

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

PEDECIBA – AREA BIOLOGÍA

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

OPCIÓN GENÉTICA

**ROL DE LA ACETILACIÓN DE HISTONAS  
EN LA RESPUESTA CELULAR AL DAÑO EN EL ADN**

Leticia Méndez Acuña

Laboratorio de Epigenética e Inestabilidad Genómica  
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Orientador: Dr. Wilner Martínez-López

Tribunal:

Lic. Ekaterina Scvortzoff

Dr. José Sotelo

Dr. Juan Claudio Benech

Montevideo – Uruguay

Agosto 2017

## AGRADECIMIENTOS

Al tutor de este trabajo, Wilner Martínez, por haberme brindado la posibilidad de llevar adelante esta tesis.

A los compañeros del Laboratorio de Epigenética e Inestabilidad Genómica (LEIG) del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE): Mareney Rovira, Verónica Berdejillo, Jonatan Valencia y Dayana Moreno, por los buenos momentos e instancias de discusión compartidos.

A Juan Francisco Gari por la realización de los análisis estadísticos y por haberme brindado su estímulo y apoyo durante prácticamente toda la realización de este trabajo.

A Fabrizio Palitti y colaboradores del Departamento de Agrobiología y Agroquímica de la Università degli Studi della Tuscia, (Viterbo, Italia) por recibirme en su laboratorio, y darme su apoyo en la realización de parte de los experimentos realizados con etopósido e irradiación con rayos X.

Al Instituto Italo Latino Americano (IILA) por la financiación de mi estadía en la Università degli Studi della Tuscia (Viterbo, Italia).

A Sandrine Roch-Lefèvre, Eric Gregoire, Marco Valente y compañeros del Laboratorio de Dosimetría Biológica (LDB) del Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire (IRSN) (Fontenay-aux-Roses, Francia) por su gran apoyo en la realización de los experimentos con radiación gamma y recuento de foci  $\gamma$ -H2AX.

Al Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) por la financiación de mi estadía en el IRSN (Fontenay-aux-Roses, Francia).

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por la financiación de mi beca de Doctorado.

A Gustavo Folle por su apoyo y participación como tutor frente a la ANII.

A María Vittoria Di Tomaso por todas las discusiones compartidas y su gran apoyo siempre.

A los compañeros del Departamento de Genética por los momentos compartidos y el uso compartido de la infraestructura para el cultivo de células.

Al Servicio de Clasificación Celular y Citometría de Flujo (SECIF-IIBCE) por la realización de los análisis de ciclo celular.

A Cecilia Fernández por su gran apoyo e impulso en la culminación de este trabajo.

Al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) por contribuir en la continuación de mi formación científica.

Al tribunal de esta tesis: Ekaterina Scvorztoff, José Sotelo y Juan Claudio Benech por haber aceptado su evaluación.

A mi familia y amigos por su apoyo desde diferentes puntos de vista, sin el que no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

## INDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>3</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>5</b>
<b>1- ANTECEDENTES</b>	<b>7</b>
<b>1.1- Daño en el ADN</b>	<b>7</b>
<b>1.1.1- Agentes inductores de daño en el ADN</b>	<b>7</b>
<i>1.1.1.1- Radiaciones ionizantes</i>	7
<i>1.1.1.2- Radiaciones no ionizantes</i>	9
<i>1.1.1.3- Agentes inhibidores de ADN topoisomerasas</i>	10
<b>1.2- Respuesta celular al daño en el ADN</b>	<b>13</b>
<b>1.2.1- Reparación del daño en el ADN</b>	<b>15</b>
<i>1.2.1.1- Reparación de bases y nucleótidos dañados</i>	16
<i>1.2.1.2- Reparación de rupturas de doble cadena</i>	18
<i>1.2.1.3- Reparación del daño mediado por inhibidores de la Topoisomerasa II (TopoII)</i>	19
<b>1.3- Cambios epigenéticos en la respuesta celular al daño en el ADN</b>	<b>21</b>
<b>1.3.1- Estructura de la cromatina</b>	<b>21</b>
<b>1.3.2- Remodelación de la cromatina</b>	<b>22</b>
<b>1.3.3- Fosforilación de histonas</b>	<b>25</b>
<i>1.3.3.1- Fosforilación de histonas en la reparación de rupturas de doble cadena</i>	25
<i>1.3.3.2- Fosforilación de histonas en la vía de reparación NER</i>	27
<b>1.3.4- Acetilación de histonas</b>	<b>28</b>
<i>1.3.4.1- Acetiltransferasas de histonas (HATs)</i>	29
<i>1.3.4.2- Desacetilasas de histonas (HDACs)</i>	30
<b>1.3.5- Inhibidores de desacetilasas de histonas (HDACi)</b>	<b>33</b>
<b>1.3.6- Sensibilización al tratamiento anticancerígeno por HDACi</b>	<b>36</b>
<b>1.4- Características de las células tumorales de vejiga urinaria</b>	<b>37</b>
<b>2- FUNDAMENTACION</b>	<b>38</b>
<b>3- HIPOTESIS</b>	<b>39</b>
<b>4- OBJETIVOS</b>	<b>39</b>
<b>4.1- OBJETIVO GENERAL</b>	<b>39</b>
<b>4.2- OBJETIVOS ESPECIFICOS</b>	<b>39</b>
<b>5- METODOLOGIA</b>	<b>40</b>
<b>5.1- Líneas celulares y muestras biológicas</b>	<b>40</b>
<b>5.2- Cultivo de células</b>	<b>40</b>
<b>5.3- Tratamientos</b>	<b>41</b>
<b>5.3.1- Agentes genotóxicos empleados</b>	<b>41</b>
<b>5.3.2- Inhibidores de desacetilasas de histonas (HDACi)</b>	<b>42</b>
<b>5.4- Western Blot</b>	<b>42</b>
<b>5.5- Ensayos clonogénicos</b>	<b>43</b>

5.6- Ensayo Cometa	44
5.7- Inmunodetección fluorescente de foci $\gamma$ -H2AX	46
5.8- Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo	48
5.9- Análisis estadístico	49
<b>6- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b>	<b>51</b>
<b>7- RESULTADOS</b>	<b>52</b>
7.1– Efecto de inhibidores de desacetilasas de histonas en la sobrevida celular al tratamiento con etopósido	52
7.1.1- Acido valproico	55
7.1.2- Tricostatina A	58
7.1.3- Butirato de sodio	61
7.2– Efecto de inhibidores de desacetilasas de histonas en el daño producido por agentes genotóxicos	70
7.2.1 - Efecto de inhibidores de desacetilasas de histonas en el daño en el ADN inducido por etopósido	71
7.2.2 - Efecto de inhibidores de desacetilasas de histonas en el daño inducido en el ADN por radiaciones ionizantes	78
7.2.3 - Efecto de inhibidores de desacetilasas de histonas en el daño en el ADN inducido por la radiación UVC	82
7.3- Efecto de inhibidores de desacetilasas de histonas en la cinética de reparación del daño genético inducido por diferentes agentes genotóxicos	84
7.3.1 – Radiaciones ionizantes	85
7.3.1-1 - <i>Butirato de sodio y rayos X</i>	85
7.3.1.2- <i>Acido valproico y rayos gamma</i>	88
7.3.2- Radiación UVC	90
<b>8- DISCUSION</b>	<b>94</b>
8.1- Efecto de los inhibidores de desacetilasas de histonas en la sobrevida y proliferación luego del tratamiento con etopósido	94
8.2- Efecto de los inhibidores de desacetilasas de histonas en el daño producido por agentes genotóxicos	97
8.2.1- Posible efecto genotóxico de los inhibidores de desacetilasas de histonas	97
8.2.2- Efecto de la combinación de HDACi y agentes genotóxicos	99
8.3- Efecto de los HDACi en la cinética de remoción del daño genético inducido	103
<b>9- CONCLUSIONES</b>	<b>106</b>
<b>10- PERSPECTIVAS</b>	<b>107</b>
<b>11- BIBLIOGRAFIA</b>	<b>108</b>

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AP	Sitios apurínicos/apirimidínicos
ARN	Ácido ribonucleico
ARNi	ARN interferencia
ATM	Proteína mutada en ataxia telangiectasia ( <i>Ataxia Telangiectasia mutated</i> )
ATR	Proteína relacionada a ataxia telangiectasia ( <i>Ataxia Telangiectasia related</i> )
BER	Reparación por escisión de bases ( <i>Base excision repair</i> )
BRCA1	Proteína de susceptibilidad al cáncer de mama 1 ( <i>Breast cancer type-1 susceptibility protein 1</i> )
CDC25	Fosfatasa 25 del ciclo de división celular ( <i>Cell division cycle phosphatase 25</i> )
Chk1	Proteína quinasa de control del ciclo celular 1 ( <i>Chekponit kinase 1</i> )
Chk2	Proteína quinasa de control del ciclo celular 2 ( <i>Chekponit kinase 2</i> )
CHO	Línea celular de ovario de hámster chino ( <i>Chinese Hamster Ovary</i> )
CPDs	Dímeros de pirimidina ciclobutano
DDR	Respuesta celular al daño en el ADN ( <i>DNA damage response</i> )
DNA-PKcs	Subunidad catáltica de la proteín-quinasa de ADN
FDA	Food and Drug Administration of United States
GFP	Proteína fluorescente verde ( <i>Green fluorescent protein</i> )
GGR	Reparación genómica global ( <i>Global genomic repair</i> )
$\gamma$ -H2AX	Variante de la histona H2A fosforilada
HAT	Acetil-transferasa de histonas ( <i>Histone acetyl-transferase</i> )
HDAC	Desacetilasa de histonas ( <i>Histone deacetylase</i> )
HDACi	Inhibidor de desacetilasas de histonas ( <i>Histone deacetylases inhibitor</i> )
HUS1	Proteína 1 sensible a hidroxurea ( <i>Hydroxyurea-sensitive-1 protein</i> )
HR	Recombinación homóloga ( <i>Homologous recombination</i> )
IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria del 50%
LET	Transferencia lineal de energía
Ku	Heterodímero formado por Ku70 y Ku80 que participa en la vía de reparación del ADN NHEJ
MDC1	Proteína mediadora del punto de control 1 ( <i>Mediator of DNA damage checkpoint 1</i> )
NaB	Butirato de sodio
NBS1	Proteína 1 del síndrome de Nijmegen ( <i>Nijmegen breakage syndrome-1 protein</i> )
NER	Reparación de nucleótidos dañados ( <i>Nucleotide excision repair</i> )
NHEJ	Reparación por reasociación de extremos no homólogos ( <i>Non Homologous End Joining</i> )
MMR	Reparación de apareamientos erróneos de bases nitrogenadas ( <i>Mismatch Repair</i> )
MRE11	Proteína de recombinación meiótica 11 ( <i>Meiotic recombination-11 protein</i> )
MRN	Complejo proteico compuesto por Mre11, Rad50 y NBS1

PI3K	Quinasa fosfatidilinositol-3
PTMs	Modificaciones postraduccionales de las histonas ( <i>Post-translational modifications</i> )
P53	Proteína supresora tumoral ( <i>Tumour suppressor p53</i> )
RDC	Ruptura de doble cadena en el ADN
RFC	Factor de replicación C ( <i>Replication factor C</i> )
RNS	Especies reactivas del nitrógeno
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RPA	Proteína de replicación A ( <i>Replication protein A</i> )
RSC	Ruptura de simple cadena en el ADN
SMC1	Proteína de mantenimiento estructural de los cromosomas 1 ( <i>Structural maintenance of chromosomes protein-1</i> )
SAHA	Ácido hidroxámico del suberoylanilido
TCC	Carcinoma de células transicionales
TCR	Reparación acoplada a la transcripción ( <i>Transcription Coupled Repair</i> )
TM	Tail moment
TMR	Tiempo medio de reparación
Topo I	ADN topoisomerasa I
Topo II	ADN topoisomerasa II
TSA	Tricostatina A
VPA	Acido valproico
53BP1	Proteína de unión a p53 1 ( <i>p53-binding protein 1</i> )
6-4 PPs	6-4 fotoproductos pirimidina pirimidona
911	Complejo 911 integrado por RAD9, HUS1 y RAD1

## RESUMEN

Como consecuencia del daño en el ADN las células eucariotas desencadenan una respuesta que involucra la detección del sitio dañado, la amplificación y diversificación de la señal a través de cascadas de quinasas y la activación de efectores que participan en la detención del ciclo celular, la reparación del ADN y en algunos casos la inducción de apoptosis. Estos procesos ocurren en el contexto de la cromatina, la cual es una estructura dinámica que compacta al ADN y contribuye a preservar la información genética y regular la expresión génica. Los mecanismos epigenéticos de remodelación de la cromatina constituyen un nivel adicional de regulación tanto de la transcripción como de los procesos de reparación del ADN, incidiendo en la estabilidad genómica. Asimismo, en la última década el conocimiento de los procesos epigenéticos ha adquirido una singular importancia dado que su alteración, en conjunto con alteraciones genéticas, ha sido asociada al desarrollo de enfermedades como el cáncer.

En este trabajo se estudió la influencia de la acetilación de histonas, uno de los mecanismos epigenéticos mejor caracterizados, en la respuesta celular al daño inducido por diferentes agentes genotóxicos (radiaciones ionizantes y no ionizantes; y un inhibidor de la ADN topoisomerasa II), los cuales inducen daño genético por diferentes mecanismos, interviniendo distintos sistemas de reparación del ADN para su remoción. Empleando los inhibidores de desacetilasas de histonas (HDACi): butirato de sodio, ácido valproico y tricostatina A, se analizó el efecto de la alteración de los niveles de acetilación en la sobrevivencia celular, inducción y reparación del daño producido en el ADN por los agentes genotóxicos mencionados, así como su influencia en la progresión del ciclo celular en diferentes sistemas de células de mamíferos.

Entre las hipótesis de trabajo se planteó la potenciación del efecto de los agentes genotóxicos en presencia de HDACi mediante el incremento del nivel de daño producido en el ADN o por la disminución en su tasa de reparación. El uso combinado de HDACi con agentes inductores de daño en el ADN está siendo evaluado en el tratamiento antineoplásico, por tanto estudios como el aquí presentado resultan de interés para profundizar en los mecanismos subyacentes en este tipo de terapias.

Los resultados obtenidos indicaron que en la mayoría de los casos el pre-tratamiento con los HDACi potenció el efecto de los diferentes agentes genotóxicos empleados, tanto en términos de sobrevivencia como de daño genético inducido. Asimismo, los HDACi incidieron en la cinética de remoción del daño producido por rayos X, rayos gamma y UVC, en general disminuyendo la tasa de reparación.

Estos hallazgos nos han permitido proponer que la alteración en el balance de acetilación/desacetilación producido por el pre-tratamiento con los HDACi disminuye la eficiencia de diferentes sistemas de reparación del ADN. Esto podría ser explicado por una reducción de la interacción de la maquinaria de reparación a nivel de los sitios de ADN dañados generada por

los cambios ocurridos en la conformación de la cromatina. Estos podrían implicar a su vez la alteración de la interacción con otros mecanismos epigenéticos como la ubiquitinación de histonas, responsable del desensamblaje de los nucleosomas, el cual podría verse disminuido en presencia de los HDACi por activación de deubiquitininasas de histonas.

## **1- ANTECEDENTES**

### **1.1- Daño en el ADN**

En el ADN de las células de todos los organismos frecuentemente ocurren alteraciones, ya sea en su estructura química o en la secuencia de nucleótidos que lo componen. Las consecuencias biológicas del daño genético dependen tanto del tipo de lesiones inducidas como de su localización genómica. Entre los tipos de lesiones inducidas se encuentran el daño tanto en las bases nitrogenadas y/o nucleótidos como rupturas de simple (RSC) y doble cadena (RDC) en el ADN, siendo estas últimas las más severas para la sobrevivencia de las células y la preservación de su integridad genómica. La falla o la ausencia de reparación de las RDCs puede ocasionar una tasa de mutaciones elevada, rupturas y reordenamientos cromosómicos e inestabilidad genómica que pueden conducir a la muerte celular (Obe et al. 1992; Pfeiffer et al. 2000; Di Tomaso et al. 2008). En los eucariotas superiores el daño generado en genes responsables de la reparación del ADN y/o en los genes involucrados en la regulación del ciclo celular puede conducir a la transformación oncogénica y al desarrollo de cáncer (Peterson y Côté 2004; Jeggo y Löbrich 2007). Los reordenamientos cromosómicos, si bien constituyen un factor importante en la variación genética en poblaciones naturales y en la evolución de las especies, en poblaciones humanas se encuentran frecuentemente vinculados a infertilidad, retardo mental, malformaciones congénitas y síndromes de inestabilidad genética (Lejeune et al. 1963).

#### **1.1.1- Agentes inductores de daño en el ADN**

Gran parte de los cambios que ocurren en el ADN son consecuencia de errores durante los procesos de replicación, recombinación o reparación. Por ejemplo, durante la síntesis del ADN pueden producirse RDCs cuando las horquillas de replicación encuentran una hebra molde dañada. A su vez, el ADN reacciona con una gran variedad de agentes tanto exógenos como endógenos. Entre los endógenos se incluyen aquellos que son producto del metabolismo celular, como las especies reactivas del oxígeno (ROS) (aniones superóxido, radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno) derivados de la respiración oxidativa y de la peroxidación de los lípidos, y agentes alquilantes (Wood et al. 2001). Los exógenos abarcan tanto a agentes físicos como las radiaciones ionizantes (rayos X y rayos  $\gamma$ ) y radiaciones no ionizantes como la luz ultravioleta (UV), así como agentes químicos, entre los que se incluyen las drogas radiomiméticas y compuestos que inhiben a las ADN topoisomerasas (Friedberg et al. 2006). A este conjunto de agentes se les denomina genotóxicos.

##### **1.1.1.1- Radiaciones ionizantes**

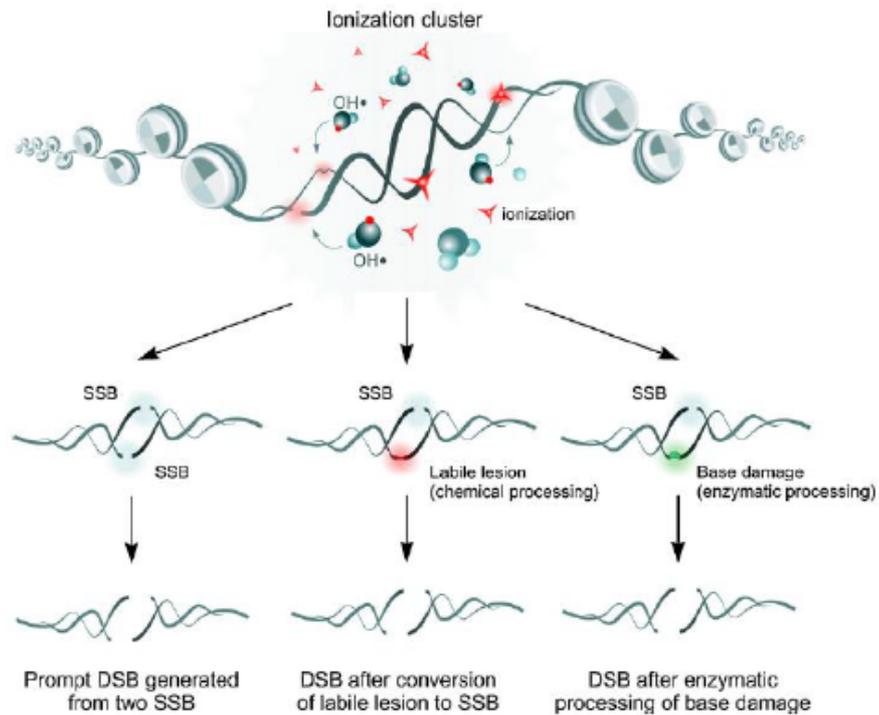
La radiación ionizante está compuesta por partículas de elevada energía capaces de inducir la liberación de electrones de los átomos o moléculas con los que interactúa. Es generalmente el resultado del decaimiento natural de núcleos atómicos inestables, pudiendo también ser generada en forma artificial, como por ejemplo mediante aceleradores de partículas. Al atravesar la materia estas partículas le transfieren su energía induciendo la ionización de los átomos a su

paso. La Transferencia Lineal de Energía (LET) es la cantidad de energía liberada por la partícula a lo largo de su trayecto durante su decaimiento. Los diferentes tipos de radiaciones ionizantes se diferencian por el tipo de partícula emitida y su poder de penetración, siendo clasificadas como de alta o baja LET de acuerdo a la densidad de la energía depositada.

La radiación de alta LET libera energía en el orden de los 400 eV dentro de áreas de aproximadamente de 5 a 10 nm e incluye tanto a las partículas alfa como a los neutrones (Goodhead 1989). Las partículas alfa son emitidas en forma espontánea durante el decaimiento radioactivo de elementos con números de masa elevados (mayores a 150), como por ejemplo uranio y plutonio. En el caso de los neutrones, si bien no son partículas cargadas y no son ionizantes, sus colisiones con núcleos atómicos producen una reacción en cadena que tiene como resultado la liberación de partículas cargadas que causan ionización.

Por otra parte, la radiación de baja LET libera energía por debajo de los 100 eV dentro de áreas de aproximadamente de 2 nm y comprende la radiación  $\beta$ ,  $\gamma$  y los rayos X (Goodhead 1989). La primera es originada por el decaimiento  $\beta$  de núcleos atómicos con un exceso de neutrones o protones y posee un bajo poder de penetración. Mientras que los rayos  $\gamma$  y los rayos X constituyen radiaciones electromagnéticas de alta frecuencia ( $10^{19}$  Hz), los que se diferencian según su origen. Los rayos X son emitidos durante los procesos atómicos que involucran electrones energéticos. Sin embargo, los rayos  $\gamma$  son emitidos por núcleos excitados u otros procesos producidos por interacciones entre partículas subatómicas. Luego de una reacción de decaimiento, el núcleo atómico se encuentra en un estado "excitado" (con exceso de energía). Esta energía es liberada por la emisión de un pulso de radiación electromagnética llamado rayo  $\gamma$ , el cual es idéntico en su naturaleza a la luz o a las microondas pero posee un elevado nivel de energía. Al igual que todas las formas de radiación electromagnética, los rayos  $\gamma$  no poseen masa ni carga e interactúan con la materia colisionando con los electrones en las órbitas atómicas perdiendo su energía en su trayecto.

A nivel biológico, las membranas celulares, las proteínas y el ADN son blanco de las radiaciones ionizantes. Su efecto en estas estructuras puede ser producido tanto por daño directo como por radicales libres, incluyendo especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ROS y RNS respectivamente). El daño inducido por las radiaciones ionizantes a nivel del ADN ocurre tanto directamente en sus propios componentes así como por medio de la ionización del material que lo rodea, mayoritariamente de las moléculas de agua, formándose moléculas reactivas que luego interaccionan con él (Goodhead 1999). Entre los tipos de daño generados en el ADN se encuentran RSCs y RDCs, daño en las bases nitrogenadas, uniones cruzadas ADN-proteínas y uniones intra e intercatenarias (Prise 1994) (Figura 1).



**Figura 1** – Rupturas de doble cadena (RDCs) inducidas por la radiación ionizante. Las RDCs pueden producirse tanto en forma directa, luego del procesamiento químico de lesiones en los residuos de azúcar, los que en su forma inicial no causan la ruptura del esqueleto azúcar-fosfato, así como luego del procesamiento de daño generado en bases nitrogenadas. Extraída de Mladenov e Iliakis (2011a).

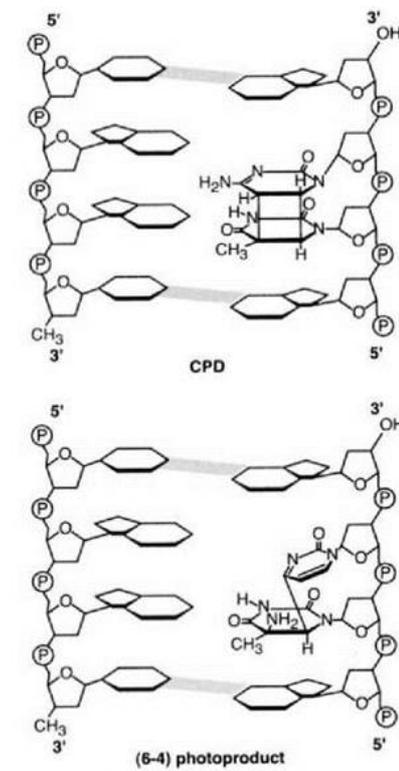
### 1.1.1.2- Radiaciones no ionizantes

#### **Radiación ultravioleta (UV)**

Si bien solo un 6.1% del espectro solar electromagnético que llega a la superficie de la tierra se encuentra en el rango UV, la radiación UV conlleva importantes implicancias para la salud humana y los ecosistemas terrestres y acuáticos. El rango UV se extiende desde los 100 a los 400 nm y se encuentra dividido en: UVC (100–280 nm), UVB (280–315 nm) y UVA (315–400 nm) (Aucamp et al. 2011; McKenzie et al. 2011). Cuanto menor es la longitud de onda de la radiación UV mayor es su absorción por la atmósfera, por lo tanto las radiaciones UVC y UVB son absorbidas por el ozono y el oxígeno en un 100% y 90% respectivamente. Como consecuencia, la radiación UV que alcanza la superficie de la tierra es mayoritariamente UVA. La relevancia a nivel biológico de la radiación UV reside en la inducción de daño a nivel del ADN en los organismos acuáticos y terrestres (Norval et al. 2007). Debido a que la longitud de onda a la que la molécula de ADN posee mayor absorción es a los 260 nm, el UVC es el más efectivo para la inducción de fotoproductos (Yagura et al. 2011), por lo tanto si bien no alcanza la superficie terrestre es empleado ampliamente en estudios experimentales sobre el daño inducido en el ADN por la radiación UV.

