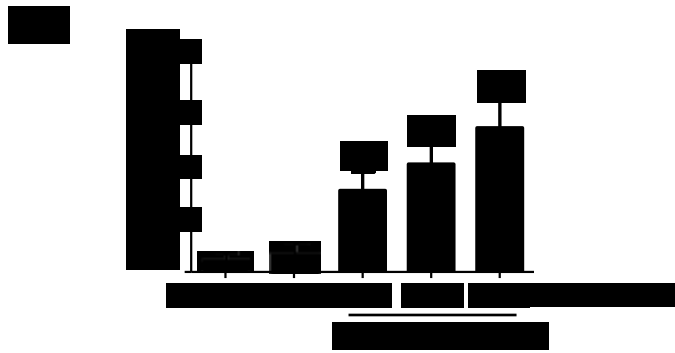
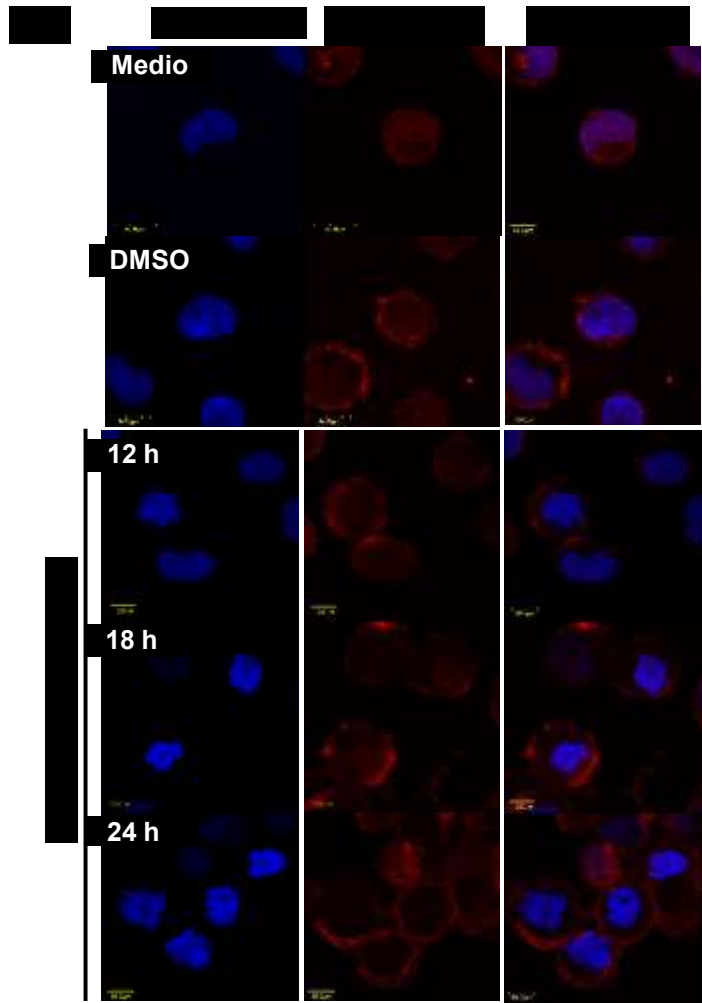
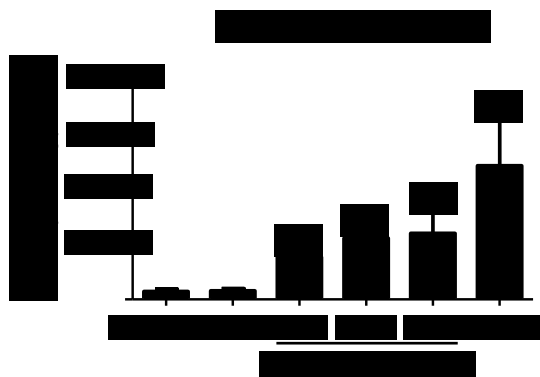
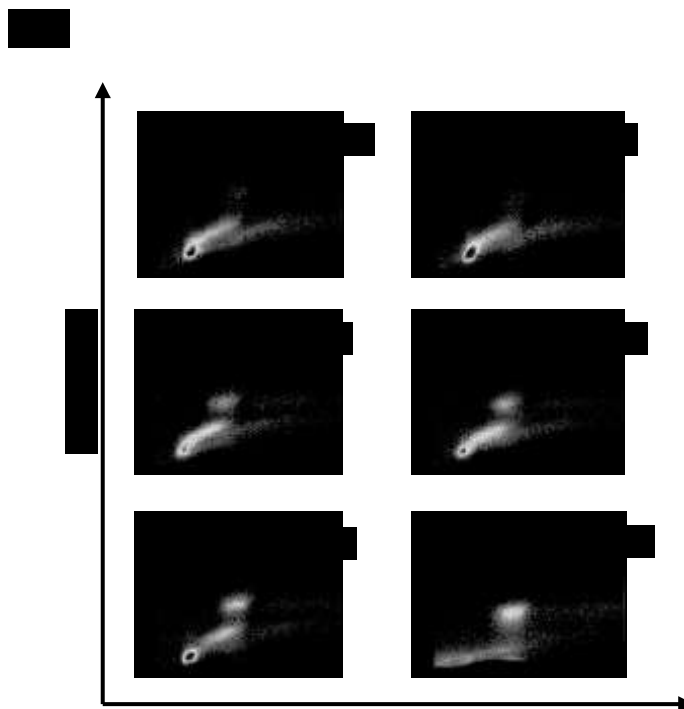


Tabla 1. Porcentajes de núcleos mitóticos	
Muestra	% Núcleos mitóticos (Media ± Desv. Estándar)
Medio	2.1 ± 1.09
DMSO	3.41 ± 1.7
20 µM Cur 12 h	15.05 ± 3.17
20 µM Cur 18 h	19.91 ± 3.88
20 µM Cur 24 h	26.6 ± 4.74

14.1.2. Niveles proteicos de H3S10-p

Para confirmar esta hipótesis, se evaluó la Histona 3 fosforilada en Serina 10 (H3S10-p), un marcador que se ha demostrado, se asocia fuertemente con la condensación de los cromosomas mitóticos en células de mamíferos [108]. Esta modificación por fosforilación es catalizada en el inicio de la fase G2, por la cinasa Aurora B en la heterocromatina pericentromérica y se propaga a lo largo de los brazos de los cromosomas, alcanzando su máxima abundancia en metafase, seguida de una rápida reducción hacia la transición a anafase [109].

En los ensayos de *western blot*, se detectó un claro incremento en los niveles de H3S10-p, desde la 6 h de tratamiento con 20 µM de curcumina. No obstante el máximo nivel de este marcador se observó a las 24 h, en un grado comparable al control positivo, que se obtuvo mediante el tratamiento con Nocodazol, un inhibidor de la polimerización de microtúbulos, que enriquece las poblaciones de células arrestadas en mitosis temprana (Figura 5A). Los cambios más evidentes en los niveles de H3S10-p, se detectaron a 12 y 24 h, lo cual parece ser consistente con el tiempo de duplicación de las células K562. Aproximadamente cada 12-16 h se esperaría que las células concluyeran un ciclo de duplicación y consecuentemente se enriqueciera la población G2/M, que posiblemente queda arrestada en mitosis.



[Redacted text block]

Con base en este resultado, se decidió evaluar por citometría de flujo los niveles de H3S10-p, en combinación con una tinción con yoduro de propidio, que determina el contenido de DNA. Con esta metodología pudimos identificar poblaciones con su material genético duplicado (4N), pero que además fueran positivas para la marca mitótica. Es decir, definir qué parte de la población G2/M, corresponde a células arrestadas específicamente en Mitosis. De forma consistente, con los resultados previos del conteo de núcleos, encontramos que en los grupos Medio y DMSO hay cerca de un 2.8% y 3% de células positivas para la marca mitótica (Figura 5B).

De forma evidente los grupos tratados con 20 μ M de curcumina muestran un incremento de 5-8 veces más en la frecuencia de dicho fenómeno. En respuesta al fitoquímico se detectó a las 12, 18 y 24 h de tratamiento, un aumento del 15%, 21.8% y 23%, respectivamente de células positivas para H3S10-p y contenido tetraploide de DNA (Figura 5B). Como control positivo, se utilizaron células tratadas con Nocodazol, en donde claramente hay una acumulación del 48% de células 4N/H3S10-p positivas.

Estos datos confirman que la dosis de 20 μ M de curcumina favorece un arresto en mitosis, que parece tener un comportamiento tiempo-dependiente. Por lo cual podemos concluir que parte del arresto G2/M que detectamos en nuestro trabajo previo, involucra un claro enriquecimiento de una población en mitosis.

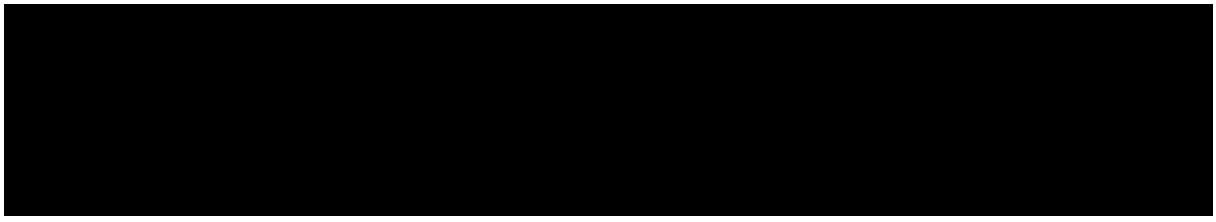
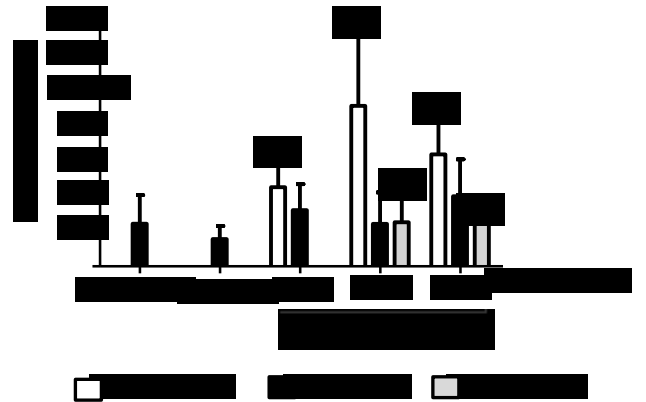
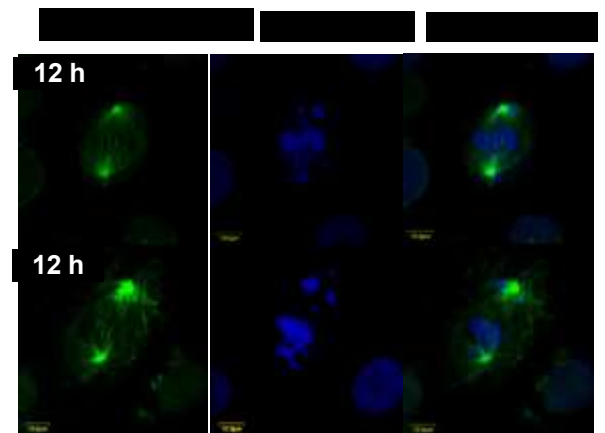
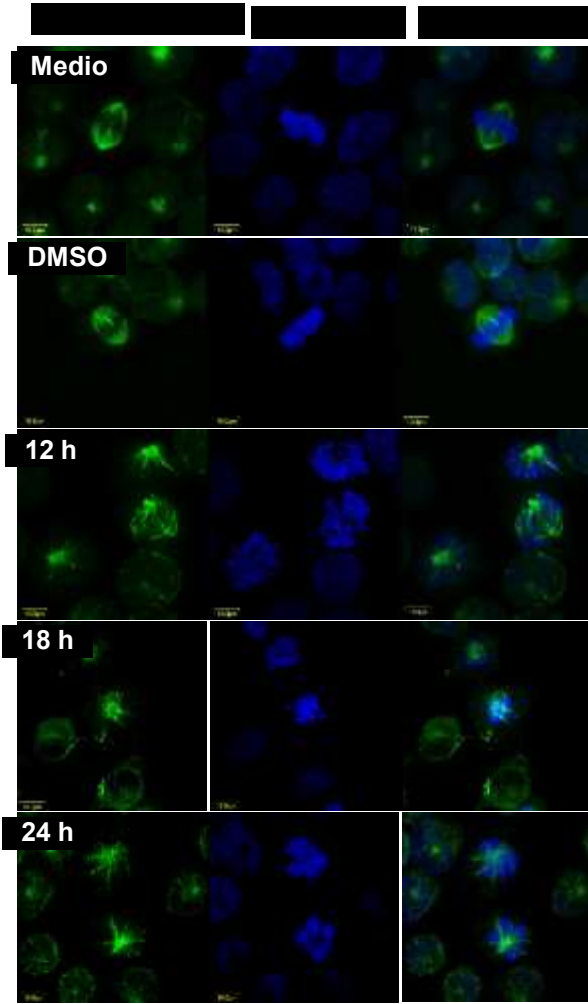
14.2. Alteraciones morfológicas en Mitosis

Una vez que demostramos que el fitoquímico induce un arresto en mitosis, decidimos evaluar si las características típicas de este proceso, como el adecuado ensamblaje del huso mitótico y una correcta segregación cromosómica no se ven afectados por el tratamiento con curcumina. Alteraciones en estos procesos se han descrito como marcadores morfológicos de células que experimentan procesos de catástrofe mitótica.

14.2.1. Efecto de la curcumina en el huso mitótico

Para analizar la arquitectura del huso mitótico realizamos tinciones de los microtúbulos mediante la detección de α -tubulina. Pese a que no contamos con un marcador de centrosoma, como γ -tubulina, para ubicar con precisión los polos, la convergencia de los microtúbulos a su centro organizador, genera zonas focales, con una tinción mayor para α -tubulina, lo cual evidencia de forma indirecta la localización de los centrosomas.

Como era de esperarse en cultivos asincrónicos, en los grupos control (medio o DMSO) detectamos aproximadamente un 2% de células con husos bipolares, con una arquitectura típica de metafase, con los cromosomas perfectamente alineados en el ecuador del huso, exhibiendo una orientación amfitética, es decir, sujetos a una tensión equivalente que proviene de microtúbulos que emanan de polos opuestos. No se detectaron husos monopolares o multipolares. En contraste, en las células tratadas con 20 μ M de curcumina se observó un incremento significativo en el número de husos monopolares dependiente del tiempo de exposición (Figura 6A, Tabla 2). Aunque también se detectó la presencia de husos bipolares, a diferencia de los observados en los controles, muchos de ellos se observan con defectos en la estructura y orientación de los microtúbulos, que deriva en una distribución asimétrica de los cromosomas. Lo anterior lo pudimos observar principalmente en los tratamientos con curcumina por 12 h, en donde resulta evidente mediante la tinción nuclear, que las alteraciones en la arquitectura de los microtúbulos deriva en una distribución asimétrica de los cromosomas (Figura 6B). Finalmente en tiempos largos de 18 y 24 h detectamos un ligero incremento de aproximadamente 2% en una población con husos multipolares (Tabla 2).



Estos datos sugieren que la curcumina tiene un impacto en la adecuada conformación de los husos mitóticos, favoreciendo principalmente un fenotipo de monopolaridad. Probablemente este efecto directo sobre la maquinaria esencial para la adecuada cariocinesis y progresión de la mitosis, podría explicar el efecto de la curcumina como un inductor de arresto en mitosis.

Tabla 2. Efecto de curcumina en el huso mitótico

	Monopolar	Bipolar	Multipolar
Medio	0	2.41 ± 1.62	0
DMSO	0	1.55 ± 0.73	0
20 µM Cur 12 h	4.48 ± 1.39	3.19 ± 1.47	0
20 µM Cur 18 h	9.09 ± 4.53	2.41 ± 1.78	2.5 ± 1.5
20 µM Cur 24 h	6.33 ± 2.03	3.97 ± 2.08	1.5 ± 0.27

14.2.2. Efecto de la curcumina en la segregación cromosómica

Con base en los datos previos se podría suponer que en presencia de un huso mitótico estructuralmente alterado, si la mitosis prosigue y la cariocinesis y citocinesis se completan, se puede dar origen a células con micronúcleos o multinúcleadas. También es posible que las células no experimenten citocinesis dando origen a células gigantes tetraploides. Es por ello que analizamos el impacto de la curcumina en la inducción de ambos parámetros. En las células crecidas sin tratamiento o expuestas a DMSO, hay un basal de aproximadamente 1% de células con micro/multinúcleos. Mientras que en respuesta a 20 µM de curcumina desde las 18 h hay un incremento de ~ 3% que alcanza su máximo valor a las 24 h con cerca de un 6 % (Figura 7, Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de curcumina en la morfología nuclear		
	Multi/micronúcleos	Células gigantes
Medio	0.90 ± 0.12	0
DMSO	2.31 ± 1.21	0
20 µM Cur 12 h	2.89 ± 1.43	1.02 ± 0.14
20 µM Cur 18 h	3.46 ± 2.02	0.75 ± 0.54
20 µM Cur 24 h	6.52 ± 3.12	0.64 ± 0.46

Por otra parte prácticamente no detectamos un cambio en la frecuencia de células gigantes en respuesta a curcumina (Tabla 3); sugiriendo que no son tan frecuentes los eventos de citocinesis abortivas. Estos datos demuestran que el fitoquímico, induce un incremento en la frecuencia de células con alteraciones nucleares en forma tiempo dependiente. Lo cual parece ser consistente con el incremento observado en alteraciones del huso mitótico que podrían impactar en orientaciones merotéticas o sintéticas de los cromosomas que deriven en segregaciones asimétricas. Aunque no se pudo descartar que la curcumina también afecte a proteínas de unión a microtúbulos como Astrina, que participan en el control de la segregación cromosómica.

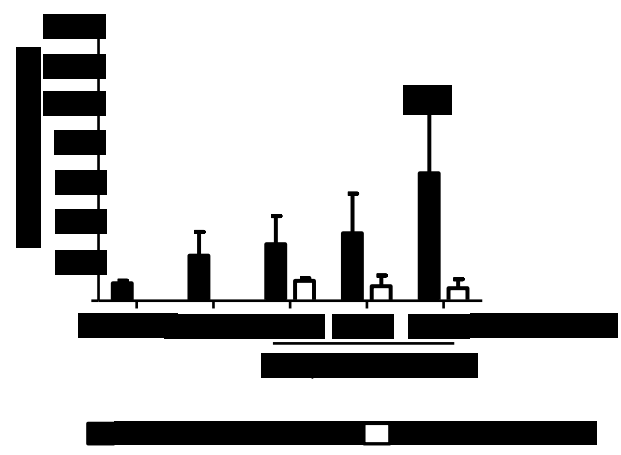
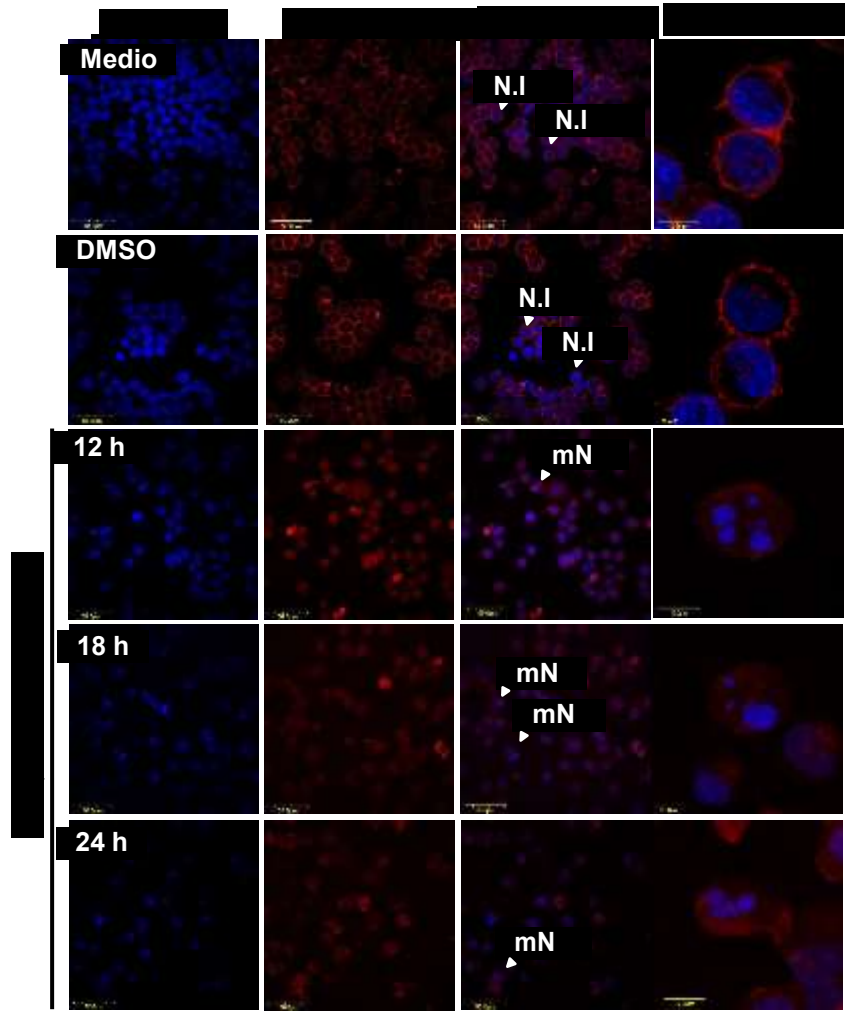


Figura 7. Curcumina induce anomalías nucleares. Las células K562 fueron crecidas en medio y tratadas con 0.1 % DMSO y 20 μ M de curcumina por 12, 18 y 24 h. Después de los tratamientos fueron fijadas para inmunofluorescencia. Se utilizó DAPI para teñir los núcleos y faloidina para el citoesqueleto de actina. Se gráfica el porcentaje de células con anomalías nucleares (multi/micronúcleos) o que presentan un fenotipo de células gigantes, en respuesta al tratamiento con curcumina. * $p < 0.05$ vs Medio. Se muestran imágenes representativas en 60X y el aumento en 100X/3X. N.I= Núcleo interfásico, mM= multi/micronúcleos.

