



mec
MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CULTURA



**FACULTAD DE
CIENCIAS**
UDELAR | fcien.edu.uy

**LOCALIZACIÓN DEL DAÑO GENÉTICO INDUCIDO POR
BLEOMICINA EN CROMOSOMAS DE LA LÍNEA CELULAR CHO-9
MEDIANTE INMUNODETECCIÓN DE LA HISTONA H2AX
FOSFORILADA.**

**Tesina de grado
Licenciatura en Bioquímica
2012**

**Estudiante: Silvia Basso Alfonso
Tutor: Dra. María Vittoria Di Tomaso
Co-Tutor: Msc. Laura Lafon- Hughes
Departamento de Genética
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable**

AGRADECIMIENTOS

En el desarrollo del presente trabajo varias han sido las personas que me han brindado su apoyo y colaboración. No obstante, debo un especial agradecimiento al Dr. Gustavo Folle, a la Ing. Agr. Beatriz López-Carro y al Lic. Pablo Liddle por su importante colaboración en diferentes aspectos teóricos y técnicos y fundamentalmente a la Dra. María Vittoria Di Tomaso y a la Msc. Laura Lafon-Hughes por la disponibilidad y paciencia, así como también por el apoyo y la constante orientación, seguimiento y supervisión.

RESUMEN

La integridad del genoma se encuentra constantemente monitoreada durante el ciclo celular por proteínas que detectan y señalizan el daño producido en el ADN. Estas señales son amplificadas y transmitidas hacia otras proteínas involucradas en la detención del ciclo celular, reparación de las lesiones o programación de la muerte celular (apoptosis). Esta sofisticada red de interacciones constituye la denominada respuesta al daño en el ADN (DDR: *DNA Damage Response*). La ruptura de doble cadena (RDC) del ADN es el tipo de lesión más perjudicial para la célula, pudiendo dar lugar a la formación de aberraciones cromosómicas (AC), si no son reparadas eficientemente. La generación de AC puede producir defectos en el desarrollo, enfermedades neurodegenerativas, inmunodeficiencia, esterilidad y predisposición al cáncer.

En la DDR, se producen modificaciones epigenéticas en el contexto de la cromatina que remodelan su estructura o actúan como señales específicas. La fosforilación de la Ser-139 de la variante de histona H2AX (formando γ -H2AX en las regiones adyacentes a las RDC), es una de las primeras modificaciones que sufren las histonas en respuesta al daño. La fosforilación de la histona ante RDC está mediada por ATM y DNA-PKcs, quienes a su vez integran las vías de control del ciclo celular y la reparación del ADN. La detección de γ -H2AX mediante inmunomarcación ha sido desarrollada principalmente en núcleos interfásicos, lo que permite la visualización de *foci* en los sitios de daño. La γ -H2AX es considerada un marcador específico para la evaluación de lesiones del genoma en células sometidas a agentes clastogénicos, sin embargo, no existe información en la literatura científica sobre la localización cromosómica de γ -H2AX durante la mitosis.

Se analizaron las marcas de γ -H2AX en extendidos cromosómicos obtenidos mediante citocentrifugación de células CHO-9 (línea celular proveniente de fibroblastos de ovario de hámster Chino) tratadas con 0.01 mg/ml del agente radiomimético bleomicina (BLM) durante 30 min, y de células sin tratar (control). La detección de γ -H2AX se realizó mediante inmunomarcación y visualización empleando microscopía de epifluorescencia. Se seleccionaron 25 metafases control y 25 tratadas, en las cuales fueran identificables ocho cromosomas de interés (1, Z1, 2, Z2, Z3, Z4, 5 y Z6) que, debido a reordenamientos cromosómicos, presentan 5 regiones de homología entre sí. En base al idiograma de CHO-9 con bandas-G, se asignó a cada banda un valor ($V= 0, 1, 2$) según ausencia o presencia de marca en una o ambas cromátidas. Se calculó $\sum V$ para cada metafase y $\sum V/\text{longitud}$ para cada cromosoma y cada región de homología. Se comparó la marcación de γ -H2AX entre metafases, cromosomas, regiones homólogas y regiones sensibles al daño inducido por radiaciones ionizantes y endonucleasas, detectadas en investigaciones realizadas previamente en nuestro laboratorio.

El análisis de marcas totales de γ -H2AX por metafase permitió dividir a las poblaciones de metafases en tres sub-poblaciones: (a) ≤ 50 marcas (predominante en los controles), (b) entre 51 y 200 marcas (predominante en las metafases tratadas) y (c) >200 marcas (con proporciones similares en células tratadas y controles). La presencia de fosforilación de H2AX en células no tratadas con BLM y la existencia de un porcentaje similar de metafases con altos niveles de marcación de γ -H2AX (>200) tanto en ausencia como en presencia de BLM, sugiere un rol adicional aún no conocido de la γ -H2AX durante la mitosis. La sub-población con un nivel intermedio de marcación (entre 51 y 200), permitió discriminar el efecto de la BLM sobre la formación de γ -H2AX, el cual no fue proporcional en todos los cromosomas. Sin embargo, las regiones de homología entre los ocho cromosomas estudiados, tanto en células tratadas como controles, presentaron un número de marcas de γ -H2AX similar, indicando la ausencia de un efecto de posición en el cromosoma. Por otra parte, se observó una localización preferencial de las marcas de γ -H2AX en las regiones teloméricas y subteloméricas, así como una tendencia a la disminución de las mismas a nivel centromérico, principalmente en las células tratadas con BLM. Esta distribución intercromosómica e intracromosómica no homogénea de marcas concuerda con la distribución del daño inducido por radiaciones ionizantes y endonucleasas descrito previamente en nuestro laboratorio y sigue un patrón similar a la distribución cromosómica de la histona H4 hiperacetilada, sugiriendo que las regiones transcripcionalmente activas presentan mayor marcación de γ -H2AX y se localizan en regiones sensibles al daño.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Cromatina y cromosomas.....	1
1.1.1 Organización estructural de la cromatina y los cromosomas.....	1
1.1.2 Modificaciones epigenéticas de la cromatina.....	5
<i>Modificaciones post-traduccionales y complejos remodeladores</i>	5
<i>Histonas no canónicas</i>	5
<i>La variante histónica H2AX</i>	6
1.1.3 Los tipos de cromatina en los cromosomas metafásicos.....	6
<i>Bandas G</i>	7
<i>Bandas R</i>	8
<i>Bandas C</i>	8
<i>Bandeo con fluorocromos</i>	9
1.1.4 Los tipos de cromatina en el núcleo interfásico.....	9
1.2 Daño genético y respuesta celular.....	10
1.2.1 Fosforilación de H2AX (γ -H2AX) en la respuesta al daño.....	12
<i>Cinética de los foci de γ-H2AX</i>	13
<i>Rol de la γ-H2AX en la reparación de las RDC</i>	14
1.2.2 Fosforilación de H2AX durante las fases G ₂ /M del ciclo celular.....	15
1.3 Los cromosomas de la línea CHO-9.....	16
1.3.1 Localización del daño en cromosomas de CHO-9.....	19
1.4 Objetivos.....	22
1.4.1 General.....	22
1.4.2 Específicos.....	22
1.4.3 Actividades Específicas.....	23
2. MATERIALES Y MÉTODOS	24
2.1 Cultivo celular.....	24
2.2 Tratamiento con BLM.....	24
2.3 Preparación de extendidos metafásicos.....	24
2.4 Inmunomarcación de γ -H2AX.....	24
2.5 Obtención y procesamiento de imágenes cromosómicas.....	25
2.6 Cuantificación y distribución de γ -H2AX en los cromosomas metafásicos 1, Z1, 2, Z2, Z3, Z4, 5, y Z6.....	25

2.7	Análisis de la distribución de marcas de γ -H2AX por metafase.....	26
2.8	Elaboración de curvas de marcación de γ -H2AX por cromosoma.....	26
2.9	Estandarización del número de marcación de γ -H2AX según longitudes relativas de los cromosomas y regiones homólogas entre los mismos.....	26
2.10	Comparación del número de marcas de γ -H2AX entre cromosomas.....	27
2.11	Comparación del número de marcas de γ -H2AX entre regiones cromosómicas homólogas.....	27
2.12	Comparación de los patrones de fosforilación de H2AX con regiones de histona H4 hiperacetilada y regiones sensibles al daño inducido por radiaciones ionizantes y endonucleasas en los cromosomas 1, 2, 5, Z2, Z4 y Z6.....	27
3.	RESULTADOS.....	28
3.1	Cuantificación y distribución de marcas de γ -H2AX en los cromosomas metafásicos 1, Z1, 2, Z2, Z3, Z4, 5, y Z6 de CHO-9.....	28
3.2	Distribución de marcación de γ -H2AX por metafase.....	30
3.3	Distribución de marcas de γ -H2AX por cromosoma.....	32
3.4	Comparación de marcas de γ -H2AX entre cromosomas.....	34
3.5	Comparación de marcas de γ -H2AX entre regiones cromosómicas homólogas.....	36
3.6	Comparación entre los patrones de distribución de marcas de γ -H2AX, histona H4 hiperacetilada y regiones sensibles al daño inducido por RI y endonucleasas en los cromosomas 1, 2, 5, Z2, Z4 y Z6.....	38
4.	DISCUSIÓN.....	40
4.1	Distribución de marcas de γ -H2AX por metafase.....	40
4.2	Distribución intracromosómica de marcas de γ -H2AX y comparación con regiones de histona H4 hiperacetilada y regiones sensibles al daño inducido por RI y endonucleasas.....	43
4.3	Distribución intercromosómica de marcas de γ -H2AX y comparación con regiones sensibles al daño inducido por RI y endonucleasas.....	44
4.4	Distribución de marcas de γ -H2AX entre regiones cromosómicas homólogas.....	45
5.	CONCLUSIONES.....	46
6.	BIBLIOGRAFIA.....	47

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cromatina y cromosomas

Los términos cromatina y cromosoma reflejan dos estados morfológicamente diferentes de una misma entidad celular. Los cromosomas son estructuras discretas e independientes, visibles al microscopio óptico, que se forman cuando la cromatina alcanza su máximo nivel de condensación durante la división celular (mitótica o meiótica). La cromatina, tanto eucromatina como heterocromatina hacen referencia al distinto grado de su compactación en el núcleo interfásico. Esta separación inicial fue propuesta por Emil Heitz en 1928, quien observó mediante microscopía óptica que parte de la cromatina durante la interfase se encontraba en un estado altamente condensado, la cual denominó heterocromatina, en oposición al resto de la cromatina, menos compacta, denominada eucromatina (Heitz, 1928; Passarge, 2001). La heterocromatina puede diferenciarse en constitutiva y facultativa. Cuando es originariamente eucromatina y adquiere características heterocromáticas, ya sea por compensación de dosis (cromosoma X de hembras de mamíferos) o debido a la necesidad de silenciar genes en algunos tipos celulares (como los genes tejido-específico) se denomina heterocromatina facultativa. La heterocromatina constitutiva, en cambio, mantiene siempre características heterocromáticas (Holmquist, 1992). Por tanto, las diferencias en el grado de compactación de la cromatina son el reflejo de la actividad transcripcional durante la interfase o la necesidad de compactar el material hereditario para lograr una correcta segregación cromosómica.

1.1.1 Organización estructural de la cromatina y los cromosomas

Cada cromosoma está formado por una molécula de ADN (constituida por dos cadenas antiparalelas de polinucleótidos que se unen mediante puentes de hidrógeno, formando una doble hélice) unida a proteínas (histonas y no histonas). Como resultado de la replicación del ADN durante la fase S del ciclo celular, los cromosomas metafásicos poseen dos moléculas de ADN (dos doble hélices) unidas a proteínas que constituyen las denominadas cromátidas hermanas. A medida que ocurre la duplicación del ADN, las moléculas nacientes se van empaquetando con proteínas histónicas y no histónicas.

Mediante la asociación ADN-histonas, se logra la compactación cromosómica. La unidad básica estructural de la cromatina es el nucleosoma (Figura 1), el cual consiste en aproximadamente 147 pb de ADN enrollado 1.7 veces en torno a un núcleo octamérico de proteínas denominadas histonas (van Driel *et al.*, 2003). Las histonas son proteínas básicas que poseen una gran proporción de aminoácidos cargados positivamente (lisina y arginina), logrando una unión

sumamente estable con la doble hélice de ADN, el cual constituye un polianión debido a las cargas negativas que le confieren los grupos fosfato. Existen cinco tipos principales de histonas: H1, H2A, H2B, H3 y H4. El núcleo octamérico de histonas se halla constituido por dos copias de H2A, H2B, H3 y H4, formando un cilindro de 10 nm de diámetro (Passarge, 2001).

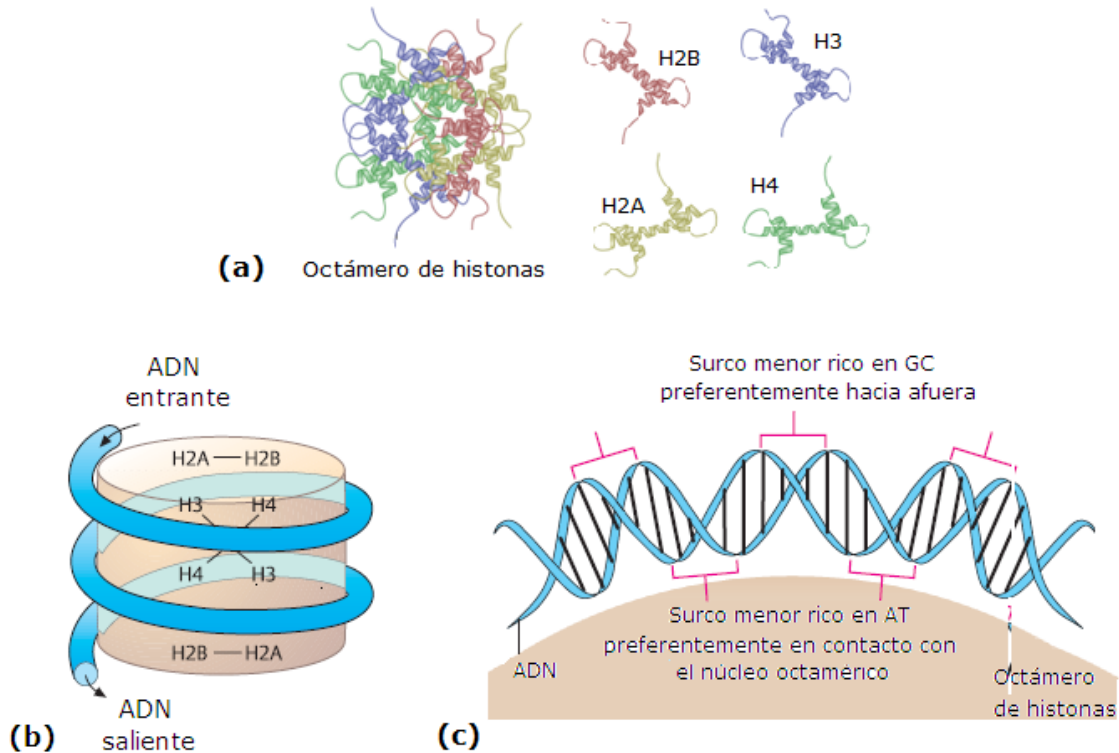


Figura 1.- (a) Estructura del octámero de histonas (b) Esquema de un nucleosoma mostrando el empaquetamiento del ADN alrededor del núcleo octamérico de histonas (c) Disposiciones preferenciales de las regiones del ADN con el octámero de histonas (Passarge, 2001).

Los nucleosomas adyacentes se encuentran conectados por una cadena de ADN de unión o "*linker*" de una longitud variable (entre 30-40 pb, según la especie y el tipo de célula), al cual se une la histona H1, que permite que las fibras nucleosomales adquieran una estructura más compacta, de un nivel superior de condensación. El modelo clásico de organización de la cromatina sugiere la formación de una fibra de cromatina de 30 nm de diámetro (Figura 2) y niveles crecientes de compactación que se describen a continuación.

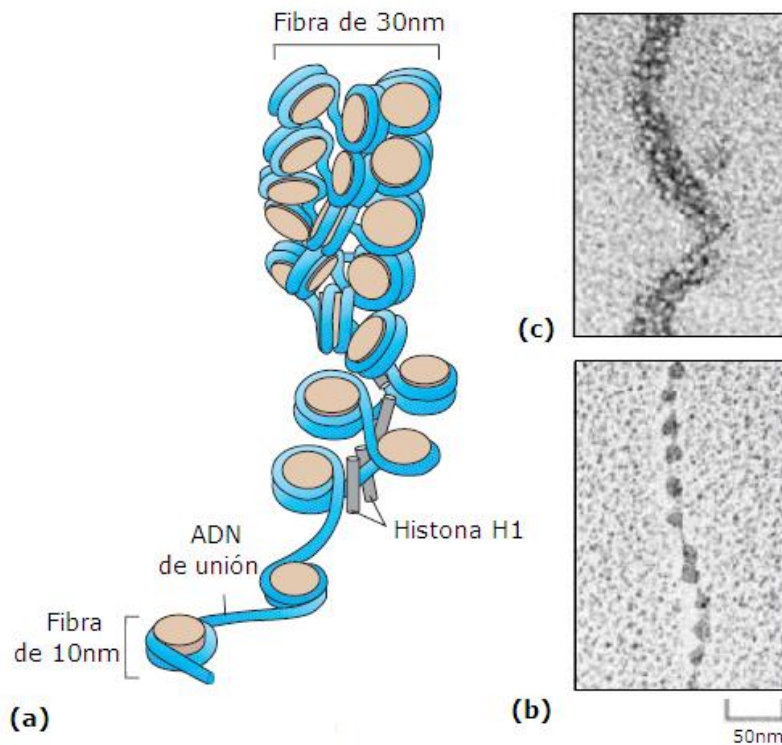


Figura 2.- (a) Esquema de la estructura de la cromatina mostrando la fibra de 10 nm, compuesta por nucleosomas y ADN de unión, y la interacción de los nucleosomas con la histona H1 para formar la fibra de 30 nm. (b) y (c) Micrografías electrónicas de una fibra de 10 nm, organización en “cuentas de collar” y fibra 30 nm, respectivamente.

El siguiente nivel de plegado de la cromatina en interfase sería la formación de “*loops*”, constituidos por fibras de 30 nm unidos a una estructura de proteínas no histónicas, denominada matriz nuclear (Figura 3). Estos *loops* de cromatina se unirían a la matriz nuclear a nivel de su base, a través de secuencias específicas de ADN ricas en A-T (>70%), denominadas MARs (Matrix Attachment Regions) (Belmont, 2002; Sumner, 2003).