El daño inducido por UVC en las biomoléculas se debe a la absorción directa de la luz para generar moléculas más reactivas, lo que conduce a la aparición de dímeros de pirimidina ciclobutano (Cyclobutane Pirimidine Dimers, CPDs) por la unión covalente entre las bases

nitrogenadas de pirimidinas adyacentes (citosinas o timinas), y 6-4 fotoproductos (pyrimidine-(6-4) pyrimidone photoproducts, 6-4PP) en la cadena de ADN (Schuch et al. 2013) (Figura 2). A su vez, como resultado de la incorporación y procesamiento de ambos tipos de lesiones pueden llegar a producirse reordenamientos cromosómicos (Thompson 2012).



**Figura 2** – Lesiones inducidas en el ADN por la radiación UV: Dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs) y 6-4 fotoproductos. Extraída de Friedberg et al. 2006.

### 1.1.1.3- Agentes inhibidores de ADN topoisomerasas

Las ADN topoisomerasas son enzimas que realizan la conversión entre isómeros topológicos del ADN ya sea durante la replicación, transcripción, recombinación y reparación del ADN, como durante la condensación y segregación cromosómica (Wang 1985; Hande 1998; Adachi et al. 2003). Actúan generando un corte transitorio en el esqueleto de azúcar-fosfato del ADN, el que puede ser atravesado por otro segmento de ADN, realizando luego la reunión de las hebras cortadas. Este corte en el ADN de simple o doble cadena, llevado a cabo por las ADN topoisomerasas I y II respectivamente, es realizado mediante la formación de un complejo covalente enzima-ADN (Figuras 3 y 4). En la formación de este complejo catalítico intermediario ocurre una reacción de transesterificación con la participación de un residuo de tirosina de la enzima (Malik y Nitiss 2004).

Las ADN topoisomerasas II (TopoII) eucarióticas son enzimas homodiméricas. Los vertebrados poseen dos isoformas genéticamente distintas: TopoII $\alpha$  y TopoII $\beta$ . TopoII $\alpha$  es esencial para la replicación del ADN y la proliferación celular, asociándose a los cromosomas durante la mitosis. Su expresión está regulada por el ciclo celular, presentando una expresión máxima en las fases G<sub>2</sub>/M de este ciclo. Generalmente se encuentra presente en niveles elevados en las células

cancerígenas de elevada proliferación (Johnson et al. 2001; Adachi et al. 2003; Järvinen y Liu 2003). Por otra parte, Topoll $\beta$  es activa en células no proliferantes estando involucrada principalmente en los procesos vinculados a la transcripción y sus niveles de expresión permanecen relativamente constantes durante el ciclo celular (Lyu et al. 2006; Ju et al. 2006).

Los agentes inhibidores de Topoll se dividen en dos grandes clases. En una de ellas se encuentran los que inhiben la actividad catalítica de esta enzima, mientras que la otra clase incluye a los que estabilizan al complejo covalente formado entre la Topoll y el ADN. Estos últimos impiden la reasociación de las cadenas del ADN, aumentando de esta manera los niveles de complejos Topoll-ADN formados. Estos complejos son reversibles luego de retirado el inhibidor, pero pueden ser convertidos en rupturas estables en el ADN por colisión con enzimas de la maquinaria de replicación o transcripción (Zwelling et al. 1981; Palitti et al. 1990 y 1994; Malik y Nitiss 2004; Martínez-López et al. 2004). En esta última clase se incluyen la mayoría de los agentes inhibidores de Topoll empleados en terapia anticancerígena (Nitiss 2009).

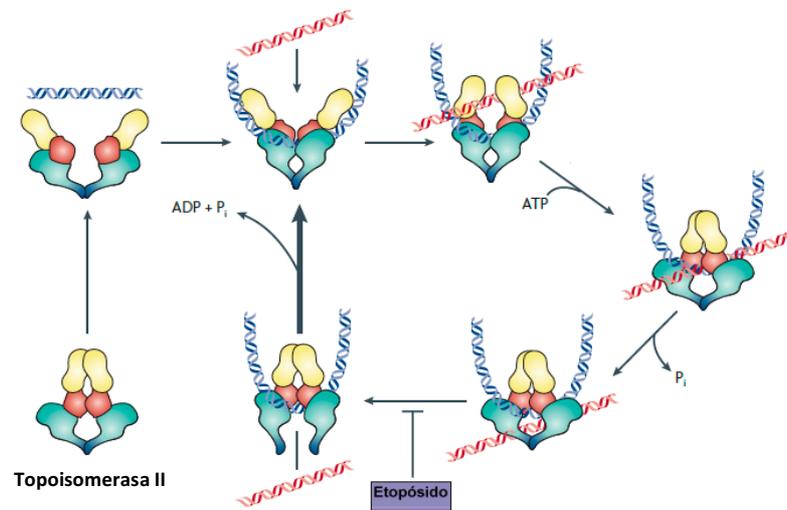
Un factor importante en la sensibilidad a las drogas anti Topoll son los niveles generales de Topoll presentes. En este sentido, se ha demostrado experimentalmente que la reducción de los niveles de Topoll son suficientes para conferir resistencia a este tipo de drogas, mientras que por el contrario células que sobreexpresan Topoll resultan hipersensibles a las mismas (Beck et al. 1993; Gudkov et al. 1993; Nitiss y Beck 1996). Sin embargo, en la clínica en la mayoría de los tipos de cáncer han habido resultados equívocos al comparar el resultado del tratamiento con este tipo de drogas y los niveles de Topoll presentes (Walker y Nitiss 2002).

Entre las desventajas del uso de drogas anti Topo II en la clínica se encuentra la aparición de malignidades secundarias, especialmente leucemias mieloblásticas agudas, debido a la inducción de translocaciones cromosómicas en células normales, las que estarían más relacionadas con la inhibición de Topoll $\beta$  (Azarova et al. 2007; Dewese y Oshroff 2009; Cowell et al 2012). Dado que Topoll $\beta$  sería la única Topoll activa en células no proliferantes, entre los beneficios potenciales de su inhibición se encuentra la capacidad de reducir la sobrevivencia de células madre cancerígenas. Uno de los desafíos planteados para el empleo de este tipo de drogas es la maximización de su eficacia terapéutica minimizando sus efectos colaterales (Nitiss 2009).

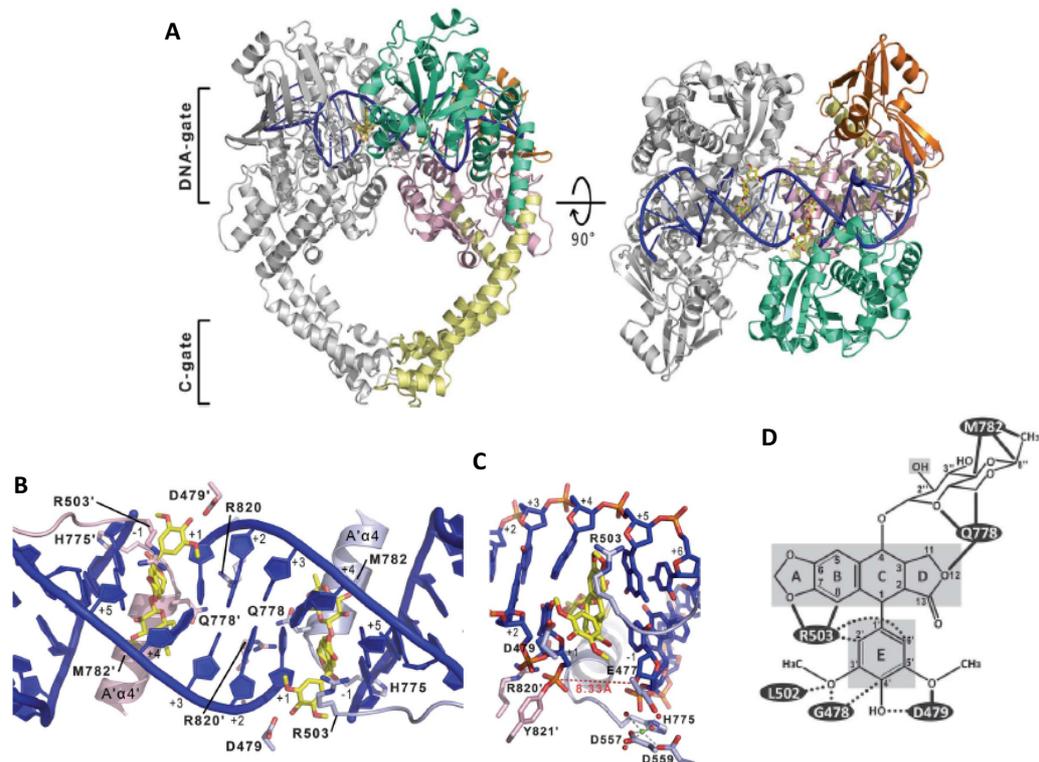
### **Etopósido**

El etopósido o VP-16 es uno de los inhibidores de la Topoll mayormente empleados en el tratamiento anticancerígeno, perteneciendo a la clase de drogas que estabiliza los complejos covalentes Topo II-ADN. De esta manera induce RDCs de forma indirecta al no permitir la reunión de las cadenas en los sitios de corte inducidos por la Topo II (Figuras 3 y 4). Interactúa tanto con la Topoll como con el ADN, pero a diferencia de otros inhibidores de Topoll, el etopósido no es un agente intercalante planar por lo que su interacción con el ADN es débil (Wu et al. 2011). Por lo tanto, sus interacciones con la Topoll tendrían un rol clave en su capacidad de estabilizar los complejos covalentes Topoll-ADN (Wilstermann et al. 2007; Bender et al. 2008). Se ha sugerido

que la mayor parte de la citotoxicidad de esta droga es causada por inhibición de la TopoII $\alpha$  por lo que su efecto principal sería sobre células en activa proliferación (Toyoda et al. 2008).



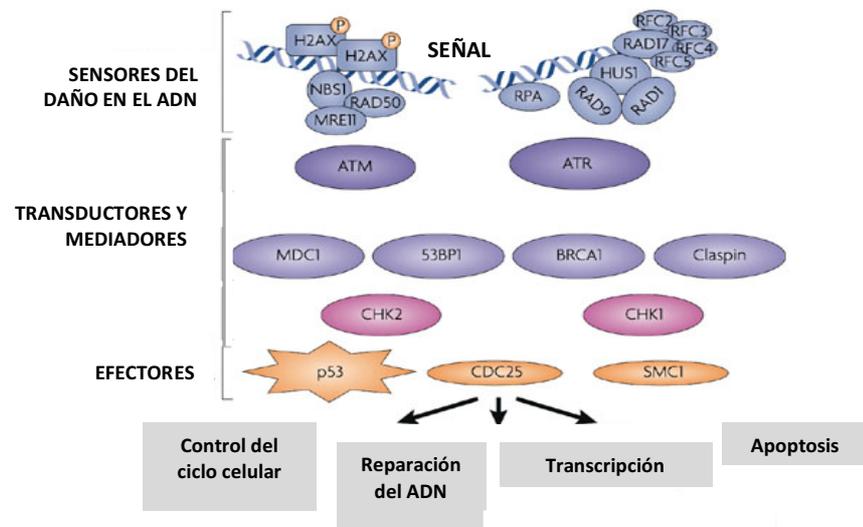
**Figura 3-** Ciclo catalítico de la Topoisomerasa II y su inhibición por etopósido. Modificada de Nitiss (2009).



**Figura 4-** **A-** Estructura cristalográfica del complejo covalente ternario formado por la Topoisomerasa II humana (hTopoII $\beta$ ) y el ADN estabilizado por etopósido. Se presentan dos vistas ortogonales de este complejo donde el ADN se encuentra en azul, uno de los monómeros de la hTopoII $\beta$  está en gris y el otro en colores. **B-** Representación de la inserción de dos moléculas de etopósido (en amarillo) en dos sitios de clivaje. El ADN se representa en azul y los dos monómeros de hTopoII $\beta$  se muestran en diferentes colores. **C-** Acercamiento de la representación del sitio de unión del etopósido. **D-** Estructura química del etopósido. Se indican en negro los residuos que interactúan con la droga. Se marcan en gris los átomos involucrados en las interacciones etopósido-ADN. Extraída de Wu et al. (2011).

## 1.2 - Respuesta celular al daño en el ADN

Con el fin de mantener la estabilidad genómica, frente a la acción de los agentes genotóxicos las células eucariotas activan la respuesta al daño en el ADN (DNA damage response – DDR). Esta respuesta es una vía de transducción de señales, donde la señal consiste en el daño inducido en el ADN o alteraciones a nivel de la cromatina. La misma es detectada por proteínas sensoras, que en general son proteínas de unión al ADN, las que inducen la activación de un sistema transductor, representado por cascadas de proteína-quinasas, las que amplifican y diversifican la señal dirigiéndose a una serie de efectores corriente abajo (Jackson 2002). Entre los efectores se encuentran: **a)** factores implicados en la **regulación transcripcional y post-transcripcional** de un gran conjunto de genes, entre los que se destacan los vinculados al control del ciclo celular y la reparación del ADN; **b)** factores asociados al **enlentecimiento o detención de la progresión del ciclo celular** en determinados intervalos denominados “checkpoints”, activados con el fin de posponer la replicación del ADN o la división celular mientras el daño persista; **c)** factores implicados en la **reparación del ADN**; y **d)** en algunos casos la activación de factores involucrados en la inducción de la muerte celular por **apoptosis** (Khanna y Jackson 2001; Ford 2005; Ciccia y Elledge 2010) (Figura 5).



**Figura 5** – Esquema de la respuesta celular al daño en el ADN desencadenada ante la señal de daño en la que participan: *sensores del daño* (RPA - proteína de replicación A; complejos similares al factor de replicación C – RFC, el complejo 911 - RAD9/HUS1/RAD1, y el complejo MRN - MRE11/RAD50/NBS1; *transductores y mediadores* (ATM – proteína mutada en ataxia telangiectasia; ATR – proteína relacionada a ATM; MDC1, 53BP1, BRCA1, claspina, CHK1) and CHK2); y *efectores* (p53, SMC1 y CDC25). Modificada de Campisi y d’Adda di Fagagna 2007.

Este mecanismo complejo de vigilancia y reparación del ADN, impide que las lesiones inducidas inicialmente se transformen en mutaciones, garantizando así la transmisión precisa de la información genética (De Boer y Hoeijmakers 2000). De esta forma, la replicación y división celular se postergan hasta que las lesiones se hayan reparado. En el caso de que esto no sea

posible, se induce el proceso apoptótico con el fin de evitar la transmisión del error a las células hijas. Cuando estos mecanismos fallan y el daño permanece sin que la célula muera, ésta la transmitirá a sus células descendientes, pudiendo iniciarse la transformación tumoral (Hoeijmakers 2001).

En esta última década ha aumentado en gran medida el conocimiento acerca de las proteínas que participan en la DDR, principalmente debido al desarrollo de estrategias de purificación que permitió la identificación de nuevos componentes en los grandes complejos proteicos involucrados. A su vez, el uso de metodologías de ARN interferencia (ARNi) sumado al análisis de imágenes *in vivo* usando la marcación con la proteína fluorescente verde (GFP) y microscopía confocal han permitido conocer aspectos funcionales de la mayoría de ellas.

Se ha constatado que entre los factores que participan en la detección del sitio dañado se encuentra el complejo MRN (Mre11/Rad50/NBS1) el cual se une a los extremos libres del ADN (Lavin 2007) (Figura 5) y dada su estructura se cree que formaría un microambiente que mantiene a los dos extremos del ADN unidos (Van Gent & Van der Burg 2007).

Este complejo recluta a quinasas miembros de la superfamilia de quinasas fosfatidilinositol-3 (PI3K), siendo las principales ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), ATR (Ataxia Telangiectasia Related) y DNA-PKcs (subunidad catálítica de la proteína-quinasa de ADN) (Figura 5). Si la señal de daño consiste en RDCs se activan ATM y DNA-PKcs, mientras que ATR responde a RSCs. Estas tres quinasas son reclutadas al sitio dañado y una vez activadas catalizan la fosforilación de diversas proteínas involucradas en la regulación de la progresión del ciclo celular, la reparación del ADN y la apoptosis (Karagiannis y El-Osta 2007; Lovejoy y Cortez 2009) (Figura 5).

El ciclo celular cuenta con cuatro puntos de control o “*checkpoints*” donde se realiza la verificación de la existencia de daño en el ADN. Éstos se ubican al final de la fase G1, en la fase S, al final de la fase G2 y al final de la fase M. Por lo tanto, en las células en proliferación luego de la inducción de daño el ciclo puede ser detenido al final de G1 o G2, activándose los mecanismos de reparación del ADN (Harper y Elledge 2007; Lazzaro et al. 2009). Esta detención del ciclo celular en respuesta al daño en el ADN ocurre por la activación por fosforilación de p53 mediada por ATM o ATR (Figura 5). En ausencia de daño en el ADN, p53 se mantiene en un bajo nivel de expresión, debido a su rápida degradación mediada por el sistema ubiquitina/proteasoma. Pero en respuesta al daño en el ADN, al ser fosforilada, p53 se convierte en una proteína funcional estabilizada y activa a nivel bioquímico a través de fosforilaciones y acetilaciones, funcionando como un factor de transcripción de un conjunto de genes, entre ellos p21. Al inducir la transcripción de p21, p53 funciona como un regulador negativo del ciclo celular, ya que P21 lo bloquea en la transición G1-S uniéndose a complejos ciclina-CdK responsables de conducir a la célula a la fase S (Thompson 2012).

Otras proteínas involucradas en la detención del ciclo celular frente al daño en el ADN son las proteínas Chk1 y Chk2, las que son activadas al ser fosforiladas, y fosforilan a su vez proteínas

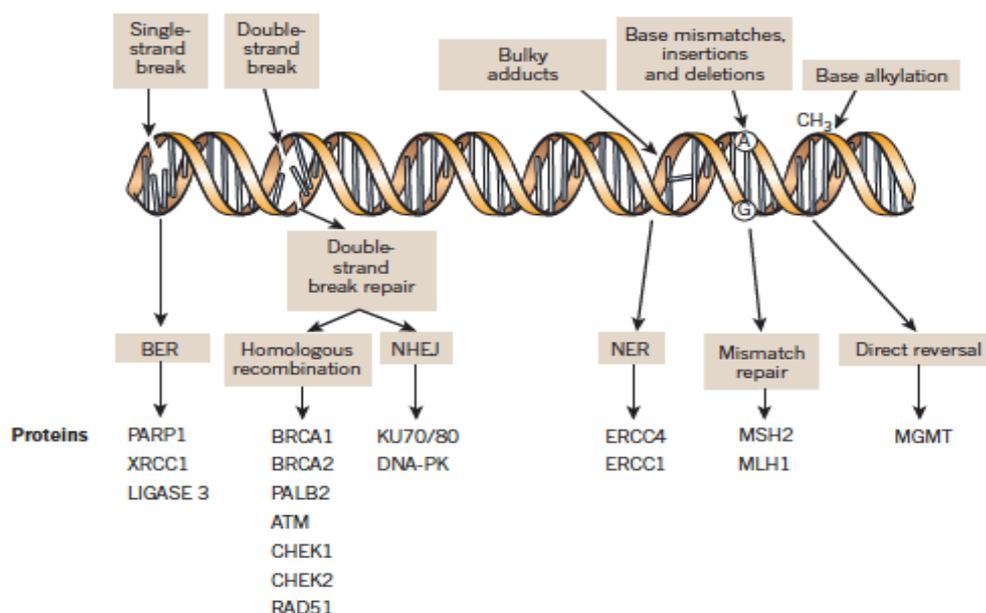
corriente abajo en la cascada de transducción de la señal (Nyberg et al 2002). Entre sus sustratos se encuentra BRCA1, que conduce a la detención del ciclo en las fases S y G2 y participa en la reparación del ADN al ser fosforilada por ATM, ATR y Chk2 (Cortez et al. 1999; Xu et al. 2001; Gudmundsdottir y Ashworth 2006). BRCA1 funciona como un adaptador entre la respuesta inicial y el resto de los sustratos en la transducción de la señal. Mutaciones en el gen que codifica para BRCA1 se han encontrado asociadas al desarrollo de cáncer de mama y ovario (Camphausen et al. 2004; Ramus et al. 2007).

En el caso de que el daño no pueda ser reparado o sea reparado en forma errónea puede desencadenarse la apoptosis mediada por p53 o la muerte mitótica (Kolesnick y Fuks 2003). p53 es activada por ATM tanto directa como indirectamente a través de la fosforilación de Chk2 (Figura 5). En células en proliferación, la exposición a agentes genotóxicos como las radiaciones ionizantes puede conducir a la muerte mitótica. Este fenómeno ocurre como resultado de la segregación incompleta de los cromosomas, y puede inducir apoptosis tanto en la célula progenitora como en las células hijas (Potten y Wilson 2004).

La imposibilidad de inducir la detención del ciclo celular o el proceso apoptótico frente al daño generado en el ADN podría aumentar la sobrevivencia de las células a los agentes genotóxicos, volviéndolas más resistentes a los mismos. Esto ocurre en muchas células cancerígenas en las que el gen que codifica para p53 se encuentra deletado o mutado, siendo incapaces de desencadenar estos procesos (Marple et al. 2004).

### ***1.2.1- Reparación del daño en el ADN***

En la reparación del daño en el ADN participan diferentes mecanismos, dependiendo del tipo de lesión inducido. Se han descrito cuatro mecanismos principales: reparación por escisión de bases (Base Excision Repair - BER), reparación por escisión de nucleótidos (Nucleotide Excision Repair NER) y en el caso de RDCs: reparación por recombinación homóloga (HR) y reparación por unión de extremos no homólogos (Non Homologous End Joining - NHEJ). La estabilidad genómica es también asegurada por un conjunto de sistemas de corrección de errores en la replicación que incluye reparación de apareamientos erróneos de bases nitrogenadas o “Mismatch Repair” (MMR) y “bypass” replicativo de las ADN polimerasas (Friedberg et al. 2006) (Figura 6).



**Figura 6** – Esquema de los principales mecanismos de reparación del ADN. La elección del mecanismo que va a estar operativo depende del tipo de lesión inducido. Se presentan las proteínas clave que participan en cada uno. BER – Reparación por escisión de bases. NER – Reparación por escisión de nucleótidos. NHEJ – Unión de extremos no homólogos. Extraída de Lord y Ashworth (2012).

### 1.2.1.1- Reparación de bases y nucleótidos dañados

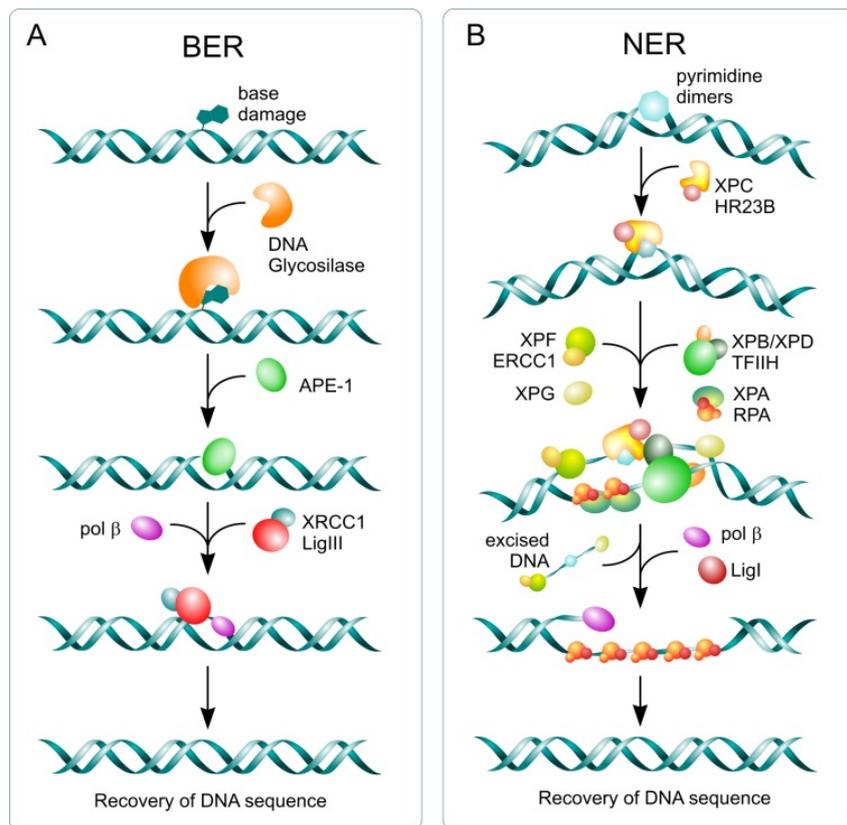
#### **Reparación por escisión de bases (BER)**

Las bases nitrogenadas oxidadas como la 8-oxoGuanina, o bases alquiladas, sitios abásicos generados por depurinación espontánea, así como las bases añadidas erróneamente son reparados por el sistema BER (Lindahl 2000). La primera etapa en este sistema implica la acción de diferentes ADN glicosilasas específicas para cada tipo de base dañada. Las mismas reconocen y remueven las bases modificadas hidrolizando los enlaces N-glucosídicos generando sitios apurínicos/apirimidínicos (AP) (Figura 7a). Estos sitios AP son reparados mediante la participación de una endonucleasa AP que cliva el enlace fosfodiéster, ADN polimerasas y ADN ligasas (Hoeijmakers 2001; Peterson y Côté 2004). En general, las lesiones que son sustratos del BER no distorsionan el esqueleto del ADN suficientemente como para detener la replicación del ADN, por lo que la inactivación de este mecanismo de reparación puede ser altamente mutagénico (Peterson y Côté 2004). A su vez, en estudios con modelos animales, se ha visto que la inactivación de las proteínas que intervienen en el BER es letal (Hoeijmakers 2001).