14.2.3. Efecto de la curcumina en proteínas de unión a microtúbulos

La estabilidad y funcionalidad de los husos mitóticos no sólo depende de la estructura de los microtúbulos sino también de la participación de proteínas de unión a microtúbulos (MAP's, *Microtubule Associated Proteins*). Esto es de la mayor importancia porque hay MAP's, como la Astrina que además de brindarle estabilidad a los microtúbulos también se la confieren a las interacciones entre cinetocóros y microtúbulos; un evento clave en la segregación cromosómica. De hecho, una inadecuada localización de Astrina deriva en la activación del SAC, el principal sistema de control, para arrestar a las células en mitosis.

Por ello decidimos analizar el efecto de la curcumina sobre la localización de Astrina en los microtúbulos. En los grupos control, conforme a lo descrito en otros modelos celulares observamos una distribución de la Astrina a lo largo de los husos en células en prometafase y en células en metafase detectamos una acumulación de astrina en el plano ecuatorial (Figura 8A, ver aumentos). El tratamiento con 20 μ M de curcumina a los tiempos de 12, 18 y 24 h produce una relocalización de Astrina y su acumulación a nivel de los polos del huso mitótico (Figura 8A, ver aumentos). En consecuencia pese a que los núcleos más abundantes, parecen ser típicos de una prometafase, no se detectó presencia de Astrina a lo largo de los microtúbulos del huso (Figura 8A, ver aumentos).

Para contar con mayores evidencias de una posible localización de Astrina en la zona de los polos del huso mitótico, decidimos evaluar su asociación con γ -tubulina, un componente del centrosoma; una estructura que en mitosis es típicamente polar. Para ello se realizó la inmunoprecipitación de Astrina y se detectó por *western blot* la presencia de γ -tubulina. Encontramos que en las muestras tratadas con 20 μ M de curcumina por 24 h, hay una mayor asociación de Astrina con γ -tubulina, en comparación con lo observado en el grupo expuesto a DMSO (Figura 8B). Este dato sugiere que

el tratamiento favorecería dicha asociación, probablemente como resultado de una mayor localización de Astrina en los polos.

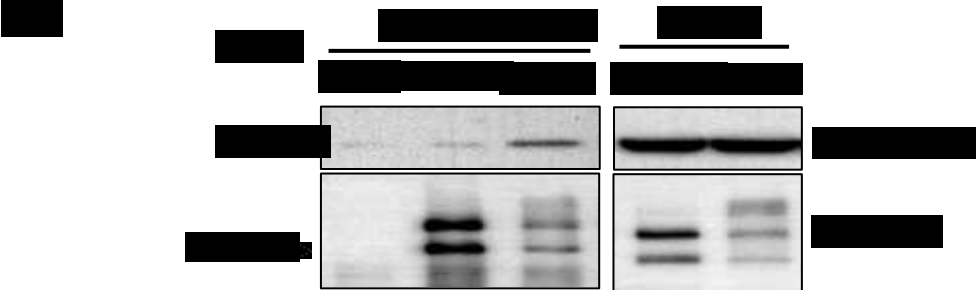
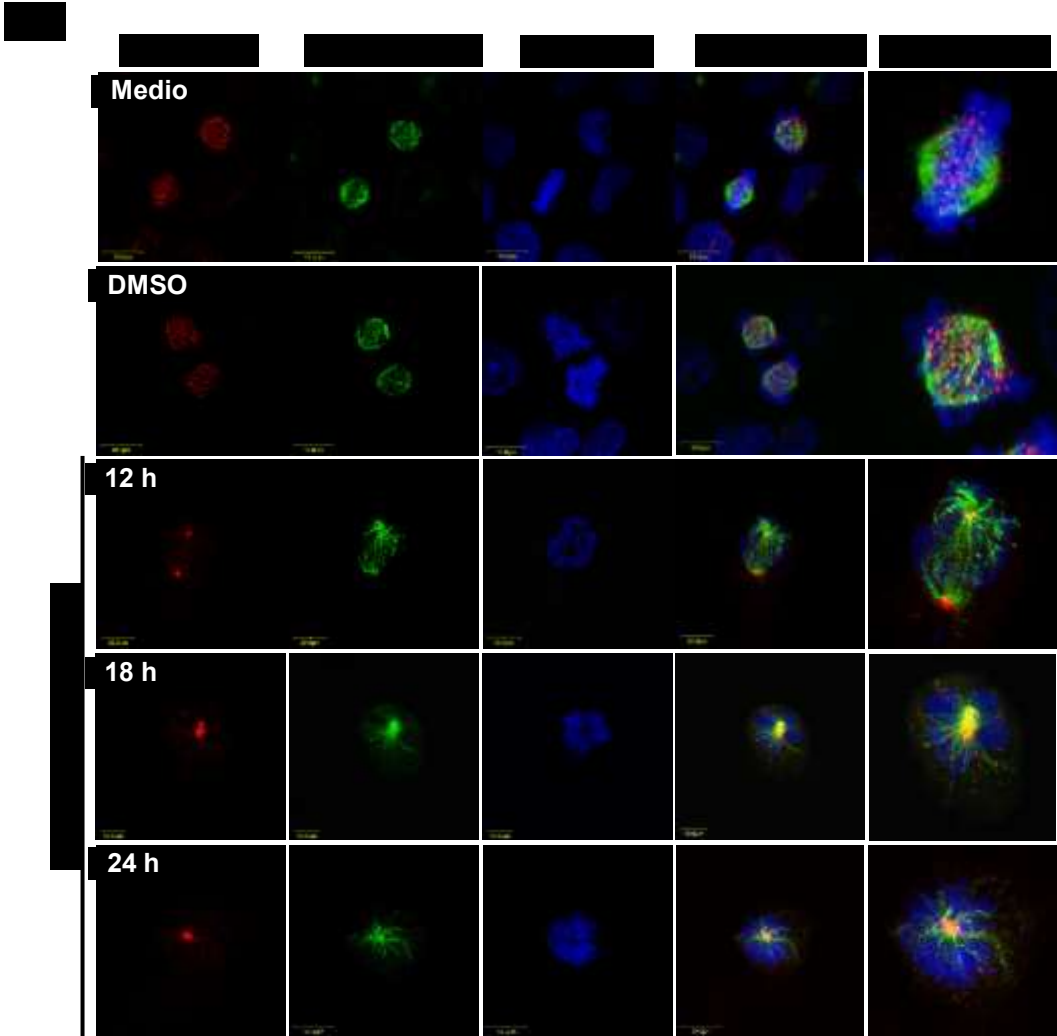
Es importante señalar que en los inmunoprecipitados del grupo control observamos las dos isoformas típicas de Astrina de ~135/120 kDa. Sin embargo, en la muestra tratada con 20 μ M de curcumina por 24 h, observamos un retardamiento en el patrón de corrimiento en el SDS-PAGE, que se traduce en una banda de mayor peso (Figura 8B). Este cambio en la migración de Astrina, también lo detectamos en los *inputs* tratados con el fitoquímico (Figura 8B).

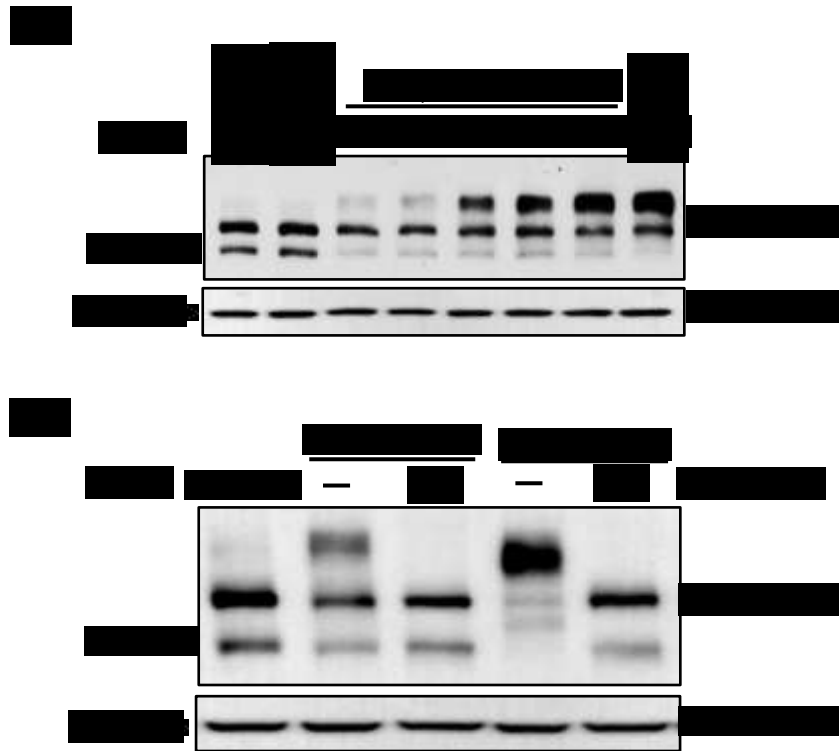
Este fenómeno lo detectamos a las 24 h de tratamiento, por lo que decidimos evaluar su comportamiento en una cinética. Mediante *western blot* detectamos un retardamiento en el patrón de migración de Astrina en las células expuestas a 20 μ M de curcumina, que se traduce en la aparición de una tercer banda, principalmente a las 12, 18 y 24 h de tratamiento (Figura 9A). Cabe señalar que en paralelo se detectó una menor cantidad de la isoforma de ~120 kDa, lo que podría sugerir que está variante sea el principal blanco de la modificación post-traducciona (Figura 9A).

En respuesta a Nocodazol, un inductor típico de arresto en mitosis temprana, se ha descrito un cambio en la movilidad de Astrina que es producto de una fosforilación posiblemente catalizada por el complejo de CDK1/ciclina B [110]. Por ello decidimos incluir un grupo tratado con Nocodazol, para comparar su patrón electroforético con el observado en respuesta al fitoquímico. Nuestros datos muestran que ambos tratamientos después de 24h producen un retardamiento similar en Astrina (Figura 9A). Con base en este dato decidimos evaluar si como en el caso de Nocodazol, el retardamiento observado en respuesta a curcumina podría ser consecuencia de fosforilación.

Para probar que realmente se trataba de una fosforilación, decidimos tratar extractos de células expuestas a curcumina y nocodazol con una pan-

fosfatasa y después corrimos esta muestra, bajo la premisa de que si el retardamiento era producto de fosforilación este desaparecería en las muestras tratadas con la fosfatasa Lambda (λ -PPasa).





Los resultados revelaron que el tratamiento previo con λ -PPasa, elimina la banda retardada, reestableciéndose el patrón típico de migración de Astrina que se observa en el grupo expuesto a DMSO (Figura 9B).

Estos datos sugieren que indirectamente la curcumina favorece una acumulación de Astrina fosforilada, al promover un arresto en mitosis.

14.3. Muerte celular tipo apoptosis

Datos previos de nuestro laboratorio sugerían una posible correlación entre el arresto en G2/M y la muerte celular de K562 en respuesta a curcumina. Dado que demostramos que parte de dicho arresto se da específicamente en mitosis y que hay un daño evidente en el aparato mitótico, estos elementos podrían constituirse en inductores de muerte celular, conforme al modelo de catástrofe mitótica. Por lo cual se evaluaron si el tratamiento con 20 μ M de curcumina a los tiempos de 12, 18 y 24 h, tendrían un efecto en algunos parámetros típicos de una muerte por apoptosis, tales como: aumento de la permeabilidad de la membrana celular, procesamiento de caspasas, cambios en los niveles de proteínas pro-apotóticas y anti-apotóticas así como fragmentación del DNA.

14.3.1. Aumento de la permeabilidad de la membrana celular

Para evaluar esta variable utilizamos un sistema que permite discriminar las células vivas de las muertas con base en diferencias en sus fluorescencias (*kit* LIVE/DEAD; Invitrogen). Este *kit* se basa en el uso de un colorante que reacciona con los grupos amino de las proteínas. En las células vivas la interacción del fluoróforo con los amino de las proteínas de membrana deriva en una fluorescencia basal, que se incrementa cuando las células mueren y su membrana plasmática se vuelve más permeable permitiendo la entrada del colorante y su reacción con los amino de todas las proteínas citoplasmáticas.

Nosotros detectamos que los grupos control, exhiben una muerte basal de aproximadamente 5-6%. En contraste, en las muestras tratadas con 20 μ M de curcumina detectamos a las 12 h, un incremento en la muerte celular de 18 %, que prácticamente no cambia a las 18 h (19%) y que alcanza su mayor valor a las 24 h, con cerca del 50 % de células muertas (Figura 10, Tabla 4). Confirmamos que el sistema funcionaba adecuadamente, ya que en el

control positivo, expuesto a UV, detectamos cerca de un 90 % de células muertas.

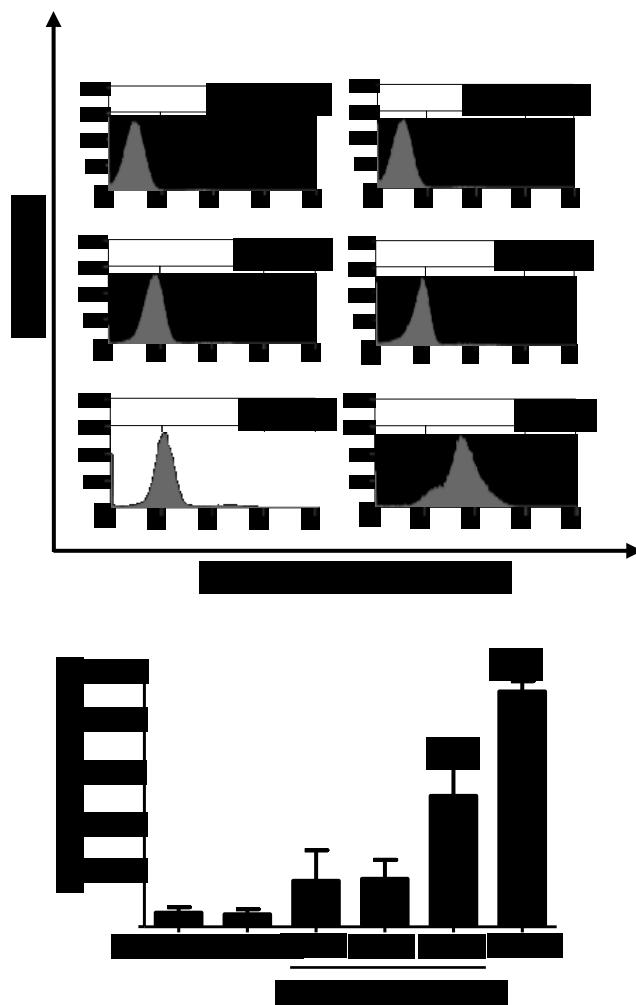
Estos datos sugieren que la curcumina después de 24 h de tratamiento, promueve un incremento en la permeabilidad de la membrana celular que se puede asociar a un mayor número de células comprometidas a muerte celular.

Tabla 4. Porcentaje de muerte celular en respuesta a curcumina	
Muestra	Muerte celular (%)
Medio	5.58 ± 1.66
DMSO	4.98 ± 1.65
20 µM Cur 12 h	18.12 ± 6.91
20 µM Cur 18 h	18.89 ± 5.21
20 µM Cur 24 h	51.36 ± 9.81
UV	92.31 ± 2.86

14.3.2. Cambios en los niveles de proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas.

Dado que determinamos un efecto citotóxico de la curcumina, decidimos evaluar si dicho fenómeno correlacionaba con un cambio a nivel de las proteínas de la familia BCL-2 que regulan la estabilidad de la membrana mitocondrial. Evaluamos la proteína pro-apoptótica, BAX, sin detectar ningún cambio evidente en sus niveles, en respuesta al tratamiento. En contraste, la proteína anti-apoptótica BCL-2 mostro niveles bajos desde las 3 h de tratamiento con 20 µM de curcumina, con respecto a los controles (Figura 11A). Cabe señalar que a las 24 h, el punto donde se observa la mayor cantidad de células comprometidas a muerte celular (Figura 10), la reducción de BCL-2 fue dramática y prácticamente no se detecta la proteína (Figura 11A).

Complementariamente evaluamos los niveles proteicos de algunos miembros de la familia de inhibidores de la apoptosis (IAP): XIAP y survivina. La primera es un inhibidor canónico que se une a las caspasas-3, -7 y-9, a través de sus dominios BIR; mientras que survivina participa tanto en la inhibición indirecta de las caspasas, como en la regulación de la progresión mitótica. En el caso de XIAP detectamos una reducción desde las 3 horas de tratamiento, con respecto a los niveles observados en los grupos Medio y DMSO.



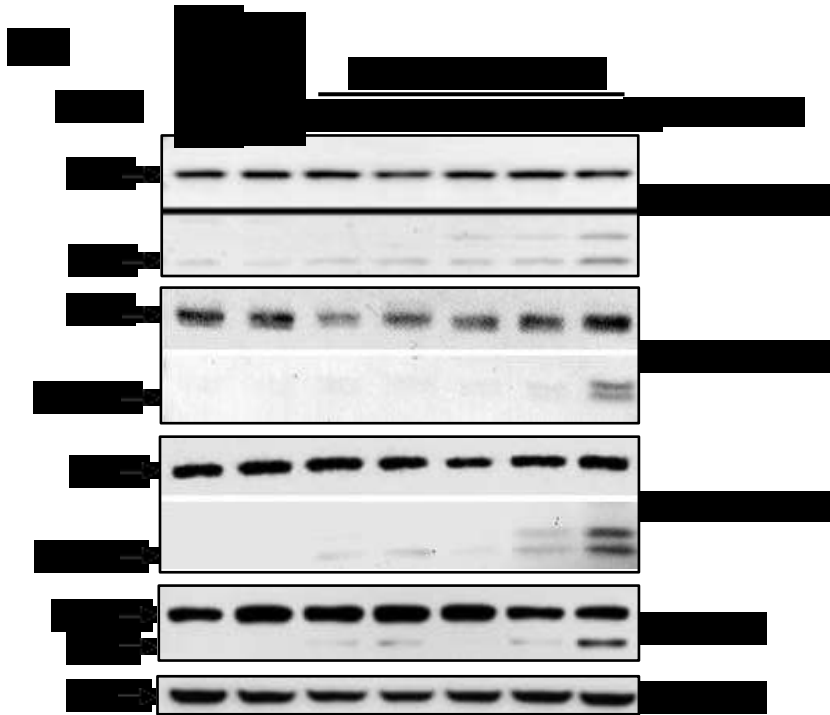
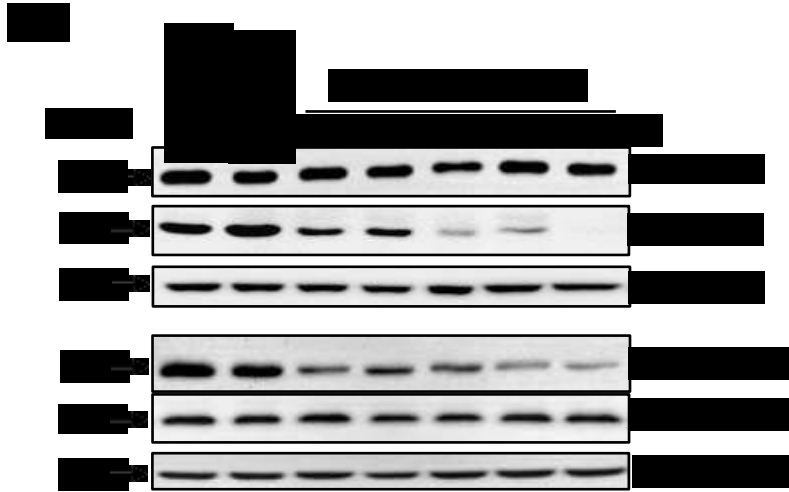
De forma análoga a lo observado con BCL-2, la menor cantidad de proteína la detectamos después de 24 h de exposición a 20 μ M de curcumina (Figura 11A). En contraste, no se detectaron cambios en los niveles proteicos de survivina en los diferentes tiempos de tratamiento con respecto a los controles (Figura 11A). Estos datos sugieren una reducción en componentes canónicos de la maquinaria antiapoptótica que favorecerían la activación de las caspasas.