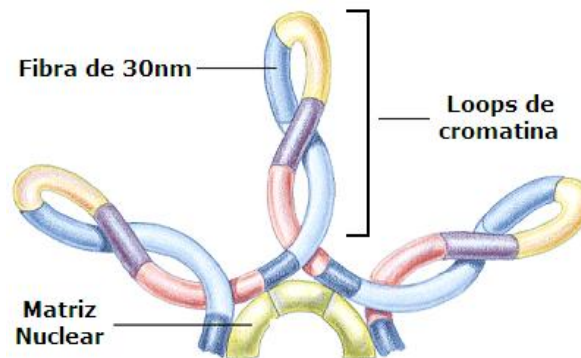


Figura 3.- Esquema de la organización de las fibras de 30 nm en “*loops*” de cromatina unidos a la matriz nuclear.

Un modelo de *scaffold-loops* para el cromosoma metafásico más compacto, propone que los bucles de cromatina de 30 nm se unen a una estructura proteica no-histónica central del cromosoma denominada andamiaje (*scaffold*), formando estructuras enrolladas denominadas mini-bandas. Los *loops* de cromatina se unen en sus bases mediante secuencias SARs (*Scaffold Attachment Regions*) (Pienta y Coffey, 1984).

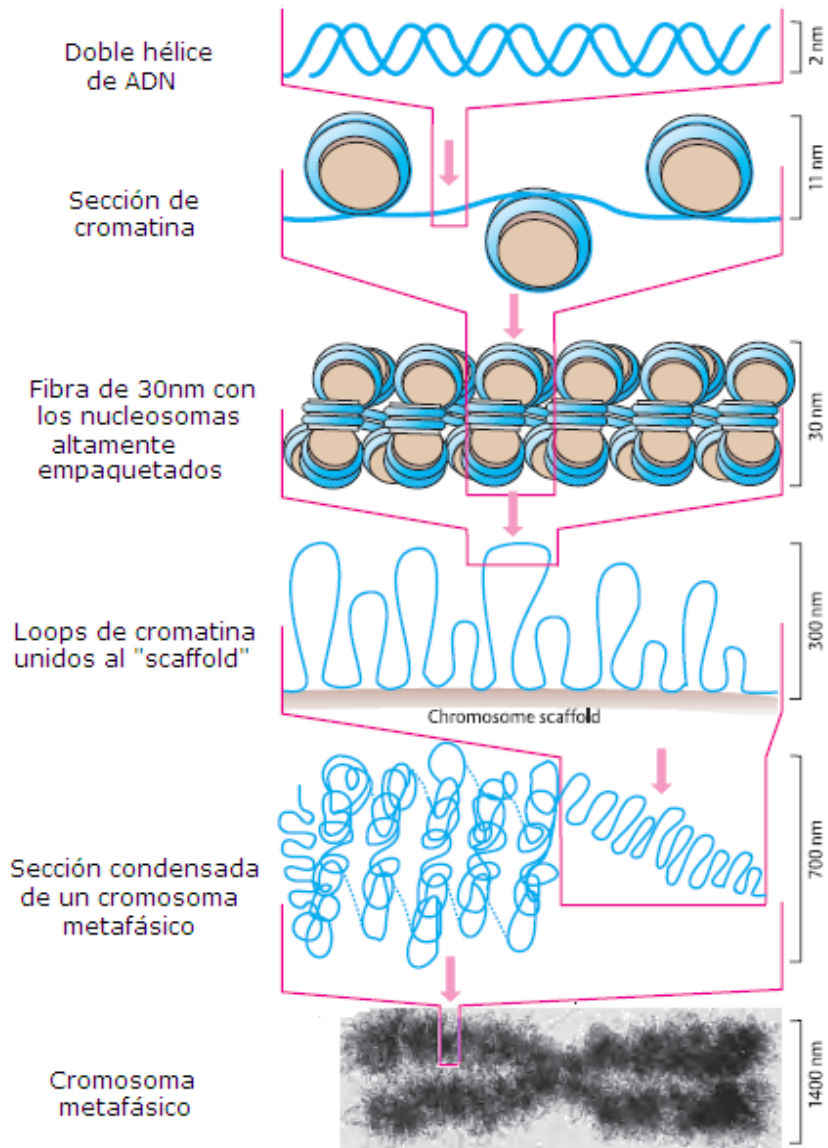


Figura 4.- Representación de los distintos niveles de compactación del ADN (Passarge, 2001, modificado).

Una vez alcanzado el máximo grado de condensación (Figura 4), se puede observar en cada cromosoma una constricción primaria, denominada centrómero. La región centromérica divide al cromosoma en dos brazos denominados p y q, siendo p el brazo más corto y q el más largo. En función de la posición del centrómero es posible clasificar a los cromosomas en: metacéntricos (el

centrómero se encuentra cerca del centro del cromosoma), submetacéntricos (la ubicación del centrómero está desplazada hacia un extremo), acrocéntricos (la posición del centrómero es cercana a un extremo) y telocéntricos (cuando el centrómero se encuentra en un extremo del cromosoma).

1.1.2 Modificaciones epigenéticas de la cromatina

Modificaciones post-traduccionales y complejos remodeladores

Las proteínas histónicas que integran la cromatina presentan una estructura similar, caracterizada por un dominio globular central y apolar, estructuralmente conservado y regiones básicas N- y C-terminales, denominadas “colas”. Las colas N- y C-terminales de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 se extienden hacia el exterior del nucleosoma (Figura 1a) (Sumner, 2003). Los residuos aminoacídicos específicos presentes en estas regiones terminales pueden ser modificados reversiblemente mediante acetilación, fosforilación, metilación, ADP-ribosilación o ubiquitinación por la acción de proteínas específicas. Estas modificaciones son post-traduccionales y tienen importantes efectos en las propiedades de las histonas y la cromatina creando un “código de histonas” o “epigenoma” que regula las funciones del ADN. Varios de estos “estados” de la cromatina son regulados y mantenidos de manera específica en cada tejido, haciendo al ADN accesible o inaccesible a la maquinaria de transcripción durante períodos específicos (Mariño-Ramirez *et al.*, 2005). Las partículas nucleosomales también pueden ser modificadas en su composición, estructura y localización por complejos remodeladores de la cromatina ATP dependientes.

Histonas no canónicas

Adicionalmente, las fibras de cromatina pueden ser modificadas por la incorporación de nucleosomas conteniendo alguna de las proteínas histónicas no canónicas, o variantes de histonas. Estas variantes de histonas nucleosomales intervienen en la regulación génica, la reparación del ADN y la recombinación que ocurre durante la meiosis. Se ha demostrado que las variantes de histonas se encuentran involucradas en los mecanismos de herencia epigenética, y poseen un rol significativo en la heterocromatización y formación de regiones especializadas de la cromatina (Pusarla y Bhargava, 2005).

La variante histónica H2AX

La H2AX es una variante de histona que se expresa constitutivamente y es incorporada al azar dentro de los nucleosomas, representando entre un 10-15% del total de H2A celular. Como las otras variantes de H2A (Figura 5), el extremo C-terminal de la H2AX presenta variaciones con respecto a la canónica, y son éstas las principales responsables de su función. H2AX contiene una secuencia consenso SQEL (serina-glutamina-ácido glutámico-leucina) en su extremo. Dentro de esta secuencia los residuos de serina y glutamina (motivo SQ) se encuentran muy conservados, desde levaduras hasta mamíferos (Pusarla y Bhargava, 2005).

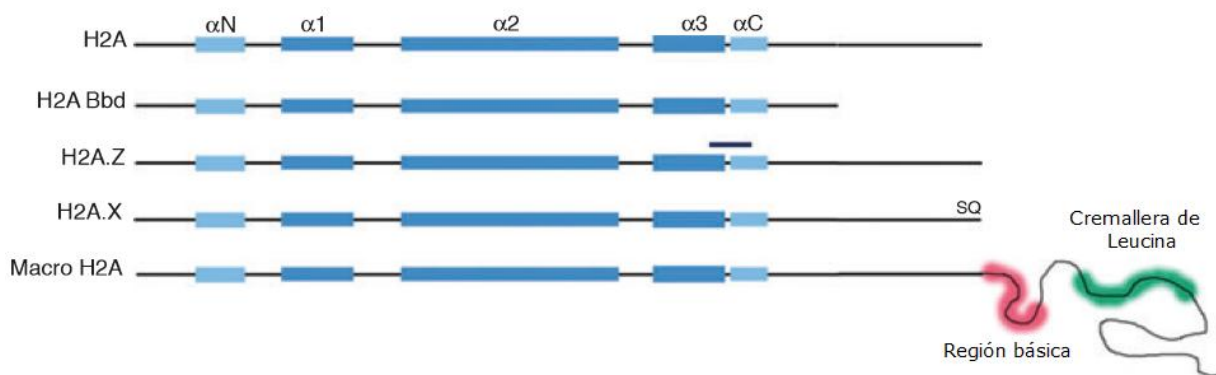


Figura 5.- Comparación esquemática de las variantes de histona H2A. Los bloques sólidos representan regiones de α -hélices. El dominio globular central está constituido por las hélices α 1 y α 3. Se indican las distintas variaciones estructurales en el extremo C-terminal de las distintas variantes (Pusarla y Purnima, 2005).

El motivo SQE es parte de la secuencia consenso blanco de las quinasas ATM, ATR y DNA-PK, pertenecientes a la familia de la fosfatidil-inositol-3 quinasa (PIK: *Phosphatidylinositol-3-Kinases*), que fosforilan el residuo conservado de serina en la posición 139 en respuesta al daño originado en el ADN, generando moléculas de H2AX denominadas γ -H2AX (Rogakou *et al.*, 1998).

1.1.3 Los tipos de cromatina en los cromosomas metafásicos

Para la identificación y caracterización de los cromosomas y de sus regiones se utilizan diversas técnicas de tinción que permiten la creación de mapas cromosómicos, denominados idiogramas (Figura 6).

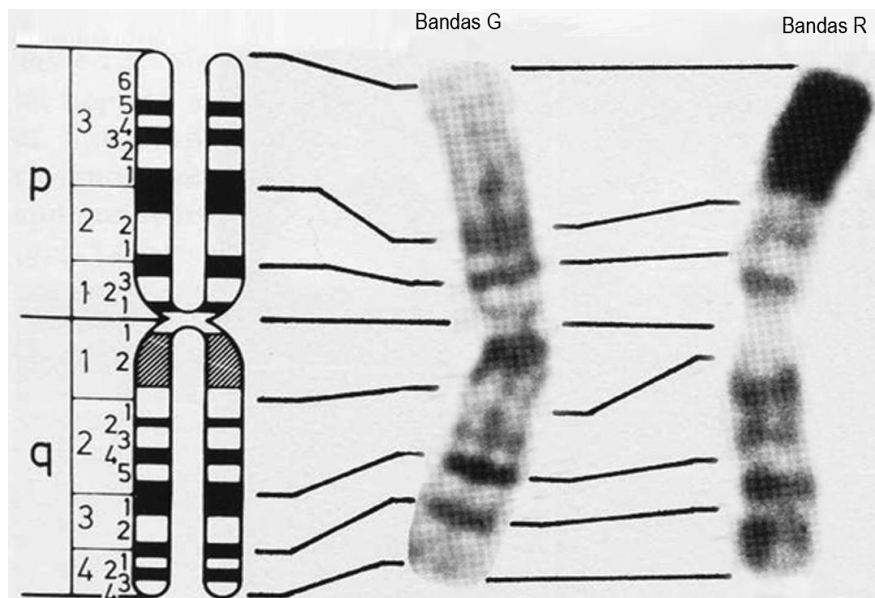


Figura 6.- Idiograma con bandeado G e imágenes del cromosoma 1 humano con bandas G y R (tinción Giemsa). Se muestra la correspondencia entre ambos patrones de bandeado y el idiograma.

Entre las técnicas de tinción más utilizadas se encuentran el bandeado G (Giemsa) que origina un patrón específico de bandas transversales claras y oscuras a lo largo de los cromosomas, el bandeado R (Reverse), que genera un patrón de bandas opuesto al bandeado G, y el bandeado C (Constitutive) específico de regiones de heterocromatina. Los mecanismos precisos por los cuales se generan las distintas bandas no son totalmente comprendidos, debido a que probablemente sean el resultado de la combinación de diferentes factores como el grado de condensación de la cromatina y la composición del ADN, siendo el reflejo de la complejidad presente en la organización de la cromatina.

Bandas G

Corresponden a regiones cromosómicas que se tiñen intensamente con el colorante de Giemsa y con fluorocromos específicos para zonas ricas en A-T como la quinacrina (bandas Q). El principio básico de la técnica de bandeado G consiste en una digestión enzimática con tripsina y posterior coloración con Giemsa. Las regiones bandas G, contienen heterocromatina facultativa, la cual se replica durante la segunda mitad de la fase S del ciclo celular. Estas regiones presentan genes tejido-específico y son ricas en secuencias largas medianamente repetidas o LINEs (Long Interspersed Elements) como por ejemplo la familia de secuencias L1 o KpnI (secuencias que generan un patrón de bandas característico al ser digeridas con la enzima de restricción *KpnI*). La heterocromatina facultativa, posee un elevado grado de condensación y corresponde a regiones

transcripcionalmente poco activas, ricas en pares de bases A-T. En sus genes, las islas CpG se encuentran metiladas y las histonas H3 y H4 desacetiladas. Debido a su compactación es menos sensible a la acción de endonucleasas. Este tipo de cromatina replica de manera tardía en los tejidos en los que no expresa sus genes, sin embargo lo hace tempranamente cuando transcribe sus genes tejido-específico (Folle y Obe, 1995; Folle y Obe, 1996; Folle *et al.*, 1998; Martínez-López *et al.*, 2000).

Bandas R

Son regiones del cromosoma que se tiñen con el colorante de Giemsa tras un tratamiento a 87°C, generando un patrón de bandas opuesto al bandeo G (bandas G-claras). Contienen eucromatina caracterizada por albergar genes constitutivos (*housekeeping genes*) que son aquellos que se encuentran activos en todos los tipos celulares. La eucromatina de las bandas R es transcripcionalmente activa, replica tempranamente y es rica en bases G-C y en secuencias cortas medianamente repetidas o SINEs (*Short INterspersed Elements*), como la familia de secuencias *Alu* (secuencias que generan un patrón de bandas característico al ser digeridas con la enzima de restricción *AluI*). Las islas CpG no se hallan metiladas en las regiones eucromáticas. Asimismo, las histonas H3 y H4 de los nucleosomas se encuentran acetiladas, lo que reduce la afinidad del ADN por el octámero histónico, produciendo en consecuencia la apertura de la cromatina (van Driel *et al.*, 2003). La eucromatina presenta una estructura laxa que permite el acceso de enzimas y factores de transcripción, así como también a agentes capaces de dañar el ADN, como por ejemplo endonucleasas (Folle y Obe, 1995; Folle y Obe, 1996; Folle *et al.*, 1998; Martínez-López *et al.*, 2000).

Bandas C

La técnica de bandeo C consiste en un tratamiento con una base fuerte y una incubación posterior en una solución salina, seguida de la tinción con el colorante Giemsa. Dicha técnica produce una tinción selectiva de la heterocromatina constitutiva que en el cariotipo humano se localiza en la región centromérica de todos los cromosomas, las regiones pericentroméricas de los cromosomas 1, 9 y 16 y la porción distal del brazo largo del cromosoma Y (Passarge, 2001). El ADN de estas regiones, (constituido por secuencias cortas altamente repetidas) replica al final de la fase S del ciclo celular. La heterocromatina α no presenta genes, sin embargo, la heterocromatina β (localizada en la periferia de la heterocromatina α) presenta retroposones y genes denominados “heterocromáticos” que se expresan en estado heterocromático (Holmquist y Ashley, 2006).

Bandeo con fluorocromos

La tinción directa de los cromosomas (sin tratamientos previos) con fluorocromos (quinacrina, naranja de acridina, Hoechst 33258, DAPI, cromomicina, entre otros) genera bandas características que dependen de la composición de bases en las diferentes regiones del ADN y la interacción de los mismos con las proteínas cromosómicas. Se emplea microscopía de fluorescencia para su visualización.

El fluorocromo DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol), ampliamente utilizado en citogenética, se une fuertemente a regiones de ADN ricas en pares de bases A-T. Si bien la fluorescencia es potenciada tanto por regiones ricas en A-T como en G-C, ésta es significativamente mayor en las áreas de ADN ricas en A-T. Por tal motivo, el DAPI origina un patrón de bandeo transversal con fluorescencia más intensa en regiones cromosómicas constituidas por heterocromatina facultativa (ricas en A-T). Este patrón de bandeo es similar al obtenido con quinacrina, un fluorocromo que ilumina intensamente las regiones ricas en A-T pero extingue su fluorescencia en áreas ricas en G-C. Sin embargo, el DAPI fluoresce además muy intensamente en las regiones pericentroméricas de los cromosomas humanos 1 y 16. El fluorocromo Hoechst 33258, muestra un patrón de bandeo análogo al producido por DAPI (Verma y Babu, 1994).

Una vez unido el DAPI al ADN de doble cadena, absorbe luz ultravioleta (máximo de absorción: 358 nm) y emite luz azul (máximo de emisión: 461 nm). Por tanto, para realizar observaciones con microscopía de fluorescencia se debe excitar con luz ultravioleta y detectar empleando un filtro azul/cian (Kapuscinski, 1995).

1.1.4 Los tipos de cromatina en el núcleo interfásico

Basándose en las diferentes características que presentan la eucromatina (replicación temprana, histona H4 hiperacetilada y activa transcripción) y la heterocromatina (replicación tardía, histona H4 desacetilada y menor actividad génica), Sadoni y colaboradores relacionaron los diferentes compartimentos del núcleo interfásico con el patrón de bandas (R, G y C) que se observa en cromosomas metafásicos.

Sus observaciones llevaron a la elaboración de un modelo de distribución para la cromatina en el núcleo interfásico (Figura 7), en el cual las regiones correspondientes a las bandas R, se agrupan en el interior del núcleo y las secuencias correspondientes a las bandas C y G en la periferia nuclear, la región perinucleolar y los cromocentros del interior nuclear. Este modelo postula,

asimismo, la existencia de polaridad de los territorios cromosómicos (eucromatina a nivel central y heterocromatina en la periferia) (Sadoni *et al.*, 1999).