#### **Reparación por escisión de nucleótidos (NER)**

La vía de reparación NER es empleada para la remoción de una variedad de lesiones que distorsionan la estructura del ADN. Entre otras se incluyen dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs), 6-4 fotoproductos pirimidina pirimidona (6-4 PPs) inducidos por la luz UV, aductos en el ADN inducidos por agentes químicos como cisplatino y óxido 4-nitroquinolina, los que interfieren con el apareamiento de bases y bloquean la replicación y transcripción del ADN (Hassa y Hottiger

2005). Se ha estimado que mediante la vía NER se reparan cerca del 70% de las lesiones en el ADN inducidas por el medio ambiente. Dependiendo del mecanismo de reconocimiento de la lesión se distinguen dos vías: la vía acoplada a la transcripción (TCR), que repara las lesiones que ocurren en la hebra del ADN transcrita de los genes activos; y la vía de reparación genómica global (Global Genomic Repair - GGR) que repara las lesiones en el ADN no transcrito (De Boer y Hoeijmakers, 2000) (Figura 7b). Ambas vías involucran cuatro etapas: a) detección de la lesión; b) reclutamiento del complejo TFIIH, que dirige el desenrollamiento del ADN en torno al nucleótido dañado; c) reclutamiento de las endonucleasas ERCC1-XPF y XPG, que generan cortes en 5' y 3' de la lesión y remueven el nucleótido dañado; y d) síntesis del ADN dirigida por la ADN polimerasa  $\beta$ , PCNA y otros factores accesorios. En el reconocimiento de la lesión, en el TCR participan CSA y CSB, los que se cree dirigen a la maquinaria básica hacia la ARN polimerasa II detenida en la lesión (Mitchell et al. 2003). En el caso del GGR, en el reconocimiento del daño participan el complejo XPC-hHR23B y el complejo UV-DDB/XPE (Volker et al. 2001). Defectos en las proteínas que participan en el NER son la causa de tres síndromes recesivos raros: Xeroderma pigmentoso, Síndrome de Cockayne y Tricodistrofia (De Boer y Hoeijmakers 2000; Cleaver et al. 2009).



**Figura 7** – Mecanismos de reparación por escisión de bases (BER) y de nucleótidos (NER). Ambos mecanismos emplean la cadena de ADN complementaria para restaurar la información de secuencia nucleotídica perdida en la cadena de ADN dañada. **A)** Representación esquemática de las etapas básicas que ocurren durante el BER. **B)** Principales eventos y actividades enzimáticas implicadas en la vía de reparación genómica global (GGR) del NER. Extraída de Mladenov e Iliakis (2011 b).

### 1.2.1.2- Reparación de rupturas de doble cadena

La reparación de rupturas de doble cadena (RDCs) en eucariotas depende de dos mecanismos que funcionan en forma complementaria: la reparación por recombinación homóloga (HR) y la reasociación de extremos no homólogos (NHEJ). Esta última a su vez presenta dos vías, una más precisa que involucra a la proteína quinasa dependiente de ADN (DNA-PK), y otra independiente de esta enzima más propensa a producir errores (Lees-Miller y Meek, 2003).

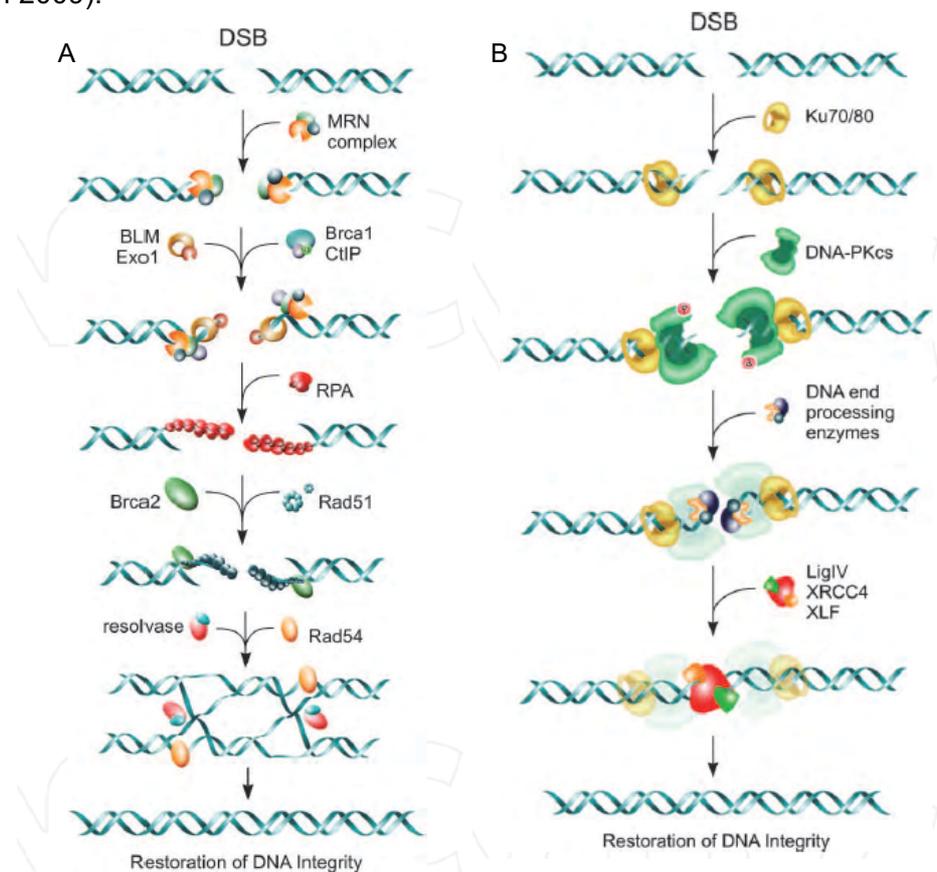
Ambos mecanismos han sido altamente conservados durante la evolución, pero su importancia relativa es diferente entre eucariotas superiores e inferiores. En eucariotas inferiores, como *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, la vía empleada con mayor frecuencia es la de HR. Este mecanismo es generalmente una vía libre de errores ya que se requiere una secuencia de ADN homóloga como molde, generalmente la cromátida hermana, por lo que solo puede llevarse a cabo tras la replicación del ADN, en las fases S y G2 del ciclo celular (Sonoda et al. 2006; Shen y Nickoloff 2007).

Al inicio de HR ocurre la resección de los extremos de ADN en el sitio de la RDC para generar tramos de ADN de simple cadena terminados en 3', los que pueden invadir una molécula de ADN de doble cadena conteniendo una secuencia homóloga. Este proceso involucra al complejo MRN, el que posee actividad exonucleasa 3'→5' (Figura 8 a). La región de ADN de simple cadena generada es cubierta por la proteína de replicación A (RPA), la que luego es reemplazada por Rad51, quien promueve la invasión del molde de ADN homólogo. Dependiendo de la naturaleza del proceso, podría formarse un intermediario de Holliday, seguido de migración de las ramas y la posterior resolución de esta estructura. En este mecanismo actúan los miembros del grupo epistático de Rad52 (Rad50, Rad51, Rad52, Rad54, Rad55, Rad57, Rad59, Mre11 y Xrs2), la mayoría de los cuales fueron identificados por ser requeridos en la reparación del daño inducido en el ADN por radiaciones ionizantes en *Saccharomyces cerevisiae* (Peterson y Côté 2004). Los productos de los genes de susceptibilidad al cáncer de mama, BRCA1 y BRCA2, están también involucrados en la modulación de HR. BRCA2 funciona regulando la unión de Rad51 al ADN y BRCA1 también tendría un rol regulatorio en el proceso (Jeggo y Löbrich 2006) (Figura 8 a).

Sin embargo, NHEJ es el mecanismo predominante en mamíferos y no se encuentra restringido a ninguna fase del ciclo celular, a diferencia de HR, que es activa solo en las fases S y G2. Es el único mecanismo activo durante la fase G1, cuando no existe una cromátida hermana para que se produzca la recombinación (Mimitou y Symington, 2009). En esta vía de reparación los extremos rotos son procesados por nucleasas y emparejados con otra secuencia de escasa o ninguna homología, no requiriendo sinapsis del ADN dañado con otra molécula de ADN no dañada (Jackson 2002; Ayene et al. 2005).

La reparación mediante NHEJ es más rápida, pero introduce errores, ya que se pierde la secuencia del lugar donde ocurre la RDC y la unión de extremos de secuencias situadas en dos cromosomas diferentes puede originar translocaciones (Wood et al. 2001; Sonoda et al. 2006; Shen y Nickoloff 2007).

En NHEJ las principales proteínas involucradas son el heterodímero denominado Ku formado por Ku70 y Ku80 (Figura 8 b). El mismo se une a los extremos de RDCs de manera independiente de la secuencia de ADN y recluta al complejo formado por la subunidad catalítica de DNA-PK (DNA-PKcs) y la proteína Artemis. También participan el complejo formado por la ADN Ligasa IV y XRCC4 (fosfoproteína) que realiza la reunión de los extremos (Ayene et al. 2005) (Figura 8 b). Por lo tanto, la elección del mecanismo a ser utilizado depende tanto de la fase del ciclo celular en que se encuentra la célula, así como del manejo inicial de la RDC. Por ejemplo, si los extremos 5' de la cadena de ADN dañada son degradados por nucleasas para producir colas 3' de cadena simple, que son el sustrato de RAD51, se iniciará el mecanismo de HR, inhibiéndose el de NHEJ (Mimitou y Symington 2009).



**Figura 8-** Esquema de los mecanismos de reparación de rupturas de doble cadena en el ADN (RDCs).

**A)** Reparación por recombinación homóloga (HR). Se presentan las principales proteínas que participan en esta vía. **B)** Reparación por reasociación de extremos no homólogos (NHEJ) (subvía dependiente de DNAPKcs). Se muestran las principales actividades enzimáticas involucradas en este mecanismo. Extraída de Mladenov e Iliakis (2011b).

### **1.2.1.3- Reparación del daño mediado por inhibidores de la Topoisomerasa II (TopoII)**

A pesar de la importancia biológica y clínica del daño inducido por los inhibidores de la TopoII, como el etopósido, aún no han sido comprendidos en su totalidad los mecanismos moleculares mediante los que ocurre su reparación. Para que las RDCs generadas por la inhibición de TopoII puedan ser reparadas, primeramente los complejos covalentes TopoII-ADN deben ser reconocidos como daño en el ADN. Esto ocurriría como consecuencia del bloqueo de la

replicación y la transcripción generada por la unión covalente entre la Topoll y el ADN (Nitiss 2009).

Una vez que los complejos son reconocidos como daño, la Topoll unida al ADN debe ser removida. Para ello se han planteado dos mecanismos posibles. Por un lado, se podría escindir la lesión por digestión nucleolítica del ADN que forma parte del aducto ADN-proteína. Mediante estudios en levaduras se ha demostrado que este mecanismo actúa en la remoción de complejos covalentes formados por la Topol con participación de la tirosil ADN fosfodiesterasa I (Pouliot et al. 1999; Liu et al. 2004). A su vez, existen evidencias de este mecanismo en el caso de Topoll en levaduras de fisión (Hartsuiker et al. 2009).

El otro mecanismo planteado implica la degradación proteolítica de la Topoll unida al ADN como primer paso en el procesamiento del daño. En este sentido, se ha constatado que los complejos covalentes estabilizados por los inhibidores de Topoll, ya sea formados por la Topoll $\alpha$  como por la Topo II $\beta$ , son degradados proteolíticamente por la vía ubiquitina/proteasoma. A su vez, la tirosil ADN fosfodiesterasa II hidroliza las uniones fosfodiéster 5'-tirosina convirtiéndolas en extremos 5'-fosfato libres pasibles de ser unidos con el resto de la cadena de ADN (Cortés-Ledesma et al. 2009; Gao et al. 2014).

Esta degradación dejaría expuestas las RDCs generadas en el ADN, las que podrían ser detectadas por los complejos sensores e iniciarse la respuesta al daño en el ADN (Adachi et al. 2003; Zhang et al. 2006). Se ha observado que la proteólisis de la Topoll es bloqueada tanto por inhibidores del proteasoma como de la transcripción, aunque no por afidicolina (inhibidor de la replicación), por lo tanto es dependiente solo de la transcripción. Sin embargo, ninguno de estos tres inhibidores suprimió totalmente la señalización del daño inducido en el ADN ni afectó sustancialmente la inducción de p53. Es decir que no suprimieron el desencadenamiento de la respuesta al daño en el ADN (Fan et al. 2008).

Por lo tanto, existen al menos dos vías diferentes involucradas en el procesamiento del daño inducido por los inhibidores de Topoll: una dependiente de la transcripción, en la que el procesamiento es iniciado por la proteólisis de la Topoll que integra el complejo covalente; y otra dependiente de la replicación, independiente del proteasoma (Fan et al. 2008).

Una vez que las RDCs se encuentran libres de proteínas son reparadas por la/s vía/s de reparación apropiadas. NHEJ sería la vía principal involucrada y a su vez participaría en las translocaciones oncogénicas generadas por drogas como el etopósido causantes de malignidades secundarias (Ayene et al. 2005; Malik et al. 2006; Kantidze y Razin 2007). El rol de Ku en la respuesta celular a inhibidores de la Topoll ha sido demostrado empleando cepas deficientes en la reparación de RDCs por mutación de Ku, las que son hipersensibles a etopósido. Sin embargo la deficiencia en DNA-PKcs no sería limitante para la reparación de este tipo de lesiones (Ayene et al. 2005).

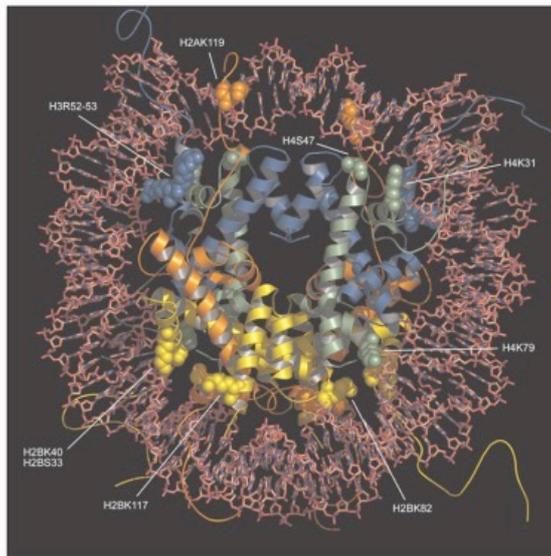
El mecanismo de reparación HR también participaría en el procesamiento de las RDCs generadas por inhibidores de Topoll, aunque resta por determinar aún su importancia en la reparación de este tipo de lesiones (Powell y Kachbic 2008; Treszezamsky et al. 2007).

### **1.3- Cambios epigenéticos en la respuesta celular al daño en el ADN**

#### ***1.3.1– Estructura de la cromatina***

En las células eucariotas, la detección, señalización y respuesta al daño en el ADN ocurren en el contexto de la cromatina, la cual es una estructura altamente compacta. El nucleosoma constituye su unidad fundamental, estando compuesto por un tramo de 147 pares de bases de ADN que realiza casi dos giros completos alrededor de un octámero de histonas integrado por las histonas H2A, H2B, H3 y H4 (Wolffe 1998) (Figura 9).

Las histonas son proteínas básicas con predominio de lisinas y argininas, que presentan alta afinidad por el ADN y permiten su plegamiento. Las cuatro histonas que forman el octámero contienen un dominio globular carboxi-terminal (C-terminal) compuesto por tres  $\alpha$ -hélices conectadas por dos “loops”, lo que permite interacciones heterodiméricas entre ellas (Arents et al. 1995), y un extremo amino-terminal (N-terminal) flexible o cola que sobresale de la estructura del nucleosoma y que contiene la mayoría de los residuos de lisina. El extremo N-terminal podría estar involucrado en interacciones internucleosómicas y puede ser objeto de diversas modificaciones post-traduccionales (Peterson y Laniel 2004; Mariño-Ramírez et al. 2005). El dominio C-terminal contacta con otras histonas del nucleosoma y con el esqueleto fosfodiéster del ADN a través de tres a seis puentes de hidrógeno (Davey et al. 2002). La falta de contactos específicos entre las histonas del octámero y las bases del ADN explica cómo los nucleosomas pueden empaquetar al ADN de manera independiente de la secuencia (Luger et al. 1997). Mediante cálculos de potencial electrostático de la superficie del núcleo del nucleosoma se observó la existencia de regiones cargadas positivamente en las colas de las histonas y a lo largo de la superficie del octámero que contacta con el ADN de forma inespecífica, mientras que la superficie interna del núcleo del nucleosoma resultó cargada negativamente (Mariño-Ramírez et al. 2005).



**Figura 9** – Cada cadena aminoacídica correspondiente a las diferentes histonas se representa con un color diferente. En azul se representa a la histona H3, en gris H4 y en naranja y amarillo a las histonas H2A y H2B respectivamente. En rojo se representa al ADN rodeando al octámero de histonas. Se puede observar el dominio C-terminal integrado por  $\alpha$ -helices y las colas N-terminales sobresaliendo del nucleosoma por fuera de la superficie del ADN. (Protein Data Bank accession code 1KX5). Extraído de Mariño-Ramírez et al. 2005.

Estudios de la estructura cristalográfica del nucleosoma a una resolución de 2.8 Å revelaron que las unidades H3 y H4 forman un tetrámero, al que se unen dos dímeros integrados por H2A y H2B. El tetrámero representa el diámetro del octámero (11 nm) y los dos dímeros se unen a ambos lados del mismo. El ADN existente entre nucleosomas adyacentes (ADN espaciador) es de longitud variable (de 10 a 80 pares de bases), formando una estructura que se asemeja a un collar de cuentas que representa el primer nivel de compactación del ADN en el núcleo (Luger et al. 1997; Mariño-Ramírez et al. 2005). Esta estructura se pliega sobre sí misma en niveles de organización de mayor compactación, estabilizada por la histona H1 (Felsenfeld y Groudine 2003; Li y Zhu 2015).

### **1.3.2- Remodelación de la cromatina**

La cromatina cumple diversas funciones, además de compactar y proteger al ADN contribuye a preservar la información genética y regular la expresión génica (Loizou et al. 2006). Es por tanto una estructura altamente dinámica que varía localmente su grado de empaquetamiento durante el ciclo celular en los procesos de replicación, transcripción, recombinación y reparación del ADN. La organización de la cromatina puede ser modificada por mecanismos como la remodelación dependiente de ATP, la incorporación de variantes de histonas y las modificaciones postraduccionales de las histonas (PTMs), las que forman parte de los mecanismos denominados epigenéticos.

Los **remodeladores dependientes de ATP** consisten en grandes complejos multiproteicos que alteran el posicionamiento de los nucleosomas mediante la hidrólisis de ATP conduciendo al reemplazo, reposicionamiento y en algunos casos la remoción de nucleosomas de la cromatina (Tsukiyama 2002; Saha et al. 2006). Dependiendo de sus subunidades catalíticas, las que

pertenecen a la superfamilia de ATPasas SWI2/SNF2, pueden ser divididas en cuatro clases: SWI/SNF, ISWI, CHD e INO80 (Van Attikum y Gasser 2009). El complejo SWI/SNF ha sido relacionado con la regulación de promotores específicos participando en el control de la expresión génica. En general, los complejos de remodelación dependientes de ATP serían utilizados en primera instancia para modificar la estructura de la cromatina y posteriormente participarían otros procesos como la acetilación o deacetilación para fijar dicha estructura en un estado activo o reprimido (Peterson y Workman, 2000).

A su vez, la composición de los nucleosomas puede ser alterada mediante la incorporación de **variantes de histonas** con funciones especializadas (Kamakaka y Biggins, 2005; Bassett et al. 2009; Venkatesh y Workman 2015). Estas histonas no se sintetizan en la fase S del ciclo celular y se incorporan a la cromatina de forma independiente a la replicación del ADN. La histona H2A es la que presenta un mayor número de variantes, entre ellas H2A.X, H2A.Z y MacroH2A. Estas dos últimas se han encontrado asociadas a represión transcripcional (Costanzi y Pehrson 1998; Rangasamy et al. 2003), mientras que la histona H2A.X está involucrada en la respuesta al daño en el ADN (Rogaku et al. 1999). La histona H3 presenta dos variantes principales, la H3.3 que se localiza en las regiones transcripcionalmente activas (Ahmad y Henikoff 2002), y la variante centromérica CENP-A en mamíferos, necesaria para una correcta segregación cromosómica (Folco et al. 2008). La incorporación en forma combinada en los nucleosomas de estas variantes de las histonas H3 y H2A provee múltiples posibilidades para generar dominios de cromatina con diferentes propiedades (Hassa y Hottiger 2005).

Finalmente, las **modificaciones postraduccionales de las histonas (PTMs)** constituyen modificaciones covalentes reversibles en los residuos aminoacídicos e incluyen a la fosforilación de serinas y treoninas; acetilación de lisinas; metilación de lisinas y argininas; biotilación, ubiquitinación y sumoylación de lisinas; y poli-ADP-ribosilación en residuos de arginina y glutamato (Fischle et al. 2003; Hassa y Hottiger 2005). Estas modificaciones ocurren fundamentalmente en los extremos amino terminales (N-terminales) de las histonas aunque también se han observado modificaciones en sus dominios C-terminales globulares (Ng et al. 2002; Zhang 2003; Mersfelder y Parthun 2006).

Las diferentes PTMs modulan la estructura de la cromatina, influyendo en su estado de compactación alterando las estructuras de orden superior (Zheng y Hayes 2003), y aumentando la movilidad de los nucleosomas por medio de cambios en la interacción de las histonas del octámero y el ADN (Cosgrove et al. 2004; Mariño-Ramírez et al. 2005). De esta manera, determinan la transición entre estados de la cromatina transcripcionalmente activos e inactivos, otorgando así un nivel superior de regulación de la expresión génica y posibilitando los procesos de replicación, recombinación y reparación del ADN (Turner 1998; Strahl y Allis, 2000). Tal como se detallará más adelante en este capítulo, las PTMs son reguladas dinámicamente en respuesta al daño en el ADN tanto a nivel local en los sitios dañados, como a nivel global (Gong et al. 2016).

La importancia de los diferentes procesos de modificación y remodelación de la cromatina ha sido demostrada por su influencia durante el desarrollo y por el hecho de que su incorrecta regulación puede conducir a enfermedades humanas como el cáncer (Zhang y Dent 2005; Loizou et al. 2006; Lafon-Hughes et al. 2008). En este sentido, los cambios epigenéticos han cobrado gran importancia como los eventos clave en la patogénesis de varios tipos de cáncer (Purrucker y Mahlknecht 2010).

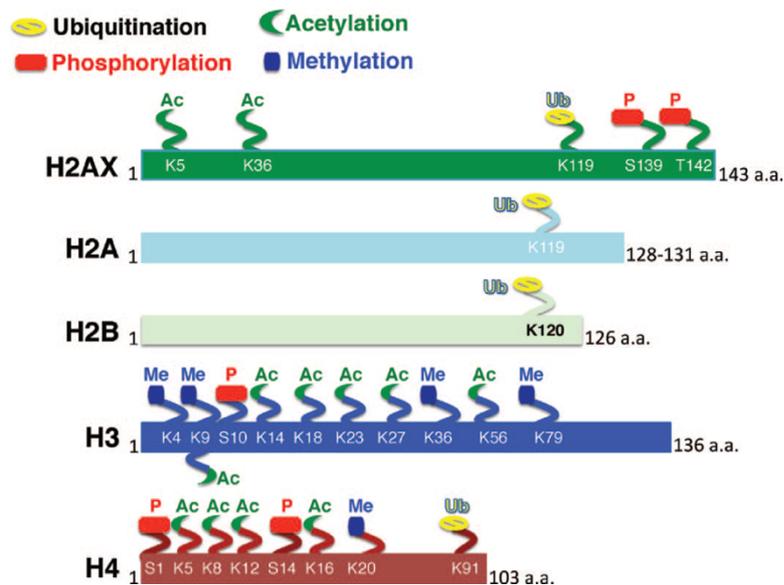
Se ha determinado la existencia de un “código de histonas” en la regulación de la expresión génica, donde diferentes PTMs permiten el reclutamiento de diferentes factores asociados a la cromatina (Strahl y Allis, 2000; Esteller y Almouzni 2005; Turner 2005). En este sentido, se ha descrito la unión específica de determinadas proteínas, entre ellas factores de transcripción, a lisinas acetiladas mediante dominios de unión específicos denominados bromodominios. La unión a lisinas o argininas metiladas ocurre mediante cromodominios, dominios Tudor, PHD (Plant Homeo Domain) y MBT (Malignant brain tumor) (Jenuwein y Allis 2001; Legube y Trouche 2003, Lans et al. 2012), mientras que la unión a histonas fosforiladas es realizada por medio de dominios de la familia de proteínas 14-3-3 (Kouzarides 2007).

De manera análoga a la transcripción génica, en la respuesta al daño en el ADN (DDR) el código epigenético también posee un rol regulatorio (Hassa y Hottiger 2005; Loizou et al. 2006; Karagiannis y El-Osta 2007), requiriéndose la modificación de la estructura de la cromatina ya sea para el reconocimiento inicial de las lesiones, así como para el reclutamiento de los factores de reparación (Karagiannis y El-Osta 2007). Las diferentes PTMs pueden influir tanto durante la señalización del daño, así como en la apertura o la restauración de la estructura cromatínica a su estado original luego de concluida la reparación (Hunt et al. 2013). Se ha demostrado que las diferentes PTMs poseen un rol primordial en la DDR facilitando el acceso de las proteínas de reparación a los sitios dañados y sirviendo como una plataforma de interacción para ellas (Escargueil et al. 2008; Pandita y Richardson 2009; Méndez-Acuña et al. 2010; Gong et al. 2016).

Por otra parte, al igual que para la regulación transcripcional, en la DDR se ha propuesto que la acción concertada de enzimas modificadoras de histonas, como HATs y HDACs, complejos remodeladores dependientes de ATP y variantes de histonas, colectivamente regularía la estructura de la cromatina para inducir las vías de HR y NHEJ (Soria et al. 2012). Existiría un acoplamiento funcional entre enzimas remodeladoras dependientes de ATP y modificadoras de histonas, aunque habrían diferencias en la acción de ambos tipos de complejos en el control transcripcional y en la reparación del ADN (Peterson y Côté 2004; Bassal y El-Osta 2005). Los complejos remodeladores dependientes de ATP participarían en la DDR aumentando la accesibilidad a la cromatina mediante la remoción o el intercambio de histonas por sus variantes en la vecindad de los sitios dañados (Corpet y Almouzni 2009). A su vez, la incorporación de variantes de histonas participaría en la reversión de la PTMs permitiendo la restauración de la conformación de la cromatina una vez que la reparación del daño ha finalizado (Polo y Almouzni 2007).