14.3.3. Efecto de curcumina en el procesamiento de las caspasas

Debido a que nuestros hallazgos mostraban una reducción en algunos mecanismos anti-apoptóticos que impiden la activación de las caspasas, decidimos analizar su procesamiento; una forma indirecta para evaluar si están activas.

Aunque los cambios en BCL-2 sugerían principalmente una alteración a nivel de la membrana mitocondrial, si la curcumina activa un mecanismo tipo apoptosis se podría esperar el encendido de las dos rutas. Es por ello que analizamos tanto la caspasa-9, como la caspasa-8; moléculas iniciadoras de la vía intrínseca y extrínseca, respectivamente. También evaluamos el procesamiento de la caspasa-3, efectora y el corte de PARP, uno de sus principales sustratos.

En los grupos control, sólo detectamos la forma completa (47 kDa) de la caspasa-9. Sin embargo, en respuesta a curcumina las formas de procesamiento parcial (37/35 kDa) se detectan desde las 12 h, evidenciándose de forma clara a las 24 h (Figura 11B). Similarmente las formas de procesamiento parcial (43/41 kDa) de caspasa-8 se detectan hasta las 24 h de tratamiento (Figura 11B). En consistencia con la activación de las caspasas iniciadoras, en respuesta a curcumina detectamos las formas de procesamiento total (19/17 kDa) de caspasa-3, a partir de las 12 h; alcanzándose sus mayores niveles a las 24 h, el punto temporal donde se presenta el mayor efecto tóxico (Figura 11B).



[Redacted text block]

El patrón de procesamiento de caspasa-3 sugería su posible activación; para confirmar esta hipótesis evaluamos el procesamiento de PARP, uno de sus principales sustratos. Observamos la mayor acumulación de PARP cortado (89 kDa), a las 24 h de tratamiento con el fitoquímico (Figura 11B). Este evento es consistente con que a ese tiempo es cuando se detecta la mayor cantidad de caspasa-3 procesada y teóricamente activa.

Todos estos datos sugieren que la curcumina podría promover un mecanismo de apoptosis intrínseca, que deriva en el procesamiento parcial de la caspasa-9 y el procesamiento total de la caspasa-3. Esta última parece ser funcionalmente activa, como lo evidencia el corte de PARP.

14.3.4. Fragmentación del DNA

Dado que los datos previos nos sugerían la activación de un mecanismo de muerte celular programada; se evaluó un marcador típico de células en apoptosis tardía: la fragmentación del DNA.

En primera instancia analizamos la fragmentación de la cromatina, que ocurre entre los nucleosomas y produce oligómeros que son múltiplos de aproximadamente 180 pb y que generan el típico patrón de escalera en una electroforesis de DNA. En las células control, básicamente se extrajo DNA genómico de alto peso molecular, sin evidencia de fragmentación. En contraste, en las células tratadas con 20 μ M de curcumina por 24 h, se detecta un patrón de fragmentos de DNA, múltiplos de 200 pb, que va del rango de 200 a 1400 pb. Adicionalmente observamos una proporción de DNA de alto peso molecular, por arriba de las 15000 pb (Figura 12A). Este patrón difiere del obtenido en el control positivo, que fueron células tratadas con 100 nM de Nocodazol por 24 h. En este grupo se detectó un enriquecimiento de los productos de fragmentación y la desaparición del material de alto peso molecular (Figura 12A). Estos datos sugieren que el fitoquímico activa un proceso de fragmentación parcial de la cromatina, en las células que sufren apoptosis.

Con la evidencia anterior, decidimos emplear una metodología que nos permitiera determinar si parte de esta fragmentación ocurre en la población arrestada en la fase G2/M que se enriquece a las 24 h de tratamiento. Para ello utilizamos una doble tinción que nos permitiera definir a las poblaciones TUNEL positivas (con fragmentación del DNA) que tuvieran un contenido tetraploide de DNA (arrestadas en G2/M) (Figura 12B, Tabla 5). En los grupos control, se detectó cerca de un 3-4 % de células TUNEL positivas no asociadas a una fase específica de ciclo celular. Sin embargo, en las células tratadas con 20 μ M de curcumina por 24 h, detectamos una población de aproximadamente 22 % de células TUNEL positivas y arrestadas en la fase G2/M (Figura 12B). Estos datos fueron consistentes con los ensayos previos de fragmentación de la cromatina pero adicionalmente nos sugieren que este marcador apoptótico ocurre preferentemente en la población concentrada en G2/M. Adicionalmente, confirmamos el adecuado funcionamiento y sensibilidad del sistema empleando un control positivo proporcionado por el *kit* APO-BrdU™ TUNEL Assay Kit (Invitrogen) en donde detectamos ~ 30% de células TUNEL positivas (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentaje de células TUNEL positivas	
Muestra	Muerte celular
Medio	3.81 \pm 2.08
DMSO	3.02 \pm 2.63
20 μM Cur 24 h	21.94 \pm 3.57
Control +	29.57 \pm 7.57

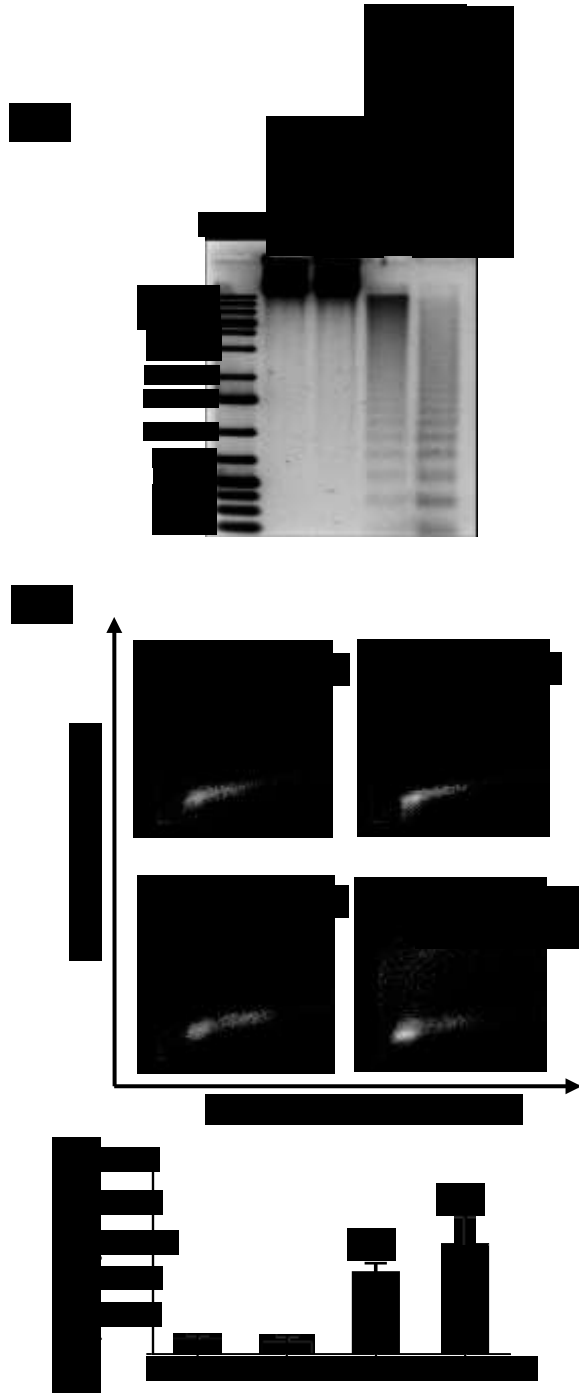


Figura 12. Curcumina induce la fragmentación del DNA. Las células K562 fueron tratadas con 20 μM curcumina por 24 h. Como controles negativos se utilizaron células crecidas en Medio y expuestas a 0.1 % DMSO. (A) Se analizó la fragmentación de la cromatina mediante el ensayo de escalera de DNA en geles de agarosa. Como control positivo se utilizaron células tratadas con 100 nM de Nocodazol por 24 h. Se muestra un gel representativo. (B) Las células fueron teñidas con el kit APO-BrdU™ TUNEL Assay (Invitrogen) y analizadas por citometría de flujo, con el objetivo de determinar si parte de la fragmentación del DNA, ocurría específicamente en la fase G2/M. El control positivo empleado en este ensayo es parte de los componentes del kit empleado. Se gráfica la media ± desv. stn de por lo menos tres experimentos independientes. * $p < 0.05$ vs Medio.

14.4. Muerte celular en mitosis

Los resultados anteriores muestran que una dosis de 20 μM de curcumina por 24 h, produce un claro enriquecimiento de células en mitosis, pero además una reducción en algunas moléculas anti-apoptóticas como BCL-2 y XIAP, así como un procesamiento de caspasas y fragmentación del DNA en la fase G2/M. Por lo cual decidimos evaluar si conforme al modelo de catástrofe mitótica, parte de las células que se encuentran arrestadas en mitosis, mueren por un mecanismo tipo apoptosis. Para ello, mediante inmunofluorescencia y citometría de flujo realizamos una doble tinción para detectar las células doble positivas para un marcador de arresto en mitosis (H3S10-p) y apoptosis (Caspasa-3 activa). El primer acercamiento cualitativo por inmunofluorescencia, nos permitió detectar principalmente células H3S10-p (+)/Caspasa-3 (-) en los grupos control. En respuesta al esquema de 20 μM curcumina por 24 h detectamos dos poblaciones, una primera con núcleo interfásico y caspasa-3 activa (Figura 13A). Una segunda, exhibía un claro núcleo mitótico y en consecuencia una fuerte tinción para H3S10-p. Parte de estas células también fueron positivas para la marca de caspasa-3 activa (Figura 13A). La detección visual de esta población doble positiva es lo que nos sugirió la conveniencia de cuantificarla mediante citometría de flujo. En las muestras control detectamos cerca de un 3 % de células H3S10-p positivas y aproximadamente un 6%, caspasa-3 positivas; estimándose cerca de un 2% de poblaciones dobles positivas (Figura 13B, Tabla 7). Sin embargo, en las muestras tratadas con 20 μM curcumina por 24 h, hubo un incremento significativo en todas las poblaciones analizadas. Se detectó ~ 16 % de células positivas para H3S10-p, ~ 11 % de células caspasa-3 positivas y la población H3S10-p (+)/ Caspasa-3 (+) se incrementó hasta en un 18 %, todas suman aproximadamente 45%, similar al porcentaje de células arrestadas en G2/M. Como controles positivos de las marcas H3S10-p y caspasa-3 activa, se utilizaron células tratadas con 100 nM de Nocodazol y 1 μM de estaurosporina por 24h, respectivamente (Figura 13B, Tabla 6).

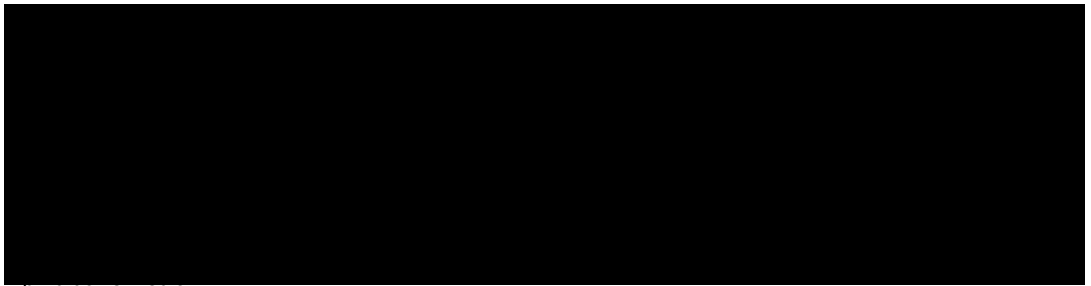
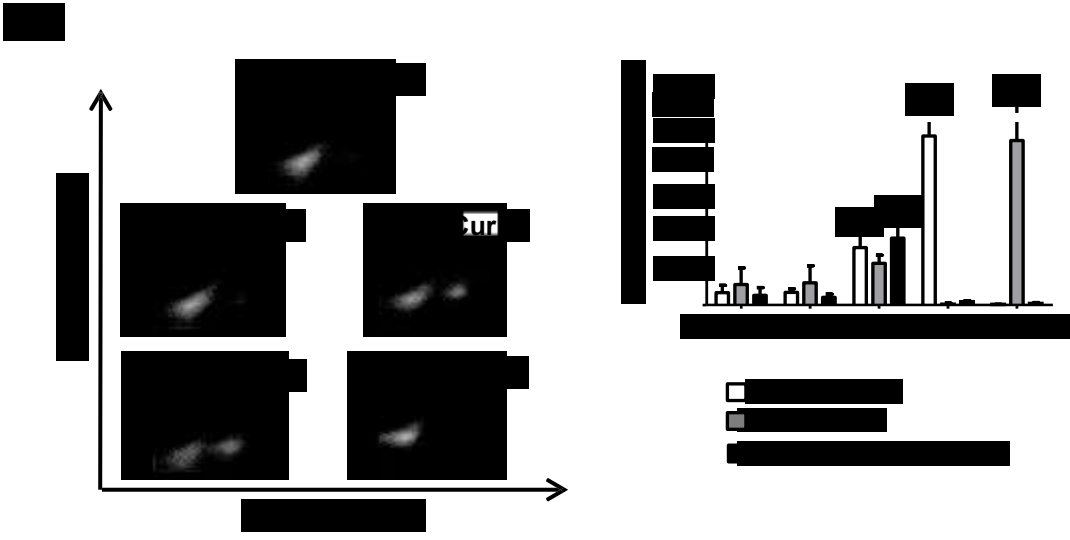
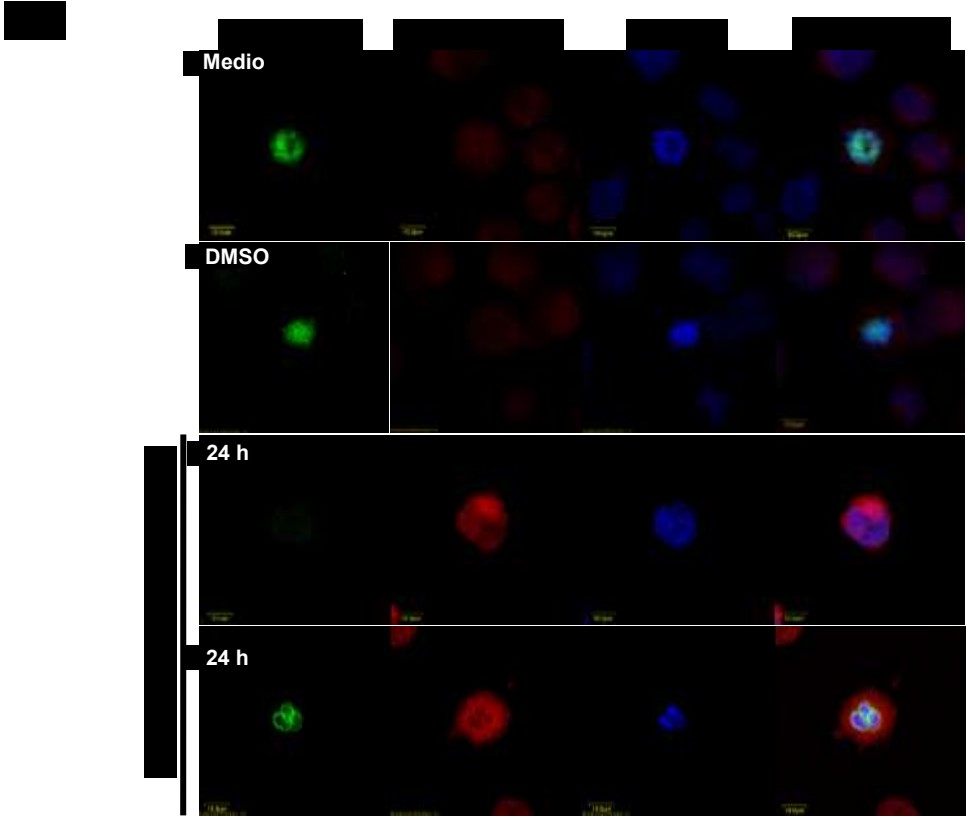


Tabla 6. Porcentaje de células H3S10-p, Caspasa-3 y H3S10-p/Caspasa-3 positivas

	H3S10-p (+)	Casp-3 (+)	H3S10-p (+)/Casp-3 (+)
Medio	3.37 ± 1.86	5.63 ± 4.14	2.66 ± 1.93
DMSO	3.51 ± 0.86	6.09 ± 4.19	2.12 ± 0.76
20 µM Cur 24 h	15.7 ± 4.14	11.43 ± 1.92	18.31 ± 4.41
100 nM Noco 24 h	46.23 ± 10.45	0.24 ± 0.25	0.95 ± 0.18
1 µM Staur 24 h	0.11 ± 0.11	45 ± 19.35	0.45 ± 0.19

14.5. Puntos de control en G2 y Mitosis

Una vez que demostramos que el fitoquímico es capaz de inducir un proceso de muerte celular en mitosis, decidimos evaluar el estatus de algunos componentes moleculares del punto de control en G2 y Mitosis. Esto es importante, porque el estado de activación de dichos puntos de control es clave para la evolución del proceso de catástrofe mitótica. Se ha propuesto que un punto de control en G2 débil que permite la entrada prematura a mitosis de células con daño a DNA, es un inductor de catástrofe mitótica. Adicionalmente, las células que sufren un daño directo en el aparato mitótico, se arrestan en dicha fase como resultado de un adecuado funcionamiento del punto de control de ensamblaje del huso, que detecta alteraciones a nivel de la interacción entre cinetócoros y microtúbulos. Por lo cual dicho sistema, permite el establecimiento del arresto en mitosis que es clave en el mecanismo de catástrofe mitótica.