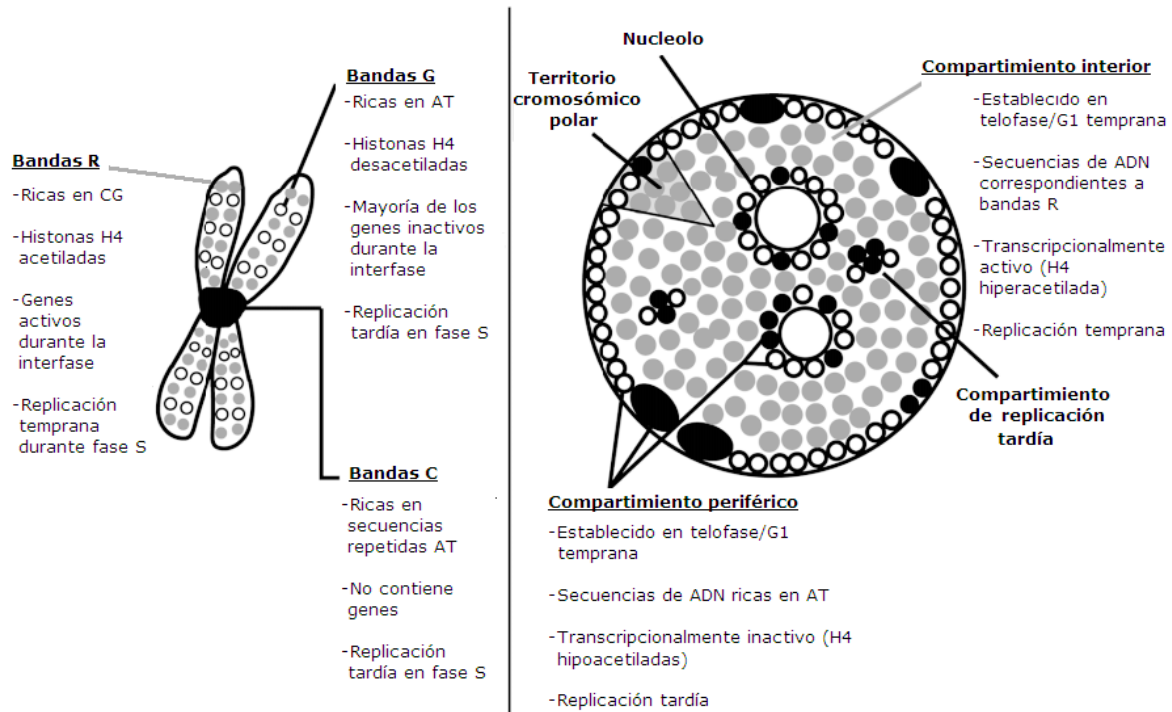


Figura 7.- Modelo de la cromatina en metafase (izquierda) y en interfase (derecha) según Sadoni *et al.*, 1999 (modificado). El patrón de bandas observado en los cromosomas metafásicos (bandas G, C y R), se distribuye de forma característica en el núcleo interfásico. Las bandas R (genes constitucionales, H4 hiperacetilada y replicación temprana) se localizan en el interior del núcleo; las bandas G (genes tejido-específico, H4 hipoacetiladas y replicación tardía) y bandas C (rica en secuencias repetidas, pobre en genes, H4 desacetiladas y de replicación tardía) se localizan en el compartimiento periférico de replicación tardía (Sadoni *et al.*, 1999, modificado).

1.2 Daño genético y respuesta celular

La integridad del genoma es constantemente monitoreada por sofisticadas redes de señalización que actuando en conjunto, constituyen la denominada “respuesta al daño del ADN (DDR: DNA Damage Response) mediante la cual se detecta, señala y promueve la reparación de las lesiones. Células defectuosas en estos mecanismos suelen mostrar mayor sensibilidad a los agentes genotóxicos, generando como consecuencia, inestabilidad genómica y enfermedades como el cáncer (Polo y Jackson, 2011).

La molécula de ADN experimenta diversos tipos de lesiones que al no ser restituidas o al repararse erróneamente, pueden conducir a la aparición de daño a nivel cromosómico.

Las rupturas de doble cadena (RDC) no constituyen el tipo de daño más frecuente, pero sí el más perjudicial para la célula, debido a que se produce la pérdida de continuidad de la molécula de ADN y sólo en las etapas del ciclo celular en donde el ADN ha sido replicado (final de la fase S y fase G₂) puede lograrse una reparación con alta fidelidad, al utilizar la cromátida homóloga como molde. Esta vía de reparación se denomina Recombinación Homóloga (HR: *Homologous Recombination*). Sin embargo, durante todo el ciclo celular y fundamentalmente en etapas pre-replicas (fase G₁ o fase G₀), las RDC son reparadas mediante vías de baja fidelidad, principalmente la vía de reparación por Unión de Extremos no Homólogos (NHEJ: *Non-Homologous End Joining*), ya sea por su vía dependiente (*Dependent-NHEJ*) o independiente (*Backup-NHEJ*) de la DNA-PK (Paques y Haber, 1999; Rothkamm *et al.*, 2003; Goedecke, 2007; Iliakis *et al.*, 2007). Cuando las RDC no son reparadas eficientemente, pueden dar lugar a diversas aberraciones cromosómicas que se asocian con defectos en el desarrollo, radiosensibilidad, enfermedades neurodegenerativas, inmunodeficiencia, esterilidad y predisposición al cáncer (Jackson y Bartek, 2009).

Las RDC pueden generarse por mecanismos celulares endógenos, como por ejemplo el colapso de la horquilla de replicación del ADN. También existe una producción controlada y específica de RDC que cumplen un rol fisiológico como en la recombinación V(D)J de las inmunoglobulinas en linfocitos de vertebrados, en la muerte celular programada o apoptosis y en la recombinación meiótica de las células germinales (Jackson y Bartek, 2009; Polo y Jackson, 2011). Estas lesiones son producidas también por la acción de agentes exógenos tales como la integración de elementos retrovirales, las radiaciones ionizantes, drogas radiomiméticas como la bleomicina (BLM), sustancias alquilantes o intercalantes en el ADN y los inhibidores de la topoisomerasa II que impiden la religación de las cadenas de ADN escindidas por esta enzima.

Las radiaciones no ionizantes, como la luz UV, pueden también inducir RDC de modo dependiente de los sistemas de reparación y replicación del ADN. Los dímeros de pirimidina y 6-4 fotoproductos (principales lesiones originadas por la radiación UV) son reparados por el sistema de reparación por Escisión de Nucleótidos (NER: *Nucleotide Excision Repair*), tanto por su vía acoplada a la transcripción (TCR o TC-NER: *Transcription Coupled Repair*), que repara lesiones en la hebra de ADN transcrita, como su vía de reparación del genoma global (GGR o GG-NER: *Global Genome Repair*). El NER, elimina un segmento de cadena de ADN que contiene la lesión, dejando una brecha, una ruptura de cadena simple (RSC). Si el ADN que contiene RSC comienza a replicarse,

pueden originarse RSC en la cadena opuesta, originando RDC. Por tanto, también se pueden generar RDC durante la replicación de moléculas de ADN que contienen RSC (Jackson y Bartek, 2009; Polo y Jackson, 2011).

Luego de la generación de RDC, se activa una cascada de señalización que coordina los mecanismos de control del ciclo celular y reparación del ADN. Las proteínas que median la detección, señalización y reparación de las lesiones en el ADN son rápidamente reclutadas a los sitios de daño en esta molécula, lo cual es precedido por cambios en la estructura de la cromatina.

1.2.1 Fosforilación de H2AX (γ -H2AX) en la respuesta al daño

La fosforilación de la variante de histona nucleosómica H2AX denominada γ -H2AX está involucrada en la detección y reparación del daño del ADN. La presencia de la carga negativa extra aportada por el grupo fosfato en el residuo de serina en la posición 139 (Rogakou *et al.*, 1998) genera una decondensación localizada de la cromatina, que proporciona un mayor acceso a los diversos factores y complejos enzimáticos de las vías de reparación y control del ciclo celular. (Ayoub *et al.*, 2009).

La H2AX se ha denominado “la histona guardiana del genoma” (Fernandez- Capetillo *et al.*, 2004) debido a que es una de las primeras modificaciones que sufren las histonas en respuesta al daño. La fosforilación de H2AX se produce rápidamente en los sitios de daño y se ha considerado un marcador de RDC. Esta fosforilación puede ser mediada tanto por ATM, ATR como DNA-PKcs. ATM ha sido ampliamente reportada como la principal enzima encargada de la fosforilación de H2AX vinculada al daño inducido por radiaciones ionizantes (Kinner *et al.*, 2008), mientras que la fosforilación por ATR se produce en respuesta al daño del ADN inducido por UV (Hanasoge y Ljungman, 2007) o al estrés en la replicación (Ward y Chen, 2001). Por otra parte, la DNA-PKcs es capaz de fosforilar H2AX en los nucleosomas durante la fragmentación del ADN en la apoptosis (Rogakou *et al.*, 2000) y desempeña también un importante rol en la generación de γ -H2AX inducido por radiación ionizante (An *et al.*, 2010).

Además de la fosforilación de la histona H2AX, que aumenta la carga negativa en los nucleosomas, la estructura de la cromatina se ve remodelada también por un incremento en la acetilación de la histona H3 en los residuos K9, K14, K18, K23 y K27, y la histona H4 en los residuos K5, K8, K12 y K16. En conjunto, estos cambios facilitan el acceso de las diferentes proteínas involucradas en la reparación de lesiones en el ADN (Ayoub *et al.*, 2009).

Cinética de los foci de γ -H2AX

La γ -H2AX es generada alrededor de las RDC. Mediante inmunomarcación es posible detectarla en forma de *foci*, los cuales pueden ser visualizados en menos de 3 minutos después de que la célula ha sido irradiada, y su cantidad aumenta rápidamente hasta un máximo a los 30 minutos post-irradiación. Los *foci* de γ -H2AX son proporcionales a la dosis de radiación, siendo el número de *foci* proporcional al número de RDC (Rogakou *et al.*, 1999).

Un aspecto especialmente relevante de la fosforilación de H2AX es que no se limita sólo al entorno inmediato de la lesión, sino que se extiende a ambos lados de las RDC. Se ha estimado que por cada RDC se fosforilan aproximadamente 2000 moléculas de H2AX. Si estas moléculas formaran parte de todos los nucleosomas, su fosforilación comprometería una región de 1-2 Mb de cromatina. Sin embargo, dado que H2AX es sólo 10-15% del total de H2A, no se encuentra en todos los nucleosomas y por lo tanto se espera que la región fosforilada sea más amplia. De hecho, los análisis de inmunofluorescencia muestran que las regiones modificadas son vastas; el área de corte típica de un *foci* es de 0.1 a 0.35 μm^2 (Costes *et al.*, 2010). Por lo tanto, una sola lesión en el ADN produce una modificación que es amplificada en una extensa región de la cromatina, lo que puede considerarse como la preparación para el reclutamiento y montaje de la maquinaria de reparación (Kinner *et al.*, 2008; Bewersdorf *et al.*, 2006).

Una vez que la RDC es reparada, es necesario re-establecer la estructura de la cromatina, por lo tanto es indispensable remover la γ -H2AX que desestabiliza la estructura con su grupo fosfato. Este re-establecimiento de la organización de la cromatina se puede producir mediante la sustitución de la γ -H2AX por una histona sin fosforilar, o por desfosforilación directa de la histona presente en el nucleosoma (Svetlova *et al.*, 2007; Chowdhury *et al.*, 2005).

En mamíferos, la fosfatasa 2A (PP2A) participa en la desfosforilación de la γ -H2AX, regulando el *pool* celular luego de una RDC. No está claro si la desfosforilación ocurre *in situ* o si se requiere su previa disociación de la cromatina. Por un lado, la co-localización parcial de la γ -H2AX con la PP2A es compatible con la idea de una desfosforilación *in situ*. Sin embargo, la lenta cinética de eliminación de los *foci* de γ -H2AX sumado al hecho que la misma es poco afectada por inhibidores de la desfosforilación de γ -H2AX, indican que la eliminación de los *foci* es independiente de la desfosforilación, la cual puede ocurrir luego que la histona modificada es removida de la cromatina (Svetlova *et al.*, 2007; Chowdhury *et al.*, 2005). Este modo de acción es homólogo al de las levaduras, en donde la γ -H2AX es eliminada de la cromatina y posteriormente desfosforilada por el

complejo HTP-C, que presenta una subunidad activa, denominada PPh3, idéntica a la PP2A en un 60% (Kinner *et al.*, 2008).

En concordancia con este mecanismo, se ha identificado una chaperona de histonas, denominada PP2C γ , que también interviene en la desfosforilación. PP2C γ facilita la incorporación de dímeros H2A-H2B o H2AX-H2B desfosforilados y actúa a su vez como depósito nuclear de los dímeros fosforilados (Kimura *et al.*, 2006).

Rol de la γ -H2AX en la reparación de las RDC

El reclutamiento de proteínas de señalización y reparación en los sitios de lesiones, constituye el primer evento de la respuesta celular al daño del ADN (Figura 8). Muchos componentes involucrados en la reparación del ADN, incluyendo ATM, BRCA1, 53BP1, MDC1, RAD51 y el complejo MRN (Mre11/RAD50/NBS1) co-localizan con los *foci* de γ -H2AX. Estos micro-dominios contienen cientos de moléculas que se acumulan alrededor de cada RDC (Fernandez- Capetillo *et al.*, 2004).

La H2AX es fosforilada por ATM, proteína que se activa frente a la presencia de RDC. Sin embargo, el mecanismo más probable es que la fosforilación inicial esté mediada por la DNA-PK, que es activada eficientemente mediante la interacción con el complejo Ku70/Ku80, el cual presenta gran afinidad por los extremos de ADN (Kinner *et al.*, 2008). Se ha visto que H2AX interactúa físicamente con NBS1, 53BP1 y MDC1 (Kobayashi, 2004; Kobayashi *et al.*, 2008). El reconocimiento específico de γ -H2AX, requiere la presencia de dominios particulares. Los dominios FHA y BRCT, presentes en algunas proteínas involucradas en la DDR son capaces de reconocer específicamente residuos de aminoácidos fosforilados (Kinner *et al.*, 2008).

La interacción de MDC1 con γ -H2AX es el paso inicial para la amplificación de la señal y reparación de la RDC. MDC1 también interactúa directamente y de manera muy dinámica con NBS1, la cual se encuentra formando el complejo MRN y es necesaria para la activación de ATM. La fosforilación de MDC1 por la caseína quinasa 2 (CK2) promueve la interacción con NBS1. De esta manera se genera una retroalimentación positiva que extiende la fosforilación de H2AX varios Mb del sitio original de la RDC (Kinner *et al.*, 2008).

Esto genera un círculo de retroalimentación que conduce a más fosforilaciones de H2AX y a las modificaciones de la cromatina necesarias para el reclutamiento de la proteína 53BP1, que se

acumula por la interacción con γ -H2AX y MDC1. La cascada de activación culmina con la fosforilación de MDC1 por RNF8 y la poliubiquitinación de H2AX por 53BP1, que reclutan al complejo BRCA1/BARD1 (Kinner *et al.*, 2008). En la Figura 8 se sintetiza el mecanismo de reclutamiento de proteínas de la DDR mediado por la γ -H2AX.

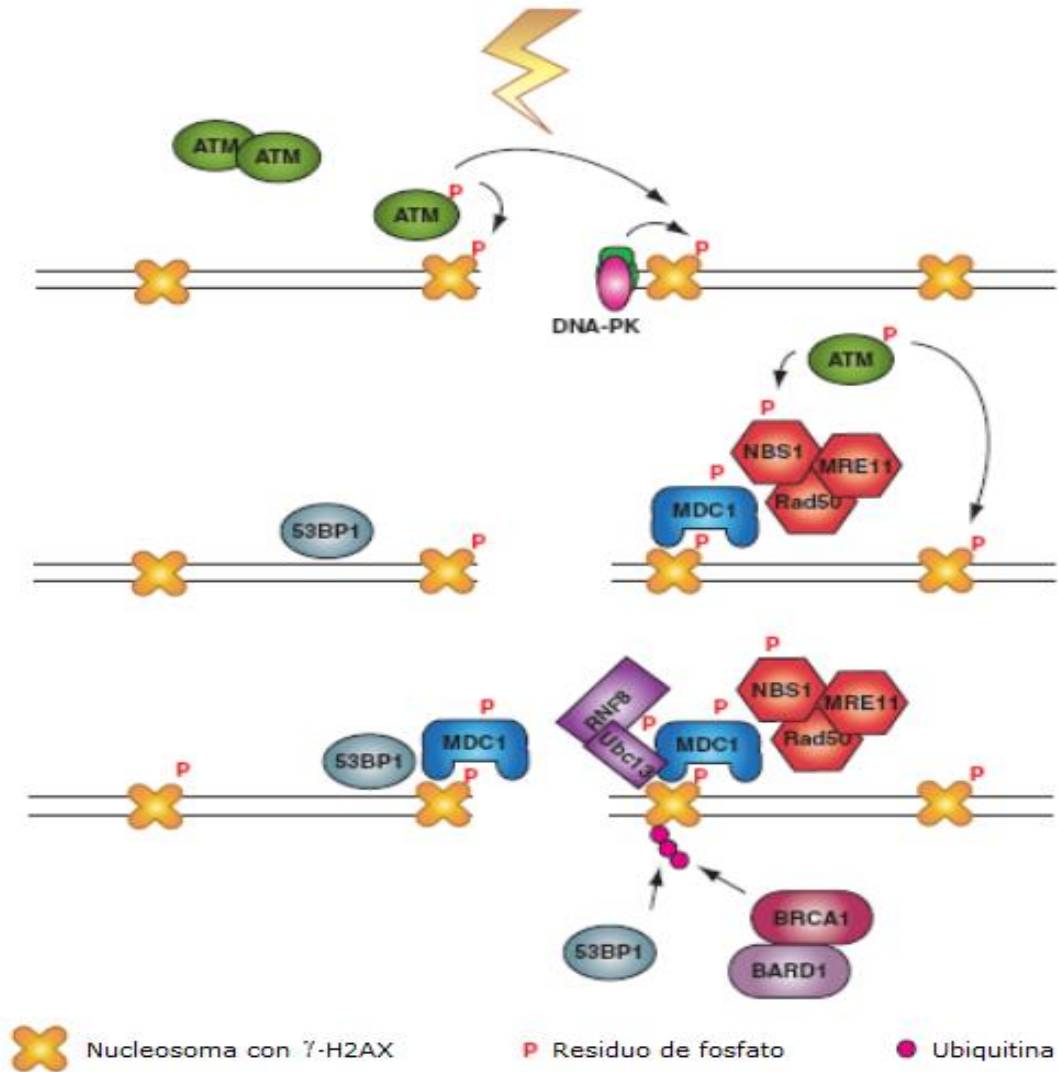


Figura 8.- Modelo de reclutamiento de proteínas de DDR mediado por la γ -H2AX (Kinner *et al.*, 2008).

1.2.2 Fosforilación de H2AX durante las fases G₂/M del ciclo celular

El estado de condensación de la cromatina cambia dramáticamente durante todo el ciclo celular, Durante la mitosis, cada molécula de ADN se condensa y reduce su longitud aproximadamente 10000 veces comparado con los cromosomas en G₁ (Sumner, 2003).

En ausencia de fuentes exógenas o artificiales que produzcan daño al ADN, los niveles detectados de γ -H2AX reflejan las RDC generadas durante el metabolismo normal de la célula (niveles basales). Se ha detectado que la fosforilación de H2AX, dependiente de ATM, es máxima durante las primeras etapas de la fase M del ciclo celular (McManus y Hendzel, 2005; Ichijima *et al.*, 2005).