En la Figura 10 se presentan los residuos específicos de las histonas que son modificados postraduccionalmente durante la respuesta a la inducción de RDCs. Además de las PTMs que ocurren luego de inducido el daño en el ADN, el estado inicial de las modificaciones de histonas pre-existente a la generación del daño también pueden influir en la DDR. Por ejemplo, proteínas como 53BP1 requieren la presencia de metilación en determinadas lisinas de las histonas H3 y H4 (H3K79me y H4K20me respectivamente) y la acetilación de H3 en la lisina 56 (H3K56ac) para asociarse a los sitios dañados (Huyen et al. 2004; Botuyan et al. 2006; Das et al 2009). Estas tres modificaciones de histonas se encuentran normalmente presentes en la cromatina y no cambian en respuesta al daño en el ADN. H3K79 estaría metilada de forma constitutiva y resultaría expuesta debido a los cambios en la conformación de la cromatina luego de inducidas las RDCs, lo que permitiría el reclutamiento de 53BP1 (Huyen et al. 2004).

En la sección siguiente se profundiza en dos de las PTMs más estudiadas en relación a los mecanismos de reparación de RDCs, así como en la vía de reparación NER en respuesta al daño inducido por UVC.



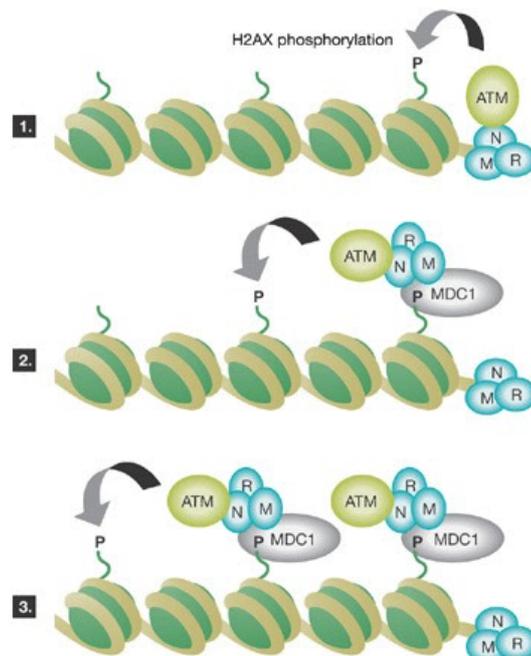
**Figura 10** – Principales modificaciones postraduccionales de las histonas en residuos específicos asociadas a la respuesta al daño en el ADN y la reparación de rupturas de doble cadena. Extraído de Hunt et al. (2013).

### 1.3.3- Fosforilación de histonas

#### 1.3.3.1- Fosforilación de histonas en la reparación de rupturas de doble cadena

La primera PTM que se descubrió asociada específicamente a las RDCs es la fosforilación de la variante H2A.X denominada  $\gamma$ H2AX, que representa de 10 a 15% de la histona H2A en mamíferos (Rogakou et al. 1999; Fernandez-Capetillo et al. 2004b). Luego de la inducción de RDCs, esta histona es fosforilada rápidamente en la serina 139 de su extremo carboxi-terminal alcanzando su máximo nivel a los 30 minutos aproximadamente luego de generadas las RDCs (Rogakou et al. 1998). Su fosforilación ocurre por un mecanismo dependiente de la acción de miembros de la

familia de quinasas PI3K, como ATM, ATR y DNA-PKcs (Burma et al. 2001; Ward y Chen 2001; Stiff et al. 2004). ATM es reclutada a los sitios de RDCs y activada por el complejo MRN por medio de una interacción entre el extremo C-terminal de uno de sus miembros (NBS1) y ATM (Lavin 2007). Esta fosforilación se extiende a megabases de distancia del sitio dañado y es requerida para la retención y acumulación de proteínas de reparación en este sitio (Thiriet y Hayes 2005; Loizou et al. 2006). Posiblemente esto ocurra por medio de interacciones entre el sector de la histona fosforilada y dominios específicos de factores de señalización de la reparación (Celeste et al. 2003) (Figura 11). Se ha constatado que se requiere a  $\gamma$ H2AX para la posterior amplificación de la señal de daño (Stucki y Jackson 2004). Esta histona fosforilada recluta a la proteína mediadora MDC1 (mediator of DNA damage checkpoint 1) (Stucki et al. 2005), la que a su vez induce el reclutamiento de 53BP1 (p53-binding protein 1) en la vecindad de las RDCs por medio de la ubiquitinación de la histona H2A. Tanto MDC1 como 53BP1 interactúan con MRN, resultando en una mayor acumulación de ATM en los sitios dañados (Goodarzi et al. 2010), generando un loop de retroalimentación que conduce a una mayor fosforilación de H2AX (Kinner et al. 2008) (Figura 11).



**Figura 11** – Modelo para la fosforilación de la histona H2AX regulada por MDC1: El complejo MRN (MRE11-RAD50-NBS1) se une a los extremos del ADN en los sitios dañados y recluta a ATM la que fosforila la H2AX proximal. Luego la proteína mediadora MDC1 se une a H2AX fosforilada y recluta más MRN-ATM. El nuevo pool de ATM fosforila H2AX distales del sitio de RDC, contribuyendo a la extensión de  $\gamma$ H2AX a regiones más distales. Extraída de West y van Attikum (2006).

El recuento de sitios con H2AX fosforilada (foci  $\gamma$ H2AX) ha sido descrito como un ensayo capaz de cuantificar las RDCs inducidas en el ADN (Rogakou et al. 1998). Como se detalla más adelante en las secciones 5.7 y 6.5.1.2, en este trabajo se emplearon anticuerpos anti- $\gamma$ H2AX con fluorocromos asociados para la cuantificación de focos de  $\gamma$ H2AX mediante microscopía de fluorescencia.

Otros eventos que se han observado luego de la inducción de RDCs son la fosforilación de la histona H2B en la serina 14 (H2BS14) (Fernandez-Capetillo et al. 2004a) y la fosforilación por DNA-PKcs de la histona H1. Esta última se ha constatado que es requerida para una reparación eficiente por el sistema NHEJ (Loizou et al. 2006).

La fosforilación de la serina 1 ubicada en el extremo amino-terminal de la histona H4 (H4S1) también se ha visto implicada en la respuesta a RDCs y sería importante en la vía de reparación NHEJ (Cheung et al. 2005; Utlej et al. 2005). Utlej et al. (2005) sugirieron que dicha fosforilación ocurriría después de la desacetilación de la histona H4 y que estas modificaciones postraduccionales podrían regular la restauración de la estructura de la cromatina luego de ocurrida la reparación.

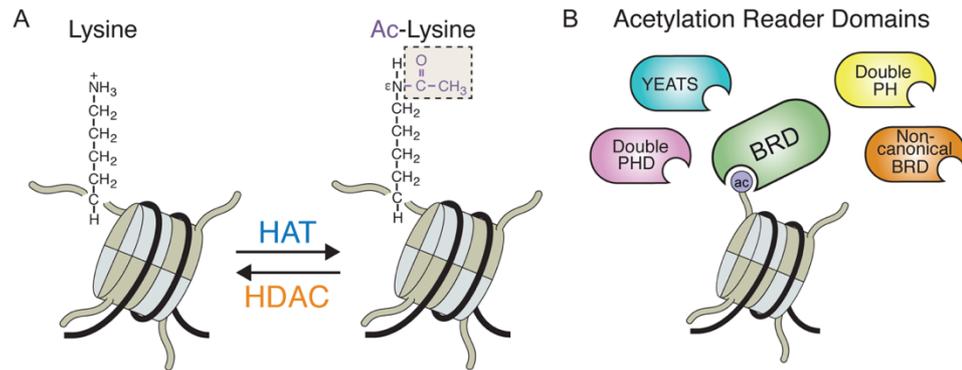
Se han identificado dos fosfatasas responsables de la desfosforilación de las histonas H2A/H2AX. En levaduras se describió a la fosfatasa Pph3 (Keogh et al. 2006) y en células de mamíferos a PP2A (Chowdhury et al. 2005). Sin embargo, se ha observado que la disminución de  $\gamma$ H2AX en los sitios dañados es independiente de Pph3, lo que sugirió que la desfosforilación de  $\gamma$ H2AX ocurriría luego de ser reemplazada por la histona H2A en la cromatina (Keogh et al. 2006). Dado que cepas mutantes en Pph3 resultaron defectuosas en la recuperación del checkpoint G2/M, se ha propuesto que la remoción de la marca de fosforilación sería necesaria para disminuir la señal de daño en el ADN (Loizou et al. 2006).

### ***1.3.3.2- Fosforilación de histonas en la vía de reparación NER***

A pesar de que no existen evidencias sobre la activación de las quinasas de la familia PI3K por las lesiones reparadas por el sistema NER, se ha constatado que cuando la horquilla de replicación se detiene en los sitios dañados se crean rupturas de simple cadena (RSCs), éstas pueden ser cubiertas por RPA/ATRIP y así activar la actividad quinasa de ATR (Martínez-López et al. 2013). En este sentido, se ha observado que luego de la irradiación UV varias histonas son fosforiladas, entre ellas la histona H2AX formando  $\gamma$ H2AX (Hanasoge y Ljungman 2007) y la histona H2A en las serinas 2, 18 y 122 (Moore et al. 2006). A su vez, durante el NER dos residuos aminoacídicos de la histona H3: S10 y T11 son blanco de fosforilación diferencial. Ambos son defosforilados por la irradiación UV y re-fosforilados luego de que el daño ha sido reparado. La hipofosforilación de la histona H3 en los residuos aminoacídicos H3S10 y H3T11 está asociada con represión transcripcional, por lo que esta modificación podría ser uno de los mecanismos que la célula emplea para inhibir la transcripción en los sitios dañados por UVC (Dinant et al. 2008).

### 1.3.4- Acetilación de histonas

Junto con la fosforilación, la acetilación es la modificación postraduccional de histonas mejor caracterizada. Esta modificación covalente implica la adición de un grupo acetilo (-COCH<sub>3</sub>) a los grupos ε-amino de un residuo de lisina en histonas y proteínas no histónicas. La acetilación es catalizada por acetil-transferasas de histonas (HATs) (Verdin y Ott 2015; Lee y Workman 2007), mientras que la remoción del grupo acetilo es realizada por desacetilasas de histonas (HDACs) (Yang y Seto 2008) (Figura 12 a). Los niveles de acetilación son regulados por el balance entre las actividades de HATs y HDACs (Gong y Miller 2013).



**Figura 12- a)** Representación esquemática de la acetilación y desacetilación de los extremos N-terminales en los residuos de lisina de las histonas que forman el nucleosoma catalizadas por acetil-transferasas (HATs) y desacetilasas de histonas (HDACs) respectivamente. **b)** Las lisinas acetiladas son reconocidas por proteínas que contienen bromodominios (BRD) y otros dominios de unión a lisinas acetiladas. Extraída de Gong et al. 2016.

En el nucleosoma, las histonas del octámero pueden ser acetiladas en múltiples residuos de lisina. En la mayoría de las especies los principales residuos donde se produce acetilación en la histona H3 son las lisinas 9, 14, 18, 23 y 56 y en la histona H4 las lisinas 5, 8, 12 y 16 (Davie 2003) (Figura 10). Una de las funciones principales de la acetilación es la regulación de la estructura de la cromatina. Esta modificación interfiere en el plegamiento de la cromatina conduciendo a su descompactación (Hebbes et al. 1994; García-Ramírez et al. 1995; Wang et al. 2001), mientras que la desacetilación resulta en su compactación (Kornberg y Lorch 1999). Esto ocurre a causa de su efecto en las interacciones de las histonas con el ADN y/o con otras proteínas, ya que neutraliza las cargas positivas de los residuos de lisina y disminuye la afinidad entre las histonas y el ADN, lo que conduce a una estructura más laxa (Jeppesen 1997; Davie 2003; Legube y Trouche 2003). A su vez, la acetilación de los extremos N-terminales de las histonas afectaría las interacciones internucleosómicas induciendo cambios en las estructuras cromatínicas de orden superior (Zheng y Hayes 2003; Mariño-Ramírez et al. 2005).

La importancia de la señalización por medio de la acetilación ha sido bien establecida en muchos procesos celulares, tal como la regulación de la expresión génica. Mientras que la acetilación induce la activación transcripcional, la desacetilación ejerce el efecto opuesto (Davie 2003; Shahbazian y Grunstein 2007). La acetilación de la histona H4 en la lisina 14 (H4K14ac) es la

que aparece con mayor frecuencia en la cromatina activa transcripcionalmente, estando implicada en la regulación de la topología del ADN y en la inhibición de la fibra de 30 nm, asociada por tanto a una estructura cromatínica más laxa (Shogren-Knaak et al. 2006). Al ser reclutadas las HATs hacia un promotor génico aumentan localmente el nivel de histonas acetiladas e inducen su actividad transcripcional (Davie 2003). Se ha observado que no es necesario que los nucleosomas sean acetilados en su totalidad para impedir la compactación de la cromatina. Tse et al. (1998) demostraron que la acetilación del 46% del máximo de sitios es suficiente para inhibir el nivel de plegamiento superior de la cromatina e inducir la transcripción.

Por otra parte, se ha constatado que las proteínas acetiladas pueden ser reconocidas por proteínas con dominios de unión a lisinas acetiladas, principalmente bromodominios (BRD), aunque existen otros dominios con capacidad de unirse a estas modificaciones postraduccionales (Musselman et al. 2012; Filippakopoulos et al. 2012; Li et al. 2014) (Figura 12 B). Se ha propuesto que el reclutamiento de otras proteínas que interactúan con los sitios acetilados también podría controlar el grado de condensación de la cromatina (Bottomley 2004).

Al igual que en la transcripción, la acetilación de histonas tiene un rol fundamental en la regulación de la respuesta celular al daño en el ADN (DDR). Tanto la acetilación de histonas del nucleosoma como de las variantes de histonas en diversos sitios, se han visto involucradas en la reparación del daño inducido en el ADN (Méndez-Acuña et al. 2010).

#### ***1.3.4.1- Acetiltransferasas de histonas (HATs)***

Las HATs son las enzimas responsables de transferir un grupo acetilo de la acetil coenzima A a ciertas lisinas que componen tanto proteínas histónicas como no histónicas (Figura 12 a). De acuerdo a su estructura y homología de secuencia se clasifican en 3 familias: GNAT, que incluye GCN5 y PCAF; CBP/P300; y MYST, que incluye a Tip60 (Farria et al. 2015).

Luego de la inducción de daño en el ADN se ha observado la acetilación de lisinas de diferentes histonas que participarían en la DDR. La HAT Tip60 se encuentra involucrada en la reparación de RDCs desde los eventos de señalización del daño tempranos hasta la elección de la vía de reparación a ser empleada. Por un lado, Tip60 acetila a ATM aumentando su actividad y por otro lado acetila a las histonas H2AX, H3 y H4. En la histona H4 acetila a la lisina 16 (H4K16ac) lo que promueve la vía de reparación HR. Sin embargo, la desacetilación de este mismo sitio promueve la reparación vía NHEJ (Gong y Miller 2013).

En la variante H2AX se constató la acetilación de la lisina 5 (H2AX K5ac) por parte de Tip60, y de la lisina 36 (H2AX K36ac) por CBP/p300 (Ikura et al. 2007; Xie et al. 2010). Otra HAT denominada MOF, integrante de la familia MYST, regula los niveles globales de H4K16ac. Las células deficientes en MOF presentan fallas en el reclutamiento de los factores de la DDR y una capacidad de reparación de RDCs reducida tanto por la vía HR como NHEJ (Sharma et al. 2010; Gong et al. 2016).

En la histona H3 luego de la inducción de RDCs los niveles globales de H3K9ac, H3K56ac y H3K14ac son regulados por la DDR (Tjeertes et al. 2009; Miller et al. 2010). Estas acetilaciones son dependientes de la HAT GCN5 y reclutan a su vez complejos remodeladores dependientes de ATP (Gong y Miller 2013).

En la Tabla 1 se presentan los diferentes sitios de acetilación y las HATs involucradas en la DDR en células de mamíferos.

Histone acetylation sites and enzymes involved in the DDR in mammalian cells.

	Name	Localization	DDR histone sites	DDR pathways	Recruitment
<b>Mammalian histone acetyltransferases (HATs)</b>					
KAT1	HAT1	N, C	n.d.	DDR [80]	n.d.
KAT2A	GCN5	N	H3K9/K14/K18/K23/56 [36,37,62]; H4K16 [36]	DDR [37,62]; NER [36]	UV [36]
KAT2B	PCAF	N	H3K9, H3K14 [81]	DDR [81]	n.d.
KAT3A	CBP	N	H3K56 [60]; H3K18, H4K5/K8/K12/K16 [52]; H2AXK36 [42]	NHEJ [52]; NER [82]	Laser damage [52]
KAT3B	p300	N	H3K56 [37,60,83]; H3K18, H4K5/K8/K12/K16 [52]; H2AXK36 [42]	NHEJ [52]; DDR [84,85]; NER [82]	Laser damage [52]; U
KAT4	TAF1	N	n.d.	DDR [87]	
KAT5	TIP60	N	H2AXK5 [28]; H4K16 [56,57]	HR [48,56,57]; DDR [45,88]	IR [88]; R.E. [48,56]
KAT8	MOF	N	H4K16 [46,53,89]	DDR [46,53]; NHEJ & HR [89]	n.d.
KAT13D	CLOCK	N, C	n.d.	DDR [90]	Laser damage [90]
Other HATs: MOZ (KAT6A), MORF (KAT6B), HBO1 (KAT7), ELP3 (KAT9), TFIIC90 (KAT12), SRC1 (KAT13A), ACTR (KAT13B), p160 (KAT13C)					

**Tabla 1** – Acetil-transferasas de histonas (HATs) involucradas en la respuesta celular al daño en el ADN (DDR) en células de mamíferos. Para cada enzima se presentan las lisinas específicas que acetilan, la vía de la DDR en la que se encuentra implicada y su localización celular. Debajo de la tabla se presentan las HATs que no se han observado involucradas en la DDR. Abreviaturas: N:nuclear; C:citoplasmática; n.d: no determinado; NER: reparación por escisión de nucleótidos; NHEJ: reparación por unión de extremos no homólogos; HR: reparación por recombinación homóloga; UV: radiación ultravioleta; IR: radiación ionizante; RE: enzima de restricción. Extraída de Gong y Miller 2013.

### 1.3.4.2- Desacetilasas de histonas (HDACs)

Hasta el momento se han identificado 18 HDACs en mamíferos, las que se han dividido en cuatro clases de acuerdo a su homología con las HDACs de levaduras. Las clases I, II y IV, también llamadas HDACs clásicas, comparten homología en sus secuencias y se diferencian de las de clase III (Sirtuínas) en sus mecanismos catalíticos. Mientras que las primeras requieren para su actividad la presencia de  $Zn^{+2}$ , las Sirtuínas necesitan  $NAD^+$  como cofactor (Witt et al. 2009).

Las HDACs de clase I comprenden a las HDAC-1, -2, -3, y -8, son nucleares, se expresan en forma ubicua en todas las células y poseen un rol importante en la regulación de la proliferación celular. Las HDACs 1 a 3 tienen una participación importante en la represión transcripcional, mientras que esta actividad no se ha constatado en el caso de HDAC8.

Las HDACs de clase II están subdivididas en dos clases según la homología en su secuencia y su organización en dominios: IIA y IIB. Las HDACs de clase IIA incluyen a las enzimas HDAC-4, -5, -7 y -9 y las de clase IIB a la HDAC6 y HDAC10. Esta clase de HDACs se diferencia de la clase I en los tejidos en que son expresadas, sus localizaciones subcelulares y sus roles biológicos. Son expresadas en tipos celulares específicos y están estrechamente ligadas a procesos de diferenciación celular, localizándose mayoritariamente en el citoplasma pero se pueden volver nucleares luego de diversos estímulos. En el caso de las HDACs de clase IIB, HDAC6 tiene como blanco la tubulina (Haggarty et al. 2003), mientras que se conoce poco aún sobre la función de HDAC10.

Las HDACs de clase III conforman la familia de las Sirtuínas, denominada así por su homología con SIR2 de levaduras. Esta clase comprende a SIRT-1 a 7, donde SIRT1, 6 y 7 son nucleares, SIRT2 es principalmente citoplasmática y SIRT-3 a 5 son mitocondriales.

La clase IV está conformada únicamente por la HDAC11, la cual es expresada principalmente en el núcleo en tipos celulares específicos.

En general, la actividad HDAC se encuentra asociada a cromatina condensada y transcripcionalmente inactiva. Como se comentó anteriormente, las HDACs, al retirar los grupos acetilo de las lisinas, producirían un aumento en las interacciones iónicas de las histonas cargadas positivamente y el ADN cargado negativamente, volviendo a la cromatina más compacta lo que dificultaría el acceso al ADN de los factores y maquinaria de transcripción.

Por otra parte, las HDACs tienen una participación importante en la DDR. En particular, HDAC1 y HDAC2 poseen un rol significativo en la vía de reparación de RDCs NHEJ mediante la desacetilación de lisinas específicas de las histonas, como por ejemplo H3K56ac y H4K16ac (Tjeertes et al. 2009;. Miller et al. 2010). En la Tabla 2 se presentan los diferentes sitios de desacetilación y las HDACs involucradas en la DDR en células de mamíferos.

Además de esta función epigenética, se ha reconocido que ciertas HDACs también poseen una importante función en el citoplasma controlando el estado de acetilación y función de numerosas proteínas y factores de transcripción (Yang y Seto 2008; Witt et al. 2009). A su vez, pueden ejercer su actividad catalítica sobre sustratos no histónicos implicados en funciones de homeostasis, diferenciación y apoptosis, siendo enzimas clave en la regulación del ciclo celular (Minucci y Pelicci 2006). En la Tabla 3 se resumen algunos de los sustratos no histónicos sobre los que las HDACs tienen efecto.

**Mammalian histone deacetylases (HDACs)**

Class I	HDAC1	N	H3K56, H4K16 [54]	NHEJ [54]	Laser damage [54]
	HDAC2	N	H3K56, H4K16 [54]	NHEJ [54]	Laser damage [54]
	HDAC3	N	H3K9/K14, H4K5/K12 [65]	DDR [65]	n.d.
Class II	HDAC4	N	n.d.	DDR [91,92]	IR [91]
	HDAC9	N	n.d.	HR [93]	n.d.
	HDAC10	N,C	n.d.	HR [93]	n.d.
Class III	SIRT1	N	H1K26 [66], H2AXK5 [41], H3K56 [60], H4K16 [94]	DDR [41,60,94,95]; HR [66]	R.E. [66,94]
	SIRT2	C	H3K56 [60]	DDR [60]	n.d.
	SIRT6	N	H3K9 [61]	NHEJ [61]; HR [96]; BER [97]	Laser damage [96]; R.E.

Other HDACs: HDAC8 (Class I); HDAC5, HDAC6, HDAC7 (Class II); SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT7 (Class III); HDAC11 (Class IV)

**Tabla 2** – Desacetilasas de histonas (HDACs) involucradas en la respuesta celular al daño en el ADN (DDR) en células de mamíferos. Para cada enzima se presentan las lisinas específicas que desacetilan, la vía de la DDR en la que se encuentra implicada y su localización celular. Debajo de la tabla se presentan las HDACs que no se han observado involucradas en la DDR. Abreviaturas: N:nuclear; C:citoplasmática; n.d: no determinado; VER: reparación por escisión de nucleótidos; NHEJ: reparación por unión de extremos no homólogos; HR: reparación por recombinación homóloga; IR: radiación ionizante; RE: enzima de restricción. Extraída de Gong y Miller 2013.

	Protein	Intracellular Function	HDAC implicated
Acetylation increases protein stability	RUNX3	Tumor suppressor	HDAC1, 5
	P53	Tumor suppressor	HDAC1
	c-Myc	Oncoprotein	Not determined
	AR	Nuclear receptor	HDAC1
	Smad7	Signal transducer	HDAC1
Acetylation decreases protein stability	HIF-1 $\alpha$	Transcription factor	Not determined
Acetylation promotes protein-protein interaction	STAT3	Signal transducer	HDAC1, 2, 3
	AR	Nuclear receptor	HDAC1
Acetylation disrupts protein-protein interaction	NFkB	Transcription factor	Not determined
	Ku70	DNA repair protein	Not determined
	HSP70	Chaperone	HDAC6
Acetylation increases DNA binding affinity	P53	Tumor suppressor	Not determined
	STAT3	Signal transducer	HDAC1, 2, 3
	E2F1	Transcription factor	HDAC1
	MyoD	Transcription factor	Not determined
Acetylation increases transcriptional activation	RUNX3	Tumor suppressor	HDAC1, 5
	P53	Tumor suppressor	Not determined
	AR	Nuclear receptor	HDAC1
	E2F1	Transcription factor	HDAC1
	MyoD	Transcription factor	Not determined

**Tabla 3** - Sustratos no histónicos de las desacetilasas de histonas (HDACs). Extraída de Kim y Bae (2011).

### 1.3.5- Inhibidores de desacetilasas de histonas (HDACi)

Los inhibidores de HDACs (HDACi) actúan impidiendo la remoción de los grupos acetilo por parte de las HDACs, lo que conduce al aumento en los niveles de acetilación y a la activación transcripcional (Marks et al. 2001). Existen muchos HDACi naturales y sintéticos, los que pueden ser subdivididos en cinco clases de acuerdo a su estructura: i) hidroxamatos (ácidos hidroxámicos), ii) péptidos cíclicos, iii) ácidos grasos de cadena corta, iv) benzamidas y v) quetonas electrofílicas. Algunos de ellos pueden actuar en forma específica contra algunas HDACs (inhibidores selectivos de isoformas), mientras que otros son de amplio espectro, actuando contra todos los tipos de HDACs (Li et al 2016). En la Tabla 4 se presentan ejemplos de las primeras cuatro clases de HDACi mencionadas y la especificidad de cada uno de ellas.