14.5.1. Daño a DNA y marcadores de arresto en G2

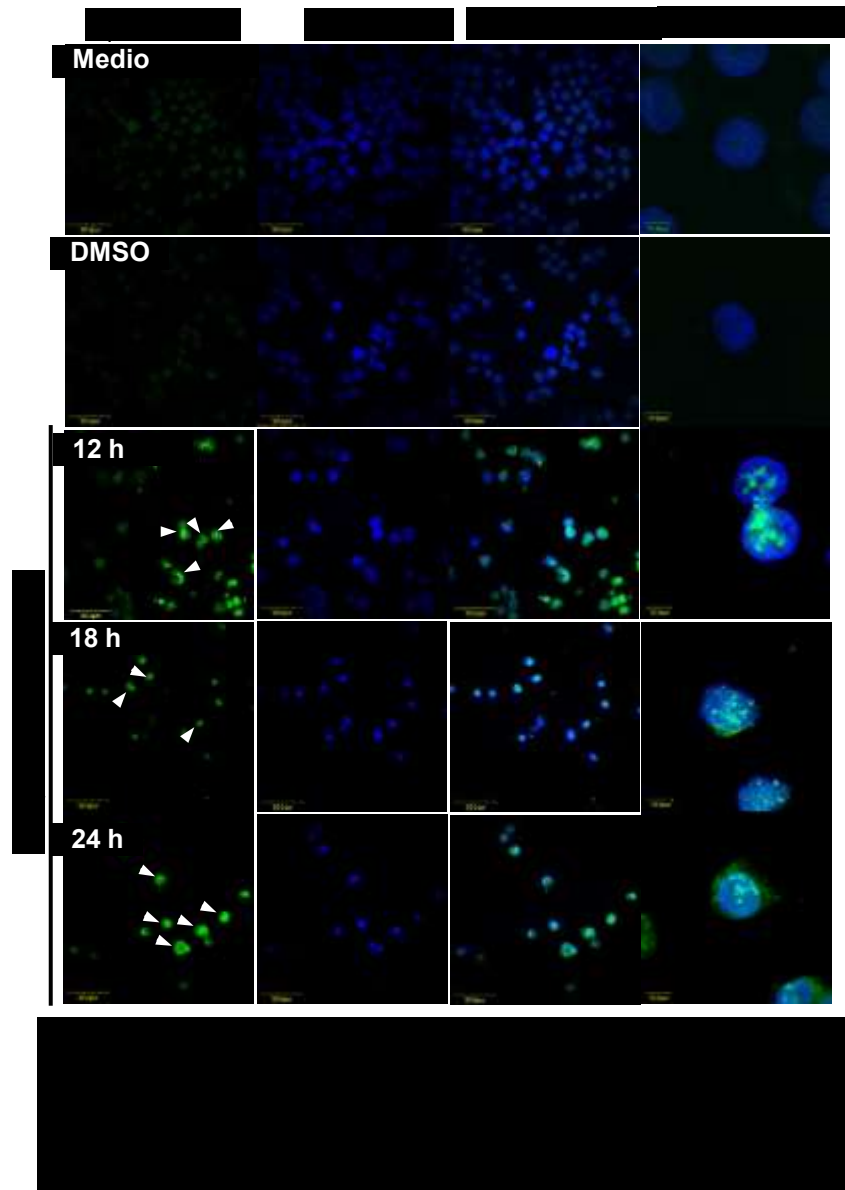
Primero se evaluó la capacidad del fitoquímico para inducir daño en el DNA. Para ello evaluamos por inmunofluorescencia un marcador típico de daño a DNA, la fosforilación en Ser 139 de la variante de histona H2AX (γ -H2AX), catalizada por cinasas tipo, ATM, ATR y DNA-PK [111]. Mediante esta

metodología el daño a DNA se detecta por la observación de focos de tinción de γ -H2AX.

En respuesta a la dosis de 20 μ M de curcumina a los tiempos de 12, 18 y 24 h, observamos la presencia evidente de focos de γ -H2AX, en comparación con los grupos control (Figura 14, ver aumentos). Este resultado nos sugirió que el tratamiento con el fitoquímico es capaz de inducir daño a DNA; un inductor típico de activación del punto de control en G2. Dado que justo en esos tiempos también tenemos un arresto de las células en la fase G2/M, entonces decidimos evaluar el estado de activación de una cinasa clave de dicho sistema, CHK-1 que fosforila e inactiva a las fosfatasas CDC25C. Así como los niveles de proteína de dos moléculas efectoras 14-3-3 σ que secuestra en citoplasma a CDC25C y P21, un inhibidor de complejos Ciclina/CDK.

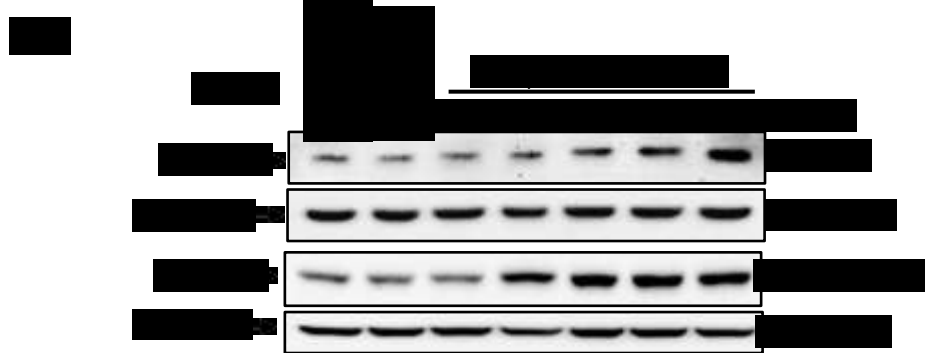
Para evaluar el estado de activación de CHK1, analizamos mediante *western blot*, sus niveles de fosforilación en Ser 345 (p-CHK1). Esta modificación es catalizada por ATR principalmente en respuesta a rupturas de doble cadena del DNA, lesiones ricas en γ -H2AX. Aunque esperábamos un incremento de p-CHK1 en consistencia con el mayor número de focos de daño a DNA; el tratamiento con 20 μ M de curcumina indujo una reducción con respecto a los niveles detectados en los controles, que es más clara a las 24 h (Figura 15A). Esta reducción en la forma fosforilada no tiene impacto en CHK1 total, ya que sus niveles son muy comparables entre los grupos control y los tratados (Figura 15A). Este dato sugería que este sistema no estaría activo y no podría fosforilar a CDC25C para crear sitios de andamiaje para las proteínas 14-3-3. Sin embargo, dado que los niveles de 14-3-3 σ no están directamente relacionados con la actividad de CHK1, decidimos evaluar si el fitoquímico, tenía algún efecto en los niveles de esta proteína. Encontramos que en comparación con los grupos control, las células expuestas a 20 μ M de curcumina exhiben un aumento en los niveles de 14-3-3 σ , desde las 6 h de tratamiento (Figura 15B). En realidad no podemos sugerir si este cambio

tiene un impacto en la actividad del punto de control en G2, ya que la localización de su principal blanco, CDK1/CiclinaB1 o su asociación con CDC25C, no lo analizamos.



De acuerdo a los datos previos podríamos sugerir que el brazo de respuesta rápido no es totalmente funcional por la falta de activación de una cinasa transductora clave, como es CHK1. Es por ello que decidimos evaluar si la curcumina también tenía algún impacto en el brazo de respuesta lenta del punto de control en G2 que involucra la activación del programa transcripcional controlado por p53 que deriva en la expresión de P21.

Encontramos que los niveles proteicos de P21 aumentan en respuesta al tratamiento desde las 12 h alcanzando un máximo nivel a las 24 h (Figura 15B). Estos cambios podrían tener una implicación funcional, ya que en el punto temporal donde observamos la mayor cantidad de este inhibidor, también hemos detectado un claro arresto en G2/M.

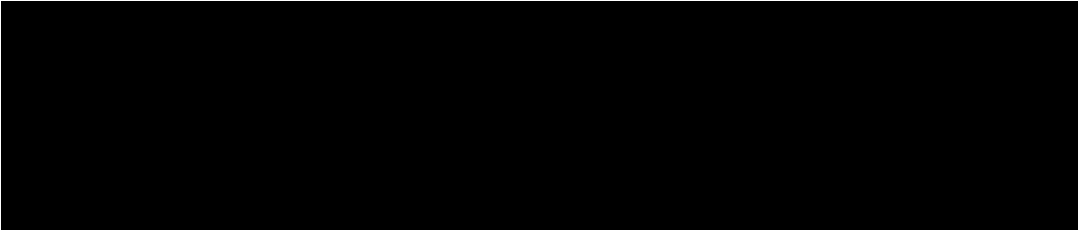
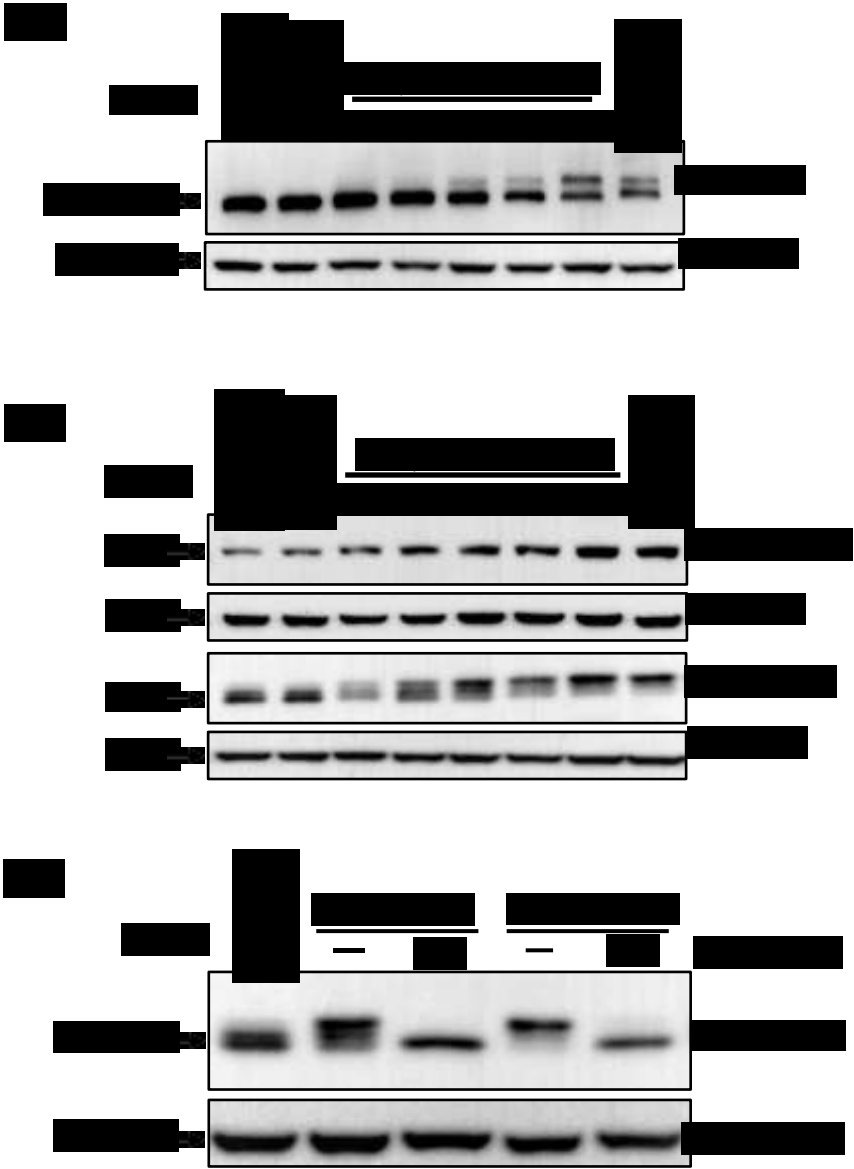


14.5.2. Marcadores de activación del punto de control en Mitosis

El principal sistema para arrestar a las células en mitosis es el punto de control de ensamblaje del huso (*SAC, Spindle Assembly Checkpoint*) que se enciende en respuesta a alteraciones a nivel de la adecuada interacción entre cinetócoros y microtúbulos. De la primera parte de este trabajo sabemos que la curcumina arresta en mitosis y provoca alteraciones en la adecuada conformación del huso mitótico que parecen tener un impacto en la adecuada segregación cromosómica. Es decir, sería probable que en respuesta a curcumina se activara el SAC, por lo que decidimos evaluar indirectamente su funcionalidad. Para ello, analizamos el estado de fosforilación de BUBR1, que correlaciona con una acumulación en mitosis y un ensamblaje del SAC en respuesta a alteraciones del huso [112, 113]. Adicionalmente, evaluamos los niveles de ciclina B y securina, dos sustratos del Complejo promotor de la Anafase (*APC/C, Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*), que se acumulan cuando el SAC está encendido y se impide la transición a anafase. Observamos una acumulación de la forma fosforilada de BUBR1 (p-BUBR1) que se evidencia por un retardamiento en su patrón de migración en la electroforesis. La aparición de una banda por arriba de los 120 kDa, que corresponde a la forma hiperfosforilada de BUBR1, es clara desde las 12 h de tratamiento (Figura 16A). La mayor cantidad de p-BUBR1 lo detectamos a las 24 h en niveles comparables al control positivo, células arrestadas en mitosis mediante el tratamiento con Nocodazol (Figura 16A). Este dato sugeriría un posible ensamblaje del SAC que de ser funcional debería impactar en la inactivación del complejo APC/C y la falta de degradación de sus posibles sustratos.

En el caso de ciclina B1, se detecta una acumulación desde las 6 h de tratamiento con curcumina, observándose la mayor cantidad de proteína en 24 h, en niveles comparables al control positivo, tratado con Nocodazol (Figura 16B). Análogamente en el caso de Securina hay una clara acumulación de proteína a las 24 h de tratamiento con el fitoquímico, pero

adicionalmente hay un retardamiento en el patrón de migración desde las 6 h (Figura 16B).

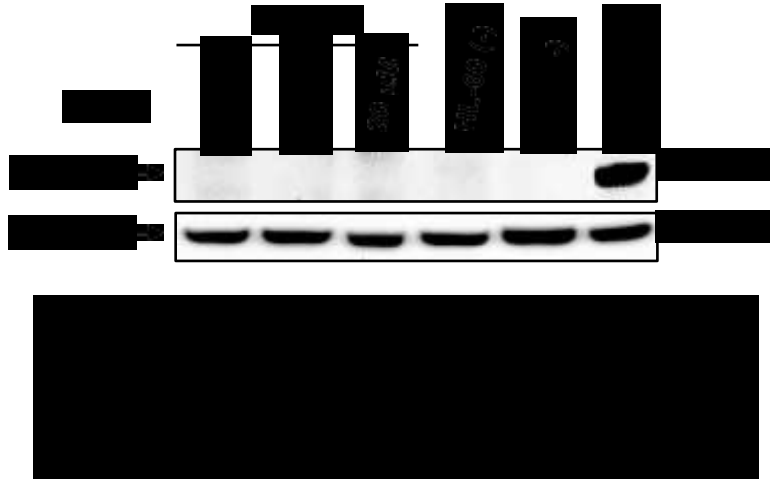


Se ha propuesto que Securina es fosforilada en mitosis por el complejo de ciclina B/CDK1 [114]. Dado que en nuestro modelo la curcumina promueve una acumulación de las células en mitosis, decidimos evaluar si el cambio de movilidad electroforética de securina, podría asociarse a una regulación por fosforilación. Para probar lo anterior, realizamos ensayos de digestión con fosfatasas. Encontramos que el tratamiento previo con una pan-fosfatasa (λ -PPasa) de los extractos proteicos de células tratadas con 20 μ M de curcumina o 100 nM de Nocodazol, elimina el retardamiento de securina, reestableciéndose un patrón de corrimiento comparable al del grupo control (Figura 16C). En consecuencia este resultado sugiere que el fitoquímico no sólo induce la acumulación de securina, sino también promueve su fosforilación, posiblemente al promover la acumulación de células en mitosis.

Esta caracterización parcial del punto de control de ensamblaje del huso, sugiere que este sistema podría estar funcionalmente activo, inhabilitando a APC/C y contribuyendo al arresto de las células específicamente en Mitosis.

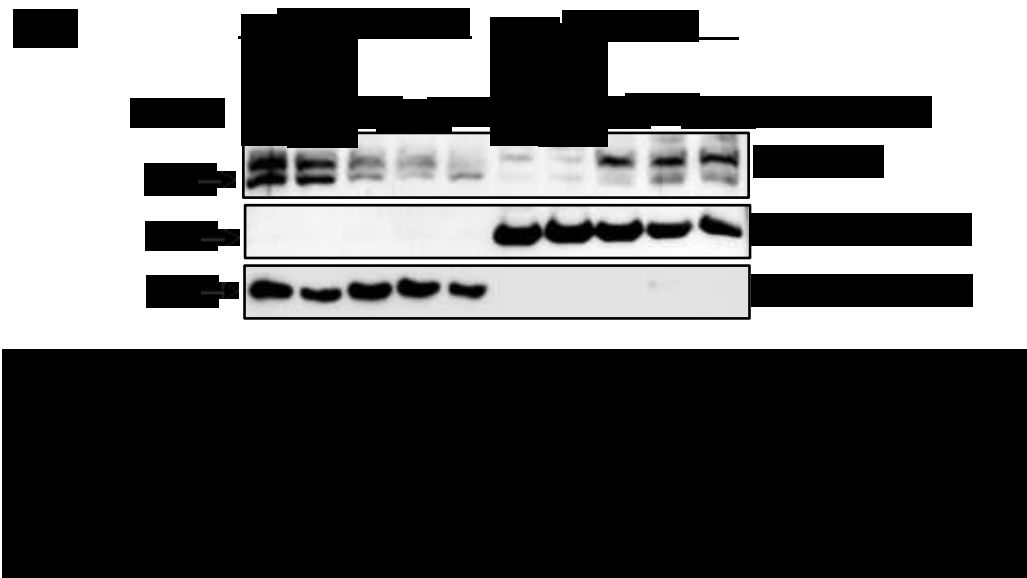
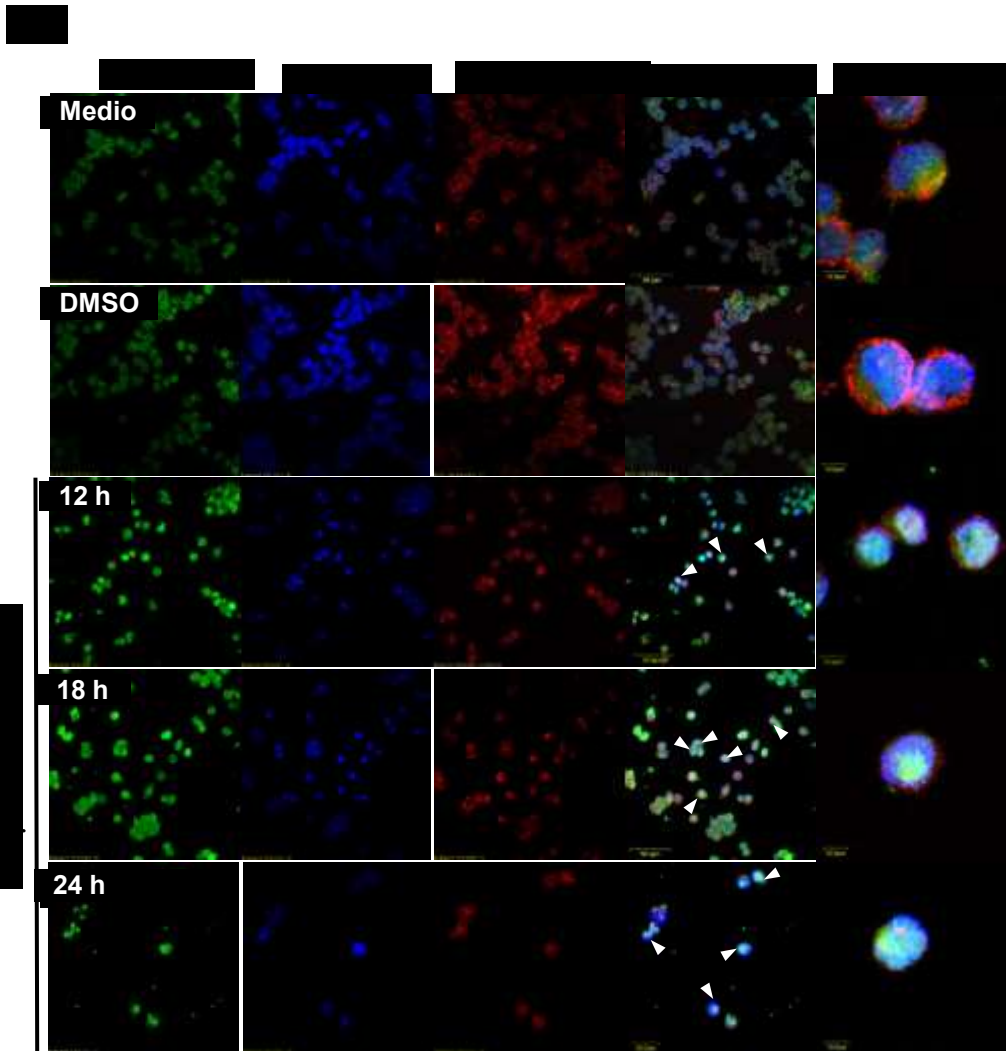
14.6. P73 un posible regulador del arresto y muerte celular en mitosis

Un dato interesante de los sistemas de regulación del punto de control en G2 es que detectamos cambios en dos de sus componentes: 14-3-3 σ y P21; que habitualmente son regulados transcripcionalmente por P53. Sin embargo, K562, es una línea que carece de dicho factor de transcripción. En nuestro modelo confirmamos este dato tanto en condiciones basales como en respuesta a curcumina (Figura 17). En consecuencia si los cambios que detectamos a nivel de proteína tienen un sustrato en una inducción transcripcional, no podría depender de P53, pero posiblemente del parálogo, P73, que puede regular programas transcripcionales canónicamente controlados por P53.