La inducción inicial de RDC inducidas por radiación, no se ve afectada por los diferentes grados de compactación que presentan los cromosomas en los distintos estados del ciclo celular. Sin embargo, se genera el doble de *foci* de γ -H2AX en las células mitóticas, siendo éstos de mayor tamaño e intensidad en comparación con los observados en interfase. Este hecho podría estar relacionado con el doble contenido de ADN que se halla en las fases G₂/M (Kato *et al.*, 2008).

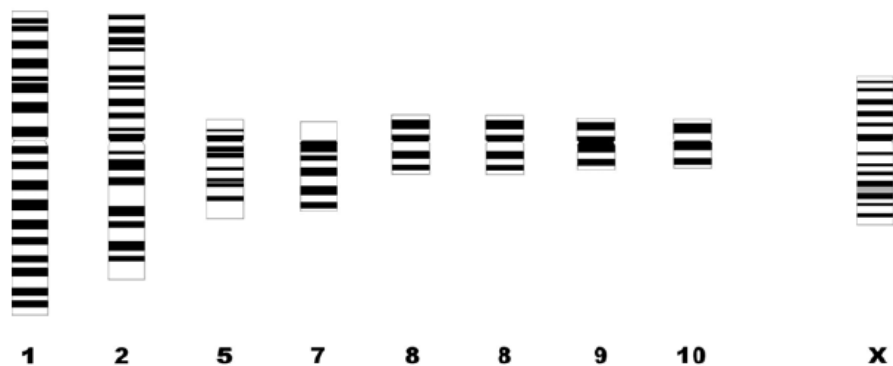
Por otra parte, la cinética de desaparición de los *foci* se ve reducida considerablemente en células mitóticas. Este resultado puede sugerir que, debido a que las histonas se encuentran en una cromatina muy condensada, la accesibilidad de las enzimas que participan en la desfosforilación o el recambio de la γ -H2AX está limitada. En este mismo sentido, la reparación de las RDC no implica necesariamente la desaparición de la γ -H2AX; la fosforilación de la histona puede permanecer a pesar de que la ruptura haya sido reparada (Kato *et al.*, 2008; Forand *et al.*, 2004). Esto es consistente con la ausencia de co-localización de las proteínas implicadas en la reparación del ADN con los *foci* en cromosomas mitóticos (McManus y Hendzel, 2005).

No obstante, el rol biológico de la fosforilación de la histona H2AX durante la mitosis requiere de mayor investigación, por lo que no se descarta la posibilidad de que esta modificación post-traducciona se encuentre asociada a alguna otra función biológica durante la mitosis (McManus y Hendzel, 2005; Ichijima *et al.*, 2005).

1.3 Los cromosomas de la línea CHO-9

La línea celular CHO-9 deriva de un cultivo de fibroblastos de ovario de hámster chino (CHO), establecido por Puck *et al.* en 1958. Esta línea celular contiene 21 cromosomas, 9 de los cuales son aparentemente normales (1, 2, 5, 7, el par 8, 9, 10, X). Los 12 restantes son cromosomas reordenados, denominados cromosomas Z (Z1-Z10, Z12 y Z13), que surgieron por reordenamientos entre los cromosomas originales (Figura 9 y Tabla 1) (Kao y Puck, 1969; Deaven y Petersen, 1973; Siciliano *et al.*, 1985).

CROMOSOMAS NORMALES



CROMOSOMAS REORDENADOS

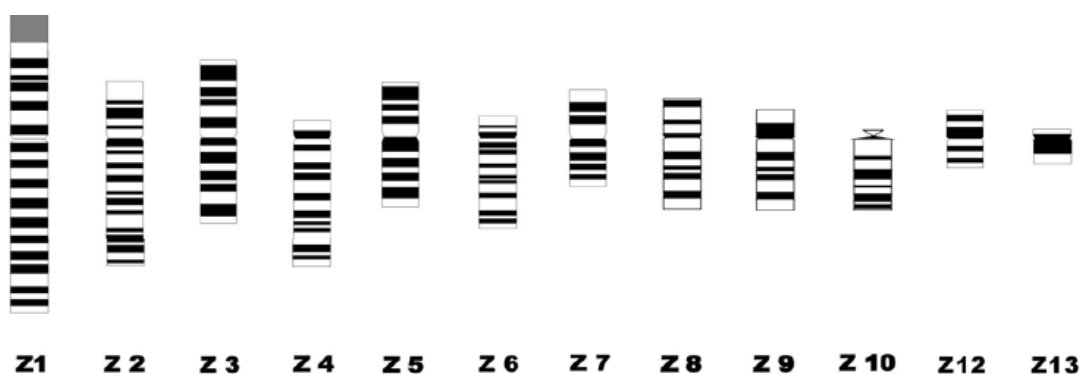


Figura 9.- Idiograma con bandeo G de los cromosomas de la línea celular CHO-9.

Cromosoma Z	Origen de los cromosomas Z [Origen cromosómico principal]
Z1	t(1p;5q) [1]
Z2	del(2q) [2]
Z3	t(3p;4p) [3]
Z4	inv (3) [3]
Z5	del (4) [4]
Z6	t(1p;5q) [5]
Z7	t(3p;4p) [4]
Z8	t(6p; ^a) [6]
Z9	t(6p; ^a) [6]
Z10	Origen desconocido
Z12	Origen desconocido
Z13	Origen desconocido

Tabla 1.- Reordenamientos cromosómicos que han dado origen a los cromosomas Z. El subíndice ^a indica que se desconoce el segundo cromosoma involucrado en la traslocación (Martínez-López *et al.*, 2000).

Los cromosomas Z1 y Z6 derivan de una translocación recíproca que involucra la región telomérica del brazo corto del cromosoma 1 y la porción distal del brazo largo del cromosoma 5 (1p; 5q). El cromosoma submetacéntrico Z2 proviene de una extensa delección del brazo largo del cromosoma 2 (2q1-q24). El origen del cromosoma acrocéntrico Z4 es una inversión pericéntrica del cromosoma 3 que abarca casi todo su brazo largo y la región proximal de su brazo corto. Los cromosomas Z8 y Z9 derivan del par acrocéntrico 6 (por translocación que involucra el brazo corto del 6 en ambos casos) pero presentan en los brazos cortos bandas adicionales de procedencia desconocida. Una delección del cromosoma 7 habría dado origen al cromosoma Z10 (Deaven y Petersen, 1973). Sin embargo, los estudios de mapeo génico no han confirmado esta hipótesis (Siciliano *et al.*, 1985).

Estos reordenamientos dan lugar a regiones de homología entre los cromosomas involucrados. La Figura 10 muestra las regiones de homología, definidas excluyendo las bandas que contienen los sitios de fractura, debido a que no se ha determinado con exactitud el punto de corte dentro de la banda (Siciliano *et al.*, 1985).

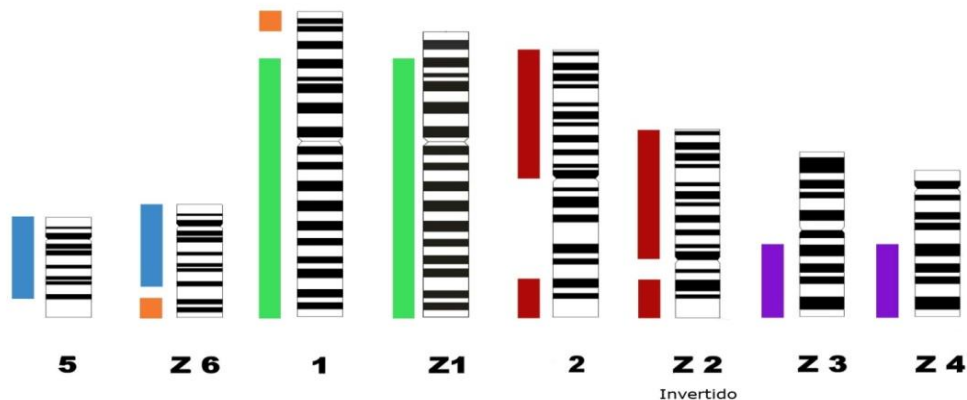


Figura 10.- Diagramas de los cromosomas de la línea celular CHO. Las barras de igual color indican las regiones homólogas entre los cromosomas, delimitadas excluyendo las bandas que albergan los sitios de fractura. Es posible que durante los reordenamientos se hubieran perdido regiones cromosómicas (Siciliano *et al.*, 1985).

Por otra parte, el cromosoma X de la línea CHO-9 presenta un peculiar brazo corto (Xp) bandas C negativo y un brazo largo (Xq) que, con excepción de una pequeña constricción secundaria medial, presenta la heteroplicnosis que caracteriza a la heterocromatina.

Las células de CHO-9 crecen en monocapa y presentan morfología fusiforme (Figura 11); siendo su ciclo celular de aproximadamente 14-16 hs.

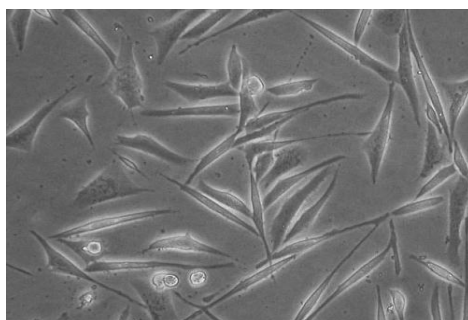


Figura 11.-Células de CHO-9 en cultivo, observadas en un microscopio invertido (60x).

Las células CHO, de vasta aplicación en investigación y desarrollo biotecnológico, han sido ampliamente utilizadas en nuestro laboratorio para realizar experimentos de mutagénesis (Folle y Obe, 1995; Folle y Obe, 1996; Folle *et al.*, 1998; Martínez-López *et al.*, 2001; Obe *et al.*, 2002).

1.3.1 Localización del daño en cromosomas de CHO-9

Los estudios previos de localización del daño en cromosomas metafásicos se han llevado a cabo utilizando diversos agentes capaces de producir aberraciones cromosómicas, denominados clastogénicos. Si las RDC no son reparadas apropiadamente, constituyen las principales lesiones capaces de producir dichas aberraciones (Obe *et al.*, 2002).

Las endonucleasas de restricción así como las radiaciones ionizantes inducen distintos tipos de aberraciones cromosómicas, según la etapa del ciclo celular en que se encuentre la célula al momento de la exposición al agente. Se producen aberraciones de tipo cromosoma cuando el agente actúa durante la fase G_1 y en el comienzo de la fase S y aberraciones de tipo cromátida cuando la exposición ocurre al final de la fase S y durante la fase G_2 del ciclo celular (Folle *et al.*, 1998).

A diferencia de las radiaciones ionizantes; como por ejemplo rayos γ , rayos X y neutrones, que teóricamente podrían producir daño a lo largo de todo el genoma, las endonucleasas de restricción inducen RDC en secuencias específicas. La enzima *A₁u₁* reconoce como sitios de corte la secuencia 5'AGCT'3, presente en los elementos SINEs de las bandas R o G-claras. Asimismo, la enzima *Bam*HI reconoce secuencias 5'GGATCC3', ubicadas en los elementos LINEs del ratón y hámster, localizados en las bandas G (G-oscuras). La DNasa I escinde el ADN preferentemente en los enlaces fosfodiéster adyacentes a un nucleótido de pirimidina, originando RSC (Folle y Obe, 1995; Folle *et al.*, 1998).

A pesar de la especificidad de corte de algunas endonucleasas, se ha descrito que la localización de los puntos de corte inducidos por *AluI*, *BamHI* o DNasa I, así como los sitios de fractura (SF) inducidos por neutrones o rayos γ , se ubican preferentemente en las bandas G-claras de los cromosomas de CHO-9, mostrando un patrón de distribución no aleatoria, tanto si el daño es inducido en la fase S como G₁ del ciclo celular. Estos hallazgos sugirieron que las regiones de cromatina que contienen genes activos son más propensas a sufrir daño (Folle y Obe, 1995; Folle y Obe, 1996; Folle *et al.*, 1998).

Uno de los parámetros asociados a la cromatina activa es la acetilación de la lisina en el extremo N-terminal de la histona H4. En cromosomas metafásicos, las regiones con histona H4 hiperacetiladas se asocian a actividad transcripcional (bandas R) mientras que las hipoacetiladas, con regiones génicas poco activas (bandas G y C). Las regiones cromosómicas de CHO-9 con hiperacetilación de la histona H4 co-localizan con los SF inducidos por agentes clastogénicos (Figura 12) (Martínez-López *et al.*, 2001).

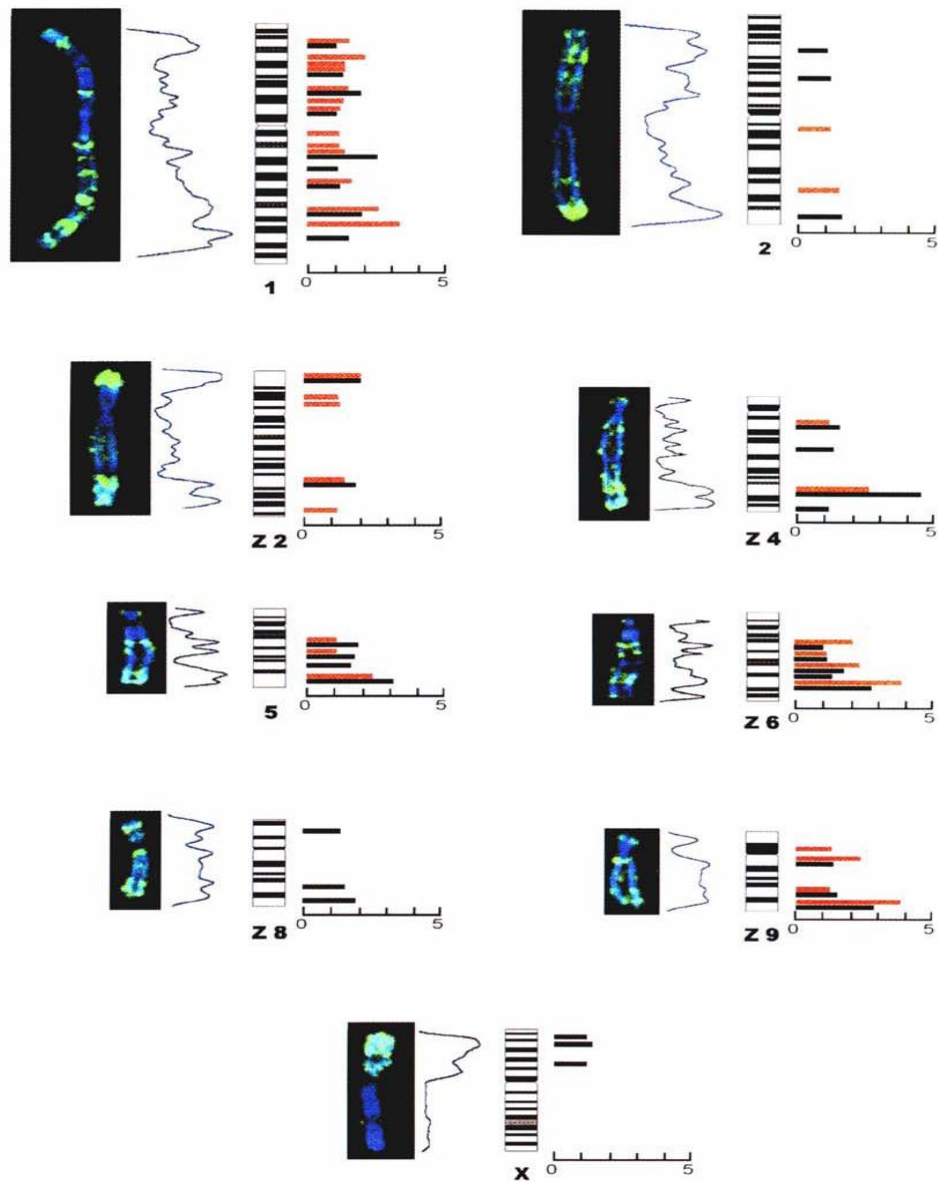


Figura 12.- Patrones de histona H4 hiperacetiladas junto con los diagramas de los cromosomas 1, 2, Z2, Z4, Z5, Z6, Z8, Z9 y X de la línea celular CHO-9 mostrando la co-localización de las regiones hiperacetiladas con los sitios de fractura. Las barras rojas corresponden a radiaciones ionizantes y las bandas negras a endonucleasas (Martínez-López *et al.*, 2001).

Estos patrones preferenciales de localización de daño en las regiones cromosómicas que contienen genes activos pueden explicarse teniendo en cuenta los cambios estructurales de la cromatina debido a su actividad transcripcional. Como se explicó anteriormente, la eucromatina presenta una conformación abierta que la hace más accesible a los distintos agentes químicos capaces de dañar al ADN o a radicales libres originados durante la acción de las radiaciones ionizantes (Folle *et al.*, 1998; Martínez-López *et al.*, 2001).

Por otra parte, los análisis de localización del daño utilizando γ -H2AX como marcador en núcleos interfásicos muestran un patrón de distribución no aleatorio, con la formación preferencial de *foci* en las regiones de euromatina del interior nuclear (Cowell *et al.*, 2007; Sadoni *et al.*, 1999).

La gran mayoría de los estudios sobre los patrones de localización del daño genético, han sido llevados a cabo en cromosomas metafásicos (análisis de aberraciones cromosómicas) o en núcleos interfásicos (inmunomarcación de γ -H2AX); sin embargo, no constan hasta el momento datos publicados sobre la localización del daño primario (RDC) en cromosomas metafásicos empleando anticuerpos anti- γ -H2AX. Por tal motivo, consideramos de interés analizar en la línea celular CHO-9 la distribución cromosómica de las regiones que presentan H2AX fosforilada, inducida por el agente radiomimético BLM, detectada inmunomarcando con anticuerpos anti- γ -H2AX, extendidos cromosómicos obtenidos mediante citocentrifugación.

1.4 Objetivos

1.4.1 General

Conocer el efecto del agente radiomimético BLM sobre la fosforilación de la variante de histona H2AX en cromosomas metafásicos de CHO-9 y relacionarlo con regiones cromosómicas transcripcionalmente activas y propensas al daño inducido por otros agentes clastogénicos.

1.4.2 Específicos

- 1-** Localizar y cuantificar γ -H2AX en ocho cromosomas metafásicos (1, 2, 5, Z1, Z2, Z3, Z4 y Z6) de CHO-9 que presentan regiones de homologías, tanto en células tratadas con bleomicina como controles.
- 2-** Comparar el número de marcas de γ -H2AX entre metafases tratadas y controles.
- 3-** Comparar el número de marcas por unidad de longitud, de diferentes cromosomas tanto tratados como controles.
- 4-** Comparar el número de marcas por unidad de longitud, en cada par de regiones homólogas tanto en metafases tratadas como en controles.
- 5-** Comparar los patrones de fosforilación de H2AX con regiones de histona H4 hiperacetilada y regiones sensibles al daño inducido por radiaciones ionizantes y endonucleasas en los cromosomas 1, 2, 5, Z2, Z4 y Z6.