Class of inhibitor	HDACs inhibited	Inhibitor name	Abbreviation/other names
Hydroxamates	Class I, II, IV	Suberoylanilide hydroxamic acid	SAHA/Vorinostat/Zolinza
		PXD101	Belinostat
		Trichostatin A	TSA
Short-chain fatty acids	Class I, II: 4,5,9	Sodium Butyrate	NaB
		Sodium Phenylbutyrate	
		Valproic acid	VPA
Benzamides	Class I	MS-275	
	Class I, IV	MGCD-0103	
Cyclic tetrapeptides	Class I	Depsipeptide Apicidin	FK228

**Tabla 4** – Clases de inhibidores de HDACs (HDACi) y su especificidad. Extraída de Smith y Workman (2009).

En diversos tipos de cáncer se ha constatado la alteración en el balance entre la acetilación y desacetilación de histonas, lo que conduce a cambios en la expresión de genes supresores tumorales y proto-oncogenes (Lafon-Hughes et al. 2008; Kim y Bae 2011; Farria et al. 2015). Las HDACs serían las enzimas más importantes en esta desregulación ya que sus niveles varían enormemente en las células cancerígenas. Las HDACs 1, 2, 3, 6, 8 y 11 se han observado sobreexpresadas en diferentes tipos de tumores (Glozak y Seto 2007; Stiborová et al. 2012), lo que pone de manifiesto su implicancia en los procesos de formación y progresión tumoral.

El uso de HDACi permitiría revertir la desacetilación anómala en las células cancerígenas y ha surgido como una estrategia potencial para el tratamiento de tumores sólidos y hematológicos malignos (Slingerland et al. 2014). Se ha observado que los HDACi pueden tener efecto antineoplásico en diversos tipos de células tumorales, ya sea cuando son empleados en forma aislada como en combinación con quimio o radioterapia (Stiborová et al. 2012). Los mecanismos mediante los que ejercen este efecto son diversos, lo que indica que actúan sobre múltiples sustratos (histonas y proteínas no histónicas), así como la existencia de patrones heterogéneos de alteraciones moleculares en las diferentes células cancerígenas. Mediante la inhibición de las HDACs es posible lograr la inducción de ciertos genes o la regulación de otros que se encuentran silenciados en las células tumorales. Por ejemplo, la expresión del gen que codifica para p21,

una proteína cuya acción conduce a la detención del ciclo celular, puede ser inducida mediante el empleo de HDACi en células deficientes en p53, quien sería su inductor en condiciones normales. Esto resulta de suma importancia en terapia antineoplásica, ya que muchos tipos de cáncer carecen de p53 funcional, siendo incapaces de detener el ciclo celular por esta vía (Egger et al. 2004). La posibilidad de detener el ciclo celular e inducir la apoptosis mediante el empleo de butirato de sodio (NaB) y otros HDACi ha llevado a que se analice actualmente la utilidad de estos compuestos en terapia antineoplásica (Acharya et al. 2005; Marks y Xu 2009). Varios HDACi se encuentran en pruebas clínicas, siendo evaluados en diferentes tipos tumorales, como linfoma de células T, leucemia mieloide aguda y cáncer cervical, entre otros (Xu et al. 2007).

A continuación se describen con mayor detalle las clases de HDACi a las que pertenecen los compuestos empleados en el presente trabajo.

### *Ácidos grasos de cadena corta o ácidos alifáticos*

Los ácidos grasos de cadena corta son HDACi débiles, siendo capaces de ejercer su efecto a concentraciones en el rango milimolar, inhibiendo a todas las HDACs de clase I y de la clase IIa: HDAC-4, 5 y 9 (Davie 2003; Munshi et al. 2005) (Tabla 4). Si bien su mecanismo de acción no está claro aún, se ha propuesto que podrían competir con el grupo acetilo liberado en la reacción de desacetilación (Stiborová et al. 2012). En esta clase se incluyen el butirato de sodio (NaB) y el ácido valproico (VPA).

El **NaB** es un subproducto del metabolismo de carbohidratos en el intestino, producido por fermentación bacteriana anaeróbica de fibras de la dieta, siendo uno de los ácidos grasos con actividad HDACi mejor estudiados (Figura 13). Se ha observado la hiperacetilación de histonas en células en cultivo con tiempos de incubación con NaB variables, entre 2 y 24 horas, dependiendo de la línea celular empleada (Sun et al. 2001; Munshi et al. 2005). El NaB tiene múltiples efectos en las células de mamífero en cultivo, tales como inhibición de la proliferación, inducción de la diferenciación celular y apoptosis, e inducción o represión de la expresión génica (Yaneva et al. 2005; Kim et al. 2007; Li et al. 2008).

El **VPA** inhibe a las HDACs de clase I y IIa más eficientemente que el NaB (Figura 13). Aunque su uso principal ha sido como anticonvulsivo para el tratamiento de la epilepsia, numerosos estudios han demostrado su efecto antitumoral en algunos tipos de cáncer, como el de próstata y neuroblastoma, reduciendo de forma significativa el crecimiento tumoral y la formación de metástasis en animales con tumores. Algunos de sus efectos son la detención del ciclo celular, descompactación de la cromatina e inducción de fenómenos de diferenciación celular (Marchion et al. 2005).

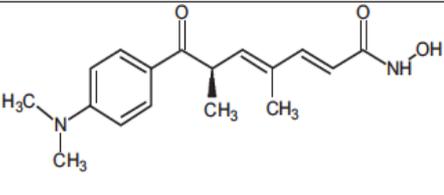
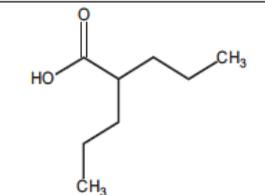
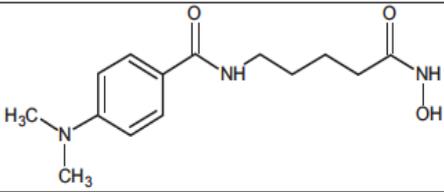
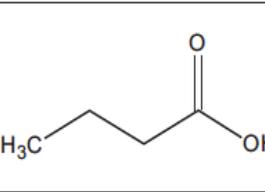
### *Ácidos hidroxámicos o hidroxamatos*

Los ácidos hidroxámicos son compuestos quelantes del  $Zn^{2+}$  e interactúan directamente con este tipo de iones que se encuentran en la base del sitio catalítico de las HDACs, resultando en la inactivación de la unión de la enzima con su sustrato (Xu et al 2007). Por lo tanto, son HDACi de

amplio espectro, ya que inhiben a todas las HDACs dependientes de  $Zn^{2+}$ , es decir las pertenecientes a las clases I, II y IV (Tabla 4). Su efecto inhibitor es más potente que el de los ácidos grasos de cadena corta, ya que ejercen su efecto en el rango nanomolar (Dokmanovic y Marks 2005).

A este grupo pertenecen dos de los HDACi utilizados con mayor frecuencia en el laboratorio, la Tricostatina A (TSA) y el ácido hidroxámico suberoylanilido (SAHA).

La **TSA** fue aislada de *Streptomyces hygroscopicus* como antibiótico antifúngico (Figura 13). De acuerdo con múltiples estudios, el tratamiento con TSA genera un aumento en la acetilación de histonas globalizado (Tóth et al. 2004). Se ha constatado que TSA posee un efecto inhibitor potente contra las HDACs 1, 2, 3, 4, 7, 9 y 6 y una actividad relativamente débil contra HDAC8 (Witt et al. 2009).

Hydroxamic acids	Aliphatic acids		
	Tricostatin A		Valproic acid
	M344 4-(dimethylamino)-N-[7-(hydroxyamino)-7-oxoheptyl]benzamide		Butyric acid

**Figura 13-** Estructura de inhibidores de HDACs (HDACi) pertenecientes a las clases de Ácidos hidroxámicos y Ácidos grasos de cadena corta o ácidos alifáticos - Extraída de Stiborová et al. 2012.

Hasta el momento, dos HDACi han sido aprobados para su uso como agentes antitumorales por la US FDA (Food and Drug Administration of United States): SAHA y romidpesina; ambos para el tratamiento de linfoma de células T cutáneo y periférico (Watanabe 2010). Sin embargo, aún no se ha aprobado ningún HDACi para el tratamiento de tumores sólidos (Li et al. 2016).

SAHA, también denominado Vorinostat (Zolinza®, Merck), fue el primero en ser aprobado en el año 2006 y ha sido usado en numerosos ensayos clínicos en el tratamiento de varios tipos de cáncer como el de próstata, melanoma y linfomas, entre otros (Grant et al. 2007). Al igual que TSA, pertenece a la clase de ácidos hidroxámicos y posee un efecto inhibitor de amplio espectro, no selectivo (Hideshima y Anderson 2013).

Romidpesina o FK228 (Istodax®, Celgene) es un compuesto natural aislado de *Chromobacterium violaceum* o sintético, que integra la clase de HDACi de los péptidos cíclicos, siendo un inhibidor específico de las HDAC1 y HDAC2 pertenecientes a las HDACs de clase I.

Al igual que los ácidos hidroxámicos es un inhibidor potente actuando en concentraciones en el rango nanomolar (Hideshima y Anderson 2013).

### ***1.3.6- Sensibilización al tratamiento anticancerígeno por HDACi***

Ante la evidencia creciente sobre el importante rol de los cambios epigenéticos, en particular la desregulación de HDACs, en la progresión tumoral y su posible participación en la resistencia a drogas adquirida por las células tumorales, ha aumentado el desarrollo de estrategias antineoplásicas que involucran a los HDACi (Perego et al. 2012).

A pesar de que estos inhibidores presentan actividad antitumoral al ser empleados como agentes únicos en estudios preclínicos, han tenido una eficiencia reducida al ser usados para el tratamiento de ciertos tipos de tumores (Stiborová et al. 2012). Sin embargo, los resultados de varios estudios indican que los HDACi aumentan la eficacia anticancerígena de las terapias convencionales y podrían ser muy eficientes en la clínica al ser usados en combinación con las radiaciones ionizantes o la quimioterapia (Frew et al. 2009; Lane y Chabner 2009; Hrebackova et al. 2010; Cheriya et al. 2011). A su vez, se ha observado que en estas combinaciones de tratamientos las células normales resultan menos sensibles que las células tumorales a los efectos antiproliferativos y pro-apoptóticos de los HDACi (Perego et al. 2012).

La explicación que se ha dado para la eficacia aumentada de la combinación de HDACi con otros agentes ha sido su capacidad de inducir la apoptosis. Sin embargo, los HDACi podrían modular la expresión o la función de diversos blancos moleculares o vías importantes en los procesos cancerígenos. Dados los efectos pleiotrópicos de los HDACi, tanto sobre las histonas como sobre proteínas no histónicas, múltiples mecanismos podrían converger para producir la sensibilización de las células tumorales a los agentes citotóxicos convencionales, en particular a los agentes inductores de daño en el ADN.

Para seleccionar la combinación adecuada de HDACi y agentes genotóxicos capaz de interactuar en forma sinérgica y sensibilizar a las células tumorales al tratamiento, es necesario conocer su mecanismo de acción así como la respuesta celular al tratamiento. Sin embargo, los mecanismos de estas interacciones no se conocen aún en profundidad (Perego 2012). Se ha propuesto que los HDACi podrían potenciar los efectos de los agentes genotóxicos, ya sea potenciando la DDR o interfiriendo con los procesos de reparación del ADN (Frew et al. 2009). Por otro lado, los HDACi podrían inducir estrés genotóxico induciendo daño adicional en el ADN lo que contribuiría a su efecto sensibilizador (Frew et al. 2009; Gaymes et al. 2006).

## 1.4- Características de las células tumorales de vejiga urinaria

El cáncer de vejiga urinaria es el segundo tumor maligno más común del tracto genitourinario y ocupa el cuarto lugar entre los tipos de cáncer que afectan a los hombres (Siegel et al. 2016). El tratamiento actual para los individuos con esta enfermedad, ya sea local o en el estadio metastásico, es quimioterapia sistémica. Sin embargo este tratamiento permite solo un beneficio modesto, ya que la supervivencia a largo plazo es el 20% de los pacientes que sufren de la enfermedad metastásica (Stenzl et al. 2011). La forma predominante de este tipo de cáncer es el carcinoma de células transicionales (TCC), representando el 90% de los casos (Wu et al. 2005).

Recientemente se ha observado la expresión aumentada de HDAC1, tanto en muestras de individuos con este tipo de cáncer como en tumores de vejiga urinaria inducidos en ratones (Ozawa et al. 2010). A su vez, Gui et al. (2011) secuenciaron los exomas completos de nueve individuos con TCC, contrastando los patrones encontrados con sus respectivas muestras de linfocitos de sangre periférica. En estas muestras realizaron el "screening" de las mutaciones encontradas en 88 individuos con diferentes estadios de TCC. Entre los genes mutados con mayor frecuencia, además de cinco genes ya conocidos por encontrarse mutados en este tipo de cáncer, entre ellos p53, encontraron 8 genes con mutaciones no silenciosas involucrados en procesos de remodelado de la cromatina, entre los que se destacan NCOR1 y 2 dos genes de HATs (CBP y p300). NCOR1 codifica para una subunidad de un complejo integrado por HDAC3. Al menos dos de estas mutaciones se encontraron en el 16% de los individuos con TCC estudiados. Al evaluar la relación entre la prevalencia de cada gen mutado y el estadio tumoral, observaron que la incidencia de mutaciones en p53 aumentaba en las muestras de estadios más avanzados. Pero no encontraron correlación con el estadio en la incidencia de mutaciones en los genes de HATs o NCOR1.

Dadas estas observaciones sobre la expresión aumentada de HDAC1 en el cáncer de vejiga, así como la mutación en genes que codifican para dos HATs, lo que conduciría a la alteración del balance normal de acetilación/desacetilación, la inhibición de HDACs podría ser una opción efectiva para el tratamiento de este tipo de cáncer. Tanto el efecto, como el mecanismo de acción de los HDACi como tratamiento quimioterápico en este tipo de cáncer, aún no ha sido analizados en profundidad (Li et al. 2016).

## 2- FUNDAMENTACION

Dada la participación de las modificaciones postraduccionales de las histonas en la respuesta celular al daño en el ADN (“DNA damage response o DDR”), constituyendo un nivel adicional de regulación tanto de la expresión génica como de los procesos de reparación del ADN, se plantea evaluar la influencia de la alteración en el balance de acetilación/desacetilación de histonas (uno de los mecanismos epigenéticos mejor conocidos) en la respuesta de líneas celulares humanas y de hámster chino al tratamiento con diferentes agentes genotóxicos.

Los **agentes genotóxicos** empleados inducen daño en el ADN por diferentes mecanismos, interviniendo distintos sistemas de reparación del ADN para su remoción. Como agentes inductores de daño directo sobre el ADN se emplearon dos tipos de **radiaciones ionizantes** como rayos X y rayos gamma (los cuales inducen rupturas de simple y doble cadena y bases oxidadas), así como **radiaciones no ionizantes** como UVC (productora de dímeros de pirimidina y 6-4 fotoproductos). A su vez, se emplearon agentes inhibidores de la ADN topoisomerasa II como el etopósido, que produce rupturas de doble cadena en el ADN de manera indirecta.

Dada la posibilidad de alterar los niveles de acetilación de histonas mediante el empleo de compuestos que inhiben a las desacetilasas de histonas (HDACs), se emplearon los siguientes **inhibidores de HDACs (HDACi)**: butirato de sodio (NaB), ácido valproico (VPA) y tricostatina A (TSA). Estos agentes fueron ensayados en diferentes tipos celulares, a saber: células transformadas y estabilizadas derivadas de fibroblastos de ovario de hámster chino (CHO), células linfoblastoides humanas de crecimiento continuo y dos líneas celulares derivadas de cáncer de vejiga urinaria (una originada de un carcinoma *in situ* y otra de una metástasis retroperitoneal). Estas últimas resultan un modelo interesante para estudiar el grado de sensibilización que pueden producir los HDACi a los agentes quimioterápicos comúnmente empleados en terapia antineoplásica.

Se plantean varias hipótesis sobre los posibles mecanismos involucrados en la sensibilización de estos tipos celulares, incluyendo la inducción de mayor daño en el ADN en presencia de estos HDACi y su posible incidencia en la reparación del daño genético inducido, así como su efecto en la progresión del ciclo celular.

### 3- HIPOTESIS

La alteración del balance de acetilación/desacetilación inducida por los inhibidores de desacetilasas de histonas (HDACi) incide en la respuesta celular al daño en el ADN potenciando el efecto de los agentes genotóxicos mediante su influencia en la sobrevida celular, la inducción y reparación del daño en el ADN, así como por su efecto en la progresión del ciclo celular.

Esta hipótesis general se desglosa en tres hipótesis de trabajo, con las que se vinculan directamente los objetivos descritos a continuación.

**Hipótesis de trabajo # 1** - La exposición previa a HDACi potencia el efecto del etopósido, conduciendo a una menor sobrevida y proliferación de las células expuestas a la combinación de estos tratamientos en comparación con la de las células tratadas con etopósido solamente.

**Hipótesis de trabajo # 2** – El nivel de daño inducido en el ADN por los agentes genotóxicos en presencia de HDACi se correlaciona negativamente con la sobrevida celular. Es decir que a mayor daño inducido en el ADN menor sobrevida y viceversa.

**Hipótesis de trabajo # 3** – El pre-tratamiento con HDACi influye en la eficiencia de remoción del daño inducido en el ADN por diferentes agentes genotóxicos.

### 4- OBJETIVOS

#### 4.1- OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de la alteración del balance de acetilación/desacetilación inducida por los inhibidores de desacetilasas de histonas (HDACi) en la respuesta celular al daño en el ADN producido por diferentes agentes genotóxicos, tales como las radiaciones ionizantes y no ionizantes; así como un inhibidor de la ADN Topoisomerasa II, el etopósido.

#### 4.2- OBJETIVOS ESPECIFICOS

**4.1.1-** Evaluar el efecto de los inhibidores de desacetilasas de histonas (HDACi) ácido valproico (VPA), tricostatina A (TSA) y butirato de sodio (NaB) en la sobrevida y proliferación de células de mamífero en cultivo expuestas a etopósido.

**4.1.2-** Estudiar el nivel de daño en el ADN inducido por diferentes agentes genotóxicos en células de mamífero pre-tratadas con los HDACi VPA, TSA y NaB.

**4.1.3-** Evaluar el efecto de los HDACi NaB, VPA y TSA sobre la remoción del daño genético inducido por diferentes agentes genotóxicos.

## 5- METODOLOGIA

### 5.1- Líneas celulares y muestras biológicas

Para los diferentes ensayos realizados se emplearon tanto líneas celulares humanas como de ovario de hámster chino, así como linfocitos humanos de sangre periférica obtenidos de donantes sanos.

Entre las líneas celulares humanas utilizadas se encuentran las líneas tumorales derivadas de tumores transicionales de vejiga urinaria, denominadas 253J y T24. En el caso de 253J es derivada de una muestra de biopsia de metástasis retroperitoneal de un hombre de 53 años (Elliot et al. 1974), mientras que T24 deriva de un carcinoma grado III de vejiga urinaria de una mujer de 82 años (Bubeník et al. 1973).

A su vez, se empleó la línea linfoblastoide humana FLEBV inmortalizada por medio del virus Epstein Barr (cedida por el Prof. L. Chessa, Universidad "La Sapienza", Roma, Italia; y el Prof. Fabrizio Palitti, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo, Italia).

Unas de las líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO) utilizadas fueron CHOK1 y su mutante radiosensible CHOxrs-5, aislada por Jeggo et al. (1982). CHOxrs-5 es deficiente en la reparación de RDCs por la vía NHEJ, presentando una mutación en el gen que codifica para Ku80. Es por lo tanto más sensible que su contraparte normal a las radiaciones ionizantes y a otros agentes inductores de RDCs (Jeggo y Kemp 1983, Darroudi y Natarajan 1987, 1989).

Finalmente, en otro set de ensayos se utilizó la línea celular de ovario de hámster chino AA8 aislada por Thompson et al. (1980).

### 5.2- Cultivo de células

Todos los cultivos fueron realizados en atmósfera húmeda a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> existiendo variaciones en los medios de cultivo utilizados dependiendo de cada caso.

En el caso de las líneas celulares 253J, T24, CHOK1 y CHOxrs5 el cultivo se realizó en monocapa en cajas de Petri de plástico (94 x 16 mm) en medio de cultivo Mc Coy 5A (Gibco) suplementado con suero fetal bovino (Gibco) a una concentración final del 10 %, glutamina (2 mM) y antibióticos: penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (50 µg/ml) (SIGMA).

En el caso de la línea celular AA8, también fue cultivada en monocapa en cajas de Petri de plástico (94 x 16 mm) pero se empleó una combinación de los medios de cultivo Ham's F12 y Medio Esencial Dulbecco (DMEM) en una proporción 1:1, enriquecida con L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (50 µg/ml) (SIGMA), y suplementada con suero fetal bovino al 10%.

Para la realización de los tratamientos con los diferentes agentes en estos cultivos en monocapa, el día previo a la realización de los mismos las células en fase exponencial de crecimiento fueron sembradas a diferentes densidades, dependiendo de la evaluación a ser realizada con posterioridad, y cultivadas durante 18 horas antes del tratamiento. Para la realización de los

ensayos clonogénicos se sembraron entre 300 y 600 células en cajas de 35 x 10 mm dependiendo de la línea celular. Para la evaluación del nivel de daño inducido y su cinética de reparación mediante el test del cometa, citometría de flujo y western Blot se sembraron 100.000 células en cajas de Petri de 35 x 10 mm.

La línea celular FLEBV fue cultivada en suspensión en medio RPMI 1640 suplementado con 20% de suero fetal bovino (Gibco) inactivado a 56 °C durante 30 minutos, 2% buffer HEPES, 1% de glutamina (Invitrogen) y 1% de estreptomycin y penicilina (Invitrogen). Para la realización del ensayo cometa, el día previo a los tratamientos se sembraron  $1.6 \times 10^6$  células por ml de medio de cultivo para cada tratamiento a realizar.

Los linfocitos de sangre periférica se obtuvieron a partir de sangre total heparinizada extraída de adultos sanos. La misma fue diluída al 50% en medio RPMI 1640 sin suero fetal bovino y mantenida a a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> sin realizar estimulación linfocitaria con fitohemaglutinina.

## **5.3- Tratamientos**

### **5.3.1- Agentes genotóxicos empleados**

#### ***Etopósido***

Las células de diferentes líneas celulares (253J, T24, FLEBV, CHOK1 y CHOxrs5) en fase de crecimiento exponencial fueron expuestas a diferentes concentraciones (5, 10, 20 o 50 µM) de etopósido (SIGMA) durante 1 hora a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>. El etopósido fue diluido en DMSO a partir de una solución stock de 2 mM, por lo tanto los cultivos control fueron tratados con el mismo volumen de DMSO. En el caso de los ensayos clonogénicos, luego del tratamiento se retiró el medio de cultivo y se incubó con medio de cultivo completo a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 7 a 10 días dependiendo de la línea celular analizada. En el caso de los tratamientos combinados con los agentes inhibidores de desacetilasas de histonas (HDACi) el tratamiento con etopósido se realizó durante la última hora de incubación con estos agentes.

#### ***Rayos X***

Las células de la línea FLEBV fueron irradiadas en medio RPMI 1640 completo a 37 °C con 2 Gy de rayos X a una tasa de dosis de 60 cGy/min empleando una fuente con 250 kV y 6 mA (Gilardoni MGL 200/8 D) (Università degli Studi della Tuscia (Viterbo, Italia)).

#### ***Rayos γ***

Muestras de sangre entera diluida al 50% en RPMI 1640 fueron irradiadas a temperatura ambiente con 0.5 Gy de rayos γ a una tasa de dosis de 0.5 Gy/min utilizando una fuente de cobalto-60 (ICO4000) (Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire (IRSN), Fontenay-aux-Roses, Francia).

## **UVC**

Para el tratamiento con UVC se retiró el medio de cultivo de las células AA8 en fase de crecimiento exponencial y se realizaron dos lavados con buffer fosfato salino (PBS). Se realizó la irradiación (1.2, 2, 4 u 8 J/m<sup>2</sup>s) empleando una fuente a 254 nm (UVC Lamp Spectrum Line), monitoreando las dosis a aplicar mediante un sensor de UVC (Spectrum Line).

### **5.3.2- Inhibidores de desacetilasas de histonas (HDACi)**

#### ***Butirato de sodio***

A partir de una solución stock 1 M de butirato de sodio (NaB) (SIGMA) se preparó una solución de trabajo 200 mM en PBS y se trataron cultivos de células 253J, T24, FLEBV, CHOK1 y CHOxrs5 con diferentes concentraciones de este agente (1, 5 ó 10 mM) durante 24 horas. Para los análisis de cinética de reparación, el tratamiento con NaB siguió de manera continua durante el tiempo de recuperación hasta la recolección de los cultivos.

#### ***Acido valproico***

Se preparó una solución stock de ácido valproico (VPA) (SIGMA) 200 mM para realizar el tratamiento de células 253J y FLEBV en cultivo y muestras de sangre total diluida al 50% en medio RPMI 1640. Dicho tratamiento se realizó con VPA (0.7 ó 1.5 mM) durante 24 horas en los ensayos con 253J y FLEBV y durante 20 horas en las muestras de sangre.

#### ***Tricostatina A***

El tratamiento con Tricostatina A (TSA) (SIGMA) se realizó a partir de una solución stock de 5 µg/ml en etanol. El tratamiento fue realizado aplicando una dosis de TSA de 50 ng/ml de forma continua, tanto en las 4 horas previas a la irradiación con UVC como durante el tiempo de recuperación post-irradiación.