14.6.1. Localización de P73 en respuesta a curcumina

Con la intención de explorar la posibilidad de que P73 pudiera ser funcional en nuestro modelo, decidimos analizar por inmunofluorescencia su posible localización nuclear en respuesta a curcumina. En las células control encontramos un patrón de tinción disperso, con zonas de P73 tanto en núcleo como en citoplasma (Figura 18A, ver aumentos). Pero en respuesta al fitoquímico, detectamos desde las 12 h una clara e intensa localización a nivel nuclear. Este patrón es prevalente a las 18 y 24 h de exposición al fitoquímico (Figura 18A, ver aumentos).

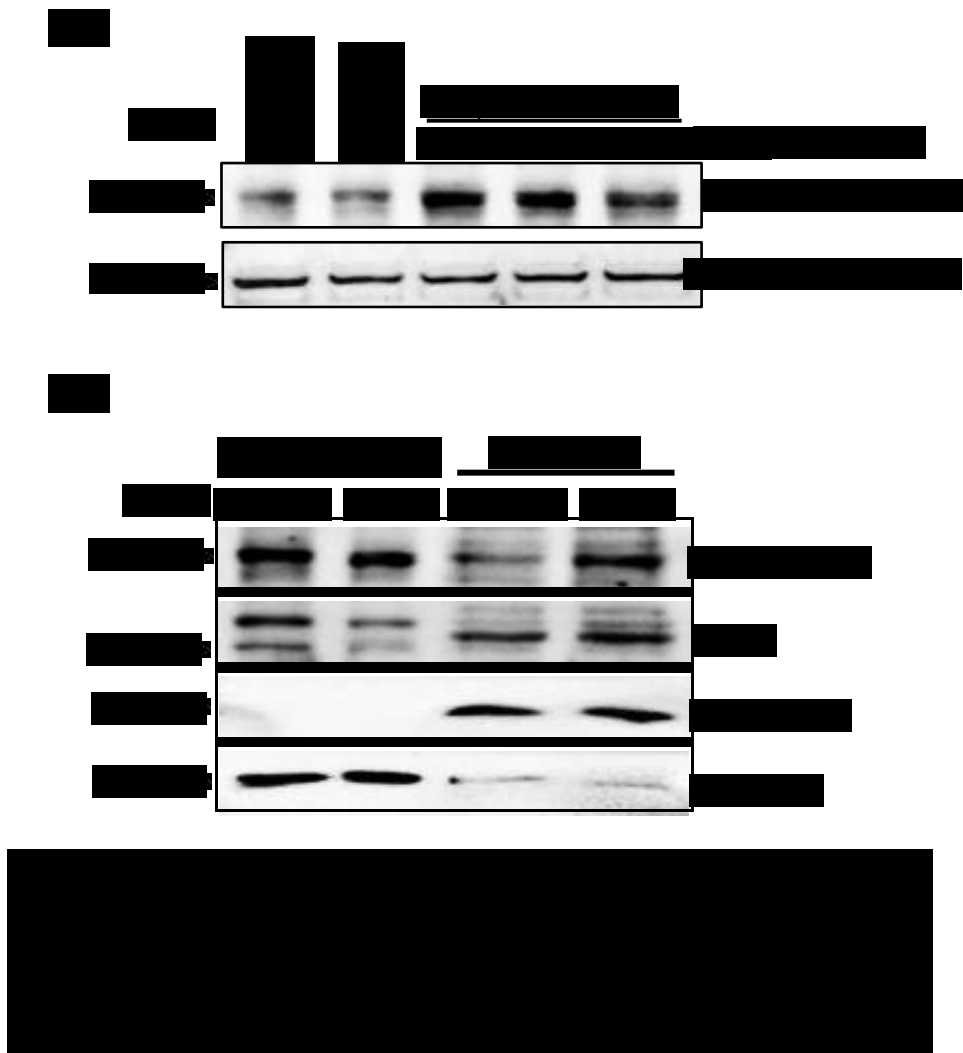


Para confirmar esta observación decidimos hacer fraccionamiento núcleo-citoplasma y encontramos que en las muestras control hay una clara acumulación de P73 a nivel citoplasmático (Figura 18B). En respuesta al fitoquímico a los tiempos de 12, 18 y 24 h, detectamos un claro incremento de P73 en la fracción nuclear acompañado de una concomitante reducción en sus niveles citoplasmáticos (Figura 18B). Este resultado no presentó contaminación citoplasmática, como lo evidencia la presencia exclusiva en la fracción nuclear y citoplasmática de los marcadores de pureza, hnRNA1 y GAPDH, respectivamente. Este dato, fue consistente con el patrón de localización nuclear que previamente habíamos observado por inmunofluorescencia.

14.6.2. Modificaciones post-traduccionales de P73 inducidas por curcumina

Para evaluar el estado funcional de P73 se analizaron los niveles de la forma fosforilada de P73 en tirosina 99 (p-P73), que es una modificación post-traduccionales catalizada por c-abl, que se asocia a la forma transcripcionalmente activa de P73. Cuando evaluamos los niveles de p-P73 en extracto total, detectamos un incremento en la fosforilación de los grupos tratados con 20 μ M de curcumina a los tiempos de 12, 18 y 24 h; con respecto a los controles (Figura 19A). Los mayores niveles de proteína fosforilada se detectaron entre las 12 y 18 h de tratamiento (Figura 19A).

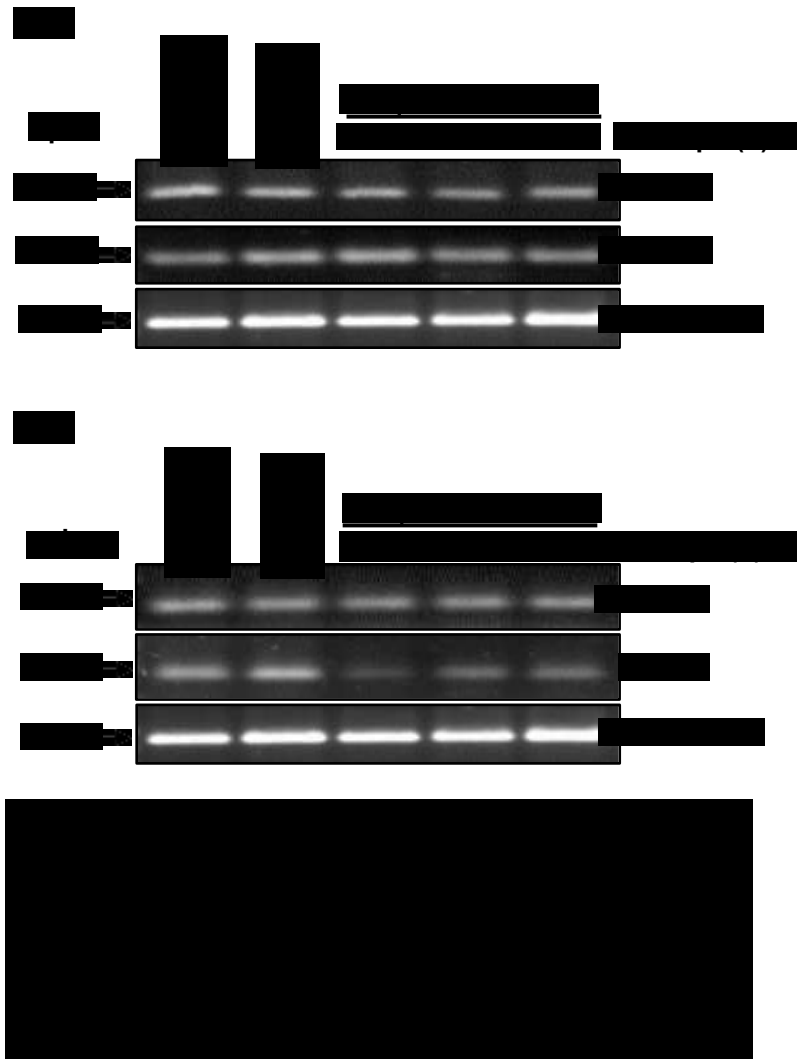
Dado que en dichos tiempos observamos una localización nuclear de P73; decidimos explorar si la forma fosforilada de P73, también se enriquecía en la fracción nuclear. De esta forma cuando las células fueron tratadas con el fitoquímico por 24 h detectamos un claro enriquecimiento de p-P73 a nivel nuclear, en comparación con el grupo control (DMSO). Esto no fue un efecto de carga, ya que cuando esa misma membrana la revelamos contra la forma total de P73, no detectamos cambios radicales en los niveles de proteína total entre los grupos (Figura 19B).



14.6.3. Efecto de la curcumina en la expresión de algunos posibles genes blanco de P73.

Estos resultados nos hicieron pensar que al ser P73 un factor de transcripción, que en respuesta a curcumina se acumulaba en el núcleo en una forma transcripcionalmente activa, era probable que también activará la expresión de algunos genes blanco que participaran en el proceso de arresto y muerte celular. Adicionalmente teníamos evidencia de que el fitoquímico favorecía un incremento en los niveles proteicos de P21 (Figura 15B), lo cual, razonamos podría deberse a una mayor expresión.

En consecuencia, dada las características de nuestro modelo, decidimos analizar por RT-PCR, la expresión de algunos genes relacionados con arresto del ciclo celular en G2/M (*P21* y *P57*) y muerte celular en mitosis (*BAX* y *BIM*), que se ha descrito pueden ser regulados por P73. Encontramos que las células expuestas a curcumina por 12, 18 y 24 h, no muestran una mayor expresión de los genes *BAX* y *BIM*, cuando se comparan con los grupos control (Figura 20A). De forma similar no se detectó una mayor expresión de *P21* y *P57* a los diferentes tiempos post-inducción con curcumina, cuando se comparan con los grupos control (Figura 20B). De hecho, en el caso de p57 se detecta una reducción en las muestras tratadas que es más evidente a las 12 h.



14.6.4. Asociación de P73 con BUBR1 en respuesta a curcumina

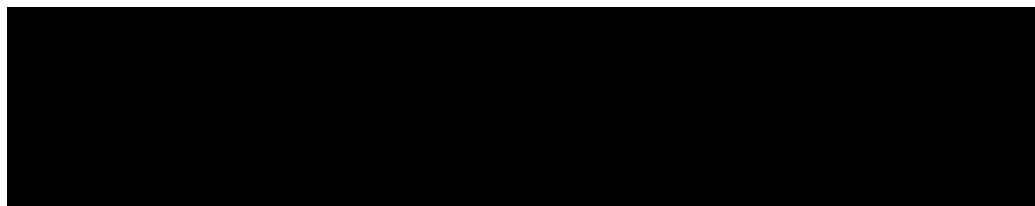
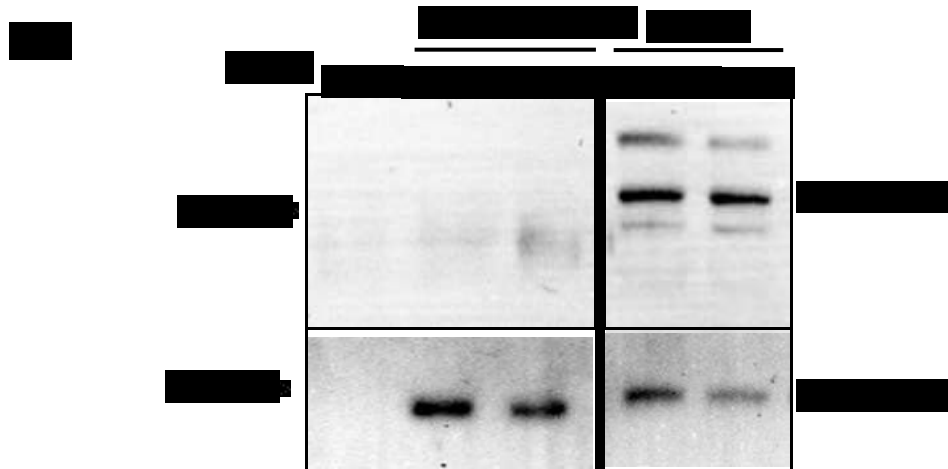
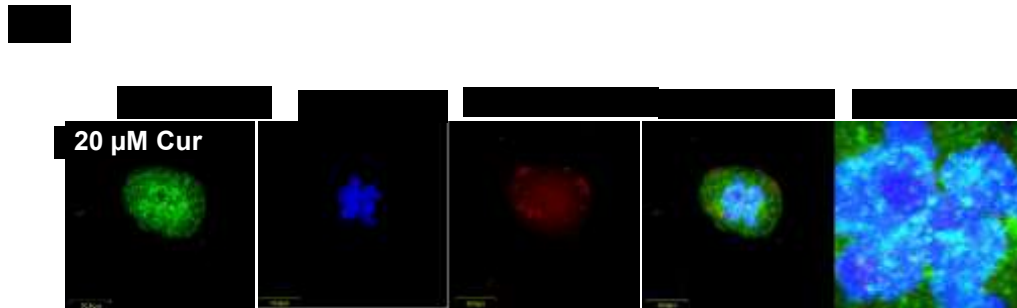
Adicionalmente, P73 podría participar directamente en el control del SAC, ya que se ha descrito que puede interaccionar con miembros del mismo, como BUB1, BUB3 y BUBR1. Particularmente, la interacción con BUBR1, se ha demostrado que promueve una mayor funcionalidad del SAC [102]. Nuestros datos sugieren, que el punto de control en mitosis podría estar activo, con la participación de BUBR1, dado el incremento que detectamos en su forma fosforilada y activa (Figura 16A). Además, también observamos que P73, no sólo se localiza en núcleos interfásicos, donde se esperaría que funcionara como factor de transcripción. Sino que también lo detectamos en núcleos mitóticos, donde podría establecer interacciones proteína-proteína con miembros del SAC (Figura 21A).

Es por ello que decidimos evaluar si en nuestro modelo existía una interacción entre P73 y BUBR1 en respuesta a curcumina. Para ello inmunoprecipitamos utilizando un anticuerpo contra BUBR1 y evaluamos por *western blot*, los niveles de P73 asociada. Bajo las condiciones de tratamiento con el fitoquímico no detectamos a la proteína P73 en los inmunoprecipitados de BUBR1, pese a que se logró enriquecer este último y ambas proteínas se detectaron en los *inputs* (Figura 21B). Estos datos sugieren que en nuestro modelo, no se presenta una asociación entre P73 y BUBR1 que pudiera impactar en la funcionalidad del SAC.

14.6.5. Efecto del silenciamiento parcial de P73 en la inducción de arresto celular en respuesta a curcumina

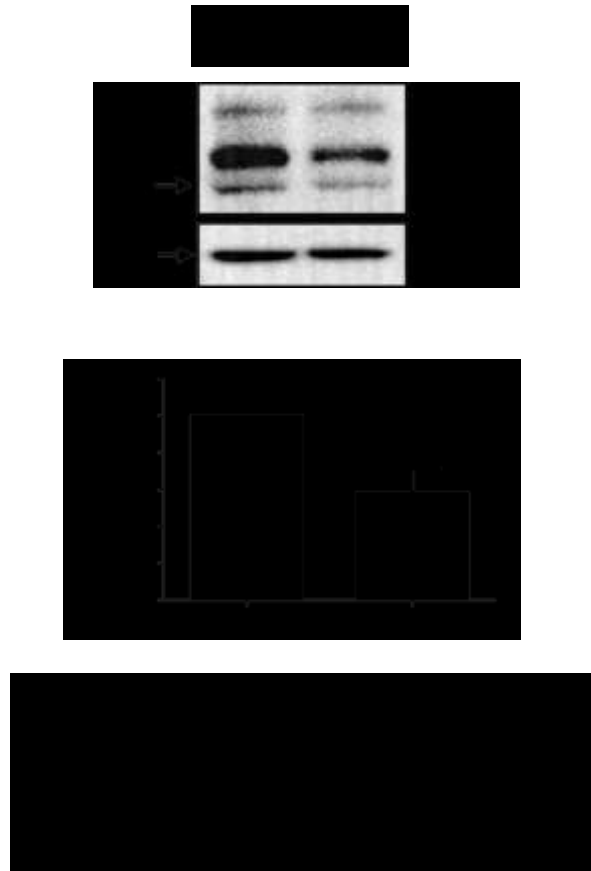
Aunque nuestros datos no muestran una participación de P73 en la regulación transcripcional de genes relacionados con arresto y muerte celular. En la literatura se ha descrito que en el contexto de catástrofe mitótica, P73 participa principalmente en el control del ciclo celular [97, 102]. Es por ello que para valorar, si valía la pena profundizar en el análisis de otros mecanismos en los que P73 pudiera estar participando para regular

dicho proceso, decidimos silenciarla y evaluar como afectaba la distribución del ciclo celular en respuesta al tratamiento con curcumina.



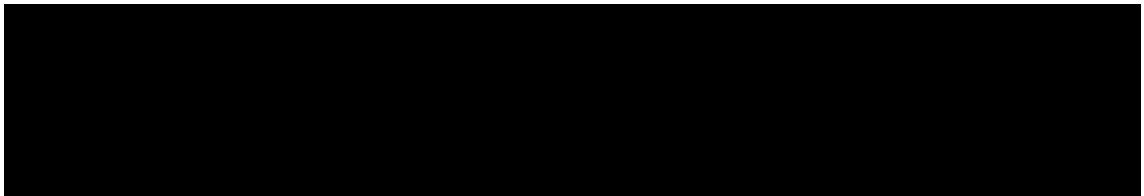
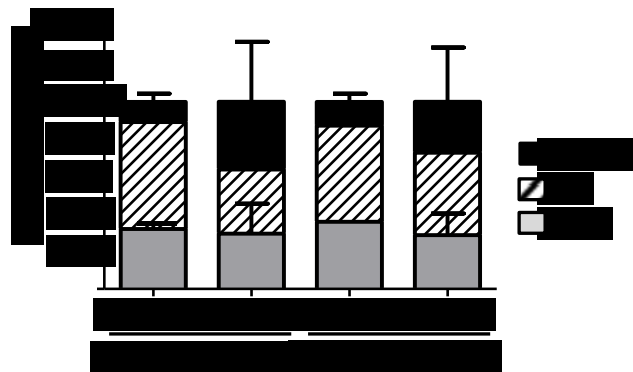
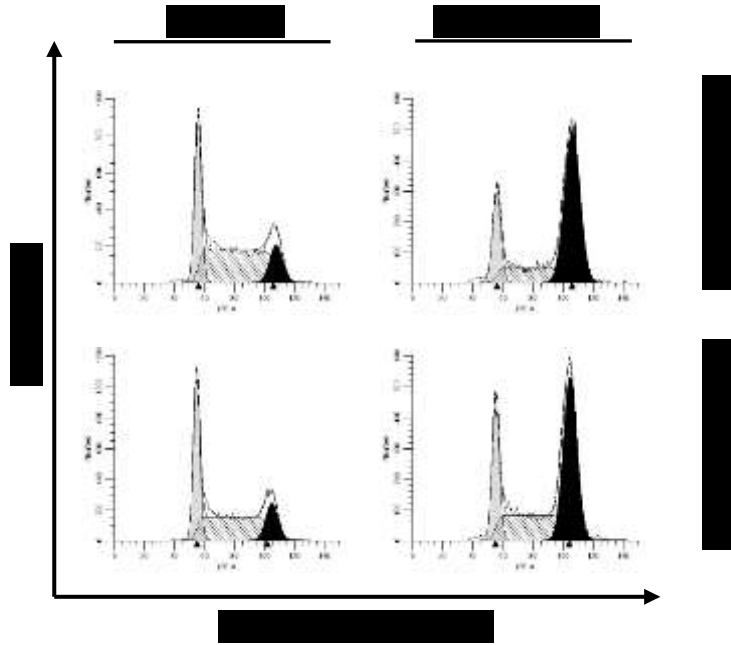
Con este objetivo, empleamos un siRNA dirigido a P73 y logramos una reducción de cerca del 40 % en los niveles proteicos de P73 (Figura 22). En este contexto de silenciamiento parcial, evaluamos la distribución de ciclo celular, en respuesta a condiciones que producen un claro arresto en G2/M (20 μM de curcumina por 24h).

Independientemente del contexto de siRNA control o P73 siRNA, no detectamos diferencias significativas en la distribución de ciclo celular, cuando las células son tratadas con 0.1 % de DMSO (Figura 23).