1.4.3 Actividades Específicas

- 1-** Implementación de cultivos asincrónicos de la línea celular derivada de fibroblastos del ovario de hámster Chino (CHO-9).
- 2-** Tratamiento de los mismos con BLM y Colcemid durante las fases G₂ tardía o mitosis, dependiendo de la fase en que se encontrase la célula durante el tratamiento con estos agentes (30 minutos y 1 hora, respectivamente).
- 3-** Recolección de la células y obtención de extendidos cromosómicos mediante citocentrifugación.
- 4-** Detección de γ -H2AX mediante inmunomarcación con anticuerpos específicos anti- γ -H2AX.
- 5-** Captura de imágenes de metafases tratadas y controles con microscopio de epifluorescencia.
- 6-** Procesamiento y análisis de las imágenes.
- 7-** Procesamiento estadístico de los datos y elaboración de conclusiones.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cultivo celular

Se realizaron cultivos en monocapa de la línea celular CHO-9 empleando cajas de Petri de 50 mm de diámetro, con medio de cultivo HAM-F12 (PAA E15-890), suplementado con suero fetal bovino (PAA A15-151) al 10% (v/v), glutamina (2 mM) y antibióticos (200 U/mL de penicilina y 125 µg/mL de estreptomycin). La incubación se realizó en estufa a 37°C y atmósfera de CO₂ al 5%. Previamente a los tratamientos, se realizaron sub-pasajes 1:5 para obtener a las 24 horas, un crecimiento celular que cubriera aproximadamente el 80 % del sustrato.

2.2 Tratamiento con BLM

Las células fueron tratadas con 0.01 mg/mL de BLM durante 30 min a 37°C. Finalizado este tiempo, se retiró el medio de cultivo y se lavó la monocapa con PBS. El medio de cultivo se centrifugó durante 5 min a 800 rpm para recuperar las células en división e incorporarlas al cultivo. Posteriormente se agregó Colcemid (Ciba; 0.16 µg/mL), incubando el cultivo a 37°C durante 60 min. Los controles fueron procesados de igual manera, excluyendo el tratamiento con BLM.

2.3 Preparación de extendidos metafásicos

Los extendidos metafásicos se obtuvieron realizando algunas modificaciones al protocolo establecido por Jeppesen (2000). El medio de cultivo conteniendo las células metafásicas se aspiró con una pipeta Pasteur. Se centrifugó 5 min a 1200 rpm. El pellet se resuspendió en una solución hipotónica de KCl 75 mM a 37°C a una concentración final de 50.000 células/mL. Posteriormente las células fueron citocentrifugadas a 2000 rpm durante 10 min. Los extendidos obtenidos con esta técnica fueron inmediatamente fijados con paraformaldehído al 2% en PBS, durante 5 minutos. Luego se lavaron en PBS y se procedió a su inmunomarcación.

2.4 Inmunomarcación de γ -H2AX

Los preparaciones de cromosomas metafásicos fueron permeabilizadas con 0.5% Tritón X-100/PBS durante 5 min, lavadas en PBS (3x3 min) y tratadas 15 min en buffer de bloqueo (2% BSA en PBS). Posteriormente se incubaron 30 min en cámara húmeda a temperatura ambiente con el anticuerpo primario anti- γ H2AX-P-ser139 (1:500 en buffer de bloqueo) desarrollado en ratón

(Abcam). Luego de la incubación, las preparaciones fueron lavadas con PBS (3x3 min) e incubadas 30 min en cámara húmeda a temperatura ambiente con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (1:250 en buffer de bloqueo), desarrollada en conejo y conjugado a Alexa 488. Finalmente, se realizaron lavados en PBS (3x3 min) para proceder a la contra-tinción con DAPI (1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Sigma-Aldrich). Por último, las preparaciones fueron montadas con Vectashield (Vector Laboratories) y selladas con esmalte. Los extendidos inmunomarcados se conservaron a 4°C en oscuridad hasta su análisis mediante microscopía de fluorescencia. Se controló la especificidad de la marcación del anticuerpo primario anti- $\gamma\text{-H2AX}$ incubando sólo con el anticuerpo secundario (controles de marcación).

2.5 Obtención y procesamiento de imágenes cromosómicas

Las observaciones con microscopía de fluorescencia se efectuaron empleando un microscopio Axioplan II (Zeiss) del Departamento de Genética del IIBCE. Este equipo cuenta con un sistema de epifluorescencia, un objetivo de inmersión 100x (N.A. 1.30) y sistemas de filtros para la observación de FITC y DAPI. Se obtuvieron imágenes microscópicas con una cámara digital de escaneado monocromático progresivo Metasystems CV-M4+CL, empleando el programa de captura y procesamiento de imágenes ISIS de Metasystems. Las imágenes fueron procesadas y analizadas con el programa Adobe Photoshop CS.

2.6 Cuantificación y distribución de $\gamma\text{-H2AX}$ en los cromosomas metafásicos 1, Z1, 2, Z2, Z3, Z4, 5, y Z6

Se seleccionaron 25 imágenes de metafases tratadas con BLM y 25 controles, teniendo en cuenta que en las mismas fueran identificables según su tamaño relativo, posición centromérica y patrón de bandeo DAPI, los ocho cromosomas de interés (1, Z1, 2, Z2, Z3, Z4, 5 y Z6). Para analizar la inmunomarcación de $\gamma\text{-H2AX}$, los ocho cromosomas fueron recortados desde las metafases y colocados en un lienzo del programa Adobe Photoshop CS alineándolos al correspondiente ideograma representativo del bandeo G. La cuantificación de $\gamma\text{-H2AX}$ en cada región cromosómica fue realizada mediante el trazado de líneas paralelas a nivel de los límites de cada banda. Dado que la recolección de las células metafásicas fue de 90 min después de comenzado el tratamiento con el agente radiomimético (tiempo insuficiente para la recolección de células dañadas antes o durante la fase S del ciclo celular), la presencia de inmunomarcación en las dos cromátidas de un mismo cromosoma indicó la ocurrencia de dos eventos de fosforilación de $\gamma\text{-H2AX}$ independientes. Por lo tanto, para realizar el conteo se adjudicó a cada banda el valor (V_{banda}) 0, 1 o 2 ante la

ausencia, presencia en una cromátida o presencia de marcación en ambas cromátidas, respectivamente.

2.7 Análisis de la distribución de marcas de γ -H2AX por metafase

Mediante la asignación del valor V_{banda} 0, 1 o 2, según ausencia o presencia de marcación de γ -H2AX en una o ambas cromátidas, se calculó el número de marcas por banda (V_{banda}) de cada cromosoma ($V_{cromosoma} = \sum V_{banda}$) y luego se sumó el total de marcas de γ -H2AX de los 8 cromosomas en cada una de las 25 metafases control y tratadas ($V_{metafase} = \sum V_{cromosoma}$).

El gráfico correspondiente se efectuó utilizando el programa Microsoft Excel.

2.8 Elaboración de curvas de marcación de γ -H2AX por cromosoma

Las curvas de distribución de marcación de γ -H2AX por cromosoma, provenientes de metafases tratadas con BLM o controles se generaron sumando las marcas de γ -H2AX en cada banda cromosómica para el total de las metafases. Las gráficas correspondientes a cada cromosoma se realizaron utilizando el programa Microsoft Excel. Las imágenes de las curvas de daño junto a los ideogramas y regiones de homología, se elaboraron empleando el programa Adobe Photoshop CS.

2.9 Estandarización del número de marcación de γ -H2AX según longitudes relativas de los cromosomas y regiones homólogas entre los mismos

Las medidas de marcación de γ -H2AX fueron estandarizadas por unidad de longitud utilizando los valores de longitud relativa (en porcentajes) establecidos por Martínez-López *et al.* (2000) (Tabla 2). A partir de los valores de longitudes relativas de los cromosomas se elaboró un idiograma a escala, en el cual se procedió a la medición directa de las longitudes de las regiones homólogas entre cromosomas (Tabla 3 y Figura 10).

Cromosoma	Longitud relativa (%) (Martínez-López <i>et al.</i> , 2000)
1	11,3
Z1	10,7
2	9,2
Z2	7,1
Z3	6,2
Z4	5,7
Z6	4,4
5	3,8

Tabla 2.-Longitudes relativas de los ocho cromosomas analizados (Martínez-López *et al.*, 2000).

Región homóloga Cromosoma (Nº bandas-brazo)	Longitud relativa (%)
1 (10p + 21q)-Z1 (10p + 21q)	9,6
1(4p)-Z6 (4q)	0,8
2 (22p + 4q)-Z2(22p + 4q)	6,0
Z3 (8q)-Z4 (8q)	2,8
5 (4p + 12q)-Z6 (4p + 12q)	3,1

Tabla 3.- Longitudes relativas correspondientes a las regiones homólogas entre los cromosomas. Entre paréntesis, se indican las bandas que pertenecen a los brazos p o q de cada cromosoma (Figura 10).

2.10 Comparación del número de marcas de γ -H2AX entre cromosomas

El total de marcación por cromosoma ($V_{\text{cromosoma}}$) en las metafases analizadas se calculó sumando el número de marcas por bandas ($\sum V_{\text{banda}}$) de cada cromosoma, estandarizado por el porcentaje de longitud relativa (L) del cromosoma ($V_{\text{cromosoma}}/L_{\text{cromosoma}}$), sumándolo en el total de las metafases ($\sum V_{\text{cromosoma}}/L_{\text{cromosoma}}$). Se elaboraron gráficas de barras comparando el total de marcas de γ -H2AX por porcentaje de longitud relativa de cada cromosoma, para las metafases tratadas y sin tratar con BLM, utilizando el programa Microsoft Excel.

2.11 Comparación del número de marcas de γ -H2AX entre regiones cromosómicas homólogas

La comparación del número de marcas de γ -H2AX entre las regiones homólogas se efectuó realizando el mismo procedimiento empleado en la comparación entre cromosomas, sumando sólo las marcas de γ -H2AX presentes en las regiones homólogas ($\sum V_{\text{región}}/L_{\text{región}}$).

2.12 Comparación de los patrones de fosforilación de H2AX con regiones de histona H4 hiperacetilada y regiones sensibles al daño inducido por radiaciones ionizantes y endonucleasas en los cromosomas 1, 2, 5, Z2, Z4 y Z6

Las curvas de distribución de marcas de γ -H2AX de los cromosomas 1, 2, 5, Z2, Z4 y Z6, pertenecientes a las metafases tratadas con BLM se compararon con los patrones de histona H4 hiperacetilada y a su vez, de localización de fracturas cromosómicas producidos por RI y endonucleasas, obtenidos en estudios previos (Martínez-López *et al.*, 2001). La composición de imágenes se realizó empleando el programa Adobe Photoshop CS.

3. RESULTADOS

3.1 Cuantificación y distribución de marcas de γ -H2AX en los cromosomas metafásicos 1, Z1, 2, Z2, Z3, Z4, 5, y Z6 de CHO-9

La Figura 13 muestra imágenes de dos metafases provenientes de células de CHO-9 tratadas con BLM. Se puede apreciar la marcación en color verde (FITC) de las regiones cromosómicas que contienen histona H2AX fosforilada, así como la coloración diferencial del DAPI (contra-tinción), menos intensa en las regiones eucromáticas que en las heterocromáticas. Se observa que ambas metafases poseen diferente nivel de marcación de γ -H2AX.

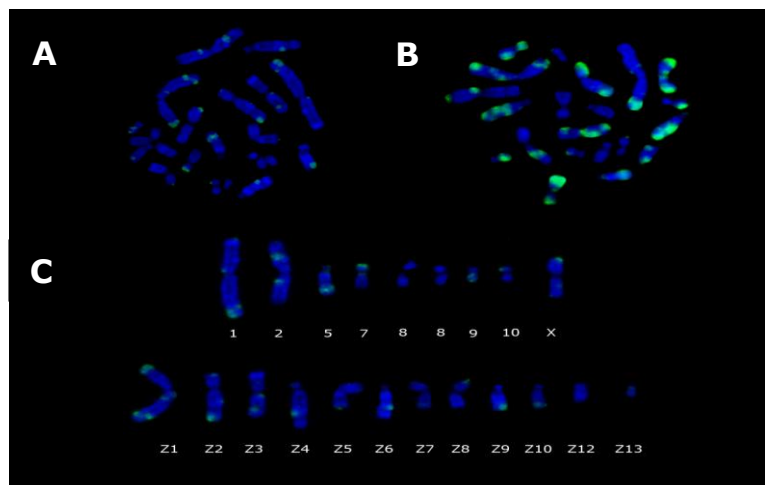


Figura 13.- Imágenes de metafases provenientes de células CHO-9 tratadas con BLM (**A y B**) y cariotipo de la metafase (A) mostrando los cromosomas originales del hámster Chino y los cromosomas originados a partir de reordenamientos denominados Z (**C**). Las regiones cromosómicas con γ -H2AX se aprecian en color verde (FITC). La contra-tinción de los cromosomas se realizó con DAPI (azul).

La Figura 14 contiene los cromosomas 1, Z1, 2, Z2, Z3, Z4, 5 y Z6 de cada una de las 25 metafases tratadas con BLM (A) y las 25 metafases no tratadas (B) incluidas en el análisis. La ubicación de los cromosomas de cada metafase, siguiendo el mismo orden (ver leyenda de la Figura 14), permite observar que todos los cromosomas de una misma metafase poseen un nivel similar de marcación de γ -H2AX el cual, sin embargo, varía entre las metafases (ver Figura 13). Por ejemplo, los cromosomas correspondientes a la primera (recuadro rojo) y última metafase (recuadro violeta) de las células tratadas con BLM (A), presentan un nivel intermedio y alto de marcación, respectivamente, mientras que los cromosomas correspondientes a la metafase número 9 presentan un nivel bajo de marcación (recuadro amarillo).

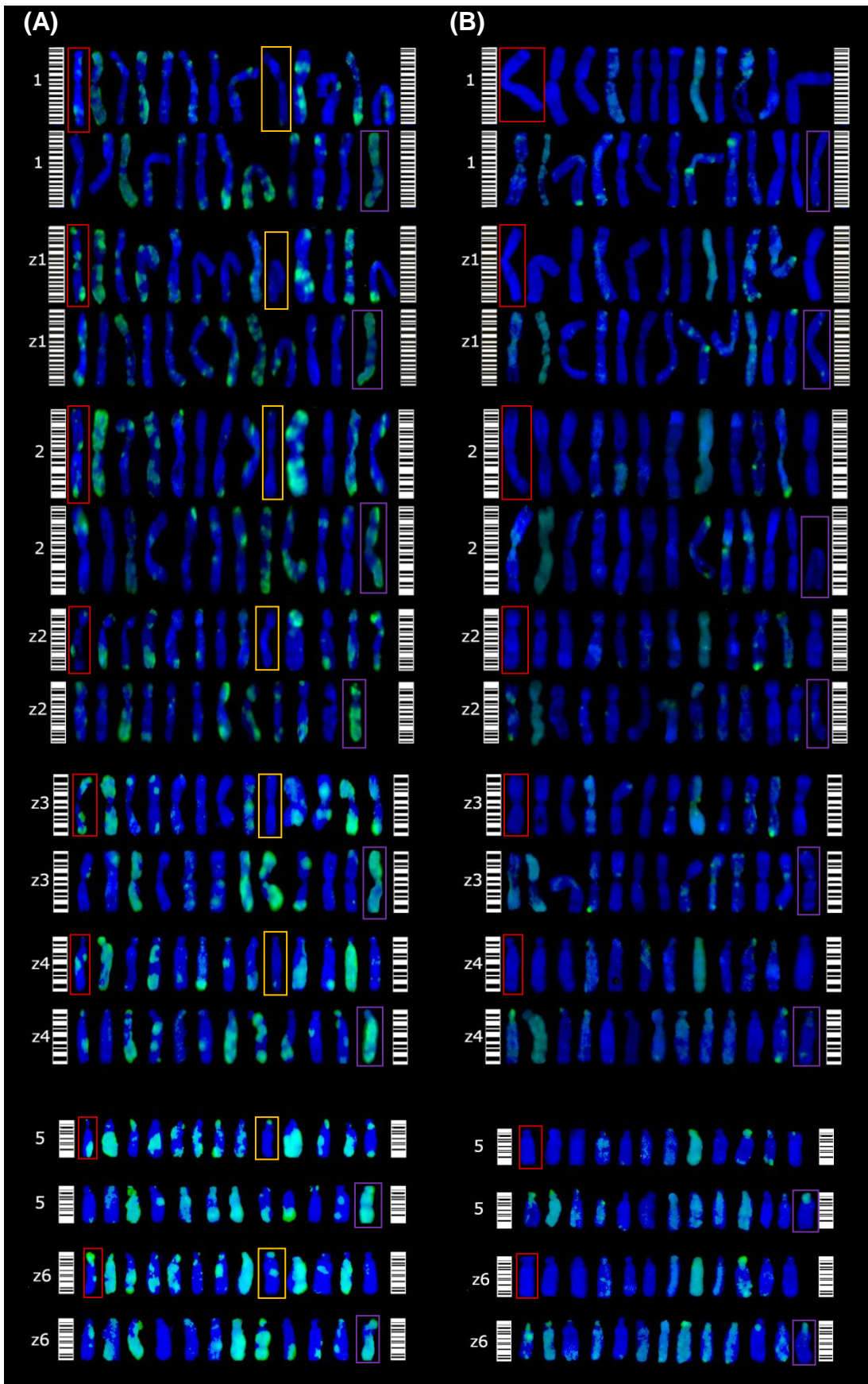


Figura 14.- Imágenes de cromosomas 1, Z1, 2, Z2, Z3, Z4, 5 y Z6 (25 de cada uno), colocados en orden descendente y alineados con su respectivo ideograma. La parte **(A)** de la Figura muestra los cromosomas pertenecientes a las 25 metafases tratadas con BLM y la **(B)** a los cromosomas de las 25 metafases sin tratamiento con BLM (controles). Los cromosomas 1, Z1, 2, Z2, Z3, Z4, 5 y Z6 pertenecientes a una misma metafase fueron colocados en la misma ubicación (de modo que los recuadrados en rojo y violeta siempre pertenecen a la primera y última metafase analizada, respectivamente), manteniéndose el orden correlativo en cada caso. En la parte **(A)** los recuadros amarillos, rojos y violetas muestran, además, cromosomas pertenecientes a metafases con un nivel bajo, intermedio y alto de marcación, respectivamente.

3.2 Distribución de marcación de γ -H2AX por metafase

La Figura 15 presenta dos gráficos de barra que muestran la distribución del número total de marcas de γ -H2AX en las 50 metafases analizadas (25 controles y 25 tratadas con BLM). Se puede observar que existe una dispersión importante del nivel de marcas cromosómicas de γ -H2AX, tanto entre las metafases de células tratadas como entre las no tratadas. Dicha dispersión es aún más notoria en las metafases de células no tratadas con BLM (controles).