## **5.4- Western Blot**

### ***Preparación de las muestras para SDS-PAGE y western blot***

Luego de realizados los tratamientos con NaB (1 y 5 mM) y etopósido en los cultivos de las líneas celulares 253J y CHO K1, las células fueron retiradas de la placa de Petri mediante raspado de la capa celular en presencia de 500 µl de buffer de lisis (1M Tris-HCl (pH=7.4), 2 M NaCl, 1mM EGTA, 1 mM EDTA, 1% NP-40 100%, 0.1 mM NaF) conteniendo un cocktail de inhibidores de proteasas manteniéndolas siempre en frío y colocadas en tubos eppendorf. Una alícuota de 200 µl de cada tratamiento fue homogeneizada en buffer de muestra para proteínas en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Tris-HCl 0.6 M pH 6.8, SDS 2%, glicerol 10 %, 2-mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0.002%). Luego las proteínas fueron desnaturizadas en un baño a 95 °C durante 10 minutos y se realizó la cuantificación de las muestras mediante ensayo Bradford.

### ***Electroforesis y transferencia***

Se llevó a cabo la electroforesis en un gel de poliacrilamida al 15% sembrando 50 µg de proteína en cada carril (110 V y amperaje libre durante 90 min). Una vez finalizada la corrida, las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF ("polyvinylidene difluoride") de 0.2 µm de poro durante 75 minutos a 350 mA y voltaje libre a 4°C. Terminado el proceso de transferencia las membranas fueron lavadas con TBS-Tween 20 0.1% (TBS-T) y bloqueadas con TBS-T y 5% de leche en polvo descremada (buffer de bloqueo) durante 1 hora.

### ***Incubación con anticuerpos y revelado***

Las membranas fueron incubadas durante toda la noche a 4°C en agitación constante con el anticuerpo primario de conejo correspondiente (anti Histona H4 acetilada en la Lisina 8 (H4K8ac) (1/6000) o anti-histona H3 acetilada en la lisina 9 (1/1000) (H3K9ac)) (Upstate-Millipore) diluidos en buffer de bloqueo. Posteriormente, las membranas fueron lavadas 2 veces con TBS-T durante 10 minutos e incubadas durante una hora a temperatura ambiente en agitación con el anticuerpo secundario anti-conejo IgG (1/3000) (Life Technologies) conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) diluido en buffer de bloqueo. Finalmente el anticuerpo secundario fue lavado 2 veces con TBS-T durante 10 minutos. El revelado se realizó mediante quimioluminiscencia (ECL plus de Amersham) sobre placas fotográficas (AGFA) en cuarto oscuro utilizando el revelador Kodak D-11 y fijador AGFA G334. Posteriormente, a las membranas se le realizó la remoción de los anticuerpos primario y secundario incubándolas en una solución de glicina 0.2 M (pH=2.8) durante 60 minutos con el fin de volver a exponer las proteínas a un anticuerpo anti histona total (H3 o H4) para realizar el control de carga. Finalmente, se realizó la incubación con un anticuerpo secundario conjugado con HRP y el revelado fue realizado del mismo modo que con los anticuerpos anti-histonas acetiladas.

Para el análisis de las placas fotográficas, las mismas fueron escaneadas en escala de grises y la densidad de las bandas fue cuantificada empleando el programa Image J (NIH). Para los distintos tratamientos se determinó la intensidad relativa de las bandas de histonas acetiladas estableciendo la relación de su intensidad respecto a la banda correspondiente de histona total.

## **5.5- Ensayos clonogénicos**

Los ensayos clonogénicos evalúan la sobrevivencia a largo plazo de las células luego de su exposición a los agentes de interés, poniendo en evidencia su capacidad de proliferar y generar un clon o colonia luego del tratamiento realizado. A la pérdida de la capacidad de dividirse y producir progenie se la denomina muerte reproductiva, mientras que a las células que son capaces de mantener su integridad reproductiva se las denomina clonogénicas (Marple et al. 2004). Estos ensayos se llevaron a cabo por triplicado sembrando 300 o 600 células, dependiendo de la línea celular, en cajas de Petri de 35 x 10 mm de diámetro el día previo a realizar los tratamientos. Las células fueron tratadas durante 24 horas con el HDACi (VPA, TSA o NaB) y durante la hora final de este tratamiento fueron expuestas a etopósido (5, 10, 20 o 50 µM). Al cabo de este tratamiento se retiró el medio de cultivo, se realizaron dos lavados con

buffer fosfato salino (PBS) y se volvió a colocar medio de cultivo completo e incubar a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Al cabo de 7 o 10 días, dependiendo de la línea celular, cuando se observaron colonias reconocibles integradas por al menos 50 células, se retiró el medio de cultivo y se fijaron las células con etanol al 70%. Posteriormente, se realizó la tinción con cristal violeta (0,1%) y el recuento de colonias, calculando la eficiencia relativa de plaqueo para cada uno de los tratamientos realizados. La misma representa el porcentaje de las células sembradas que fueron capaces de dividirse y formar colonias; y se calcula en relación a la cantidad de colonias presentes en el control negativo.

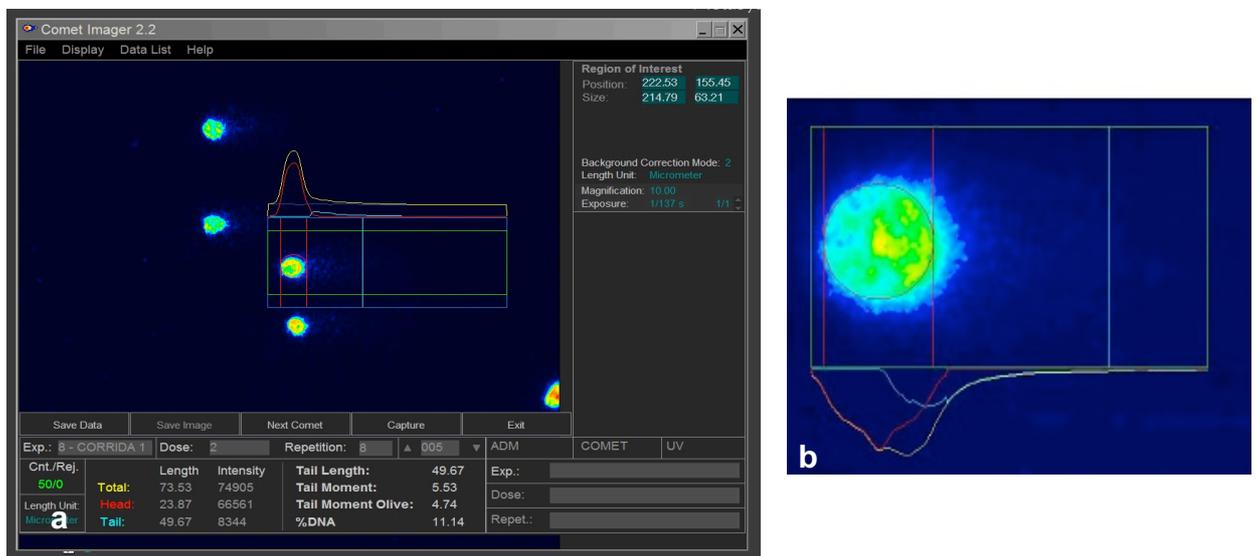
## 5.6- Ensayo Cometa

El ensayo de electroforesis en gel de células individuales o ensayo cometa combina la simplicidad de las técnicas bioquímicas para detectar rupturas en las cadenas del ADN y/o sitios álcali-lábiles con la aproximación a nivel de células aisladas típica de los ensayos citogenéticos. La versión alcalina de este ensayo (pH > 13) permite la detección de un amplio rango de lesiones sobre el ADN tales como rupturas de simple y doble cadena, sitios de reparación por escisión y sitios álcali-lábiles (Singh et al. 1988). El mismo consiste en una electroforesis de células lisadas embebidas en agarosa y colocadas sobre portaobjetos, donde el ADN libre migra hacia el ánodo mostrando una cola de fragmentos que se asemeja a un cometa, de manera que cuanto mayor es el daño sobre el ADN más grande es la cola del cometa (Tice et al. 1990) (Figura 14).

Luego de los diferentes tratamientos realizados con etopósido, rayos X o UV-C en presencia o ausencia de los HDACi VPA, NaB, o TSA en los distintos tiempos de recuperación evaluados, se siguió el procedimiento descrito por Singh et al. (1988) con modificaciones de Speit y Hartmann (1999). En el caso de las líneas celulares cultivadas en monocapa (253J, T24, CHOK1, CHOxrs5 y AA8) los cultivos fueron tratados con tripsina (0.05%)/EDTA (0.02%) y una vez que se contó con las células en suspensión a una concentración de 1.5 x 10<sup>6</sup> células/ml, éstas fueron embebidas en agarosa de bajo punto de fusión (0.5 % en PBS sin Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>) (Gibco) y colocadas sobre portaobjetos pre-cubiertos con agarosa de punto de fusión normal (1.5% en PBS sin Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>) (Gibco). Se colocaron cubreobjetos con el fin de lograr la extensión de la agarosa y una vez que ésta se encontró gelificada los portaobjetos fueron incubados a 4 °C en un buffer de lisis que contiene detergentes y una elevada concentración salina (NaCl 2.5 M; EDTA 100 mM; Tris 10 mM, Tritón X-100 1%) a pH 10 por al menos 1 hora. Luego de ser colocados en la cuba de electroforesis los preparados fueron sometidos a una solución de NaOH (300 mM) y EDTA (1 mM) (pH >13) durante 20 minutos para permitir la desnaturalización del ADN y la expresión de sitios álcali-lábiles. Bajo estas condiciones alcalinas se llevó a cabo la electroforesis en una cuba horizontal (Horizon 20-25, Gibco) a 25 V y 300 mA durante 20 minutos, al cabo de lo cual se realizaron lavados con Tris (0.4 M) (pH 7.5) con el fin de neutralizar el pH alcalino. Finalmente, se realizó la deshidratación de la agarosa por inmersión en etanol al 70% durante 5 minutos y al momento de realizar el análisis se tiñeron las preparaciones con bromuro de etidio (10 µg/ml).

El nivel de daño inducido en el ADN fue analizado en 50-100 núcleos tomados al azar de dos preparados de cada uno de los tratamientos y tiempos de recuperación realizados. Se llevó a cabo utilizando un microscopio de epifluorescencia equipado con un filtro de excitación de 515–560 nm, una cámara CCD y sistema de análisis de imágenes. Para cuantificar el daño en cada uno de estos núcleos, se emplearon softwares diseñados para la medición de la longitud de la migración y la intensidad de fluorescencia en la cola del cometa, la que es directamente proporcional a la cantidad de ADN migrado (Figura 14 b). En el caso de los experimentos con las líneas celulares 253J, T24, FLEBV, CHOK1 y CHOxrs5, realizados en el Departamento de Agrobiología e Agroquímica de la Università degli Studi della Tuscia (Viterbo, Italia), se empleó el software Comet Assay III 3.0 (Perceptive Instruments). En los ensayos llevados a cabo con la línea celular AA8 para evaluar el efecto de TSA en el daño inducido por UV-C y su cinética de reparación, realizados en el Laboratorio de Epigenética e Inestabilidad Genómica del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (Montevideo, Uruguay), se utilizó el software Comet Imager 4.2.14 (MetaSystems GmbH). Mediante la utilización de dichos softwares fue posible calcular el parámetro “Tail Moment” (TM), según Olive y Banáth (1993), como el producto de la cantidad de ADN migrado (intensidad de fluorescencia en la cola del cometa) por la distancia entre el centro de gravedad (mediana) de la curva de intensidad de fluorescencia de la cabeza y el centro de gravedad (mediana) de la intensidad de fluorescencia de la cola del cometa.

En los ensayos realizados con la línea celular AA8 se aplicó una versión modificada del ensayo cometa para la detección de CPDs inducidos por UVC, la que incluye el empleo de la endonucleasa T4 de acuerdo a Collins et al. (1993) y Woollons et al. (1997). La endonucleasa T4 empleada fue producida en colaboración con el Laboratorio de Reparación del ADN del Departamento de Microbiología del Instituto de Ciências Biomédicas de la Universidade de São Paulo (Brasil). En esta versión de la técnica, al cabo de la incubación de los preparados en buffer de lisis y en forma previa a realizar la electroforesis, los mismos fueron lavados con PBS y con el buffer en el que se encuentra diluida la enzima para luego ser tratados con la endonucleasa T4 en cámara húmeda a 37°C durante 30 minutos. A continuación los preparados fueron mantenidos a 4 °C durante 15 minutos y luego de retirar los cubreobjetos y realizar un lavado con PBS se realizó la electroforesis, continuando con la técnica habitual del ensayo cometa anteriormente descrita.



**Figura 14** – Cuantificación del daño mediante el ensayo cometa empleando el software Comet Imager (MetaSystems™). **a)** Captura de pantalla del software al realizar la medición de un cometa. **b)** Imagen aumentada de un núcleo en proceso de cuantificación. La línea azul vertical indica el final de la cola del cometa marcando la longitud de la migración y las curvas en la parte inferior representan los perfiles de Intensidad de Fluorescencia en la cabeza (núcleo celular) y la cola del cometa respectivamente.

## 5.7- Inmunodetección fluorescente de foci $\gamma$ H2AX

Tanto el procesamiento de las muestras, como la tinción inmunofluorescente, adquisición, procesamiento y análisis de las imágenes fueron realizados de acuerdo a Valente et al. (2011) en el laboratorio del Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire (IRSN) (Fontenay-aux-Roses, Francia).

### *Procesamiento de las muestras*

Luego de la irradiación la sangre diluida al 50% en RPMI 1640 (Invitrogen), con y sin tratamiento con VPA, fue incubada a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 30 o 180 minutos. A cada tiempo de recuperación se extrajeron 5 ml de muestra para llevar a cabo el aislamiento de linfocitos. Los tubos fueron mantenidos a 0°C (en hielo) y toda la manipulación siguiente fue realizada a esta temperatura con el fin evitar la disminución de la señalización de  $\gamma$ H2AX y la reparación del daño inducido. A cada tubo se le agregaron 2,5 ml de Ficoll-Histopaque 1077 (SIGMA) y se centrifugó a 1000 g durante 20 minutos a 0 °C en centrífuga refrigerada. Se retiró el anillo formado en la interfase y se lavó tres veces con PBS frío centrifugando a 350 g durante 7 minutos a 0 °C. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en PBS. De cada suspensión de linfocitos se colocaron 20  $\mu$ l dentro de spots circulares de portaobjetos Superfrost® (Menzel-Glaser, Braunschweig). Los portaobjetos fueron colocados a 4°C durante 30 minutos para permitir la adhesión de los linfocitos. A continuación se realizó la fijación en paraformaldehído (PFA) (SIGMA) al 1% a temperatura ambiente durante 10 minutos y el lavado en PBS. Los preparados fueron mantenidos en PBS a 4°C de 1 a 7 días antes de la tinción.

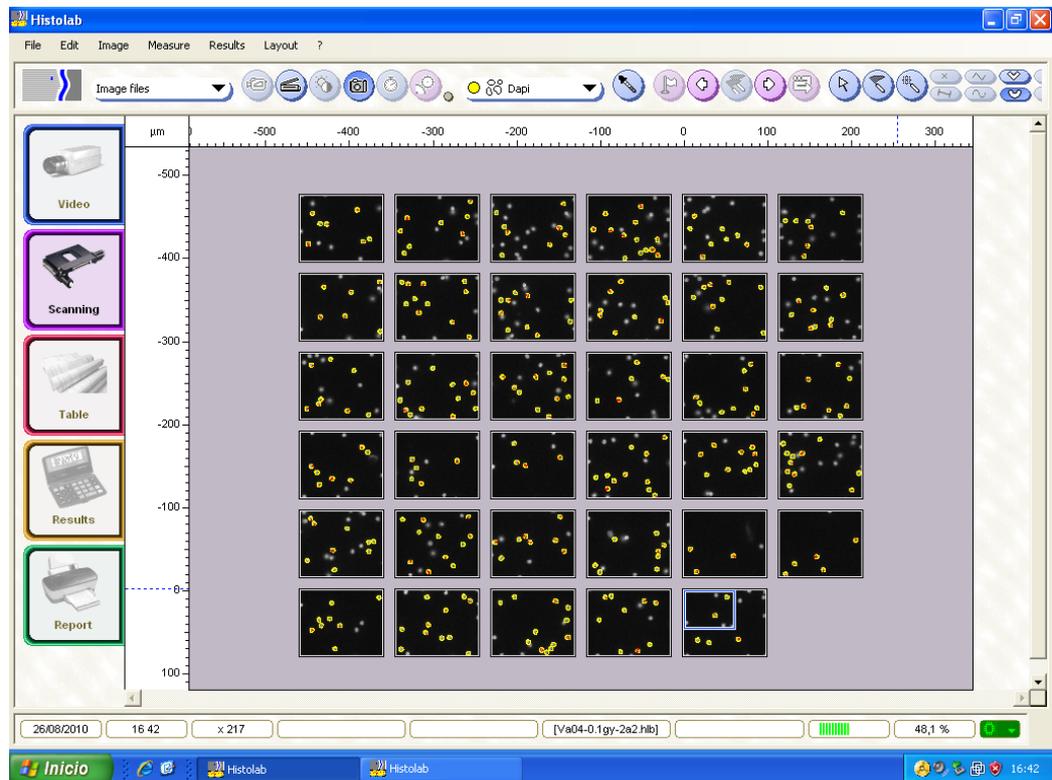
### ***Tinción inmunofluorescente***

Los linfocitos adheridos a los portaobjetos fueron permeabilizados en PBS + Triton X-100 al 0,1% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego de un lavado en PBS se realizó el bloqueo con BSA al 2% durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se realizó la incubación con un anticuerpo monoclonal de ratón anti  $\gamma$ H2AX fosforilada (Ser139) (Millipore) (1:500) en BSA 2% a temperatura ambiente en cámara húmeda durante 1 hora. Luego de realizar un lavado en PBS durante 5 minutos se incubó con un anticuerpo secundario de cabra anti ratón conjugado con FITC Alexa Fluor 488 (Invitrogen A21121) (1:400) a temperatura ambiente en cámara húmeda durante 1 hora. Finalmente, al cabo de 3 lavados con PBS se colocó Anti-Fade/DAPI (Vecta Shield) en cada spot de los preparados y se colocaron cubreobjetos.

### ***Adquisición, procesamiento y análisis de imágenes***

Los preparados fueron analizados empleando un microscopio de epifluorescencia (Imager.Z1, Carl Zeiss) equipado con una cámara CCD y una fuente de luz fluorescente (EL6000, Leica, Solms). Se realizó la captura automatizada de las imágenes usando el software Metafer 4 versión 3.6.0 (MetaSystems<sup>TM</sup>), el que controla la platina motorizada del microscopio, los filtros y la cámara digital. Se anotaron las coordenadas de cada spot y para la adquisición de las imágenes empleando la función básica del software denominada "cálculo de coordenadas" se seleccionó para cada uno una cuadrícula de campos que no se superponían. Dependiendo de la densidad celular promedio, se seleccionaron y adquirieron de 100 a 250 para cada spot mediante el módulo Metafer Autocapt (MetaSystems GmbH) usando un objetivo de 63x (Carl Zeiss). Para compilar en una sola imagen los foci  $\gamma$ H2AX distribuidos en las 3 dimensiones de las células (3D), el clasificador del software Autocapt fue programado para adquirir 26 imágenes 2D para cada campo, con una separación de 0.3  $\mu$ m en el eje z entre dos capas consecutivas. Para evitar la pérdida de información las imágenes no fueron sobre-expuestas. Los softwares de adquisición de imágenes como Autocapt impiden la sobre-exposición de las imágenes durante su captura fijando un tiempo de exposición automático. Con el fin de realizar comparaciones más rigurosas, los tiempos de integración seleccionados por el software fueron fijados y mantenidos constantes durante la adquisición de todas las imágenes en todos los tratamientos. Las imágenes resultantes (resulting fields of view - FOV) fueron transformadas en imágenes de entrenamiento (TRN) empleando un comando especial del software de manera que cada canal de fluorescencia (verde para foci  $\gamma$ H2AX y azul para los núcleos teñidos con DAPI) pudiera ser exportado como una imagen individual en escala de grises.

El recuento de los foci  $\gamma$ H2AX fue realizado de forma automática empleando el software HistoLab<sup>TM</sup> versión 7.5.2 (Microvision Instruments), manteniendo constantes todos los parámetros del análisis de imágenes durante la realización de todo el estudio (Figura 15).



**Figura 15**– Análisis de imágenes de foci  $\gamma$ H2AX empleando el software HistoLab™ versión 7.5.2 (Microvision Instruments).

### 5.8- Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo

Se recolectó el medio de cultivo y las células fueron despegadas del sustrato por incubación con tripsina (0,05%)/EDTA (0,02%) realizando luego dos lavados en PBS y centrifugando a 1000 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se realizó la fijación agregando 3 ml de etanol al 70% mantenido a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se realizó la incubación de las muestras a  $-20^{\circ}\text{C}$  por al menos 30 minutos o por períodos mayores hasta su análisis por citometría de flujo. Para realizar dicho análisis las muestras fueron centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos para eliminar el etanol y resuspendidas en 1 ml de PBS. Luego de ser filtradas empleando una malla de  $50\ \mu\text{m}$  se incubaron con  $25\ \mu\text{l}$  de RNAsa (50 mg/mL) y  $25\ \mu\text{l}$  de yoduro de propidio (1 mg/ml) durante 10 minutos a temperatura ambiente. El contenido de ADN fue analizado empleando un citómetro de flujo FACSVantage (Becton Dickinson) equipado con un láser de 488 nm, midiendo la fluorescencia roja. El análisis de los datos del ciclo celular fue realizado capturando 10000 eventos para establecer el porcentaje de células en las fases G1, S y G2/M empleando el software CellQuest (Becton Dickinson).

## 5.9- Análisis estadístico

### *Ensayos clonogénicos*

Para el análisis estadístico se consideró cada ensayo como una variable aleatoria con distribución de probabilidad binomial ( $X=B(n,p)$ ). Esta variable aleatoria definida representa el número de éxitos en la realización de  $n$  pruebas de Bernoulli con probabilidad de éxito igual a  $p$ , donde el éxito representa la capacidad de una célula para proliferar y formar una colonia y el fracaso la muerte reproductiva. El parámetro  $p$  expresa entonces la probabilidad de que una célula tomada al azar dentro de la población en estudio sobreviva al tratamiento, prolifere y logre desarrollar una colonia, así como también, la proporción de células cultivadas que se espera logren sobrevivir. El total de colonias contadas en el ensayo determinan el número de éxitos, mientras que el total de células sembradas representan la cantidad de pruebas de Bernoulli realizadas ( $n$ ). Del cociente entre el total de colonias contadas y el total de células sembradas surge la estimación del parámetro  $p$ , que indica la proporción de células sembradas que fueron capaces de sobrevivir. Una vez estimado el parámetro  $p$ , se calculó el **intervalo de confianza al 95%**. Para ello se procedió a tipificar la distribución binomial y considerando el Teorema Central del Límite se aproximó la variable tipificada a una distribución normal estándar. Esta aproximación es suficientemente buena para muestras que cumplen la condición  $n \cdot p > 5$ , condición que cumplen todos los experimentos llevados a cabo. Con los valores  $p$  estimados, se calculó la **eficiencia relativa de plaqueo** como el cociente entre el valor obtenido en cada uno de los tratamientos ( $p_x$ ) con respecto al valor obtenido en el control negativo ( $p_{CN}$ ) expresado en porcentajes ( $100 \cdot p_x / p_{CN}$ ).

Con el fin de determinar si la sobrevida en los tratamientos combinados con las distintas dosis de los HDACi y etopósido era significativamente diferente de la sobrevida obtenida con el tratamiento solamente con etopósido en las diferentes líneas celulares, se realizaron pruebas de hipótesis. Éstas consistieron en contrastes de igualdad de proporciones para dos muestras de una cola a un nivel de significación ( $\alpha$ ) del 1%. Donde en la hipótesis nula ( $H_0$ ) se consideró que la sobrevida es igual en el tratamiento combinado (HDACi + etopósido) que en el tratamiento con etopósido solamente. Mientras que la hipótesis alternativa ( $H_1$ ) consideró que la sobrevida en el tratamiento combinado es mayor ( $H_1: p_X > p_Y$ ) o menor ( $H_1: p_X < p_Y$ ) que en el tratamiento solo con etopósido, según sea el caso.

### *Ensayo Cometa*

Para comparar si la diferencia en el daño inducido al cabo de los diferentes tratamientos resultó estadísticamente significativa se aplicaron pruebas  $t$  de Student para dos muestras suponiendo varianzas desiguales a un nivel de significación del 1%.

Con el objetivo de analizar la cinética de reparación del daño en los diferentes ensayos realizados, se calculó el porcentaje de daño remanente en cada tiempo de recuperación como el cociente entre el daño en el momento  $t$  y el daño en el momento inicial expresado en porcentajes

( $100 \cdot TM_t / TM_0$ ). Se ajustaron las curvas de cinética derivadas de los resultados experimentales utilizando un modelo exponencial ( $y = K \cdot \beta^x$ ). Para estimar estas curvas, se procedió primero a transformar los datos con el propósito de linealizarlos, empleando el logaritmo natural, y luego se aplicó el método de los mínimos cuadrados para regresiones lineales ( $\ln y = \ln K + x \cdot \ln \beta$ ). Se verificaron los supuestos del modelo de regresión lineal, realizando contrastes de heteroscedasticidad, autocorrelación y normalidad de los datos transformados.

Una vez obtenida la estimación, se calculó el tiempo medio de reparación (TMR), entendido como el tiempo en el que se repara el 50% del daño inicial ( $TMR = \text{Log}_{\beta}(0.5)$ ), con la finalidad de obtener un indicador de la eficiencia en la reparación luego de los diferentes tratamientos. Junto con la presentación de los parámetros estimados del modelo exponencial y del indicador del TMR, se calcularon los intervalos de confianza al 95%. A su vez, se efectuaron contrastes de significación mediante la prueba t de Student para evaluar la existencia de reparación en cada uno de los tratamientos realizados, tomando como hipótesis nula ( $H_0$ ) la no reparación ( $\beta = 1$ ) en el período de recuperación estudiado.