En respuesta al tratamiento con 20 μ M de curcumina, cuando comparamos Ctrl siRNA vs P73 siRNA, detectamos en fase G1, cerca de un 29.6 % vs 28.7%; en fase S, 34.3% vs 44.2% y en G2M aproximadamente un 36% vs 27 % (Figura 23). Aunque estos datos sugerirían la posible participación de P73 en el mantenimiento del arresto en la fase G2/M; no son concluyentes, debido a que las aparentes diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Estos datos nos sugirieron que probablemente en nuestro modelo de catástrofe mitótica inducida por curcumina, P73 no sea tan relevante para el control del arresto celular.



15. DISCUSIÓN.

En este trabajo se demostró que la curcumina tiene la capacidad de inducir un arresto en mitosis en un modelo celular de Leucemia Mieloide Crónica (K562) y que parte de esta población está muriendo por un proceso tipo apoptosis. Es decir, nuestros datos sugieren que el fitoquímico activa un mecanismo de catástrofe mitótica en una población de la línea celular, K562.

De acuerdo al Comité de Nomenclatura en Muerte Celular (NCCD, *Nomenclature Committee on Cell Death*) la catástrofe mitótica no constituye una vía efectora de muerte celular “pura”, sino un mecanismo oncosupresor que: 1) se activa durante la fase M del ciclo celular; 2) involucra algún grado de arresto mitótico; 3) se inicia por perturbaciones en el aparato mitótico (en los cromosomas y la compleja maquinaria que garantiza una segregación precisa) y 4) finalmente deriva en un proceso de muerte celular o senescencia [115]. Es por ello que para iniciar la caracterización de nuestro sistema como un posible modelo de catástrofe mitótica, buscamos definir si la curcumina era capaz de inducir arresto en mitosis en K562.

Nuestros datos muestran que a diferencia de los grupos control (Medio y DMSO); el tratamiento con curcumina, produce un mayor número de núcleos mitóticos y un incremento claro en los niveles proteicos de H3S10-p; una marca mitótica que se localiza en la heterocromatina pericentromérica en la fase G2 tardía y se extiende a lo largo de los cromosomas conforme la mitosis procede. Siendo muy evidente en profase y desapareciendo en Anafase. [109]. Estos resultados son consistentes con reportes previos en los que se ha demostrado que la curcumina induce un arresto en mitosis en modelos de cáncer de mama y colorectal [78, 116, 117].

El arresto en mitosis que observamos parece ser tiempo dependiente y sugiere que probablemente parte de las células transitan a través de la fase G2, pero continúan hasta el inicio de la Mitosis y es en esta fase donde realmente se arrestan. Nuestros datos apoyan esta hipótesis, ya que

observamos una acumulación de núcleos mitóticos, aumento de H3S10-p y Ciclina B en tiempos largos de exposición a curcumina (24 h). Se sabe que la degradación vía proteosoma de Ciclina B, un evento clave para la salida de mitosis.

Es decir, en las condiciones de tratamiento con curcumina, probablemente el punto de control en la fase G2 no es suficientemente funcional para mantener el arresto de las células, permitiendo su transición hasta mitosis. Esta suposición podría ser factible dado que nuestros datos muestran que en presencia del fitoquímico, se reduce la fosforilación activadora (Ser 345) de CHK1, una cinasa clave para la regulación de los efectores del punto de control de G2 [32]. En consistencia con este dato en la literatura también se ha descrito, que la curcumina promueve una reducción en los niveles de p-CHK1 (Ser 345) al inhibir la actividad de ATR, en un modelo de cáncer cérvico uterino. Funcionalmente esto reditúa en la inhibición del punto de control en G2 y una mayor acumulación de células en mitosis [118].

Sin embargo, en nuestro estudio no podemos concluir contundentemente que el punto de control en G2 este inactivo dado que no analizamos la actividad de ATR, ni los estados de fosforilación de CDC25C y WEE1, los principales sustratos de CHK1. Dichas fosforilaciones en WEE1 incrementan su actividad como cinasa inhibitoria sobre los complejos de Ciclina/CDK [119] y en CDC25C promueven su exportación nuclear y secuestro a nivel citoplasmático por las proteínas 14-3-3 [120]. En este sentido, nuestros datos muestran un claro aumento en los niveles de 14-3-3 σ , sin embargo, este miembro en particular no se ha demostrado que se asocie a CDC25C, pero si es capaz de secuestrar en citoplasma al complejo de ciclina B/CDK1. Aunque no analizamos la localización nuclear de dicho complejo, en nuestro sistema observamos algunos cambios que nos sugieren que se encuentra funcional, tales como la acumulación de su subunidad regulatoria (ciclina B) y la detección de células en prometafase, en donde la ruptura de la envoltura

nuclear, ya se verifico. Un evento que es dependiente de la hiperfosforilación de la lámina nuclear por ciclina B/CDK1 [25].

Adicionalmente en nuestro sistema detectamos focos de γ -H2AX, un marcador de daño a DNA [111]. Nuestro resultado es consistente con otros trabajos en donde se ha demostrado que la curcumina induce daño a DNA [121,122]. Incluso en K562 se ha reportado que el fitoquímico favorece la formación de complejos Topo-DNA, que al ser procesados por la maquinaria celular se convierten en rupturas de DNA que activan procesos de muerte celular [123].

Esto terapéuticamente podría ser de la mayor importancia ya que se ha descrito un incremento en el potencial citotóxico de drogas que causan daño a DNA cuando se emplean en modelos carentes del punto de control en G1, a los que se les inhabilita el punto de control en G2/M, mediante el silenciamiento de CHK1 [124]. Además, se ha reportado que la inhibición de CHK1, también favorece un arresto eficiente en mitosis y con ello potencia la citotoxicidad de agentes anti-mitóticos, como Paclitaxel [125].

En este sentido en nuestro modelo de estudio la curcumina podría inducir los tres efectos: daño a DNA, inhibición de CHK1 y arresto en mitosis; lo que teóricamente potenciaría su efecto citotóxico y aumentaría su potencial terapéutico.

Además, lo anterior también podría explicar porque el fitoquímico favorece un proceso de catástrofe mitótica en una línea celular como K562, deficiente de P53 [91], que tampoco tendría un punto de control en G1, robusto. De tal suerte que, cuando en este modelo celular la curcumina induce daño a DNA, existen amplias posibilidades de que este no pueda ser reparado en la fase G1 o G2 debido a la pérdida de funcionalidad de componentes clave, como P53 y CHK1, respectivamente. De esta forma, las células entrarían prematuramente a mitosis con daño en DNA; lo que se ha propuesto como un modelo de inducción de catástrofe mitótica [50]. En consistencia con esta

hipótesis, en la literatura se ha reportado que este tipo de muerte celular es prevalente en células carentes de P53 y con un punto de control en G1 deficiente [126].

Otro modelo de activación de la catástrofe mitótica contempla la presencia de alteraciones directas en la adecuada formación del huso mitótico y la compleja maquinaria que participa en el control de la segregación cromosómica. En consecuencia los principales inductores de este mecanismo lo constituyen agentes que alteran la adecuada polimerización y estabilidad de los microtúbulos del huso mitótico [50].

En ese sentido, nuestros datos claramente muestran que el fitoquímico podría inducir la catástrofe mitótica por un efecto directo en el aparato mitótico. Nosotros observamos que en K562 la curcumina induce en una forma tiempo dependiente husos mitóticos monopolares, con anormalidades en su arquitectura, al estar constituidos por microtúbulos carentes de polaridad y estructura. Este efecto podría deberse a la ya descrita capacidad del fitoquímico de unirse a la tubulina favoreciendo la despolimerización de los microtúbulos [127, 128]. En tanto que el fenotipo de husos mitóticos monopolares podría ser consecuencia del efecto inhibitorio o de deslocalización que el fitoquímico tiene sobre proteínas claves para el control de la separación de los centrosomas, tales como: Aurora cinasa A y la kinesina, Eg5 [82,129, 130]. Otra consecuencia funcional de las alteraciones estructurales del huso mitótico, son los defectos en la segregación cromosómica, ya que en respuesta a curcumina detectamos un ligero incremento en el número de células con micronúcleos o multinúcleos. Estas morfologías nucleares pueden ser consecuencia de células que experimentan cariocinesis en un escenario de orientaciones cromosómicas incorrectas, como la merotética, en donde los microtúbulos de polos opuestos se unen al mismo cinetocoro. Lo anterior provoca que la cromátida no se desplace durante la anafase a alguno de los polos y cuando se da el restablecimiento de la envoltura nuclear se puede constituir en un

micronúcleo. Es decir, este fenotipo en K562, podría ser consecuencia de la incapacidad de los husos monopolares para coordinar una segregación cromosómica equilibrada o amfitética, como se ha observado en un modelo de cáncer de mama, tratado con curcumina [79]. Indudablemente, este tipo de alteraciones se incrementaría significativamente en la medida en que las células fueran capaces de salir de mitosis. Sin embargo, en nuestro sistema dentro de la ventana temporal que analizamos, no observamos tal efecto. Lo cual es importante señalar, ya que sugiere que de ser eficiente el proceso de catástrofe mitótica inducido por curcumina, podría ser un mecanismo para detener a las células leucémicas.

El hecho de que las células se arreten en mitosis podría deberse al funcionamiento del SAC, el principal sistema que evita la transición de las células hacia anafase, al inactivar funcionalmente al complejo APC/C. Nuestros datos sugieren que en K562, la curcumina favorece el encendido del SAC, ya que encontramos una hiperfosforilación de BUBR1, un marcador de ensamblaje de dicho sistema [112, 113]. Lo anterior teóricamente, supondría la inactivación del complejo APC/C y consecuentemente la falta de degradación de sus principales sustratos: Securina y Ciclina B, un evento clave para la salida de mitosis [37]. En consistencia con esta idea en nuestro modelo en respuesta a curcumina observamos una clara acumulación de Securina y Ciclina B que correlaciona con un arresto en mitosis. Estos resultados junto con un estudio realizado en un modelo de cáncer de mama en el que se observó una mayor acumulación de miembros del SAC (MAD2 y BUBR1) en cinetócoros no unidos [82]; son de los pocos trabajos que sugieren indirectamente una activación del SAC, en respuesta a curcumina.

Adicionalmente sabemos que el SAC se activa en respuesta a la inadecuada interacción entre microtúbulos (MT) y cinetócoros (KT) [37]. Aunque nosotros no analizamos directamente dicha asociación, si observamos en respuesta a curcumina claras alteraciones en la estructura de los extremos más (+) de los

microtúbulos del huso mitótico, que son los que interaccionan con los cinetócoros. Además, nuestros datos sugieren que curcumina favorece una localización polar de Astrina, que posiblemente puede ser un efecto mecánico, resultado de las alteraciones que induce el tratamiento en la arquitectura del huso mitótico. Aunque también observamos una hiperfosforilación de Astrina que podría impactar en su funcionalidad o localización, nuestros datos muestran que esta modificación post-traduccional parece ser solamente consecuencia de la acumulación de las células en mitosis.

Las alteraciones de Astrina, podrían ser funcionalmente relevante, ya que normalmente se localiza en los cinetócoros y promueve la estabilidad de las uniones KT-MT, un evento clave para el silenciamiento del SAC [30]. En consecuencia, la localización polar de Astrina en respuesta a curcumina, es una evidencia indirecta de su deslocalización de los cinetócoros, lo que podría impactar en el funcionamiento del SAC. Pese a estos resultados, no podemos hablar contundentemente de un SAC activo dado que en nuestro modelo nunca investigamos, si la curcumina enciende este sistema y promueve un mayor secuestro de CDC20 (cofactor de APC/C) por las proteínas MAD2 y/o BUBR1.

En conjunto, lo que si sugieren estos datos es que el punto de control de ensamblaje del huso podría participar en el establecimiento del arresto en mitosis que induce la curcumina. Lo cual hace mucho sentido, dado el claro efecto que tiene el fitoquímico en la estructura del huso mitótico y sus proteínas asociadas que podrían ser inductores del SAC. De acuerdo al mecanismo de catástrofe mitótica, estos fenotipos pueden derivar en un evento de muerte celular, tipo apoptosis o necrosis.

Nuestros datos muestran que el tratamiento con el fitoquímico activa un proceso tipo apoptosis con pérdida de la permeabilidad de membrana, procesamiento de las caspasas-8, -9 y -3 y fragmentación del DNA. La caspasa-9 se activa de forma temprana con respecto a la caspasa-8, lo cual

sugiere que la apoptosis se inició por un mecanismo de vía intrínseca. Aparentemente la caspasa-3 no sólo está procesada sino activa, ya que detectamos corte en PARP, uno de sus principales sustratos. También observamos una clara reducción en los niveles de proteínas antiapoptóticas como XIAP y BCL-2, que se podrían explicar por el hecho de que estos son blancos transcripcionales de NF- κ B y se ha demostrado que curcumina es un inhibidor de dicha ruta [131]. Además se ha reportado que en células arrestadas en mitosis, miembros de la subfamilia antiapoptótica de BCL-2, como MCL-1, pueden ser fosforilados en mitosis y marcados para degradación [132, 133] Aunque en el caso de BCL-2, solo se ha descrito una fosforilación inhibitoria, mediada por CDK1 que evita su asociación con BAX/BAK [134]; no podemos descartar que en este modelo no pudiera estar operando un mecanismo de regulación parecido al de MCL-1.

Algunos de estos marcadores apoptóticos tales como la fragmentación del DNA y la presencia de caspasa-3 activa los pudimos asociar a poblaciones con contenido tetraploide y positivas para H3S10-p, respectivamente. En consecuencia, en nuestro modelo de catástrofe mitótica, podemos sugerir que células arrestadas en mitosis están muriendo por un proceso tipo apoptosis que involucra caspasa-3 activa. Estos resultados son consistentes con diferentes modelos de catástrofe mitótica inducidos por curcumina, donde el proceso de muerte celular involucra el procesamiento de caspasa-3, corte de PARP y reducción de moléculas antiapoptóticas como BCL-2, XIAP y survivina [84-87].

De forma previa, se describió en mieloblastos murinos transfectadas con BCR-ABL que el fitoquímico induce un proceso de catástrofe mitótica similar al que observamos en K562, acompañado de arresto en mitosis, activación de caspasa-3 y fragmentación del DNA [87]. En este trabajo a diferencia del nuestro se detecta a tiempos largos un menor arresto en la fase G2/M, una reducción en ciclina B, survivina y un mayor número de células multinucleadas. Los autores le atribuyen el proceso de catástrofe mitótica, a

la presencia de la proteína híbrida BCR-ABL. Nuestros resultados sugieren que no necesariamente ocurre así, porque en K562 el cromosoma Filadelfia se encuentra de forma natural, y nosotros detectamos una acumulación de ciclina B y niveles constantes de survivina, que sugiere que otros reguladores claves en el control de la segregación cromosómica como Aurora cinasa B, no estén desregulados. Esto explicaría el hecho de que no detectamos un número elevado de alteraciones en la morfología nuclear. Las diferencias entre ambos estudios podrían deberse a que el modelo murino, es un sistema artificial de expresión de BCR-ABL; que contiene las copias silvestres de ambos genes; a diferencia de nuestro trabajo, en el que K562 es una línea que se obtuvo de una paciente con crisis blástica y sólo contiene al cromosoma Filadelfia [77]. Por lo que K562 podría ser un modelo más adecuado para reproducir la Biología de los mecanismos que podrían ser activados en un paciente con Leucemia Mieloide Crónica, en respuesta al tratamiento con curcumina. En ese sentido, este trabajo es el primer estudio que describe la capacidad de la curcumina para inducir un proceso de catástrofe mitótica en una línea celular humana de LMC.

Otro aspecto en el que nos interesó profundizar, fue el análisis de las moléculas reguladoras que podrían participar en el arresto y muerte celular que desemboca en la catástrofe mitótica. Dado que nuestro sistema carece de P53 [91], nos preguntamos si su parólogo, P73, podría tener algún papel importante, como se ha descrito en trabajos previos [103-105]. Aunque logramos definir que el tratamiento con curcumina promueve una localización nuclear de P73, al parecer no impacta en algún cambio en la expresión de genes relacionados con arresto celular (*P21* y *P57*) o con apoptosis (*BAX*, *BIM*). Pese a que se ha descrito que dichos genes pueden ser controlados transcripcionalmente por P73 [58, 97, 105]. Aunque esperábamos que el cambio en los niveles proteicos de P21 que detectamos en respuesta a curcumina, pudiera explicarse por un incremento en su expresión, otra posibilidad es que la curcumina promueva su estabilidad a nivel post-traducciona, ya que se ha reportado que este CKI puede ser fosforilado por

PKC, para promover su estabilidad y de esta forma participar en el punto de control de G2/M [135, 136]. La caída que vemos en *P57*, podría deberse a que se ha reportado que *P73* induce su expresión en la transición de M a G1 para favorecer la salida de mitosis [137], sin embargo en nuestro sistema el fitoquímico está promoviendo la acumulación de las células en mitosis temprana, por lo cual se esperaría una baja expresión de *P57*. Tampoco podemos descartar que *P73* pueda tener un efecto sobre el control transcripcional de otros genes candidato (*GADD45*, *PUMA*, *NOXA*, *CD95*), que no contemplamos dentro de este primer análisis o un efecto directo de la proteína, por ejemplo, a través de su interacción con la mitocondria y la perturbación de su permeabilidad para promover muerte celular [57-60].

En este sentido, cuando analizamos la posible participación de *P73* a nivel de interacciones proteína-proteína, con miembros del SAC, no detectamos una asociación clara entre *P73* y *BUBR1* en respuesta a curcumina. En contraste con lo previamente descrito [138], nosotros detectamos a *P73* en cromosomas condensados, por lo que no podemos descartar la posibilidad de que el fitoquímico promueva la asociación de *P73* con otros miembros del SAC, con los que se ha reportado puede interactuar, como *BUB1* y *BUB3* [102].

Pese a que no logramos montar un sistema de silenciamiento de *P73* eficiente, detectamos que una menor cantidad de esta proteína en un contexto de exposición a curcumina, produce una ligera reducción en los niveles de arresto en la fase G2/M. Nosotros consideramos que este efecto se podría evidenciar de forma más clara, si empleáramos un sistema de silenciamiento que nos permitiera reducir más los niveles de *P73*. En consecuencia con esta primera aproximación, no contamos con datos que nos permitan proponer un mecanismo mediante el cual *P73* participaría en la regulación del arresto del ciclo celular, en el contexto de catástrofe mitótica.

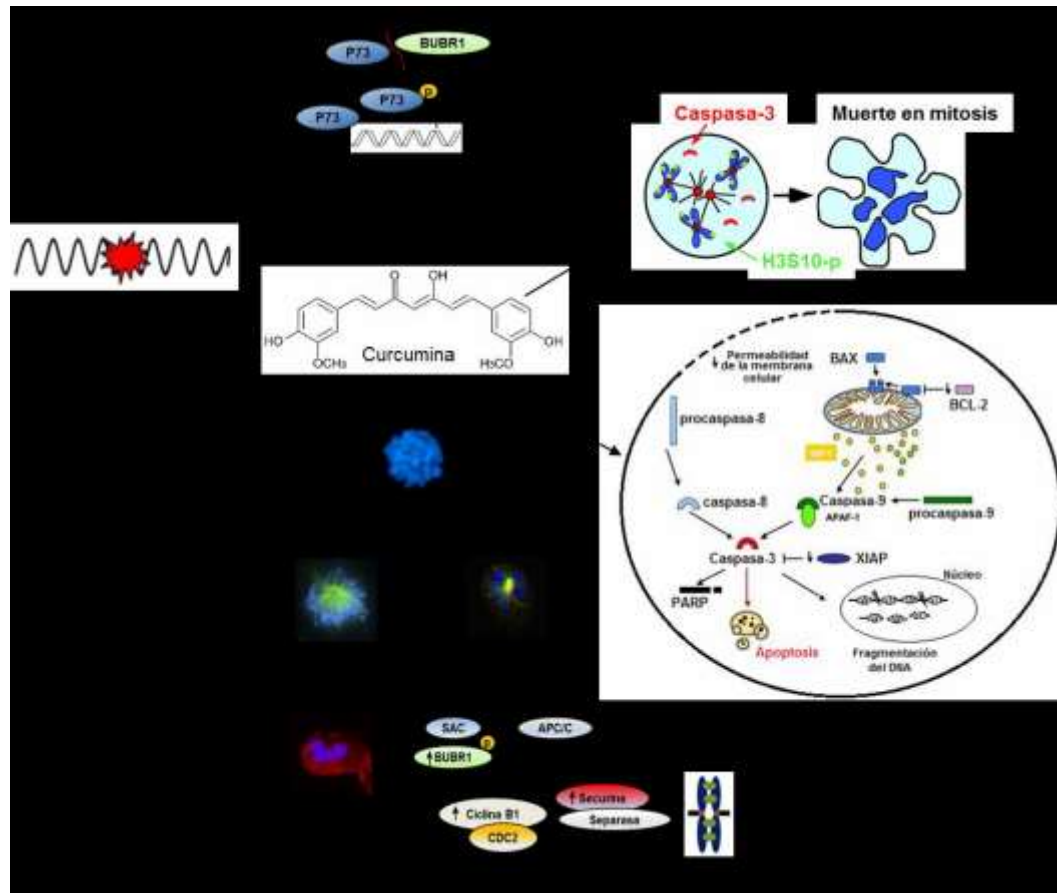
Pese a que la curcumina ha ganado interés como un potencial agente anti-tumoral por su reducida toxicidad; su principal desventaja es su baja

biodisponibilidad y el hecho de que las concentraciones que se emplean en los modelos celulares son significativamente superiores a las que se pueden alcanzar en modelos *in vivo* [13]. Sin embargo, el desarrollo de derivados sintéticos del fitoquímico ha permitido incrementar su actividad y estabilidad [139]. Es por ello, que si bien en este trabajo utilizamos dosis en el orden micromolar, una perspectiva interesante sería emplear análogos sintéticos de la curcumina que en dosis más bajas pudieran activar mecanismos tipo catástrofe mitótica en modelos de Leucemia mieloide crónica y consecuentemente tener un mayor potencial terapéutico. En consistencia con esta idea en la literatura, ya se ha descrito que un derivado de curcumina empleado en una dosis nanomolar, induce un arresto en G2/M y muerte celular por apoptosis en un modelo de cáncer de mama, sin un efecto aparente en células normales [140]. En este sentido, profundizar en el estudio de la selectividad del fitoquímico, es un aspecto determinante para definir si realmente se podría emplear como un fármaco efectivo. Particularmente, para enriquecer nuestro trabajo sería fundamental conocer el efecto de la curcumina en células normales hematopoyéticas; ya que existen reportes en los que se ha descrito el efecto de despolimerización de microtúbulos y alteraciones en la morfología nuclear, en un modelo celular de endotelio normal [81].