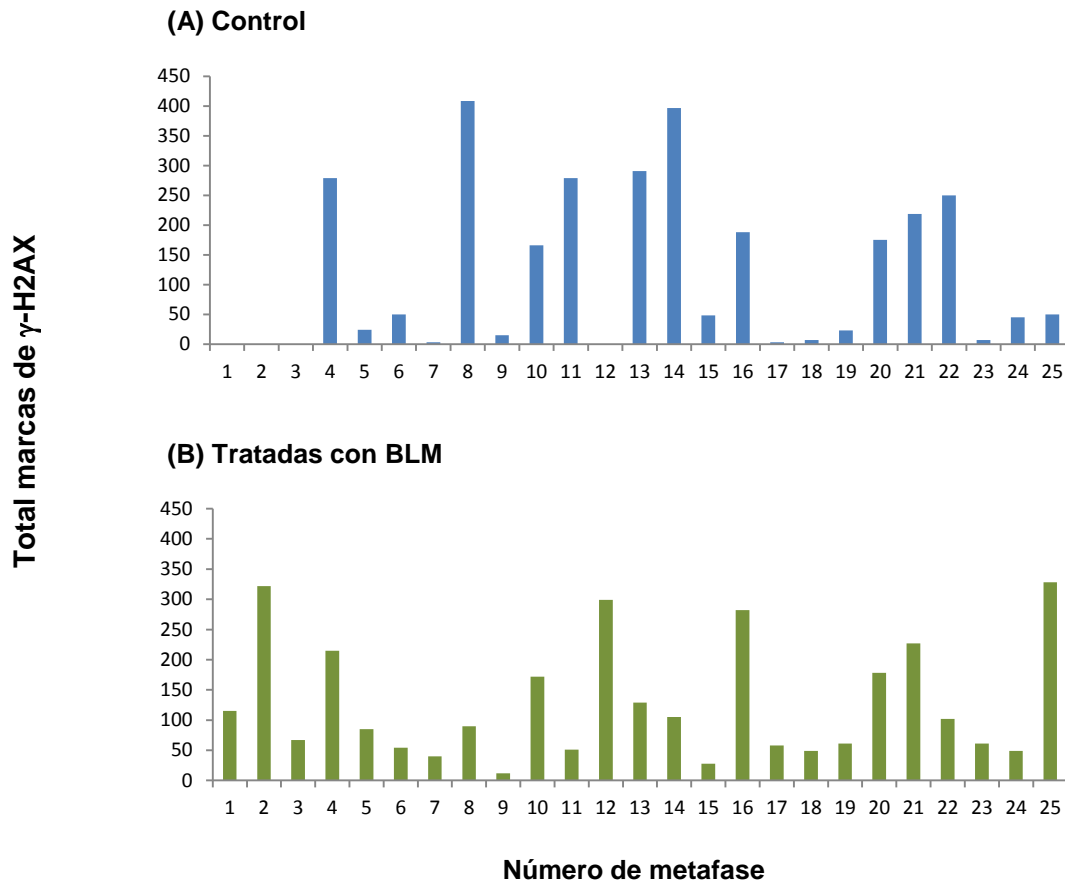


Figura 15.- Gráficos de barra que muestran la distribución del número total de marcas de γ -H2AX en las 50 metafases analizadas. **(A)** 25 metafases control y **(B)** 25 metafases provenientes de células de CHO-9 tratadas con BLM. Se observa en ambos casos, una dispersión importante del nivel de marcas cromosómicas de γ -H2AX por metafase. El número de metafase fue asignado según el orden de análisis (ver Fig. 14).

El análisis de la totalidad de marcas de γ -H2AX por metafase permitió sub-dividir, tanto a la población de 25 metafases controles como a la población de las 25 metafases tratadas, en tres sub-poblaciones según el total del número de marcas de γ -H2AX cuantificadas por metafase: bajo ($\sum V_{\text{metafase}} \leq 50$), intermedio ($51 < \sum V_{\text{metafase}} < 200$) y alto ($\sum V_{\text{metafase}} > 200$) (Tabla 4).

Total marcas de γ -H2AX	Metafases tratadas con BLM		Metafases control	
	FA	FR (%)	FA	FR (%)
$\sum V_{\text{metafase}} \leq 50$	5	20	15	60
$51 > \sum V_{\text{metafase}} < 200$	14	56	3	12
$\sum V_{\text{metafase}} > 200$	6	24	7	28

Tabla 4.- Sub-poblaciones de metafases por rango del total de marcas de γ -H2AX (primera columna). Se presentan las frecuencias absolutas (FA) y relativas (FR) del total de metafases correspondientes a cada sub-población, tanto tratadas como controles.

La Tabla 4 muestra que 60% de las metafases de células que no recibieron tratamiento con BLM presentan un total de marcas de γ -H2AX inferior o igual a 50, mientras que el 20% de metafases tratadas se encuentran dentro de este rango de marcación. Por otra parte, se puede observar que el 56% de metafases de células tratadas con BLM poseen un total de marcas de histona H2AX fosforilada en el rango comprendido entre 51 y 200 marcas, existiendo sólo un 12 % de metafases controles dentro este rango. Por último, observamos que un porcentaje similar de metafases tratadas y no tratadas (24 % y 26%, respectivamente) muestran un número elevado de marcas de γ -H2AX (>200).

El test de χ^2 con un $\alpha = 0.05$ y $\nu = 1$, demostró que la diferencia entre los valores observados de marcas de γ -H2AX inducidos por BLM con los esperados para cada sub-población de células (Tabla 5) fue significativa ($\chi^2 = 12,19$, $p \leq 0,005$).

Total marcas de γ -H2AX	Observados		Esperados		Total
	Metafases tratadas con BLM	Metafases control	Metafases tratadas con BLM	Metafases control	
$\sum V_{\text{metafase}} \leq 50$	5	15	10	10	20
$51 > \sum V_{\text{metafase}} < 200$	14	3	8,5	8,5	17
$\sum V_{\text{metafase}} > 200$	6	7	6,5	6,5	13
Total	25	25	25	25	50

Tabla 5.- Tabla del test de χ^2 ($\alpha = 0.05$ y $\nu = 1$) con los valores observados y esperados para las metafases controles y tratadas. ($\chi^2 = 12,19$, $p \leq 0,005$)

3.3 Distribución de marcas de γ -H2AX por cromosoma

La distribución del daño por cromosoma tanto en las metafases sin tratar como en las tratadas con BLM, se muestran en la Figura 16. Las curvas para cada cromosoma se exhiben a la derecha de los idiogramas con bandeado G. Las barras (de igual color) a la izquierda, representan las regiones de homología entre los cromosomas (Figura 10). Dado que la proporción de metafases con un número mayor a 200 marcas de γ -H2AX es casi idéntica entre las células tratadas y los controles y además, estas marcas posiblemente no se deban a la acción de la BLM, los datos correspondientes a esta sub-población de metafases no fueron incluidos en los análisis posteriores.

La distribución de marcas de γ -H2AX (ADN dañado) en los cromosomas de las células control es más uniforme que el producido en los cromosomas de las células tratadas, existiendo en ambos casos, una tendencia al aumento de la cantidad de marcas en los extremos cromosómicos. Esta tendencia al incremento de marcas hacia los extremos cromosómicos es más pronunciada en los cromosomas de las células tratadas con BLM que en los controles, observándose a su vez, una reducción del número de marcas a nivel centromérico, sobretodo en células tratadas. Por otra parte, en los cromosomas 1, Z3 y Z4 de las células control se observa un aumento de las marcas de γ -H2AX en las regiones centroméricas.

En cuanto a las regiones de homología, se puede observar que la distribución de las marcas de γ -H2AX es equivalente entre los cromosomas relacionados, tanto en cromosomas pertenecientes a células control, como tratadas con BLM.

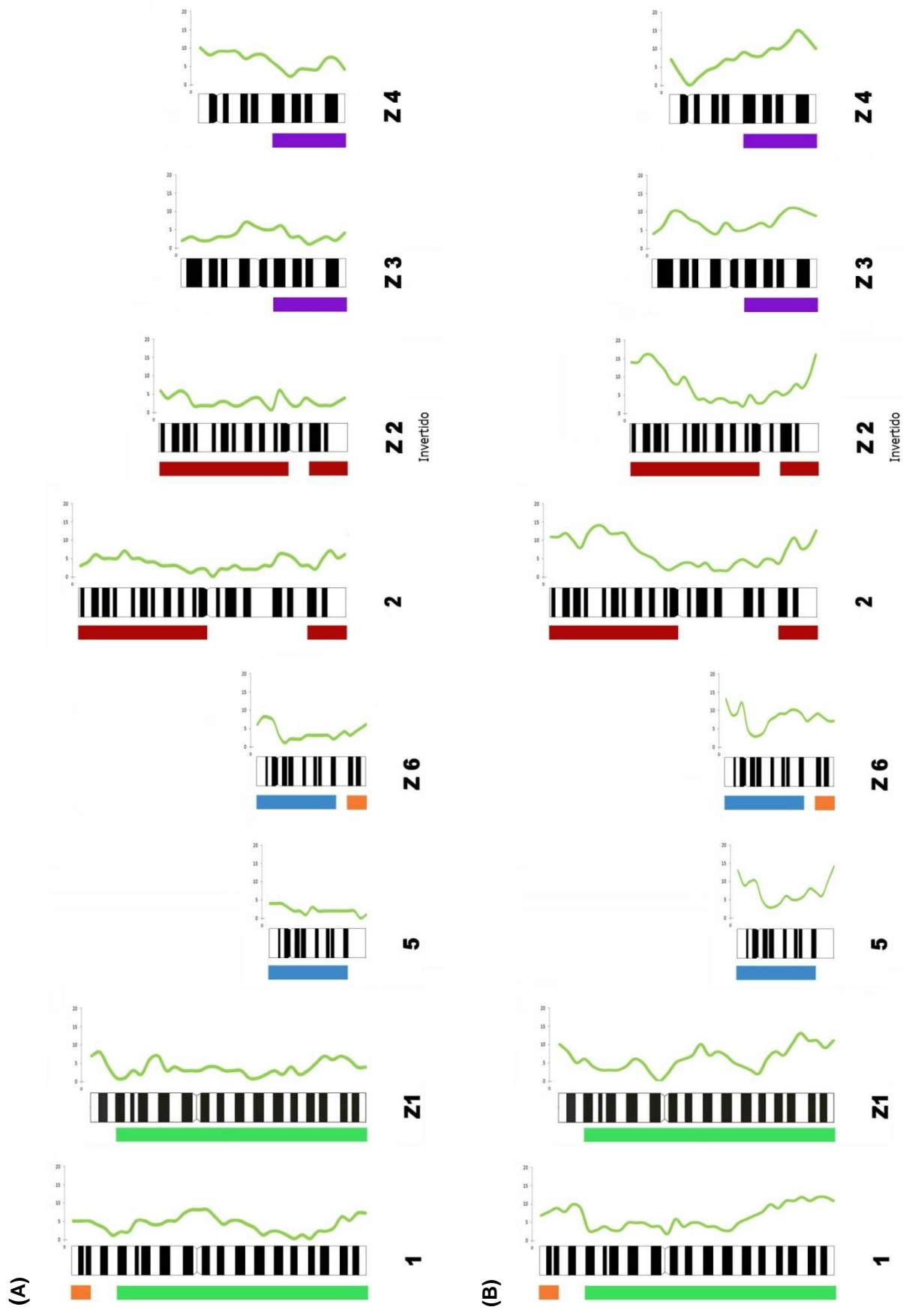


Figura 16.- (A) Curvas de daño correspondientes a los cromosomas 1, Z1, 5, Z6, 2, Z2, Z3 y Z4 de metafases de células control y (B) de metafases de células tratadas con BLM. Cada cromosoma se encuentra representado por su correspondiente ideograma de bandas G. Las barras de igual color ubicadas a la izquierda de cada ideograma indican las regiones de homología presentes entre los cromosomas.

3.4 Comparación de marcas de γ -H2AX entre cromosomas

En la Figura 17 se presenta un gráfico comparativo de daño estandarizado por unidades de longitud cromosómica para los ocho cromosomas analizados en las células control y tratadas con BLM.

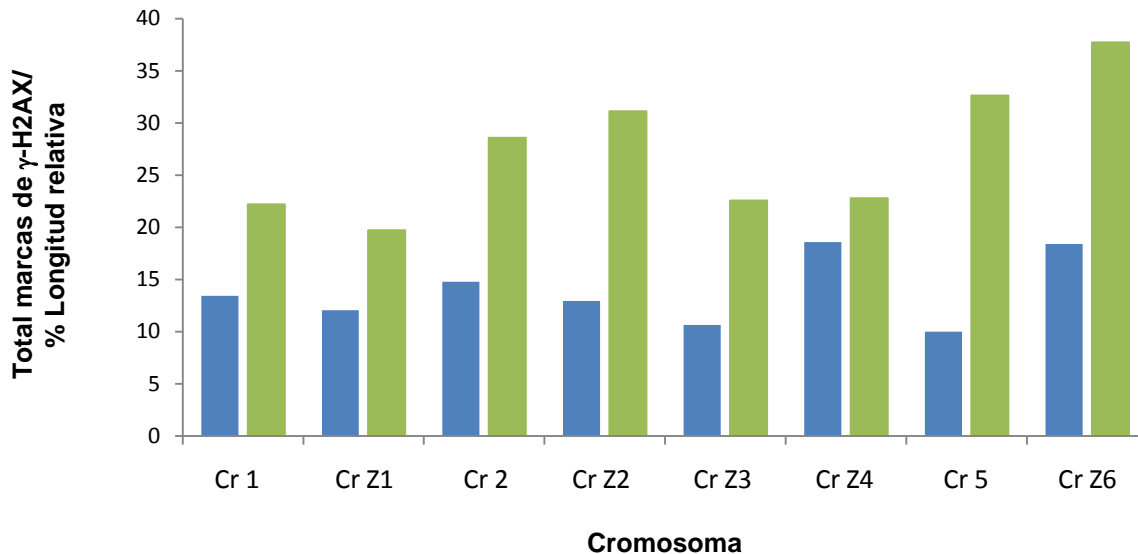


Figura 17.- Gráfico comparativo de daño por unidad de longitud para los ocho cromosomas analizados en cromosomas pertenecientes a las células control (Azul) y cromosomas de células tratadas con BLM (Verde). El daño se estimó mediante el cálculo del número de marcas de γ -H2AX originado en cada cromosoma ($V_{\text{cromosoma}} = \sum V_{\text{banda}}$) en el total de las metafases analizadas ($\sum V_{\text{cromosoma}}$), estandarizado por su porcentaje de longitud relativa del cromosoma correspondiente ($\sum V_{\text{cromosoma}}/L_{\text{cromosoma}}$).

De acuerdo a lo esperado, el número total de marcas de γ -H2AX, en los cromosomas de las células que recibieron tratamiento con BLM, fue superior al hallado en los cromosomas de células no inducidas con el agente radiomimético, lo cual sugiere el efecto de la BLM sobre la fosforilación de H2AX.

Por otra parte, se puede observar que el total de marcas de γ -H2AX varía entre los distintos cromosomas. De los cromosomas pertenecientes a las células control, los cromosomas Z4 y Z6 son los que presentan una mayor cantidad de marcas, mientras que los cromosomas 5 y Z3 son los menos marcados. En tanto que, entre los cromosomas correspondientes a las células que fueron tratadas con BLM, el número mayor de marcas de γ -H2AX corresponde a los cromosomas Z6, 5, Z2 y 2, y el menor, a los cromosomas Z1, 1, Z3 y Z4.

El cromosoma Z3 es un cromosoma con bajo número de marcas tanto en los controles como en células tratadas. Por el contrario, el cromosoma Z6 presenta un número elevado de marcas de γ -H2AX en ambas poblaciones (tratadas y controles). Por otra parte, el cromosoma 5 con baja marcación en los controles, se encuentra entre los cromosomas más marcados de las células tratadas, mientras que el cromosoma Z4 con baja marcación en las células tratadas, es uno de los cromosomas más marcados en las células control.

La Tabla 6 muestra el porcentaje de marcas de γ -H2AX estandarizados por el porcentaje de longitud relativa de cada uno de los ocho cromosomas de las células CHO-9 control y tratadas con BLM y el porcentaje de marcas que podrían deberse al efecto de la BLM

Cromosoma	$\Sigma V_{\text{cromosoma}}/L_{\text{cromosoma}}$	$\Sigma V_{\text{cromosoma}}/L_{\text{cromosoma}}$	% de incremento del número de marcas de γ -H2AX $\text{BLM-C/C} \cdot 100$
	C	BLM	
Z4	18,60	22,80	23
Z1	12,06	19,70	63
1	13,45	22,20	65
2	14,78	28,60	94
Z6	18,41	37,70	105
Z3	10,65	22,60	112
Z2	12,96	31,10	140
5	10,00	32,60	226

Tabla 6.- Total de marcas de γ -H2AX estandarizado por unidades de longitud relativa, para los ocho cromosomas de las células control (C) y tratadas con BLM. La última columna muestra en porcentajes (%) el incremento del número de marcas de γ -H2AX en los cromosomas de células tratadas con BLM con respecto a los controles, ordenado de manera ascendente. $\text{BLM-C/C} \cdot 100$ corresponde a la fórmula empleada para realizar dicho cálculo.

En la Tabla 6 se observa que el aumento del número de marcas de γ -H2AX producido por la acción de la BLM no es proporcional en todos los cromosomas. En todos los casos, se observa que el número de marcas generado por la BLM supera el observado en los controles. En la misma Tabla se presenta en porcentajes, el incremento en el número de marcas de γ -H2AX en los cromosomas de células tratadas con respecto a los controles. Este porcentaje indicaría el daño cromosómico primario inducido por BLM. El cromosoma 5 es el más afectado por la acción de este agente radiomimético, con un incremento del 226 % sobre el daño basal (aproximadamente igual al triple), mientras que el cromosoma Z4 es el menos dañado, con sólo un 23% de aumento de marcas γ -H2AX. El incremento de marcación en los cromosomas 2, Z6 y Z3 es aproximadamente igual al doble, en los cromosomas Z1 y 1, alrededor de 60% y en el cromosoma Z2 mayor al doble (140%).

3.5 Comparación de marcas de γ -H2AX entre regiones cromosómicas homólogas

De manera análoga se realizó la comparación del daño entre regiones homólogas presentes en los distintos cromosomas (Figura 18 y Tabla 7).