Para realizar comparaciones en la cinética de reparación entre diferentes tratamientos, se efectuaron pruebas de hipótesis con las regresiones estimadas, aplicando un estadístico con distribución t de Student para contrastes de homogeneidad entre regresiones (Steel y Torrie 1985).

### ***Inmunodetección fluorescente de foci $\gamma$ H2AX***

A los efectos de determinar la existencia de diferencias significativas en la media de foci  $\gamma$ H2AX tanto entre tratamientos como en los diferentes tiempos de recuperación evaluados, se realizaron contrastes de significación mediante la prueba t de Student a una cola con un nivel de significación del 1%.

## 6- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Con el fin de evaluar el rol que juegan los procesos de acetilación de histonas en la respuesta celular al daño inducido en el ADN en líneas celulares de mamíferos, se estudió el efecto del mantenimiento de la acetilación, empleando inhibidores de desacetilasas de histonas (HDACi) en forma previa y concomitante a la inducción de daño en el ADN por parte de agentes genotóxicos con diferentes mecanismos de acción.

Inicialmente se evaluó el efecto de tres inhibidores de desacetilasas de histonas (HDACi) en la sobrevivencia celular al tratamiento con etopósido (agente inhibidor de la topoisomerasa II) (Sección 7.1). Luego se cuantificó el daño generado por agentes genotóxicos con diferente mecanismo de acción sobre el ADN como el etopósido, radiaciones ionizantes (rayos X y rayos gamma) y radiación UVC en presencia y ausencia de diferentes HDACi (Sección 7.2). En el caso de uno de los HDACi estudiados (butirato de sodio), también se analizó su influencia en la progresión del ciclo celular en combinación con etopósido. Finalmente, se estudió el efecto de los tres HDACi en la eficiencia de remoción del daño genético inducido por radiaciones ionizantes (rayos X y rayos gama) y radiación UVC (Sección 7.3).

## 7- RESULTADOS

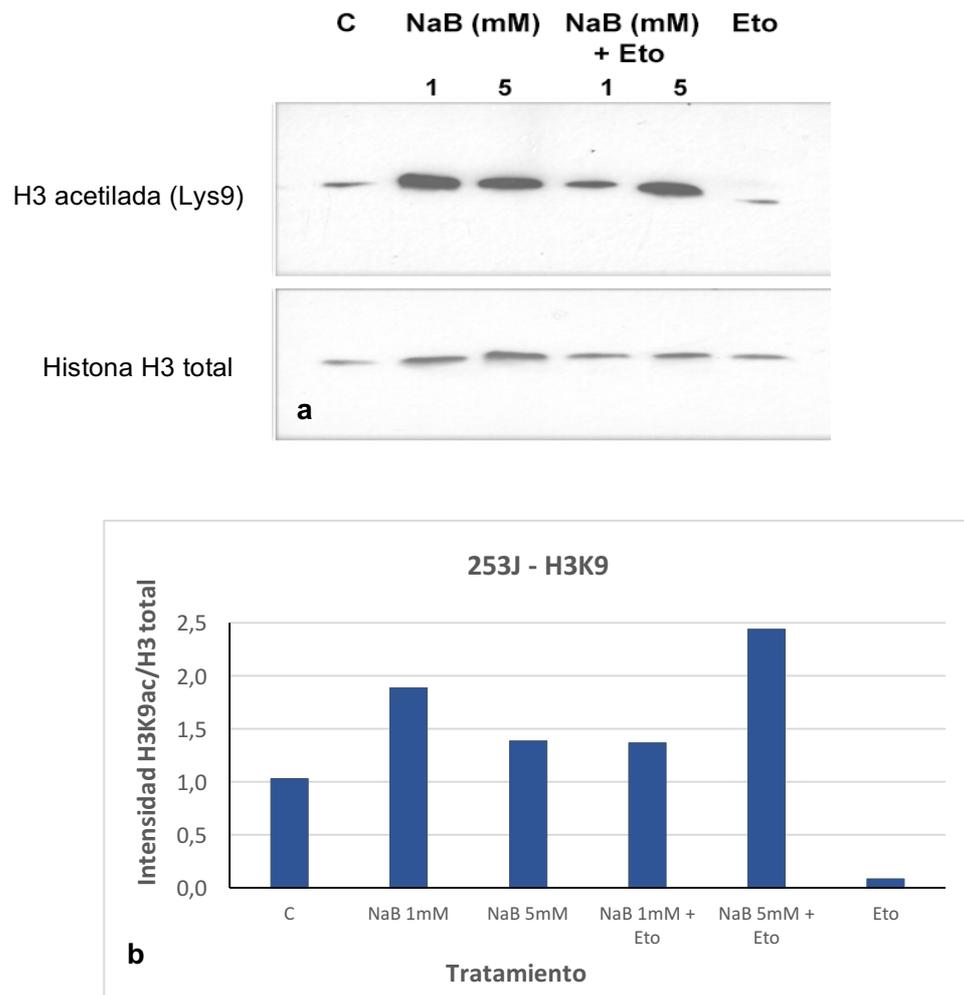
### *7.1– Efecto de inhibidores de desacetilasas de histonas en la sobrevivida celular al tratamiento con etopósido*

Se evaluó el efecto del pre-tratamiento con tres inhibidores de desacetilasas de histonas (HDACi) en la sobrevivida y proliferación celular luego de la exposición a etopósido (inhibidor de la topoisomerasa II). Para ello se realizaron ensayos clonogénicos exponiendo a las líneas celulares 253J, T24 y CHOK1 a los HDACi: ácido valproico (VPA), tricostatina A (TSA) y butirato de sodio (NaB) durante 24 horas, en forma previa y concomitante a la exposición a etopósido (1 hora).

Se seleccionaron dosis de NaB a las que se observó el aumento en la acetilación de histonas como efecto del tratamiento con este HDACi. Para ello se realizaron ensayos de Western Blot luego de la exposición durante 24 horas a NaB (1 y 5 mM) en las líneas celulares 253J y CHOK1, empleando anticuerpos anti-histonas acetiladas (Figuras 16 y 17). En el caso de 253J se empleó un anticuerpo anti-histona H3 acetilada (lisina 9 de histona H3 - H3K9ac) (Figura 16) y en el caso de CHOK1 un anticuerpo anti-histona H4 acetilada (lisina 8 de histona H4 - H4K8ac) (Figura 17).

En el caso de VPA y TSA, las dosis y tiempos de exposición a ser empleados en los ensayos clonogénicos se determinó en base a datos de la bibliografía. En el caso de VPA, esta determinación se basó en resultados obtenidos por Wang et al. (2013) y Das et al. (2007). Wang et al. (2013) observaron que el tratamiento durante 72 horas con las dosis de VPA 1 y 1.5 mM aumentó el nivel de la histona H3 acetilada en células T24. Asimismo, Das et al. (2007) constataron la acetilación de la histona H4 en líneas celulares de glioblastoma humano tratadas con VPA (1.5 mM) luego de 8 horas de exposición, aumentando el nivel de acetilación hasta las 24-48 hs y disminuyendo a las 72 hs. En el caso de TSA, Hoshikawa et al. (1994) constataron un aumento significativo de la acetilación de la histona H4 luego del tratamiento de células de carcinoma humano, T24 y HeLa con la dosis de 100 ng/ml durante 24 horas.

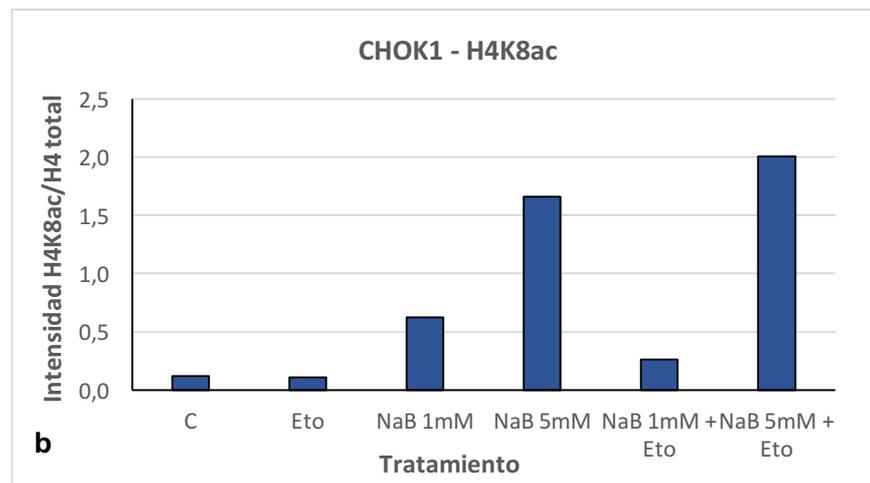
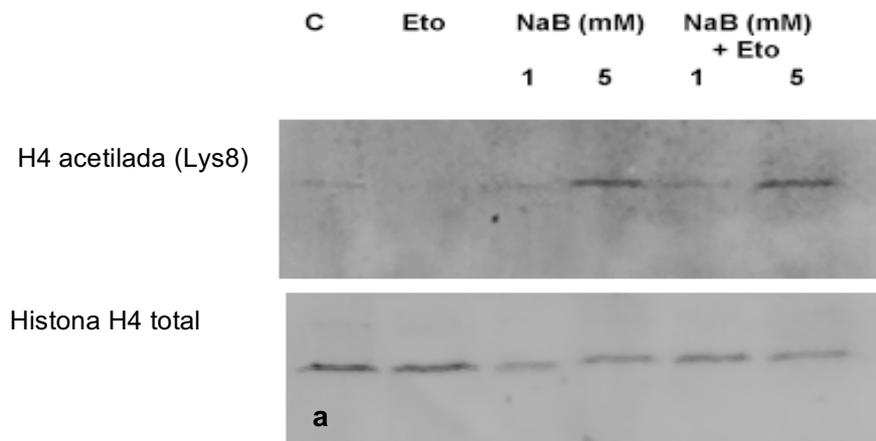
**Línea celular tumoral 253J**



**Figura 16 – a)** Western Blot representativo mostrando la acetilación de la histona H3 en la lisina 9 en la línea celular tumoral 253J luego del tratamiento con butirato de sodio (NaB) (1 y 5 mM) durante 24 horas y la combinación de NaB y etopósido (20  $\mu$ M) durante 1 hora.

**b)** Cuantificación por densitometría de las bandas obtenidas con los diferentes tratamientos empleando el software Image J (NIH).

**Línea celular de ovario de hámster chino CHOK1**

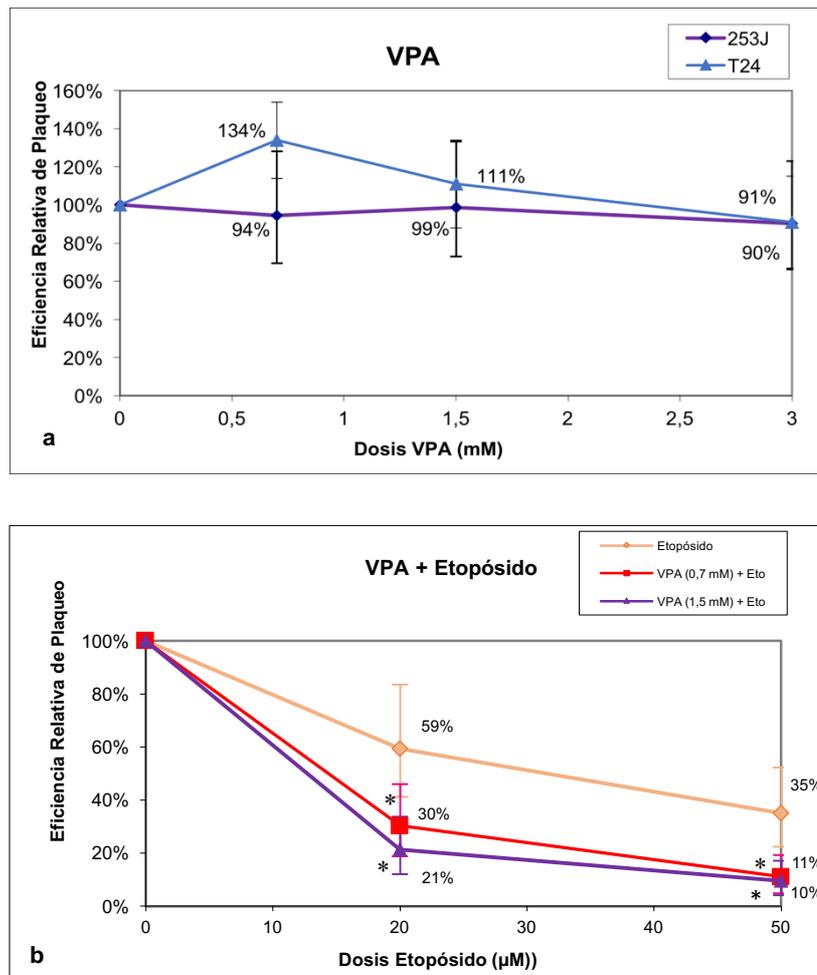


**Figura 17 – a)** Western Blot representativo mostrando de la acetilación de la histona H4 (lisina 8) en la línea celular CHOK1 tratada con butirato de sodio (NaB) (1 y 5 mM) durante 24 horas y la combinación de butirato de sodio y etopósido (20  $\mu$ M) (1 hora).  
**b)** Cuantificación por densitometría de las bandas obtenidas con los diferentes tratamientos empleando el software Image J (NIH).

### **7.1.1- Acido valproico**

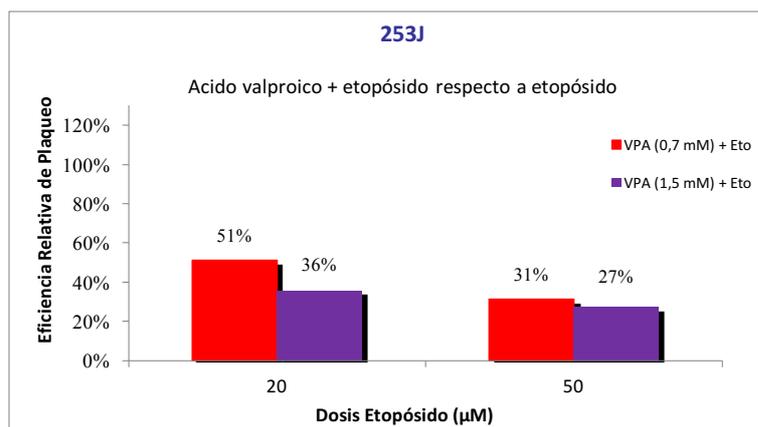
La evaluación del efecto de ácido valproico (VPA) fue realizada en las líneas celulares tumorales de vejiga humana 253J y T24. Como puede verse en la Figura 18a, luego de la exposición durante 24 horas a este inhibidor no disminuyó la sobrevida de estas líneas celulares con ninguna de las dosis de VPA ensayadas (0.7, 1.5 y 3 mM), ya que los niveles de sobrevida se encontraron en el rango del control negativo. Incluso en el caso de T24 se observó una mayor sobrevida que en el control negativo con la dosis de 0.7 mM.

El análisis del efecto de este HDACi en el tratamiento combinado con etopósido (20 y 50  $\mu$ M) fue realizado en la línea 253J, **observándose sensibilización frente al etopósido con las dos dosis de VPA ensayadas** (0.7 y 1.5 mM) (Figura 18b). Es decir que la sobrevida luego del tratamiento combinado (VPA + Etopósido) resultó significativamente menor que la de las células tratadas con etopósido solamente. En la Tabla 5 se presentan las pruebas de hipótesis realizadas para contrastar los resultados obtenidos en los ensayos clonogénicos llevados a cabo con la combinación de estos tratamientos. En las dos comparaciones realizadas la hipótesis nula ( $H_0$ ) considera que la sobrevida es igual en el tratamiento combinado (VPA + Etopósido) que en el tratamiento con etopósido solamente, mientras que en la hipótesis alternativa ( $H_1$ ) se considera que la sobrevida del tratamiento combinado es menor que solo con etopósido. Tal como puede observarse, los resultados de estos análisis permitieron rechazar la hipótesis nula y confirmaron una disminución significativa en la sobrevida en las células expuestas al tratamiento combinado con ambas dosis de VPA (a un nivel de significación del 1%) en comparación con las células expuestas a etopósido solamente.



**Figura 18** - Eficiencia relativa de plaqueo obtenida en los ensayos clonogénicos realizados en las líneas celulares 253J y T24. **a)** Datos obtenidos en las células tratadas con ácido valproico (VPA) por 24 horas. **b)** Datos obtenidos luego del tratamiento con etopósido (20 y 50  $\mu\text{M}$ ) con y sin pre-tratamiento con VPA (0.7 y 1.5 mM) durante 24 horas. Las barras de error representan los intervalos de confianza del 99% de las 3 réplicas realizadas. (\*) Datos que presentan una diferencia estadísticamente significativa a un nivel de significación ( $\alpha$ ) del 1% en comparación con el porcentaje de sobrevivencia del tratamiento con etopósido solamente (ver Tabla 5).

En la Figura 19 se graficó la eficiencia relativa de plaqueo de los tratamientos combinados (VPA + Etopósido) con respecto al tratamiento con etopósido solamente. En este caso se tomó como 100% la sobrevivencia de las células tratadas solamente con etopósido (20 y 50  $\mu\text{M}$ ). Los resultados presentados en dicha Figura corresponden al porcentaje de sobrevivencia de cada combinación de VPA+ etopósido con respecto a del tratamiento solamente con etopósido (20 y 50  $\mu\text{M}$ ). Se observó que el efecto de ambas dosis de VPA fue similar en las dos dosis de etopósido. La sobrevivencia resultó 2 y 2.8 veces menor en los tratamientos combinados con etopósido 20  $\mu\text{M}$  y en el caso de etopósido 50  $\mu\text{M}$  3.2 y 3.7 veces para VPA 0.7 y 1.5 mM respectivamente, en comparación con la sobrevivencia del tratamiento con etopósido solamente (Figura 19).



**Figura 19** - Eficiencia relativa de plaqueo de la línea celular 253J en los tratamientos combinados con cada una de las dosis de ácido valproico (VPA) (0.7 y 1.5 mM) con respecto al tratamiento con etopósido solamente (20 y 50 µM). En este caso se toma como 100% la sobrevivencia de las células tratadas solamente con etopósido (20 y 50 µM), y los resultados presentados corresponden al porcentaje de sobrevivencia de cada combinación de VPA+ etopósido con respecto a la presentada por el tratamiento con cada dosis de etopósido en particular.

<b>H0: Sobrevivencia 253J con VPA (0,7 mM) + Eto = Sobrevivencia 253J con Eto</b>			
<b>H1: Sobrevivencia 253J con VPA (0,7 mM) + Eto &lt; Sobrevivencia 253J con Eto</b>			
<b>Valor Crítico</b>	<b>2,326</b>	<b>Nivel Significación</b>	<b>1%</b>
<b>Estadístico:</b>	<b>Resultado:</b>		
<b>Eto 20 µM</b>	<b>3,824</b>	<b>Se Rechaza Ho</b>	
<b>Eto 50 µM</b>	<b>4,358</b>	<b>Se Rechaza Ho</b>	

<b>H0: Sobrevivencia 253J con VPA (1,5 mM) + Eto = Sobrevivencia 253J con Eto</b>			
<b>H1: Sobrevivencia 253J con VPA (1,5 mM) + Eto &lt; Sobrevivencia 253J con Eto</b>			
<b>Valor Crítico</b>	<b>2,326</b>	<b>Nivel Significación</b>	<b>1%</b>
<b>Estadístico:</b>	<b>Resultado:</b>		
<b>Eto 20 µM</b>	<b>5,259</b>	<b>Se Rechaza Ho</b>	
<b>Eto 50 µM</b>	<b>4,674</b>	<b>Se Rechaza Ho</b>	

**Tabla 5** – Resultados de los contrastes de igualdad de proporciones para dos muestras realizados para determinar si la sobrevivencia en el tratamiento combinado con las diferentes dosis de ácido valproico (VPA) y etopósido (Eto) (VPA 0,7 y 1,5 mM + Eto 20 y 50 µM) es significativamente diferente (al 1% de significación) de la sobrevivencia obtenida con el tratamiento con etopósido solamente en la línea celular 253J. Los dos contrastes realizados fueron de una cola (H1:  $pX < pY$ ).

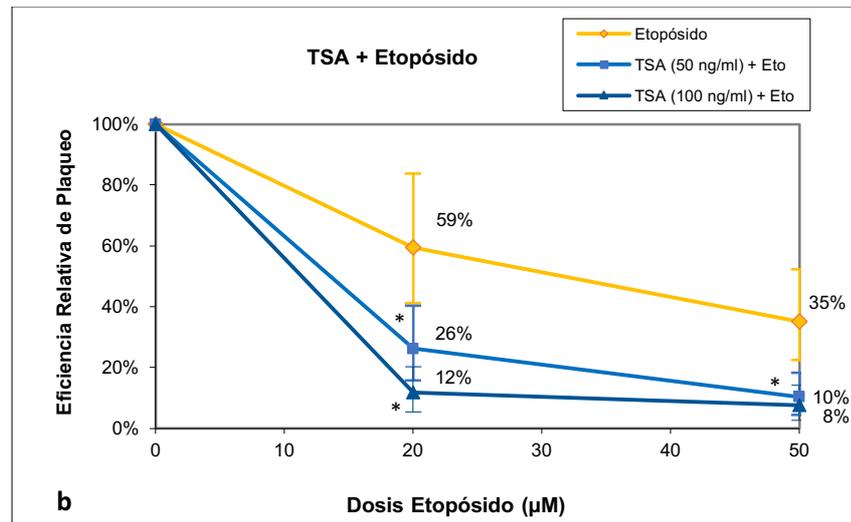
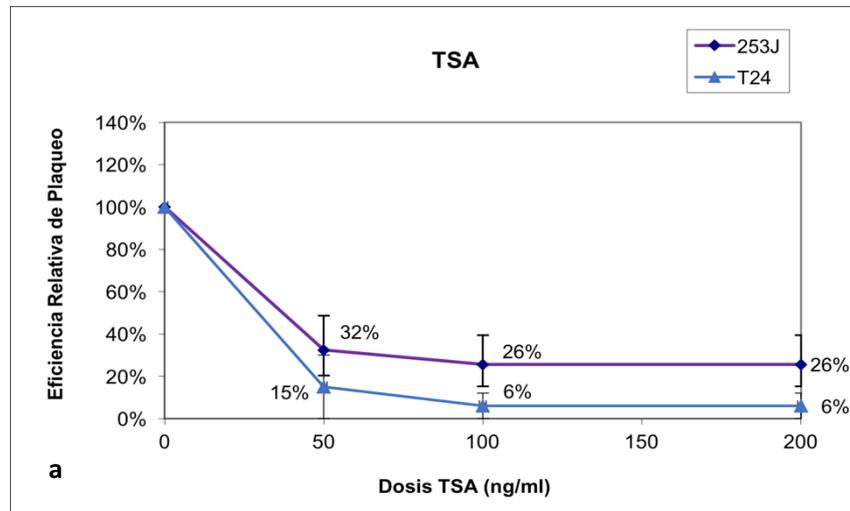
### 7.1.2- Tricostatina A

Al igual que en el caso de ácido valproico, se analizó el efecto del tratamiento con tricostatina A (TSA) durante 24 horas en la sobrevivencia y proliferación de las líneas celulares tumorales 253J y T24. A diferencia de lo observado con ácido valproico, en el tratamiento solo con TSA se observó una disminución significativa de la sobrevivencia en forma dependiente de la dosis en las dos líneas celulares. Como puede apreciarse en la Figura 20a el porcentaje de sobrevivencia con respecto al control negativo en 253J fue de 32% y 26% con TSA 50 y 100 ng/ml respectivamente, manteniéndose en 26% con TSA 200 ng/ml. Lo mismo pudo observarse en la línea celular T24, obteniéndose valores de 15 % para TSA 50 ng/ml y 6% para las dosis de 100 y 200 ng/ml respectivamente (Figura 20a).

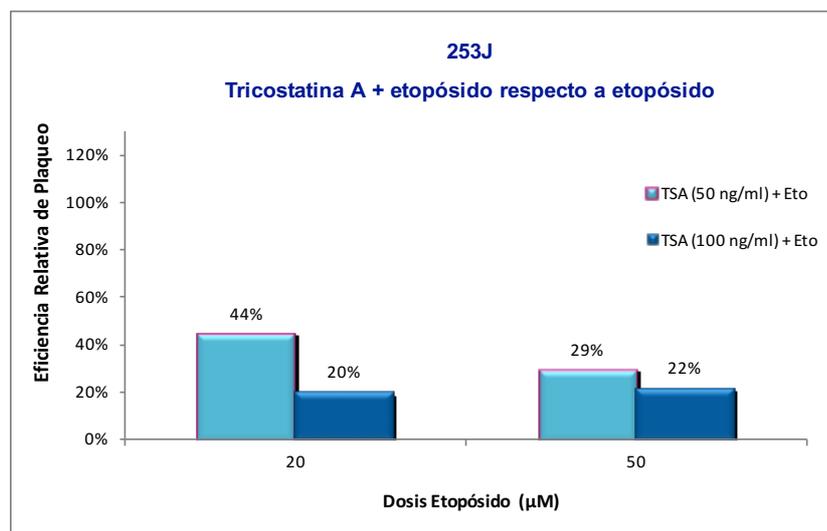
Al analizar el efecto del tratamiento combinado de TSA (50 y 100 ng/ml) y etopósido (20 y 50  $\mu$ M) en la sobrevivencia de la línea celular 253J, **se observó sensibilización al tratamiento con etopósido con ambas dosis de TSA en las dos dosis de este agente genotóxico**. Es decir que se constató una disminución significativa en la sobrevivencia en comparación con la de las células expuestas a etopósido solamente (Figura 20b). Tal como se presenta en la Tabla 6, al realizar las pruebas de hipótesis para contrastar los resultados obtenidos en los tratamientos combinados con los de las células tratadas solo con etopósido, se pudo confirmar que la sobrevivencia de las combinaciones de las dos dosis de TSA con las dos dosis de etopósido fue significativamente menor a un nivel de significación del 1%.