En resumen, con base en nuestros datos podemos proponer que en un modelo de Leucemia Mieloide Crónica (K562), la curcumina es capaz de activar un proceso de catástrofe mitótica al favorecer un arresto en mitosis mediante dos mecanismos: promoviendo daño a DNA e inactivando componentes clave del punto de control en G2 (CHK1) que probablemente derivan en una entrada prematura a Mitosis. Sin embargo, podría haber un arresto transitorio en G2, ya que detectamos cambios en componentes de este sistema (P21 y 14-3-3 σ) en respuesta al tratamiento.

Un segundo mecanismo involucraría alteraciones directas en la adecuada conformación del huso mitótico y la localización de proteínas de unión a

microtúbulos (Astrina) importantes para su estabilidad y que podrían impactar en defectos en la segregación cromosómica. Al parecer este arresto en mitosis podría deberse al encendido del SAC como lo evidencia la fosforilación de BUBR1 y la acumulación de Securina y Ciclina B, dos sustratos del complejo APC/C que indirectamente sugieren su inactivación. Adicionalmente el fitoquímico promueve una muerte celular tipo apoptosis, con reducción en los niveles de proteínas anti-apoptóticas (XIAP y BCL-2), procesamiento de caspasas y fragmentación del DNA en poblaciones con contenido tetraploide. Específicamente, detectamos una población mitótica positiva para caspasa-3 activa, lo que sugiere una muerte celular en mitosis. Aunque encontramos que en respuesta a curcumina un posible regulador del proceso de catástrofe mitótica, como P73 se localiza y acumula a nivel nuclear, al parecer no aumenta la expresión de genes relacionados con arresto (*P21*, *P57*) y muerte celular (*BAX*, *BIM*), ni tampoco interacciona con miembros del SAC, como BUBR1 (Figura 24).



16. CONCLUSIÓN.

En un modelo de leucemia mieloide crónica (K562), el tratamiento con curcumina activa un mecanismo de catástrofe mitótica que involucra un proceso de arresto en mitosis con alteraciones en la conformación del huso mitótico y la segregación cromosómica que desembocan en muerte celular programada tipo apoptosis. En la regulación de los dos procesos anteriores al parecer P73 no tiene un papel determinante.

17. PERSPECTIVAS.

- 1.- Profundizar en la caracterización de la funcionalidad de los componentes del punto de control en G2, para determinar si su inactivación es determinante en la activación de la catástrofe mitótica.
2. Determinar si el fenotipo de monopolaridad inducido por curcumina es producto de la inhibición de proteínas importantes para el control de la separación de los centrosomas, tales como: Kinesina 5 y Aurora cinasa A.
- 3.- Caracterizar como se ven alteradas la interacciones microtúbulo-cinetócoro en respuesta a curcumina.
- 4.- Analizar si la curcumina activa el SAC, mediante ensayos funcionales, como el análisis de los niveles de CDC20 secuestrado por BUBR1/MAD2.
- 5.- Evaluar en nuestro modelo la funcionalidad del complejo Ciclina B1/Cdk1 y su posible participación en el proceso de muerte celular a través de la regulación de proteínas antiapoptóticas como BCL-2.
- 6.- Emplear estrategias más eficientes para el silenciamiento de P73 que permitan evaluar de forma más clara el posible papel de esta proteína en los procesos de arresto y muerte celular inducidos por el fitoquímico.
- 7.- Evaluar si análogos de curcumina con mayor biodisponibilidad son capaces de inducir procesos de catástrofe mitótica en modelos de Leucemia Mieloide Crónica y su efecto sobre células normales.

18. REFERENCIAS.

- 1.- Iqbal Zafar. *Molecular Hematology in Leukemia Biology and Treatment: Past, Present, and Future*. Journal of Applied Hematology (2012)**3**(2):21-27.
- 2.- IARC, 2012: <http://www.iarc.fr/>
- 3.- American Cancer Society <http://www.cancer.org/>
- 4.- Cortes Jorge E., Silver Richard T., Khoury H. Jean, Kantarjian Hagop M. 2014. *Chronic Myeloid Leukemia*. Cancer Network: <http://www.cancernetwork.com/cancer-management/CML>
- 5.- Eide Christopher A., O'Hare Thomas. *Chronic Myeloid Leukemia: Advances in Understanding Disease Biology and Mechanisms of Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors*. Curr Hematol Malig Rep (2015)**10**(2): 158–166.
- 6.- Gora-Tybor J, Robak T. *Targeted drugs in chronic myeloid leukemia*. Curr Med Chem. (2008)**15**(29): 3036-51.
- 7.- Chen Y, Peng C, Li D, Li S. *Molecular and cellular bases of chronic myeloid leukemia*. Protein Cell. (2010)**1**(2): 124-32.
- 8.- Jabbour EJ, Hughes TP, Cortés JE, Kantarjian HM, Hochhaus A. *Potential mechanisms of disease progression and management of advanced-phase chronic myeloid leukemia*. Leukemia & Lymphoma (2014)**55**(7): 1451–1462.
- 9.- Bennour Ayda, Saad Ali, Sennana Halima. *Chronic myeloid leukemia: Relevance of cytogenetic and molecular assays*. Critical Reviews in Oncology/Hematology (2016)**97**: 263–274.
- 10.- Soverini Simona, De Benedittis Caterina, Mancini Manuela, Martinelli Giovanni. *Present and future of molecular monitoring in chronic myeloid leukaemia*. British Journal of Haematology (2016)**173**(3): 337–349.
- 11.- Jabbour Elias J., Cortes Jorge E., Kantarjian Hagop M. *Resistance to Tyrosine Kinase Inhibition Therapy for Chronic Myelogenous Leukemia: A Clinical Perspective and Emerging Treatment Options*. Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia (2013)**13** (5): 515-29.
- 12.- Young-Joon Surh. *Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals*. Nature Reviews Cancer (2003)**3**(10): 768-780.
- 13.- Vallianou Natalia G., Evangelopoulos Angelos, Schizas Nikos, Kazazis Christos. *Potential Anticancer Properties and Mechanisms of Action of Curcumin*. Anticancer Research (2015)**35**: 645-652.
- 14.- Shehzad Adeeb, Wahid Fazli, Lee Young Sup. *Curcumin in Cancer Chemoprevention: Molecular Targets, Pharmacokinetics, Bioavailability, and Clinical Trials*. Arch. Pharm. Chem. Life Sci. (2010)**343**(9): 489–499.
- 15.- Metzler Manfred, Pfeiffer Erika, Schulz Simone I., Dempe Julia S. *Curcumin Uptake and Metabolism*. BioFactors (2013)**39**(1):14–20.

- 16.- Pulido-Moran Mario, Moreno-Fernandez Jorge, Ramirez-Tortosa Cesar, Ramirez-Tortosa MCarmen. *Curcumin and Health*. *Molecules* (2016)21, 264: doi:10.3390/molecules21030264
- 17.- Dinesh Kumar Agrawal, Pushpesh Kumar Mishra. *Curcumin and its analogues: Potential anticancer agents*. *Medicinal Research Reviews* (2010)30(5): 818-860
- 18.- Kumar Gaurav, Mittal Sonam, Sak Katrin, Tuli Hardeep Singh. *Molecular mechanisms underlying chemopreventive potential of curcumin: Current challenges and future perspectives*. *Life Sciences* (2016)148: 313-328.
- 19.- Randy Y. C. Poon. *Cell Cycle Control: A System of Interlinking Oscillators*. En: Coutts Amanda S., Weston Louise (eds.), *Cell Cycle Oscillators: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 1342, DOI 10.1007/978-1-4939-2957-3_1.
- 20.- Harper Jane V., Brooks Gavin. *The Mammalian Cell Cycle an Overview*. En: Humphrey T., Brooks G. (eds.), *Cell Cycle Control: Mechanisms and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 296, Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- 21.- Lim Shuhui, Kaldis Philipp. *Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation*. *Development* (2013)140(15): 3079-3093.
- 22.- Donzelli Maddalena, Draetta Giulio F. *Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation*. *EMBO reports* (2003)4(7): 671-677.
- 23.- Obayaa A. J., Sedivy J. M. *Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells*. *Cell. Mol. Life Sci.* (2002)59(1): 126 – 142.
- 24.- Maiato Hélder, Sampaio Paula, Sunkel Claudio E. *Microtubule-Associated Proteins and Their Essential Roles during Mitosis*. *International Review of Cytology* (2004)241: 53-153.
- 25.- Sluder Greenfield, Hinchcliffe Edward H., Rieder Conly L. *The progression and regulation of mitotic events*. En: Stein Gary S., Pardee Arthur B. *Cell Cycle and Growth Control: Biomolecular Regulation and Cancer*, 2004, Second Edition, John Wiley & Sons, Inc.
- 26.- Walczak Claire E., Cai Shang, Khodjakov Alexey. *Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.(2010)11(2): 91-102.
- 27.- Manning Amity L., Compton Duane A. *Structural and regulatory roles of nonmotor spindle proteins*. *Current Opinion in Cell Biology* (2008)20(1): 101–106.
- 28.- Thein K.H., Kleylein-Sohn J., Nigg E.A., Gruneberg U. *Astrin is required for the maintenance of sister chromatid cohesion and centrosome integrity*. *J. Cell Biol.* (2007)178(3): 345-354.
- 29.- Dunsch A.K., Linnane E., Barr F.A., Gruneberg U. *The astrin-kinastrin/SKAP complex localizes to microtubule plus ends and facilitates chromosome alignment*. *J. Cell Biol.* (2011)192(6): 959-968.
- 30.- Manning Amity L., Bakhom Samuel F., Maffini Stefano, Correia-Melo Clara, Maiato Helder, Compton Duane A. *CLASP1, astrin and Kif2b form a molecular switch that regulates*

kinetochore-microtubule dynamics to promote mitotic progression and fidelity. The EMBO Journal (2010)**29**(20): 3531–3543.

31.- Funk Jens Oliver. *Cell Cycle Checkpoint Genes and Cancer*. Encyclopedia of Life Sciences (2005). doi: 10.1038/npg.els.0006046.

32.- Nyberg Kara A., Michelson Rhett J., Putnam Charles W., Weinert Ted A. *Toward maintaining the genome: DNA Damage and Replication Checkpoints*. Annu. Rev. Genet. (2002)**36**: 617–56

33.- Shaltiel Indra A., Krenning Lenno, Bruinsma Wytse, Medema Rene H. *The same, only different – DNA damage checkpoints and their reversal throughout the cell cycle*. Journal of Cell Science (2015)**128**(4): 607–620

34.- Wu LiHong, Liu Yang, Kong DaoChun. *Mechanism of chromosomal DNA replication initiation and replication fork stabilization in eukaryotes*. Sci China Life Sci (2014)**57**(5): 482-487

35.- Labib Karim, De Piccoli Giacomo. *Surviving chromosome replication: the many roles of the S-phase checkpoint pathway*. Phil. Trans. R. Soc. B (2011)**366**(1584): 3554–3561.

36.- London Nitobe, Biggins Sue. *Signalling dynamics in the spindle checkpoint response*. Nature Reviews Molecular Cell Biology (2014)**15**(11): 735-747.

37.- Foley Emily A., Kapoor Tarun M. *Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore*. Nature Reviews Molecular Cell Biology (2013)**14**(1): 25-37.

38.- Wang Yanchang, Jin Fengzhi, Higgins Ryan, McKnight Kelly. *The current view for the silencing of the spindle assembly checkpoint*. Cell Cycle (2014)**13**(11): 1694–1701.

39.- Kim Soonjung, Yu Hongtao. *Mutual regulation between the spindle checkpoint and APC/C*. Seminars in Cell & Developmental Biology (2011)**22**(6): 551–558.

40.- Pistrutto Giuseppa, Trisciuglio Daniela, Ceci Claudia, Garufi Alessia, D'Orazi Gabriella. *Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies*. AGING (2016)**8**(4): 603-619.

41.- Mcllwain David R., Berger Thorsten, Mak Tak W. *Caspase Functions in Cell Death and Disease*. Cold Spring Harb Perspect Biol 2013; ;5(4):a008656. doi: 10.1101/cshperspect.a008656.

42.- Goldar Samira, Shekari Khaniani Mahmoud, Mansoori Derakhshan Sima, Baradaran Behzad. *Molecular Mechanisms of Apoptosis and Roles in Cancer Development and Treatment*. Asian Pac J Cancer Prev (2015)**16**(6): 2129-2144.

43.- Green Douglas R., Llambi Fabien. *Cell Death Signaling*. Cold Spring Harb Perspect. **7**(12). pii: a006080. doi: 10.1101/cshperspect.a006080.

44.- Hata Aaron N., Engelman Jeffrey A., Faber Anthony C. *The BCL2 Family: Key Mediators of the Apoptotic Response to Targeted Anticancer Therapeutics*. Cancer Discov (2015)**5**(5): 475–87.

- 45.- Zamaraev Alexey V., Kopeina Gelina S., Zhivotovsky Boris, Lavrik Inna N. *Cell death controlling complexes and their potential therapeutic role*. Cell. Mol. Life Sci. (2015)**72**(3): 505–517.
- 46.- Budhidarmo Rhesa, Day Catherine L. *IAPs: Modular regulators of cell signaling*. Seminars in Cell & Developmental Biology (2015)**39**: 80–90. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.12.002.
- 47.- Vitale I, Galluzzi L, Castedo M, Kroemer G. *Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability*. Nature Reviews Molecular Cell Biology (2011)**12**(6): 385-92.
- 48.- Mc Gee Margaret M. *Targeting the Mitotic Catastrophe Signaling Pathway in Cancer*. Mediators of Inflammation (2015) dx.doi.org/10.1155/2015/146282.
- 49.- Golden EB, Pellicciotta I, Demaria S, Barcellos-Hoff MH, Formenti SC. *The convergence of radiation and immunogenic cell death signaling pathways*. Frontiers in Oncology Radiation Oncology (2012)**2**(88).
- 50.- Vakifahmetoglu H., Olsson M., Zhivotovsky B. *Death through a tragedy: mitotic catastrophe*. Cell Death and Differentiation (2008)**15**: 1153–1162.
- 51.- Nakayama Yuji, Inoue Toshiaki. *Antiproliferative Fate of the Tetraploid Formed after Mitotic Slippage and Its Promotion; A Novel Target for Cancer Therapy Based on Microtubule Poisons*. Molecules (2016)**21**,663;doi:10.3390/molecules21050663.
- 52.- Castedo M., Perfettini JL., Roumier T., Valent A., Raslova H., Yakushijin K., Horne D., Feunteun J., Lenoir G., Medema R., Vainchenker W., Kroemer G. *Mitotic catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entails aneuploidy*. Oncogene (2004)**23**: 4362-4370.
- 53.- Topham Caroline H., Taylor Stephen S. *Mitosis and apoptosis: how is the balance set?*. Current Opinion in Cell Biology (2013)**25**: 780–785.
- 54.- Yoon Mi-Kyung, Ha Ji-Hyang, Lee Min-Sung, Chi Seung-Wook. *Structure and apoptotic function of p73*. BMB Rep. (2015)**48**(2): 81-90
- 55.- Dötsch V, Bernassola F, Coutandin D, Candi E, Melino G. *p63 and p73, the Ancestors of p53*. Cold Spring Harb Perspect Biol (2010)**2**(9): a004887.
- 56.- Bourdon JC, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, Liu G, Diot A, Xirodimas DP, Saville MK, Lane DP. *p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity*. Genes Dev. (2005)**19**: 2122-2137.
- 57.- Engelmann D., Meier C., Alla V., Pützer BM. *A balancing act: orchestrating amino-truncated and full-length p73 variants as decisive factors in cancer progression*. Oncogene (2015)**34**: 4287–4299.
- 58.- Allocati N, Di Ilio C, De Laurenzi V. *p63/p73 in the control of cell cycle and cell death*. Experimental Cell Research (2012)**318**(11): 1285–1290.
- 59.- Ramadan Saafa, Terrinoni Alessandro, Catani Maria Valeria, Emre Sayan, Knight Richard A., Mueller Martina, Krammer Peter H., Melino Gerry, Candi Eleonora. *p73 induces*

apoptosis by different mechanisms. Biochemical and Biophysical Research Communications (2005)**331**: 713-717.

60.- Sayan AE., Sayan BS, Gogvadze V, Dinsdale D, Nyman U, Hansen TM, Zhivotovsky B, Cohen GM, Knight RA, Melino G. *P73 and caspase-cleaved p73 fragments localize to mitochondria and augment TRAIL-induced apoptosis*. Oncogene (2008)**27**: 4363-4372.

61.- Terrinoni A, Ranalli M, Cadot B, Leta A, Bagetta G, Vousden KH, Melino G. *p73-alpha is capable of inducing Scotin and ER stress*. Oncogene (2004)**23**: 3721–3725.

62.- Lev-Ari S, Strier L, Kazanov D, Madar-Shapiro L, Dvory-Sobol H, Pinchuk I, Marian B, Lichtenberg D, Arber N. *Celecoxib and curcumin synergistically inhibit the growth of colorectal cancer cells*. Clin. Cancer Res. (2005)**11**(18): 6738-44.

63.- Tong QS1, Zheng LD, Lu P, Jiang FC, Chen FM, Zeng FQ, Wang L, Dong JH. *Apoptosis-inducing effects of curcumin derivatives in human bladder cancer cells*. Anticancer Drugs (2006)**17**(3): 279-287.

64.- Shi M, Cai Q, Yao L, Mao Y, Ming Y, Ouyang G. *Antiproliferation and apoptosis induced by curcumin in human ovarian cancer cells*. Cell Biol. Int. (2006)**30**(3): 221-226.

65.- Radhakrishna Pillai G, Srivastava AS, Hassanein TI, Chauhan DP, Carrier E. *Induction of apoptosis in human lung cancer cells by curcumin*. Cancer Lett. (2004)**208**(2): 163-170.

66.- Ambegaokar SS1, Wu L, Alamshahi K, Lau J, Jazayeri L, Chan S, Khanna P, Hsieh E, Timiras PS. *Curcumin inhibits dose-dependently and time-dependently neuroglial cell proliferation and growth*. Neuro. Endocrinol. Lett. (2003)**24**(6): 469–473.

67.- Wang L, Shen Y, Song R, Sun Y, Xu J, Xu Q. *An anticancer effect of curcumin mediated by down-regulating phosphatase of regenerating liver-3 expression on highly metastatic melanoma cells*. Mol Pharmacol. (2009)**76**(6):1238-45.