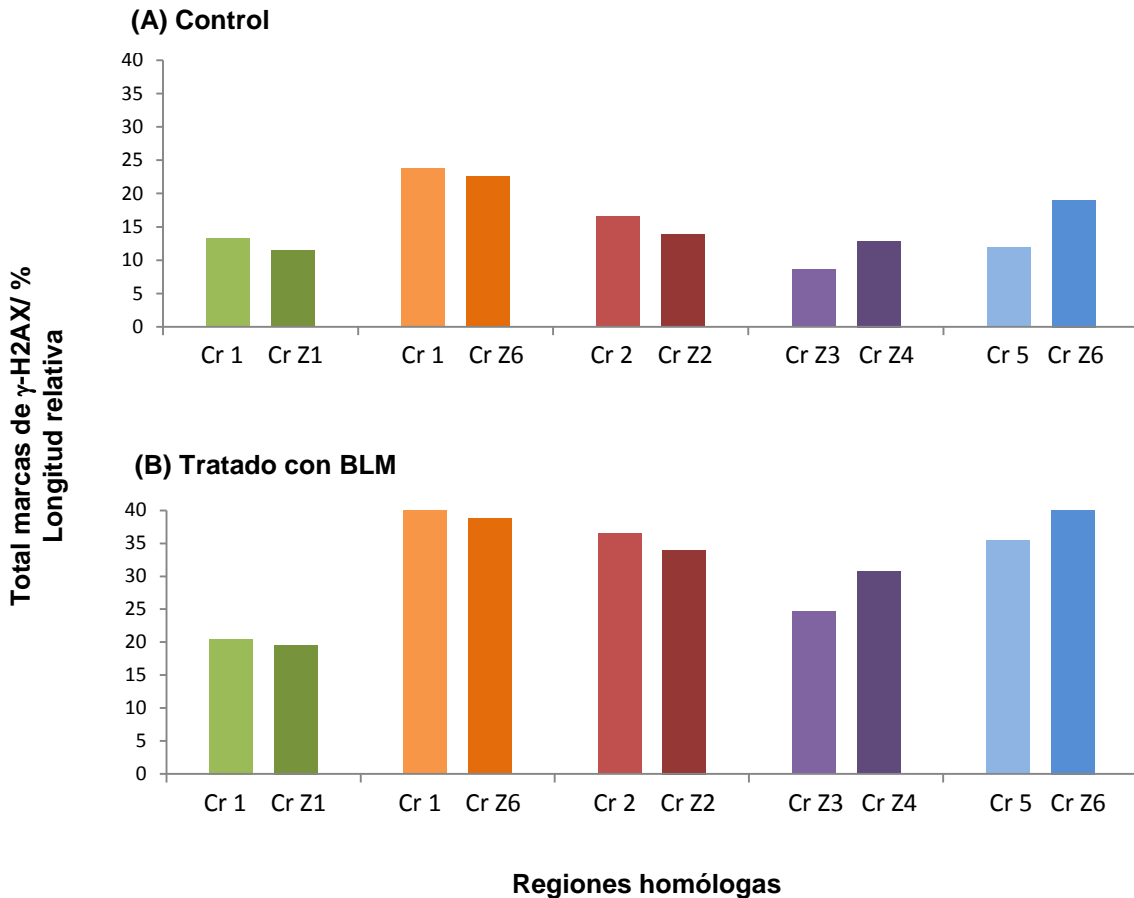


Figura 18.- Gráficos comparativos de marcas de γ -H2AX por unidad de longitud para las cinco regiones homólogas de los ocho cromosomas analizados. El daño por región se estimó dividiendo el total de marcas de γ -H2AX presentes en las regiones de homología ($V_{\text{región}} = \sum V_{\text{banda}}$) en el total de las metafases analizadas ($\sum V_{\text{región}}$) sobre el porcentaje de la longitud relativa de las correspondientes regiones ($\sum V_{\text{región}}/L_{\text{región}}$). Las barras del mismo color representan las marcas de las regiones de homología entre dos cromosomas. La distinta tonalidad de las barras de igual color diferencia las marcas de las regiones homólogas de uno y otro cromosoma. **(A)** Regiones homólogas pertenecientes a los cromosomas de las células control. **(B)** Regiones homólogas pertenecientes a los cromosomas de células tratadas con BLM.

Región homóloga Crom A – Crom B	Células control			Células tratadas con BLM		
	$\frac{\sum V_{RH \text{ Crom A}}}{L_{RH \text{ Crom A}}}$	$\frac{\sum V_{RH \text{ Crom B}}}{L_{RH \text{ Crom B}}}$	Cociente	$\frac{\sum V_{RH \text{ Crom A}}}{L_{RH \text{ Crom A}}}$	$\frac{\sum V_{RH \text{ Crom B}}}{L_{RH \text{ Crom B}}}$	Cociente
1 – Z1	13,23	11,46	1,15	20,50	19,60	1,05
1 – Z6	23,75	22,50	1,06	40,00	38,80	1,03
2 – Z2	16,50	13,83	1,19	36,50	34,00	1,07
Z4 – Z3	12,86	8,57	1,50	30,70	24,60	1,25
Z6 – 5	19,03	11,94	1,59	41,00	35,50	1,15

Tabla 7.- Comparación del total de marcas de γ -H2AX estandarizado por unidad de longitud relativa ($\frac{\sum V_{\text{región homóloga cromosoma A o B}}}{L_{\text{región homóloga cromosoma A o B}}}$) de cada región de homología tanto en la población de células control como tratadas, expresada como diferencia en el total de marcas de γ -H2AX entre las regiones de homología. Crom: cromosoma; RH: región homóloga; BLM: bleomicina.

En la Figura 18 y Tabla 7 se puede observar que, tanto en células control como tratadas, las regiones homólogas entre los cromosomas presentan un número de marcas similar. Por otra parte, se puede apreciar que el total de marcas de γ -H2AX localizadas en las regiones de homología, pertenecientes a los ocho cromosomas analizados en las células tratadas con BLM, es superior al de las regiones homólogas de los controles. En la Tabla 8 se presenta el porcentaje de incremento del número de marcas por región de homología cuando las células fueron tratadas con BLM.

Región homóloga cromosoma A - cromosoma B	% de incremento del número de marcas de γ -H2AX en región homóloga del cromosoma A (BLM-C/C*100)	% de incremento del número de marcas de γ -H2AX en región homóloga del cromosoma B (BLM-C/C*100)
1 – Z1	35,46	41,53
1 – Z6	40,63	42,01
2 – Z2	54,79	59,32
Z4 – Z3	58,11	65,16
Z6 – 5	53,59	66,37

Tabla 8.- Porcentajes (%) de incremento del número de marcas de γ -H2AX en cada una de regiones homólogas de los ocho cromosomas analizados en las células tratadas con BLM con respecto a los controles (C), ordenados de manera ascendente. El porcentaje fue calculado como se indica en la Tabla 5 pero sólo considerando la región de interés.

En la Tabla se observa además que la región homóloga entre los cromosomas 1 y Z1 es la que presenta un menor porcentaje en el incremento del número de marcas de γ -H2AX, mientras que las regiones homólogas correspondientes a los cromosomas Z4 y Z3, y a los cromosomas Z6 y 5, muestran mayor aumento del daño.

3.6 Comparación entre los patrones de distribución de marcas de γ -H2AX, histona H4 hiperacetilada y regiones sensibles al daño inducido por RI y endonucleasas en los cromosomas 1, 2, 5, Z2, Z4 y Z6

La Figura 19 muestra los patrones de fosforilación de H2AX obtenidos en el presente trabajo, junto con las regiones de histona H4 hiperacetilada y regiones sensibles al daño inducido por RI y endonucleasas en los cromosomas 1, 2, 5, Z2, Z4 y Z6, correspondientes a estudios previos de localización del daño genético.

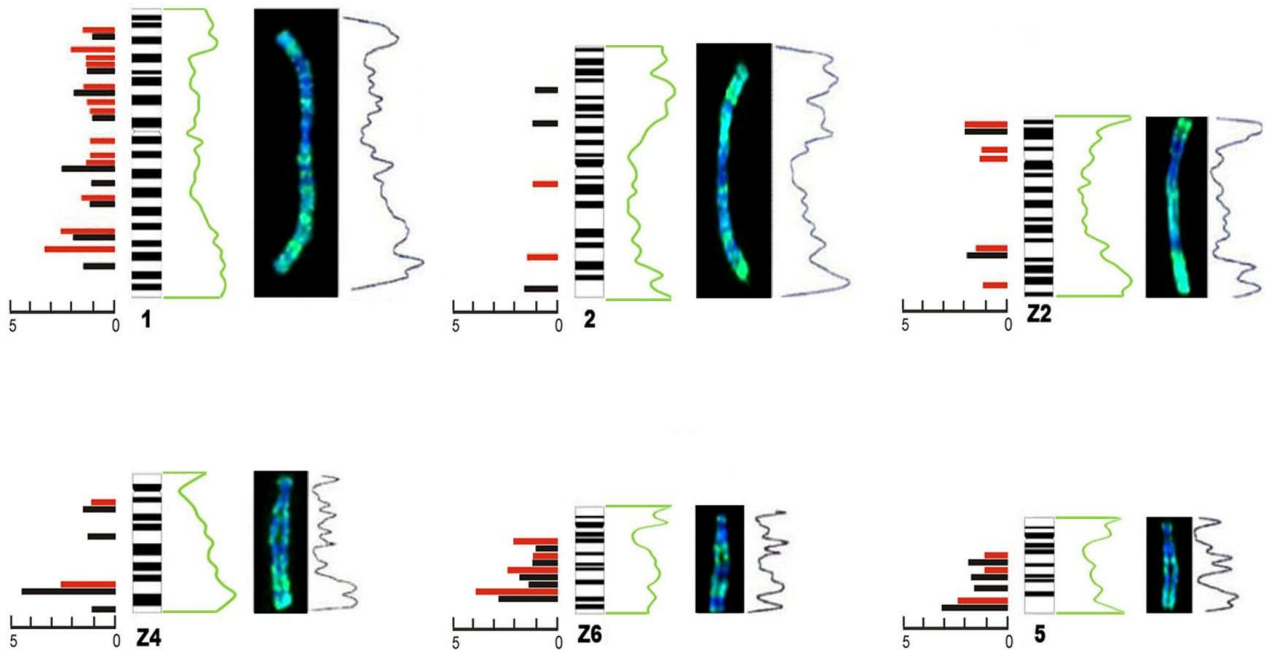


Figura 19.- Idiogramas de los cromosomas 1, 2, Z2, Z4, Z6 y 5 junto a los cuales se presentan a derecha, y en el siguiente orden: los perfiles de fosforilación de la histona H2AX (curvas verdes), imágenes de los mismos cromosomas con los patrones de H4 hiperacetilada (verde) contrateñidos con DAPI (azul) y los correspondientes perfiles de histona H4 hiperacetilada (curvas azules). A izquierda de los idiogramas se observan los sitios de fractura cromosómica inducidos por radiaciones ionizantes (barras rojas) y endonucleasas (barras negras).

Los perfiles de γ -H2AX muestran una elevada correspondencia con los perfiles de histona H4 hiperacetilada. En ambos casos se observa un incremento de las marcas en las regiones teloméricas y subteloméricas en todos los cromosomas analizados, con una marcada disminución en las regiones centroméricas o en la región pericentromérica (cromosomas Z6 y 5). Por otra parte, los sitios de fractura cromosómica inducidos por RI y endonucleasas co-localizan con regiones cromosómicas que contienen a la histona H2AX fosforilada y H4 hiperacetilada.

4. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se cuantificó y analizó la distribución de la histona H2AX fosforilada (γ -H2AX), como marcador de RDC, en ocho cromosomas metafásicos de la línea celular CHO-9 (cromosomas 1, Z1, 2, Z2, Z3, Z4, 5 y Z6) entre los cuales existen cinco regiones de homología (Figura 16).

Para dar cumplimiento a los objetivos planteados se logró, mediante citocentrifugación, obtener extendidos metafásicos tanto de controles como de células tratadas con BLM, conteniendo cromosomas de CHO-9 identificables (Figura 13). La aplicación sobre los extendidos metafásicos de la técnica de inmunomarcación indirecta, empleando anticuerpos anti- γ -H2AX y anticuerpos secundarios marcados con FITC, permitió la identificación y localización de regiones cromosómicas marcadas debido a la presencia de γ -H2AX.

El tiempo de tratamiento con BLM (30 min) y el período posterior de exposición al Colcemid (60 min) determinaron que las células metafásicas obtenidas fueran dañadas durante las fases G₂ o M del ciclo celular. Por ser ambas etapas post-replicativas, los cromosomas se encontraban duplicados y por tanto presentaban dos cromátidas. Este hecho permitió visualizar en cada región cromosómica marcada la presencia de eventos de fosforilación de H2AX independientes, ocurridos en una o en ambas cromátidas.

Se pudo observar que, en la mayoría de los cromosomas de las metafases analizadas, las regiones que contenían γ -H2AX eran extensas (Figura 14), lo que podría explicarse por una combinación de factores: el tamaño de los *foci* (Costes *et al.*, 2010; Kinner *et al.*, 2008; Bewersdorf *et al.*, 2006) y la aproximación de varios *foci* constituyendo una región marcada debido a la compactación de la cromatina.

4.1 Distribución de marcas de γ -H2AX por metafase

La cuantificación del total de marcas de γ -H2AX por metafase (Tabla 4), demostró que en las células tratadas con BLM el número de marcas fue superior al hallado en los controles, indicando el efecto de la BLM sobre la inducción de la fosforilación de H2AX. A su vez, la presencia de marcas de γ -H2AX en los controles, indicaría la existencia de eventos de fosforilación independientes al daño en la formación de γ -H2AX.

Por otra parte, la aplicación del test de χ^2 en el análisis del número total de marcas de γ -H2AX por metafase, permitió describir la presencia de tres sub-poblaciones celulares diferentes (Tabla 5; $\chi^2 = 12,19$; $p \leq 0,005$), con niveles bajos ($\sum V_{\text{metafase}} \leq 50$), intermedios ($51 > \sum V_{\text{metafase}} < 200$) y altos ($\sum V_{\text{metafase}} > 200$) de marcación (Tabla 4) a saber:

- 1) Una sub-población con un reducido número de marcas de γ -H2AX que predomina entre las células no tratadas con BLM (60%).
- 2) Una sub-población de células, con un nivel intermedio de marcas que está compuesta por un 56% de células tratadas con BLM y sólo un 12% de células control. Como observamos una gran mayoría de células tratadas con este nivel de marcación, esta sub-población permite discriminar la formación de γ -H2AX inducidas por la acción de la BLM.
- 3) Una sub-población de células con nivel alto de marcación de γ -H2AX que presentó un porcentaje similar de metafases pertenecientes a células tratadas y no tratadas (24 % y 26%, respectivamente).

Estos hallazgos, resultan especialmente interesantes ya que se observa un número de marcas de γ -H2AX inferior a 50 que predomina entre las células control, existiendo además un porcentaje de éstas con un número de γ -H2AX mayor a 200, que es similar al presente en las células tratadas con BLM. Por tanto, pensamos que nos hallamos ante sub-poblaciones celulares diferentes. Una sub-población de células que posee un número de marcas de γ -H2AX que podríamos llamar basal (ya que predomina entre las células no tratadas con BLM), una sub-población de células tratadas y no tratadas con un número alto (>200) de marcas de γ -H2AX, (independiente de la acción de la BLM) y una sub-población con número de marcas entre 51 y 200, que sería la población de células que permite discriminar la acción de la BLM en la inducción de marcas de γ -H2AX debidas al daño en el ADN.

La presencia de fosforilación de H2AX en células no tratadas con BLM y la existencia de un nivel de marcas muy elevado observado, tanto en controles como en células tratadas con BLM constituye un hallazgo difícil de interpretar. Si bien se ha descrito en metafase, la fosforilación de la histona H2AX independiente del daño inducido en el ADN (McManus y Hendzel, 2005; Ichijima *et al.*, 2005), no se halló en la literatura científica información sobre factores que pudieran explicar dicho fenómeno.

Es posible considerar la inducción de un daño originado por procesos intracelulares como por ejemplo productos del metabolismo de las células. En este sentido, se conoce la producción de especies reactivas del oxígeno (radicales libres) con capacidad de dañar el ADN (Richter *et al.*, 1988; Halliwell y Aruoma, 1991; Valko *et al.*, 2004). Por otra parte, la manipulación de las células durante el proceso experimental podría haber originado estrés celular, incrementando la producción de radicales libres o incluso la inducción de lesiones en el ADN.

A su vez, dada la presencia de una sub-población celular con un nivel similar y alto de marcas de γ -H2AX en metafases tratadas y controles, es posible que en ambos grupos haya ocurrido algún fenómeno (que operaría durante la mitosis o con anterioridad a la misma) que pudiera explicar la fosforilación de γ -H2AX por un mecanismo diferente a los mencionados anteriormente.

Como este hecho se observó sólo en una sub-población de células, no debe descartarse una posible influencia de la etapa del ciclo celular al momento de realizar los tratamientos con BLM (30 min) y/o Colcemid (60 min). El Colcemid es un agente aneugénico, ampliamente utilizado en los cultivos celulares para obtener preparaciones cromosómicas. Este compuesto impide la polimerización del huso mitótico y por tanto, obstaculiza la segregación de los cromosomas, bloqueando a las células en metafase.

Al inicio del tratamiento de los cultivos con Colcemid ciertas células (tanto de los cultivos tratados como no tratados con BLM) se encontraban en fase G₂ y otras, en alguna de las etapas de la división celular. Durante el transcurso de la hora de exposición al Colcemid, las células continuaron ciclando, bloqueándose su ciclo celular al llegar a metafase.

Por tanto, el tiempo de permanencia de las células en metafase fue diferente, dependiendo de la etapa del ciclo celular al comienzo de la exposición al Colcemid. Las células que se hallaban en fase G₂ al inicio de la exposición al agente permanecieron menos tiempo bloqueadas en metafase, mientras que las células expuestas en etapas próximas a la metafase permanecieron bloqueadas en este estadio durante un tiempo mayor.

Durante este tiempo de permanencia en metafase, es posible que la fosforilación de la histona H2AX surja como respuesta a una prolongada permanencia en esta etapa, ya sea debido a estrés celular o por un fenómeno ligado a la división celular (McManus y Hendzel, 2005; Ichijima *et al.*, 2005) que cuenta con mayor tiempo para su expresión.

Al analizar el nivel de marcas por metafase, se observó también que las diferentes metafases presentaban una importante dispersión en los niveles de marcación de γ -H2AX. Sin embargo, todos los cromosomas pertenecientes a una misma metafase mostraron un nivel de marcación de γ -H2AX similar (Figura 14). Esta sobre-dispersión podría ser ocasionada por variaciones fisiológicas entre las células, afectando eventualmente la absorción de algunos componentes del medio (Folle *et al.*, 1990), como por ejemplo el agente genotóxico BLM incorporada a los cultivos. A su vez, no es posible descartar la disponibilidad no homogénea de la BLM en el entorno de las células en cultivo. No obstante, como este fenómeno se observó también en células control, podría indicar la participación de algunos de los eventos de fosforilación de H2AX independientes a la acción de la BLM mencionados anteriormente.

4.2 Distribución intracromosómica de marcas de γ -H2AX y comparación con regiones de histona H4 hiperacetilada y regiones sensibles al daño inducido por RI y endonucleasas

El análisis de la distribución de marcas a lo largo de los cromosomas (curvas de Figura 16) permitió describir una localización preferencial de γ -H2AX en regiones teloméricas y subteloméricas de los mismos, así como una marcada disminución de las marcas hacia las regiones centroméricas. Esta tendencia al incremento de marcas hacia los extremos cromosómicos fue más pronunciada en los cromosomas de las células tratadas con BLM que en los controles, observándose a su vez, una reducción del número de marcas a nivel centromérico, sobretodo en células tratadas. Por otra parte, en los cromosomas 1, Z3 y Z4 de las células control se observa un aumento de las marcas de γ -H2AX en las regiones centroméricas.

La Figura 19 muestra que la distribución cromosómica de γ -H2AX sigue un patrón similar a la distribución de H4 hiperacetilada, observándose además una coincidencia entre las regiones hiperacetiladas, las marcadas con γ -H2AX y las descritas con una mayor frecuencia de lesiones inducidas por RI y endonucleasas (Folle y Obe, 1995; Folle y Obe, 1996; Folle *et al.*, 1998; Martínez-López *et al.*, 2001).

La localización cromosómica de repetidos teloméricos mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) empleando sondas específicas aplicadas sobre extendidos demostró que las mismas no se hallan a nivel de los extremos teloméricos de los cromosomas de CHO cromosómicos (Balajee *et al.*, 1994; Bolzán *et al.*, 2001; Vidal Bravo *et al.*, 2011). Estos autores han descrito que las secuencias repetidas teloméricas se localizan preferentemente en las regiones pericentroméricas e

intersticiales de los brazos cromosómicos. Si bien se ha postulado que las secuencias teloméricas terminales o intersticiales (ITSs: *Interstitial Telomeric Sequences*) serían sitios propensos al daño genético, en nuestro estudio las regiones cromosómicas con mayor número de marcas de γ -H2AX no colocalizan con los repetidos teloméricos de CHO-9.

4.3 Distribución intercromosómica de marcas de γ -H2AX y comparación con regiones sensibles al daño inducido por RI y endonucleasas

El análisis de las marcas de γ -H2AX normalizada por la longitud relativa del cromosoma (Tabla 6 y Figura 17) muestra que los cromosomas Z6, 5, Z2 y 2 de células tratadas con BLM son los que presentan mayores niveles de γ -H2AX y los cromosomas Z1, 1, Z3 y Z4 aquellos que poseen menores niveles de marcación. Estos resultados concuerdan con los datos sobre la distribución intercromosómica del daño inducido por RI y endonucleasas en CHO obtenidos en estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Folle y Obe, 1995; Folle y Obe, 1996; Folle *et al.*, 1998; Martínez-López *et al.*, 2001). Esta distribución intercromosómica no homogénea de las marcas de γ -H2AX, que coincide con la distribución del daño inducido, podría explicarse por la presencia de una diferente susceptibilidad cromosómica a los agentes clastogénicos (RI, endonucleasas y BLM).

Sin embargo, no es posible descartar la existencia de una fosforilación diferencial de la H2AX en los cromosomas de CHO-9 vinculada a la particular composición y estructura de las regiones de cromatina de los mismos. Ha sido descrito que las regiones cromosómicas heterocromáticas (más compactas que las constituidas por eucromatina) serían menos sensibles a la fosforilación de la H2AX, ya sea, por obstaculizar el acceso de las enzimas responsables de la fosforilación de esta variante de histona o por la presencia de un menor número de moléculas de H2AX en la heterocromatina (Cowell *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007).

Por otra parte, el análisis del incremento en el número de marcas de γ -H2AX por cromosoma de las células tratadas con BLM con respecto a los controles, permitió discriminar la acción de este agente sobre la fosforilación de la H2AX independientemente de los posibles factores intercurrentes mencionados anteriormente. Se observó que el aumento de marcas debido a la acción de la BLM no fue proporcional en todos los cromosomas (Tabla 6). Estos hallazgos concuerdan con las observaciones de Martínez-López *et al.* (2000), quienes describieron en los cromosomas de CHO la presencia de una susceptibilidad diferencial a la radiación gamma.

A su vez, como se observó también una distribución inter cromosómica no homogénea de marcas de H2AX en células que no recibieron tratamiento con BLM es posible considerar la existencia de una diferente susceptibilidad de los cromosomas ante la presencia de eventos intracelulares capaces de inducir daño en el ADN como los descritos anteriormente (radicales libres, manipulación experimental de los cultivos).

Sin embargo, se pudieron apreciar algunas discrepancias, por ejemplo, el cromosoma 5 con baja marcación en los controles, presentó un elevado número de marcas en las células tratadas, y el cromosoma Z4 con baja marcación en las células tratadas, es un cromosoma muy marcado en las células control. Esto podría ser debido a una diferente sensibilidad de los cromosomas al tipo de daño inducido (bleomicina o por ejemplo, radicales libres en los cultivos control).

4.4 Distribución de marcas de γ -H2AX entre regiones cromosómicas homólogas

El estudio de la distribución de marcas de γ -H2AX entre las regiones cromosómicas homólogas en células control y tratadas con BLM (Figuras 18 y Tabla 7), mostró que las mismas tienen un comportamiento similar, tanto en la distribución como en los niveles de marcación, que es independiente a su ubicación en el cromosoma. Estos hallazgos indicarían la ausencia de un efecto de posición intragenómica en la formación de lesiones en el ADN.

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que:

- 1- El análisis de marcas totales de γ -H2AX por metafase (test de χ^2) demostró tres sub-poblaciones diferentes de metafases: (a) ≤ 50 marcas (predominante en los controles), (b) entre 51 y 200 marcas (predominante en las metafases de células tratadas con BLM) y (c) >200 marcas (con proporciones similares en células tratadas y controles).
- 2- La presencia de fosforilación de H2AX en células no tratadas con BLM (≤ 50 marcas) y la existencia de un porcentaje similar de metafases con altos niveles de marcación de γ -H2AX (>200 marcas) tanto en ausencia como en presencia de BLM, sugiere un rol adicional aún no conocido de la γ -H2AX durante la mitosis.
- 3- La sub-población con un nivel intermedio de marcación (entre 51 y 200), permitió discriminar el efecto de la BLM sobre la formación de γ -H2AX.
- 4- El incremento en el número de marcas debido al efecto de la BLM no fue proporcional en todos los cromosomas. Sin embargo, las regiones de homología entre los ocho cromosomas estudiados presentaron un número de marcas de γ -H2AX similar, indicando la ausencia de un efecto de posición de estas regiones.
- 5- Se observó una tendencia a la disminución de marcas de γ -H2AX a nivel centromérico y una localización predominante de las mismas en las regiones teloméricas y subteloméricas. La tendencia al incremento de marcas hacia los extremos cromosómicos fue más pronunciada en las células tratadas que en los controles. Esta distribución cromosómica se encuentra en concordancia con los datos obtenidos previamente que señalaban a estas regiones sensibles al daño inducido por radiaciones ionizantes y endonucleasas (Folle y Obe, 1995; Folle y Obe, 1996; Folle *et al.*, 1998; Martínez-López *et al.*, 2001).
- 6- La distribución cromosómica de la γ -H2AX muestra además un patrón similar a la distribución cromosómica de la histona H4 hiperacetilada obtenida previamente en nuestro laboratorio (Martínez-López *et al.*, 2001), sugiriendo que las regiones transcripcionalmente activas presentan mayor marcación de γ -H2AX y se localizan en regiones sensibles al daño.

6. BIBLIOGRAFIA

- An J, Huang YC, Xu QZ, Zhou LJ, Shang ZF, Huang B, Wang Y, Liu, XD, Wu DC, Zhou PK (2010) DNA-PKcs plays a dominant role in the regulation of H2AX phosphorylation in response to DNA damage and cell cycle progression. *BMC Molecular Biology* 11: 18.
- Ayoub N, Jeyasekharan AD, Bernal JA, Venkitaraman AR (2009) Paving the way for H2AX phosphorylation Chromatin changes in the DNA damage response. *Cell Cycle* 8 (10): 1494-1500.
- Balajee AS, Oh HJ, Natarajan AT (1994) Analysis of restriction enzyme-induced chromosome aberrations in the interstitial telomeric repeat sequences of CHO and CHE cells by FISH. *Mutat Res* 307: 307-313.
- Belmont AS (2002) Mitotic chromosome scaffold structure: new approaches to an old controversy. *PNAS* 99 (25): 15855-15857.
- Bewersdorf J, Bennett BR, Knight KL (2006) H2AX chromatin structures and their response to DNA damage revealed by 4Pi microscopy. *PNAS* 103 (48): 18137-18142.
- Bolzán AD, Páez, GL, Bianchi MS (2001) FISH analysis of telomeric repeat sequences and their involvement in chromosomal aberrations induced by radiomimetic compounds in hamster cells. *Mutat Res* 479: 187-196.
- Chowdhury D, Keogh MC, Ishii H, Peterson CL, Buratowski S, Liberman J (2005) γ -H2AX Dephosphorylation by Protein Phosphatase 2A Facilitates DNA Double-Strand Break Repair. *Molecular Cell* 20: 801-809.
- Costes SV, Chiolo I, Pluth JM, Barcellos-Hoff MH, Jakob B (2010) Spatiotemporal characterization of ionizing radiation induced DNA damage foci and their relation to chromatin organization. *Mutat Res* 704: 78-87.
- Cowell IG, Sunter, NJ, Singh PB, Austin CA, Durkacz BW, Tilby, MJ (2007) γ -H2AX Foci Form Preferentially in Euchromatin after Ionising-Radiation. *PLoS ONE* 10: 1-8.
- Deaven LL, Petersen DF (1973) The chromosomes of CHO, an aneuploid Chinese hamster cell line: G-band, C-band, and autoradiographic analyses. *Chromosoma* 41(2): 129-144.
- Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A (2004) H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair* 3: 959-967.

- Folle GA, Johannes C, Obe G (1990) Induction of chromosomal aberrations by DNase I. *Int J Radiat Biol* 59 (6): 1371-1378.
- Folle GA, Martínez-López W, Boccardo E, Obe G (1998) Localization of chromosome breakpoints: implication of the chromatin structure and nuclear architecture. *Mutat Res* 404: 17-26.
- Folle GA, Obe G (1995) Localization of chromosome breakpoints induced by *AluI* and *BamHI* in Chinese hamster ovary cells treated in the G₁ phase of the cell cycle. *Int J Radiat Biol* 68 (4): 437-445.
- Folle GA, Obe G (1996) Intrachromosomal localization of breakpoints induced by the restriction endonucleases *AluI* and *BamHI* in Chinese hamster ovary cells treated in S phase of the cell cycle. *Int J Radiat Biol* 69 (4): 447-457.
- Forand A, Dutrillaux B, Bernardino-Sgherri (2004) γ -H2AX Expression Pattern in Non-Irradiated Neonatal Mouse Germ Cell and after Low-Dose γ -Radiation: Relationships Between Chromatid Breaks and DNA Double-Strand breaks. *Biol Reprod* 71: 643-649.
- Goedecke W (2007) Double strand break repair mechanisms in mammalian cells. *Chromosomal Alterations: Methods, results and importance in human health.* (Obe G, Vijayalaxmi, Eds.) Springer-Heidelberg-Germany, 55-65.
- Halliwell B, Aruoma OI (1991) DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters* 281(1-2): 9-19.
- Hanasoge S, Ljungman M (2007) H2AX phosphorylation after UV irradiation is triggered by DNA repair intermediates and is mediated by ATR kinase. *Carcinogenesis* 28 (11): 2298-2304.
- Heitz ED (1928) Heterochromatin der Moose. *Jahrb Wiss Botanik* 69:762–818.
- Holmquist GP (1992) Review Article: Chromosome bands, their chromatin flavor, and their functional features. *Am J Hum Genet* 51:17-37.
- Holmquist GP, Ashley T (2006) Chromosome organization and chromatin modification: influence on genome function and evolution. *Cytogenet Genome Res* 114 (2): 96-125.
- Ichijima Y, Sakasai R, Okita N, Asahina K, Mizutani S, Teraoka H (2005) Phosphorylation of histone H2AX at M phase in human cells without DNA damage response. *Biochem Biophys Res Comm* 336: 807-812.

- Iliakis G, Wu W, Wang M, Terzoudi GI, Pantelias GE (2007) Backup pathways of nonhomologous end joining may have a dominant role in the formation of chromosome aberrations. *Chromosomal Alterations: Methods, results and importance in human health* (Obe G, Vijayalaxmi, Eds.), Springer-Heidelberg, pp. 67-85.
- Jackson SP, Bartek J (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461 (7267): 1071–1078.
- Jeppesen P (2000) Immunofluorescence in cytogenetic analysis: method and applications. *Genet Mol Biol* 23 (4): 1107-1114.
- Kao F, Puck TT (1969) Genetics of somatic mammalian cells. IX. Quantitation of mutagenesis by physical and chemical agents. *J Cell Physiol* 74: 245-257.
- Kapuscinski J (1995) DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech Histochem* 70 (5): 220-33.
- Kato TA, Okayasu R, Bedford JS (2008) Comparison of the induction and disappearance of DNA double strand breaks and γ -H2AX foci after irradiation of chromosomes in G₁-phase or in condensed metaphase cells. *Mutat Res* 639: 108-112.
- Kim JA, Kruhlak M, Dotiwala F, Nussenzweig A, Haber J E (2007) Heterochromatin is refractory to γ -H2AX modification in yeast and mammals. *J Cell Biol* 178 (29): 209-218.
- Kimura H, Takizawa N, Allemand E, Hori T, Iborra FJ, Nozaki N, Muraki M, Hagiwara M, Kreiner AR, Fukagawa T, Okawa K (2006) A novel histone exchange factor, protein phosphatase 2C γ , mediates the exchange and dephosphorylation of H2A-H2B. *J Cell Biol* 175 (3): 389-400.
- Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G (2008) γ -H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res* 36 (17) 5678-5694.
- Kobayashi J (2004) Molecular Mechanism of the Recruitment of NBS1/hMRE11/hRAD50 Complex to DNA Double-strand Breaks: NBS1 Binds to γ -H2AX through FHA/BRCT Domain. *Radiat Res* 45: 473-478.
- Kobayashi J, Iwabuchi K, Miyagawa K, Sonoda E, Suzuki K, Takata M, Tauchi H (2008) Current Topic in DNA Double-strand Breaks Repair. *Radiat Res* 49: 93-103.
- Mariño-Ramírez L, Kann MG, Shoemaker BA, Landsman D (2005) Histone structure and nucleosome stability. *Expert Rev Proteomics* 2(5): 719-729.

- Martínez-López W, Folle GA, Obe G, Jeppesen P (2001) Chromosome regions enriched in hyperacetylated histone H4 are preferred sites for endonuclease- and radiation- induced breakpoints. *Chromosome Res* 9: 69-75.
- Martínez-López W, Porro V, Folle GA, Mendez-Acuña L, Savage JRK, Obe G (2000) Interchromosomal distribution of gamma ray-induced chromatid aberrations in Chinese hamster ovary cells. *Genet Mol Biol* 23 (4): 1071-1076.
- Mc Manus KJ, Hendzel MJ (2005) ATM-dependent DNA Damage-independent Mitotic Phosphorylation of H2AX in Normally Growing Mammalian Cells. *Mol Biol Cell* 16: 5013–5025.
- Obe G, Pfeiffer P, Savage JRK, Johannes C, Goedecke W, Jeppesen P, Natarajan AT, Martínez-López W, Folle GA, Drets ME (2002) Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutat Res* 504: 17-36.
- Paques F, Haber JE (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 63 (2): 349-404.
- Passarge E (2001) Color Atlas of Genetics 2nd edition. *Thieme Stuttgart*.
- Pienta KJ, Coffey DS (1984) A structural analysis of the role of the nuclear matrix and DNA loops in the organization of the nucleus and chromosome. *J Cell Sci Suppl* 1: 123-135.
- Polo SE, Jackson SP (2011) Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes Dev* 25: 409–433.
- Puck TT, Cieciura SJ, Robinson A (1958) Genetics of somatic mammalian cells. III. Long term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med* 108: 954-956.
- Pusarla RH, Bhargava P (2005) Histones in functional diversification Core histone variants. *FEBS Journal* 272: 5149–5168.
- Richter C, Park JW, Ames BN (1988) Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *PNAS* 85 (17):6465-6467.
- Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM (1999) Megabase Chromatin Domains Involved in DNA Double-Strand Breaks In Vivo. *J Cell Biol* 146 (5): 905-915.

- Rogakou EP, Nieves-Neiras W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM (2000) Initiation of DNA Fragmentation during Apoptosis Induces Phosphorylation of H2AX Histone at Serine 139. *J Biol Chem* 275 (13): 9390-9395.
- Rogakou EP, Plich DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998) DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139. *J Biol Chem* 273 (10): 5858-5868.
- Rothkamm K, Kruger I, Thompson LH, Lobrich M (2003) Pathways of DNA Double-Strand Breaks Repair during the Mammalian Cell Cycle. *Mol Cell Biol* 23 (16): 5706-5715.
- Sadoni N, Langer S, Fauth C, Bernardi G, Cremer T, Turner BM, Zink D (1999) Nuclear organization of mammalian genomes: polar chromosome territories build up functionally distinct higher order compartments. *J Cell Biol* 146 (6): 1211-1226.
- Siciliano MJ, Stallings RL, Adair GM (1985) The genetic map of the Chinese hamster and the genetic consequences of chromosomal rearrangements in CHO cells. En: *Molecular Cell Genetics* (Gottesman MM, Ed.), John Wiley & Sons, New York, pp 95-135.
- Sumner AT (2003) Chromosomes: organization and function. *Blackwell Science Ltd*.
- Svetlova M, Solovjeva L, Nishi K, Nazarov I, Siino J, Tomilin N (2007) Elimination of radiation-induced γ -H2AX foci in mammalian nucleus can occur by histone exchange. *Biochem Biophys Res Comm* 358: 650-654.
- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J (2004) Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 266 (1-2): 37-56.
- van Driel R, Fransz PF, Verschure PJ (2003) The eukaryotic genome: a system regulated at different hierarchical levels. *J Cell Sci* 116: 4067-4075.
- Verma RS, A Babu (1995) Human Chromosomes. Principles and Techniques. McGraw-Hill (2da edición), Nueva York, pp.419.
- Vidal Bravo M, Bianchi MS, Bolzán AD (2011) Bleomycin induces delayed instability of interstitial telomeric sequences in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res* 731: 133-139.
- Ward IM, Chen J (2001) Histone H2AX Is Phosphorylated in an ATR-dependent Manner in Response to Replicational Stress. *J Biol Chem* 276 (51): 47759-47762.