68.- Ghalaut VS, Sangwan L, Dahiya K, Ghalaut PS, Dhankhar R, Saharan R. *Effect of imatinib therapy with and without turmeric powder on nitric oxide levels in chronic myeloid leukemia*. J Oncol Pharm Pract. (2012)**18**(2):186-90.

69.- Jia YL1, Li J, Qin ZH, Liang ZQ. *Autophagic and apoptotic mechanisms of curcumin-induced death in K562 cells*. Journal of Asian Natural Products Research (2009)**11**(11): 918-928.

70.- Duvoix A, Morceau F, Schnekenburger M, Delhalle S, Galteau MM, Dicato M, Diederich M. *Curcumin-Induced cell death in two leukemia cell lines: K562 and Jurkat*. Ann.N.Y. Acad. Sci. (2003)**1010**: 389-392.

71.- Duvoix A, Morceau F, Delhalle S, Schmitz M, Schnekenburger M, Galteau MM, Dicato M, Diederich M. *Induction of apoptosis by curcumin: mediation by glutathione S-transferase P1-1 inhibition*. Biochemical Pharmacology.(2003)**66**(8): 1475–1483.

72.- Cheng F., Yu Q., Zeng Q., Liu Q, Xue K. *Study on the mechanism of apoptosis of myelocytic leukemia cell lines induced by curcumin*. Chinese-German Journal of Clinical Oncology (2008)**7**(2): P111-P114.

- 73.- Chakraborty S, Ghosh U, Bhattacharyya NP, Bhattacharya RK, Roy M. *Inhibition of telomerase activity and induction of apoptosis by curcumin in K-562 cells*. Mutation Research (2006)**596**(1-2): 81-90.
- 74.- Reuter S1, Charlet J, Juncker T, Teiten MH, Dicato M, Diederich M. *Effect of Curcumin on Nuclear Factor κ B Signaling Pathways in Human Chronic Myelogenous K562 Leukemia Cells*. Ann. N.Y. Acad. Sci. (2009)1171: 436-447.
- 75.- Chen Y., Liu H., Chen W. *Antiproliferation effects of curcumin on the STAT5 signaling pathway in K562 cells*. Chinese Journal of Clinical Oncology (2005)**2**(4): 685-692.
- 76.- Acharya Sarbari, Sahoo Sanjeeb K. *Sustained targeting of Bcr/Abl leukemia cells by synergistic action of dual drug loaded nanoparticles and its implication for leukemia therapy*. Biomaterials (2011)**32**: 5643-5662
- 77.- Lozzio C., Lozzio B. B. *Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome*. Blood (1975)**45**(3): 321-334
- 78.- Blakemore LM, Boes C, Cordell R, Manson MM. *Curcumin-induced mitotic arrest is characterized by spindle abnormalities, defects in chromosomal congression and DNA damage*. Carcinogenesis (2013)**34**(2): 351–360
- 79.- Holy Jon M. *Curcumin disrupts mitotic spindle structure and induces micronucleation in MCF-7 breast cancer cells*. Mutation Research (2002)**518**: 71–84
- 80.- Gupta Kamlesh K., Bharné Shubhada S., Rathinasamy Krishnan, Naik Nishigandha R., Panda Dulal. *Dietary antioxidant curcumin inhibits microtubule assembly through tubulin binding*. FEBS Journal (2006)**273**: 5320–5332
- 81.- Jackson SJ, Murphy LL, Venema RC, Singletary KW, Young AJ. *Curcumin binds tubulin, induces mitotic catastrophe, and impedes normal endothelial cell proliferation*. Food and Chemical Toxicology (2013)**60**: 431–438
- 82.- Banerjee Mithu, Singh Parminder, Panda Dulal. *Curcumin suppresses the dynamic instability of microtubules, activates the mitotic checkpoint and induces apoptosis in MCF-7 cells*. FEBS Journal (2010)**277**: 3437–3448
- 83.-Seung Joon Lee, Sigrid A Langhans. *Anaphase-promoting complex/cyclosome protein Cdc27 is a target for curcumin-induced cell cycle arrest and apoptosis*. BMC Cancer (2012)**12**: 44. doi: 10.1186/1471-2407-12-44.
- 84.- Magalska A, Sliwinska M, Szczepanowska J, Salvioli S, Franceschi C, Sikora E. *Resistance to apoptosis of HCW-2 cells can be overcome by curcumin- or vincristine-induced mitotic catastrophe*. Int. J. Cancer (2006)**119**: 1811–1818.
- 85.- O'Sullivan-Coyne G, O'Sullivan GC, O'Donovan TR, Piwocka K, McKenna SL. *Curcumin induces apoptosis-independent death in oesophageal cancer cells*. British Journal of Cancer (2009)**101**(9): 1585–1595.
- 86.- Subramaniam D, Ramalingam S, Linehan DC, Dieckgraefe BK, Postier RG, Houchen CW, Jensen RA, Anant S. *RNA Binding Protein CUGBP2/CELF2 Mediates Curcumin-*

Induced Mitotic Catastrophe of Pancreatic Cancer Cells. PLoS ONE (2011)**6**(2): e16958. doi:10.1371/journal.pone.0016958.

87.- Wolanin K, Magalska A, Mosieniak G, Klinger R, McKenna S, Vejda S, Sikora E, Piwocka K. *Curcumin affects components of the chromosomal passenger complex and induces mitotic catastrophe in apoptosis-resistant BCR-ABL-expressing cells.* Mol Cancer Res. (2006) **4**(7): 457-69.

88.- Fragkos M, Beard P. *Mitotic Catastrophe Occurs in the Absence of Apoptosis in p53-Null Cells with a Defective G1 Checkpoint.* PLoS ONE (2011)**6**(8): e22946. doi:10.1371/journal.pone.0022946

89.- Candi Eleonora, Agostini Massimiliano, Melino Gerry, Bernassola Francesca. *How the TP53 Family Proteins TP63 and TP73 Contribute to Tumorigenesis: Regulators and Effectors.* Hum Mutat (2014)**35**(6):702–714.

90.- Tschan MP1, Grob TJ, Peters UR, Laurenzi VD, Huegli B, Kreuzer KA, Schmidt CA, Melino G, Fey MF, Tobler A, Cajot JF. *Enhanced p73 expression during differentiation and complex p73 isoforms in myeloid leukemia.* Biochem Biophys Res Commun. (2000)**277**(1): 62-5.

91.- Law JC, Ritke MK, Yalowich JC, Leder GH, Ferrell RE. *Mutational inactivation of the p53 gene in the human erythroid leukemic K562 cell line.* Leuk Res (1993)**17**(12): 1045–50

92.- Stirewalt DL, Clurman B, Appelbaum FR, Willman CL, Radich JP. *p73 mutations and expression in adult de novo acute myelogenous leukemia.* Leukemia (1999)**13**(7): 985-90

93.- Liu JH, Liu CC, Yen CC, Gau JP, Wang WS, Tzeng CH. *Pml and TAp73 interacting at nuclear body mediate imatinib-induced p53-independent apoptosis of chronic myeloid leukemia cell.* Int. J. Cancer (2009)**125**(1): 71–77.

94.- Lin Donghong, Cui Zhaolei, Kong Lingying, Cheng Feng, Xu Jianping, Lan Fenghua. *p73 participates in WWOX-mediated apoptosis in leukemia cells.* International Journal of Molecular Medicine (2013)**31**(4): 849-854

95.- Huang Zheng-Lan, Gao Miao, Li Qian-Yin, Tao Kun, Xiao Qing, Cao Wei-Xi, Feng Wen-Li. *Induction of apoptosis by directing oncogenic BCR-ABL into the nucleus.* Oncotarget (2013)**12**(4): 2249-60.

96.- Li Y, Shao J, Shen K, Xu Y, Liu J, Qian X. *E2F1-Dependent Pathways are Involved in Amonafide Analogue 7-d-Induced DNA Damage, G2/M Arrest, and Apoptosis in p53-Deficient K562 Cells.* Journal of Cellular Biochemistry (2012)**113**(10): 3165–3177

97.- Merlo P., Fulco M., Costanzo A., Mangiacasale R., Strano S., Blandino G., Taya Y., Lavia P., Levrero M. *A Role of p73 in Mitotic Exit.* J. Biol. Chem. (2005)**280**(34): 30354-30360.

98.- Dar AA, Belkhiri A, Ecsedy J, Zaika A, El-Rifai W. *Aurora Kinase A Inhibition Leads to p73-Dependent Apoptosis in p53-Deficient Cancer Cells.* Cancer Res (2008)**68**(21): 8998–9004

- 99.- Fulco M., Costanzo A., Merlo P., Mangiacasale R., Strano S., Blandino G., Balsano C., Lavia P., Levrero M. *p73 Is Regulated by Phosphorylation at the G2/M Transition*. J. Biol. Chem. (2003)278(49): 49196 – 49202.
- 100.- Soond SM1, Barry SP, Melino G, Knight RA, Latchman DS, Stephanou A. *p73-mediated transcriptional activity is negatively regulated by polo-like kinase 1*. Cell Cycle (2008)7(9): 1214-1223.
- 101.- Talos F, Nemajerova A, Flores ER, Petrenko O, Moll UM. *p73 suppresses polyploidy and aneuploidy in the absence of functional p53*. Mol Cell. (2007)27(4): 647-59.
- 102.- Tomasini R, Tsuchihara K, Tsuda C, Lau SK, Wilhelm M, Ruffini A, Tsao MS, Iovanna JL, Jurisicova A, Melino G, Mak TW. *TAp73 regulates the spindle assembly checkpoint by modulating BubR1 activity*. PNAS (2009)106(3): 797-802.
- 103.- Niikura Y, Dixit A, Scott R, Perkins G, Kitagawa K. *BUB1 mediation of caspase-independent mitotic death determines cell fate*. J Cell Biol. (2007)178(2): 283-96.
- 104.- Niikura Y, Ogi H, Kikuchi K, Kitagawa K. *BUB3 that dissociates from BUB1 activates caspase-independent mitotic death (CIMD)*. Cell Death Differ. (2010)17(6): 1011-24.
- 105.- Toh WH, Nam SY, Sabapathy K. *An essential role for p73 in regulating mitotic cell death*. Cell Death Differ. (2010)17(5): 787-800.
- 106.- Taylor W. R. *FACS-Based Detection of Phosphorylated Histone H3 for the Quantitation of Mitotic Cells*. From: Methods in Molecular Biology, vol. **281**: Checkpoint Controls and Cancer, Volume 2: Activation and Regulation Protocols. Edited by: Axel H. Schönthal © Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- 107.- Matassov D, Kagan T, Leblanc J, Sikorska M, Zakeri Z.. *Measurement of Apoptosis by DNA Fragmentation*. From: Methods in Molecular Biology, vol. **282**: Apoptosis Methods and Protocols. Edited by: H. J. M. Brady © Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- 108.- Gurley L.R., D'Anna J.A., Barham S.S., Deaven L.L., Tobey R.A. *Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in Chinese hamster cells*. Eur. J. Biochem. (1978)84(1):1-15.
- 109.- Hendzel M.J., Wei Y., Mancini M.A., Van Hooser A., Ranalli T., Brinkley B.R., Bazett-Jones D.P., Allis C.D. *Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation*. Chromosoma (1997)106(6): 348-360.
- 110.- Chang, M.S., C.J. Huang, M.L. Chen, S.T. Chen, C.C. Fan, J.M. Chu, W.C. Lin, and Y.C. Yang. *Cloning and characterization of hMAP126, a new member of mitotic spindle-associated proteins*. Biochem Biophys Res Commun. (2001)287(1): 116-21.
- 111.- Scully Ralph, Xie Anyong. *Double strand break repair functions of histone H2AX*. Mutation Research (2013)750(1-2): 5-14.
- 112.- Li Wenqing, Lan Zhengdao, Wu Huiyun, Wu Shechao, Meadows Juliana, Chen Jie, Zhu Veronica, and Dai Wei. *BUBR1 Phosphorylation Is Regulated during Mitotic Checkpoint Activation*. Cell Growth & Differentiation. (1999)10(11): 769 –775.

- 113.- Chan G.K.T., Jablonski S.A., Sudakin V., Hittle J.C., Yen T.J. *Human BUBR1 Is a Mitotic Checkpoint Kinase that Monitors CENP-E Functions at Kinetochores and Binds the Cyclosome/APC*. The Journal of Cell Biology (1999)**146**(5): 941–954
- 114.- Tseng HH, Chuah QY, Yang PM, Chen CT, Chao JC, Lin MD, Chiu SJ.. *Securin Enhances the Anti-Cancer Effects of 6-Methoxy-3-(39,49,59-Trimethoxy-Benzoyl)-1H-Indole (BPR0L075) in Human Colorectal Cancer Cells*. PLoS ONE (2012)**7**(4): e36006. doi:10.1371/journal.pone.0036006
- 115.- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nuñez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon HU, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G. *Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012*. Cell Death and Differentiation. (2012)**19**(1): 107–120.
- 116.- Mosieniak G, Sliwinska MA, Przybylska D, Grabowska W, Sunderland P, Bielak-Zmijewska A, Sikora E. *Curcumin-treated cancer cells show mitotic disturbances leading to growth arrest and induction of senescence phenotype*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology (2016)**74**: 33–43.
- 117.- Lu Jin-Jian, Cai Yu-Jun, Ding Jian. *Curcumin induces DNA damage and caffeine-insensitive cell cycle arrest in colorectal carcinoma HCT116 cells*. Mol Cell Biochem (2011)**354**(1-2): 247–252.
- 118.- Ogiwara Hideaki, Ui Ayako, Shiotani Bunsyo, Zou Lee, Yasui Akira, Kohno Takashi. *Curcumin suppresses multiple DNA damage response pathways and has potency as a sensitizer to PARP inhibitor*. Carcinogenesis (2013)**34**(11): 2486–2497.
- 119.- O’Connel M.J, Raleigh JM, Verkade HM, Nurse P. *Chk1 is a wee1 kinase in the G2 DNA damage checkpoint inhibiting cdc2 by Y15 phosphorylation*. EMBO J. (1997)**16**(3): 545-554.
- 120.- Graves PR, Lovly CM, Uy GL, PiwnicaWorms H. *Localization of human Cdc25C is regulated both by nuclear export and 14-3-3 protein binding*. Oncogene (2001)**20**(15): 1839–51.
- 121.- Jiang Zhihua, Jin ShunQian, Yalowich Jack C., Brown Kevin D., Rajasekaran Baskaran. *The Mismatch Repair System Modulates Curcumin Sensitivity through Induction of DNA Strand Breaks and Activation of G2-M Checkpoint*. Mol Cancer Ther (2010)**9**(3): 558-568.
- 122.-Saleh Ekram M., El-awady Raafat A, Eissa Nadia A., Abdel-Rahman Wael M. *Antagonism between curcumin and the topoisomerase II inhibitor etoposide*. Cancer Biology & Therapy (2012)**13**(11): 1058-1071.
- 123.- López-Lázaro Miguel, Willmore Elaine, Jobson Andrew, Gilroy Kathryn L., Curtis Hannah, Padget Kay, Austin Caroline A. *Curcumin Induces High Levels of Topoisomerase I- and II-DNA Complexes in K562 Leukemia Cells*. J. Nat. Prod. (2007)**70**(12): 1884-1888.

- 124.- Wang Y., Decker S.J., Sebolt-Leopold J. *Knockdown of Chk1, Wee1 and Myt by RNA interference abrogates G2 checkpoint and induces apoptosis*. *Cancer Biology & Therapy*. (2004)**3**(3): 305-313.
- 125.- Xiao Zhan, Xue John, Semizarov Dimitri, Sowin Thomas J., Rosenberg Saul H., Zhang Haiying. *Novel indication for cancer therapy: Chk1 inhibition sensitizes tumor cells to antimetabolites*. *Int. J. Cancer*. (2005)**115**(4): 528–538
- 126.- Fragkos Michalis, Beard Peter. *Mitotic Catastrophe Occurs in the Absence of Apoptosis in p53-Null Cells with a Defective G1 Checkpoint*. *PLoS ONE* (2011)**6**(8): e22946.
- 127.- Chakraborti S1, Das L, Kapoor N, Das A, Dwivedi V, Poddar A, Chakraborti G, Janik M, Basu G, Panda D, Chakrabarti P, Surolia A, Bhattacharyya B. *Curcumin Recognizes a Unique Binding Site of Tubulin*. *J. Med. Chem* (2011)**54**(18): 6183–6196
- 128.- Gupta Kamlesh K., Bharne Shubhada S., Rathinasamy Krishnan, Naik Nishigandha R., Panda Dulal. *Dietary antioxidant curcumin inhibits microtubule assembly through tubulin binding*. *FEBS Journal* (2006)**273**(23): 5320–5332
- 129.- Liu Hsiao-Sheng, Ke Ching-Shiun, Cheng Hung-Chi, Huang Chi-Ying F., Su Chun-Li. *Curcumin-Induced Mitotic Spindle Defect and Cell Cycle Arrest in Human Bladder Cancer Cells Occurs Partly through Inhibition of Aurora A*. *Mol Pharmacol* (2011)**80**(4): 638–646.
- 130.- Ke Ching-Shiun, Liu Hsiao-Sheng, Yen Cheng-Hsin, Huang Guan-Cheng, Cheng Hung-Chi, Huang Chi-Ying F., Su Chun-Li. *Curcumin-induced Aurora-A suppression not only causes mitotic defect and cell cycle arrest but also alters chemosensitivity to anticancer drugs*. *Journal of Nutritional Biochemistry* (2014)**25**(5): 526–539.
- 131.- Singh Sanjaya, Aggarwal Bharat B. *Activation of Transcription Factor NF- κ B Is Suppressed by Curcumin (Diferulolylmethane)*. *The Journal of Biological Chemistry* (1995)**270**(42): 24995–25000.
- 132.- Harley ME, Allan LA, Sanderson HS, Clarke PR. *Phosphorylation of Mcl-1 by CDK1/cyclin B1 initiates its Cdc20-dependent destruction during mitotic arrest*. *EMBO J*. (2010)**29**(14): 2407-2420.
- 133.- Wertz IE, Kusam S, Lam C, Okamoto T, Sandoval W, Anderson DJ, Helgason E, Ernst JA, Eby M, Liu J, Belmont LD, Kaminker JS, O'Rourke KM, Pujara K, Kohli PB, Johnson AR, Chiu ML, Lill JR, Jackson PK, Fairbrother WJ, Seshagiri S, Ludlam MJ, Leong KG, Dueber EC, Maecker H, Huang DC, Dixit VM. *Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7*. *Nature* (2011)**471**(7336):110-114.
- 134.- Terrano DT, Upreti M, Chambers TC. *Cyclin-dependent kinase 1-mediated Bcl-2 phosphorylation acts as a functional link coupling mitotic arrest and apoptosis*. *Mol Cell Biol* (2010)**30**(3): 640-656.
- 135.- Barboule Nadia, Lafon Corinne, Chadebecq Philippe, Vidal Simone, Valette Annie. *Involvement of p21 in the PKC-induced regulation of the G2/M cell cycle transition*. *FEBS Letters* (1999) 444(1): 32-37.

- 136.- Oh You-Take, Hoon Chun Kwang, Duck Park Byoung, Choi Joon-Seok, Lee Seung Ki. *Regulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 by protein kinase C δ -mediated phosphorylation.* Apoptosis (2007)**12**(7):1339–1347.
- 137.- Merlo P, Fulco M, Costanzo A, Mangiacasale R, Strano S, Blandino G, Taya Y, Lavia P, Levrero M. *A role of p73 in mitotic exit.* J Biol Chem. (2005)**280**(34): 30354-60.
- 138.- Fulco M, Costanzo A, Merlo P, Mangiacasale R, Strano S, Blandino G, Balsano C, Lavia P, Levrero M. p73 is regulated by phosphorylation at the G2/M transition. J Biol Chem. (2003)**278**(49): 49196-202.
- 139.- Liang G, Shao L, Wang Y, Zhao C, Chu Y, Xiao J, Zhao Y, Li X, Yang S. *Exploration and synthesis of curcumin analogues with improved structural stability both in vitro and in vivo as cytotoxic agents.* Bioorg Med Chem (2009)**17**: 2623–2631.
- 140.- Somers-Edgar TJ, Taurin S, Larsen L, Chandramouli A, Nelson MA, Rosengren RJ. *Mechanisms for the activity of heterocyclic cyclohexanone curcumin derivatives in estrogen receptor negative human breast cancer cell lines.* Invest New Drugs. (2011)**29**(1):87-97.