Como puede verse en la figura 21, en el caso de etopósido 20  $\mu$ M los niveles de reducción fueron de 2.3 y 5 veces para TSA 50 y 100 ng/ml, respectivamente, en comparación con la sobrevivencia de las células expuestas a etopósido solamente. Mientras que para etopósido 50  $\mu$ M la sobrevivencia de los tratamientos combinados (TSA + Etopósido) fue 3.4 y 4.5 veces menor que con el tratamiento solo con etopósido para TSA 50 y 100 ng/ml respectivamente (Figura 21).

Es posible atribuir la disminución de la sobrevivencia observada en el tratamiento combinado (TSA + Etopósido) a la potenciación del efecto de etopósido por parte de TSA, dado que la reducción de la sobrevivencia ocasionada por TSA en forma aislada fue menor que cuando las células fueron expuestas a la combinación de tratamientos.



**Figura 20-** Eficiencia relativa de plaqueo obtenida en los ensayos clonogénicos realizados en la línea celular 253J. **a)** Datos obtenidos en las células tratadas con Tricostatina A (TSA) por 24 horas. **b)** Datos obtenidos luego del tratamiento con etopósido (20 y 50 µM) con y sin pre-tratamiento con TSA (50 y 100 ng/ml) durante 24 horas. Las barras de error representan los intervalos de confianza del 99% de las 3 réplicas realizadas. (\*) Datos que presentan una diferencia estadísticamente significativa a un nivel de significación ( $\alpha$ ) del 1% en comparación con el porcentaje de supervivencia del tratamiento con etopósido solamente (Ver Tabla 6).



**Figura 21** - Eficiencia relativa de plaqueo de la línea celular 253J en los tratamientos combinados con cada una de las dosis de Tricostatina A (TSA) (50 y 100 ng/ml) con respecto al tratamiento con etopósido solamente (20 y 50 µM). En este caso se tomó como 100% la sobrevida de las células tratadas solamente con etopósido (20 y 50 µM). Por tanto los resultados presentados corresponden al porcentaje de sobrevida de cada combinación de TSA+ etopósido con respecto a la presentada por el tratamiento con cada dosis de etopósido en particular.

<b>H0: Sobrevida 253J con TSA (50 mg/ml) + Eto = Sobrevida 253J con Eto</b>			
<b>H1: Sobrevida 253J con TSA (50 mg/ml) + Eto &lt; Sobrevida 253J con Eto</b>			
<b>Valor Crítico</b>	<b>2,326</b>	<b>Nivel Significación</b>	<b>1%</b>
<b>Estadístico:</b>	<b>Resultado:</b>		
<b>Eto 20 µM</b>	<b>4,467</b>	<b>Se Rechaza Ho</b>	
<b>Eto 50 µM</b>	<b>4,515</b>	<b>Se Rechaza Ho</b>	
<b>H0: Sobrevida 253J con TSA (100 mg/ml) + Eto = Sobrevida 253J con Eto</b>			
<b>H1: Sobrevida 253J con TSA (100 mg/ml) + Eto &lt; Sobrevida 253J con Eto</b>			
<b>Valor Crítico</b>	<b>2,326</b>	<b>Nivel Significación</b>	<b>1%</b>
<b>Estadístico:</b>	<b>Resultado:</b>		
<b>Eto 20 µM</b>	<b>7,002</b>	<b>Se Rechaza Ho</b>	
<b>Eto 50 µM</b>	<b>5,170</b>	<b>Se Rechaza Ho</b>	

**Tabla 6-** – Resultados de los contrastes de igualdad de proporciones para dos muestras realizados para determinar si la sobrevida en el tratamiento combinado con las diferentes dosis de tricostatina A y etopósido (TSA 50 y 100 ng/ml + Eto 20 y 50 µM) es significativamente diferente (al 1% de significación) de la sobrevida obtenida con el tratamiento con etopósido solamente en la línea celular 253J. Los dos contrastes realizados fueron de una cola (H1:  $pX < pY$ ).

### 7.1.3- Butirato de sodio

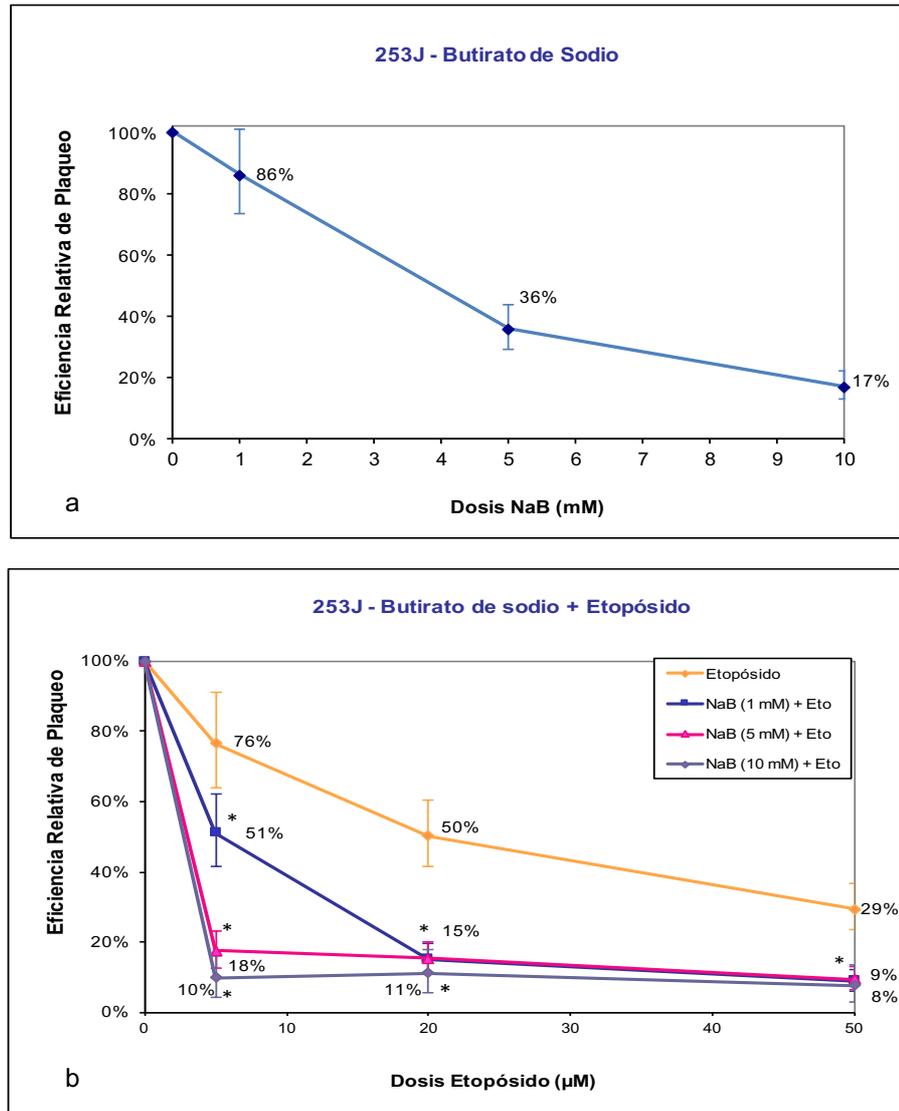
En el caso del HDACi butirato de sodio (NaB), se analizó la sobrevida y proliferación celular luego del tratamiento con etopósido en dos líneas celulares tumorales humanas: 253J y T24 y en la línea celular de hámster chino CHOK1. El efecto causado por el pre-tratamiento con NaB en la sobrevida al tratamiento con etopósido fue diferente en las tres líneas celulares evaluadas (Méndez-Acuña et al. 2017, *manuscrito en preparación*).

En la línea celular tumoral de vejiga **253J el pre-tratamiento con todas las dosis de NaB empleadas sensibilizó a las células a la exposición a etopósido**. Es decir que la sobrevida de las células expuestas a la combinación de etopósido con las dosis de NaB 1, 5 y 10 mM resultó significativamente menor ( $\alpha=1\%$ ) que la de las células tratadas solamente con etopósido para las tres dosis de esta droga ensayadas (5, 20 y 50  $\mu\text{M}$ ) (Figura 22b y Tabla 7). Si bien el tratamiento solamente con NaB redujo la sobrevida de esta línea celular en forma dependiente de la dosis (Figura 22a), en la combinación con las diferentes dosis de etopósido la sobrevida resultó mucho menor aún (Figura 22b), por lo que es posible atribuir la reducción en la sobrevida observada a la potenciación del efecto del etopósido por parte de NaB.

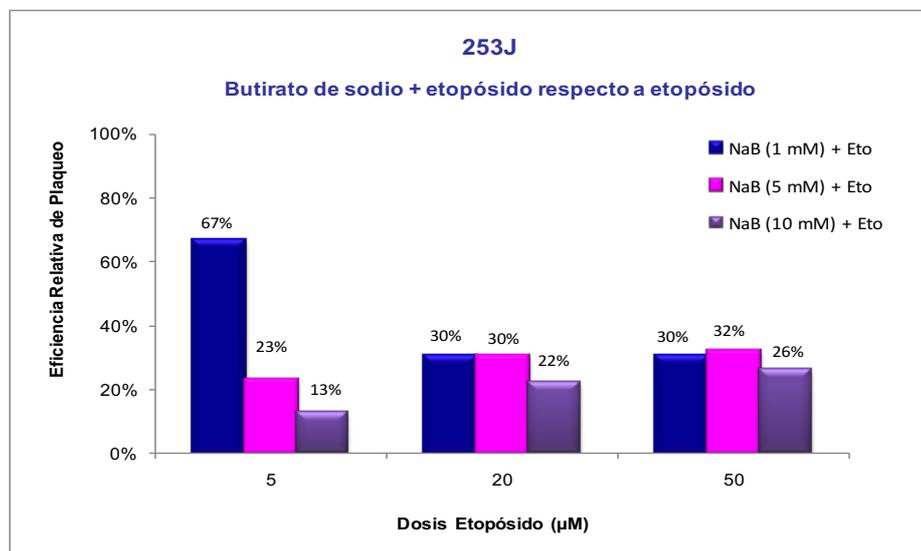
En las dosis de etopósido más altas (20 y 50  $\mu\text{M}$ ) el efecto de las tres dosis de NaB en la disminución de la sobrevida celular fue similar entre sí. En la Figura 23 se grafica la eficiencia relativa de plaqueo de los tratamientos combinados (NaB + Etopósido) con respecto al tratamiento con etopósido solamente. Como se puede observar en esta Figura, para las dosis de etopósido 20 y 50  $\mu\text{M}$  la sobrevida con las tres dosis de NaB fue entre 3 y 4.5 veces menor que la sobrevida en el tratamiento con etopósido solamente.

Sin embargo, para la dosis de etopósido 5  $\mu\text{M}$  se observaron diferencias en la disminución de la sobrevida en los tratamientos combinados con las diferentes dosis de NaB. Con las dosis de NaB más elevadas la disminución de la sobrevida fue más pronunciada que con 1 mM, registrándose una sobrevida 4.4 y 7.7 veces menor que con etopósido solamente para NaB 5 y 10 mM, respectivamente. Sin embargo, con NaB 1 mM en esta dosis de etopósido (5  $\mu\text{M}$ ) la sobrevida fue solo 1.5 veces menor que con etopósido solamente.

Es posible considerar la combinación de dosis efectiva como la menor dosis de ambos agentes a la que la sobrevida disminuye en más de un 50% en comparación con el control negativo. De acuerdo a los resultados obtenidos para 253J la combinación de dosis efectiva es la de NaB 5 mM con etopósido 5  $\mu\text{M}$ , la que indujo una disminución de la sobrevida de 4.4 veces en comparación con la obtenida en el tratamiento con etopósido solamente (Figura 23).



**Figura 22** - Eficiencia relativa de plaqueo con respecto al control negativo obtenida en los ensayos clonogénicos realizados en la línea celular 253J. **a)** Datos obtenidos en las células tratadas con butirato de sodio (NaB) (1, 5 y 10 mM) por 24 horas. **b)** Datos obtenidos luego del tratamiento con etopósido (5, 20 y 50 μM) (1 hora) con y sin pre-tratamiento con butirato de sodio (NaB) durante 24 horas. Pool de datos de 3 experimentos independientes, cada uno realizado en triplicado. Las barras de error representan los intervalos de confianza del 99%. (\*) Datos que presentan una diferencia estadísticamente significativa (a un nivel de significación ( $\alpha$ ) del 1%) en comparación con los obtenidos en los tratamientos con la misma dosis de etopósido pero sin tratamiento con NaB (ver Tabla 7).



**Figura 23** - Eficiencia relativa de plaqueo de la línea celular 253J en los tratamientos combinados con cada una de las dosis de butirato de sodio (NaB) (1, 5 y 10 mM) con respecto al tratamiento con etopósido solamente (5, 20 y 50 µM).

<b>H0: Sobrevida 253J con NaB (1mM) + Eto = Sobrevida 253J con Eto</b>			
<b>H1: Sobrevida 253J con NaB (1mM) + Eto &lt; Sobrevida 253J con Eto</b>			
<b>Valor Crítico</b>	<b>2,326</b>	<b>Nivel Significación</b>	<b>1%</b>
<b>Estadístico:</b>	<b>Resultado:</b>		
<b>Eto 5 µM</b>	<b>4,924</b>	<b>Se Rechaza Ho</b>	
<b>Eto 20 µM</b>	<b>10,648</b>	<b>Se Rechaza Ho</b>	
<b>Eto 50 µM</b>	<b>8,029</b>	<b>Se Rechaza Ho</b>	

<b>H0: Sobrevida 253J con NaB (5mM) + Eto = Sobrevida 253J con Eto</b>			
<b>H1: Sobrevida 253J con NaB (5mM) + Eto &lt; Sobrevida 253J con Eto</b>			
<b>Valor Crítico</b>	<b>2,326</b>	<b>Nivel Significación</b>	<b>1%</b>
<b>Estadístico:</b>	<b>Resultado:</b>		
<b>Eto 5 µM</b>	<b>13,064</b>	<b>Se Rechaza Ho</b>	
<b>Eto 20 µM</b>	<b>10,582</b>	<b>Se Rechaza Ho</b>	
<b>Eto 50 µM</b>	<b>7,772</b>	<b>Se Rechaza Ho</b>	

<b>H0: Sobrevida 253J con NaB (10mM) + Eto = Sobrevida 253J con Eto</b>			
<b>H1: Sobrevida 253J con NaB (10mM) + Eto &lt; Sobrevida 253J con Eto</b>			
<b>Valor Crítico</b>	<b>2,326</b>	<b>Nivel Significación</b>	<b>1%</b>
<b>Estadístico:</b>	<b>Resultado:</b>		
<b>Eto 5 µM</b>	<b>9,365</b>	<b>Se Rechaza Ho</b>	
<b>Eto 20 µM</b>	<b>6,613</b>	<b>Se Rechaza Ho</b>	
<b>Eto 50 µM</b>	<b>4,729</b>	<b>Se Rechaza Ho</b>	

**Tabla 7** – Resultados de los contrastes de igualdad de proporciones para dos muestras realizados para determinar si la sobrevida en el tratamiento combinado con las diferentes dosis de butirato de sodio y etopósido (NaB 1, 5 y 10 mM + Eto) es significativamente diferente (al 1% de significación) de la sobrevida obtenida al realizar el tratamiento con etopósido solamente en la línea celular 253J. H0 es la hipótesis nula y H1 la hipótesis alternativa. Los tres contrastes realizados fueron de una cola (H1:  $pX < pY$ ).

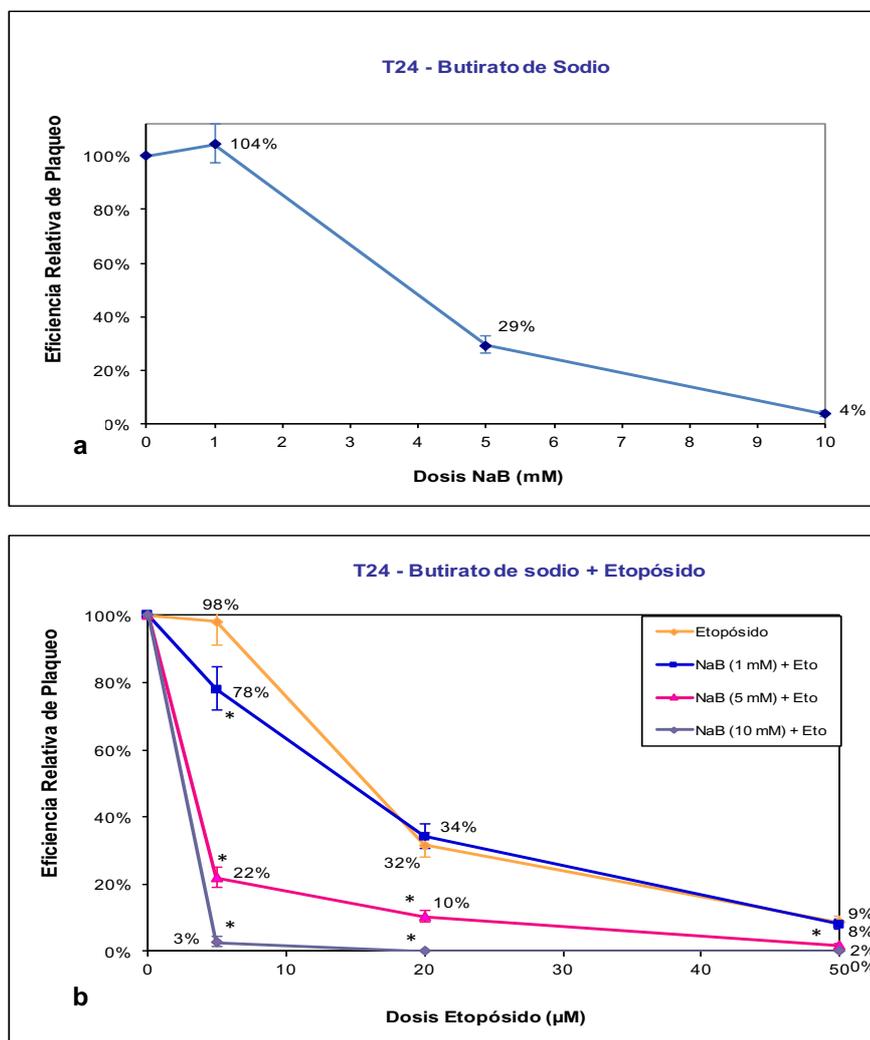
En la línea celular tumoral de vejiga **T24 se observó sensibilización por las tres dosis de NaB aunque no para todas las dosis de etopósido**. Es decir que el efecto del pre-tatamiento con NaB en la sobrevida celular fue diferente dependiendo de las dosis de NaB y de etopósido empleadas.

Como se observa en la Figura 24b, la dosis de **etopósido 5  $\mu\text{M}$**  fue la única en la que se observó **sensibilización con las tres dosis de NaB**. En esta dosis de etopósido, se observó una disminución significativa de la sobrevida ( $\alpha=1\%$ ) en las células pre-tratadas con NaB 1, 5 y 10 mM en comparación con la sobrevida de las células expuestas a etopósido solamente, observándose mayor sensibilización a medida que aumentó la dosis de NaB (Figura 24b, Tabla 8). Como se puede apreciar en la Figura 25, en los tratamientos combinados de etopósido 5  $\mu\text{M}$  con NaB 1, 5 y 10 mM la sobrevida resultó 1.3, 4.5 y 33.3 veces menor, respectivamente, que en los tratamientos con etopósido solamente.

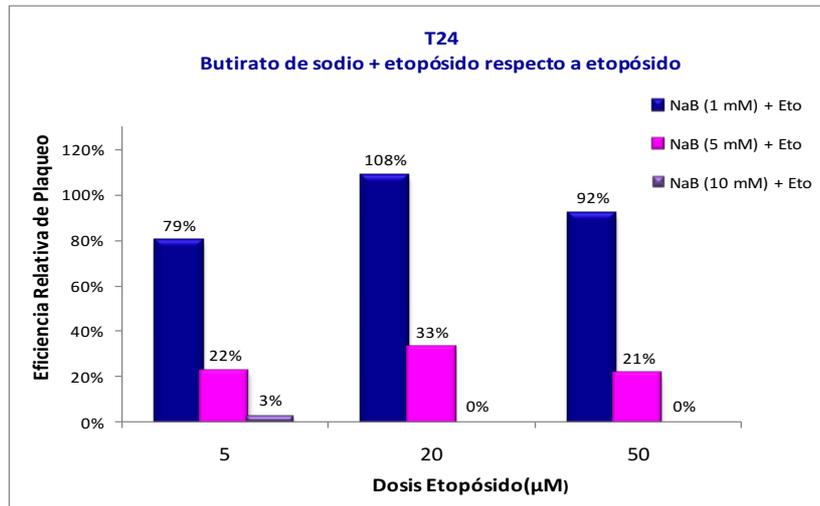
En las dosis de **etopósido 20 y 50  $\mu\text{M}$**  la sobrevida disminuyó en forma significativa ( $\alpha=1\%$ ) en los tratamientos combinados con respecto a la de las células expuestas a etopósido solo con las **dosis de NaB mayores (5 y 10 mM)**, pero no con NaB 1 mM (Figura 24b, Tabla 8). Como puede verse en la Figura 25, en el caso de etopósido 20  $\mu\text{M}$  la combinación con NaB 5 mM resultó en una sobrevida 3 veces menor que con etopósido solamente, mientras que con NaB 10 mM no existió sobrevida. Lo mismo ocurrió con esta dosis de NaB para etopósido 50  $\mu\text{M}$ . Mientras que con NaB 5 mM en combinación con etopósido 50  $\mu\text{M}$  la disminución de la sobrevida fue de 4.7 veces en comparación con las células tratadas solo con etopósido (Figura 25).

Si bien en esta línea celular en el tratamiento solamente con NaB las dosis de 5 y 10 mM produjeron una disminución significativa de la sobrevida (29% y 4% respectivamente) con respecto al control negativo (Figura 24a), en la combinación de las mismas con etopósido la disminución resultó aún mayor (Figura 24b). Por lo tanto, se puede decir que existió una potenciación del efecto del etopósido por parte de NaB.

Al igual que para 253J, la combinación de dosis efectiva en el caso de T24 resultó ser NaB 5 mM combinada con Etopósido 5  $\mu\text{M}$ , que redujo la sobrevida 4.5 veces en comparación con el tratamiento con etopósido solamente (Figura 25).



**Figura 24** - Eficiencia relativa de plaqueo con respecto al control negativo obtenida en los ensayos clonogénicos realizados en la línea celular T24. **a)** Datos obtenidos en las células tratadas con butirato de sodio (NaB) (1, 5 y 10 Mm) por 24 horas. **b)** Datos obtenidos luego del tratamiento con etopósido (5, 20 y 50 μM) (1 hora) con y sin pre-tratamiento con butirato de sodio (NaB) durante 24 horas. Pool de datos de 4 experimentos independientes, cada uno realizado en triplicado. Las barras de error representan los intervalos de confianza del 99%. (\*) Datos que presentan una diferencia estadísticamente significativa a un nivel de significación ( $\alpha$ ) del 1% en comparación con la sobrevivencia de las células tratadas con la misma dosis de etopósido pero sin tratamiento con NaB (ver Tabla 8).



**Figura 25** - Eficiencia relativa de plaqueo de la línea celular T24 en los tratamientos combinados con cada una de las dosis de butirato de sodio (NaB) (1, 5 y 10 mM) con respecto al tratamiento con etoposido solamente (5, 20 y 50 µM).

<b>H0: Sobrevida T24 con NaB (1mM) + Eto = Sobrevida T24 con Eto</b>			
<b>H1: Sobrevida T24 con NaB (1mM) + Eto &lt; Sobrevida T24 con Eto</b>			
<b>Valor Crítico</b>	<b>2,326</b>	<b>Nivel Significación</b>	<b>1%</b>
<b>Estadístico:</b>	<b>Resultado:</b>		
<b>Eto 5 µM</b>	<b>7,501</b>	<b>Se Rechaza Ho</b>	
<b>Eto 20 µM</b>	<b>-1,550</b>	<b>No Se Rechaza Ho</b>	
<b>Eto 50 µM</b>	<b>0,794</b>	<b>No Se Rechaza Ho</b>	

<b>H0: Sobrevida T24 con NaB (5mM) + Eto = Sobrevida T24 con Eto</b>			
<b>H1: Sobrevida T24 con NaB (5mM) + Eto &lt; Sobrevida T24 con Eto</b>			
<b>Valor Crítico</b>	<b>2,326</b>	<b>Nivel Significación</b>	<b>1%</b>
<b>Estadístico:</b>	<b>Resultado:</b>		
<b>Eto 5 µM</b>	<b>32,279</b>	<b>Se Rechaza Ho</b>	
<b>Eto 20 µM</b>	<b>15,210</b>	<b>Se Rechaza Ho</b>	
<b>Eto 50 µM</b>	<b>9,555</b>	<b>Se Rechaza Ho</b>	

<b>H0: Sobrevida T24 con NaB (10mM) + Eto = Sobrevida T24 con Eto</b>			
<b>H1: Sobrevida T24 con NaB (10mM) + Eto &lt; Sobrevida T24 con Eto</b>			
<b>Valor Crítico</b>	<b>2,326</b>	<b>Nivel Significación</b>	<b>1%</b>
<b>Estadístico:</b>	<b>Resultado:</b>		
<b>Eto 5 µM</b>	<b>25,000</b>	<b>Se Rechaza Ho</b>	
<b>Eto 20 µM</b>	<b>13,208</b>	<b>Se Rechaza Ho</b>	
<b>Eto 50 µM</b>	<b>6,708</b>	<b>Se Rechaza Ho</b>	

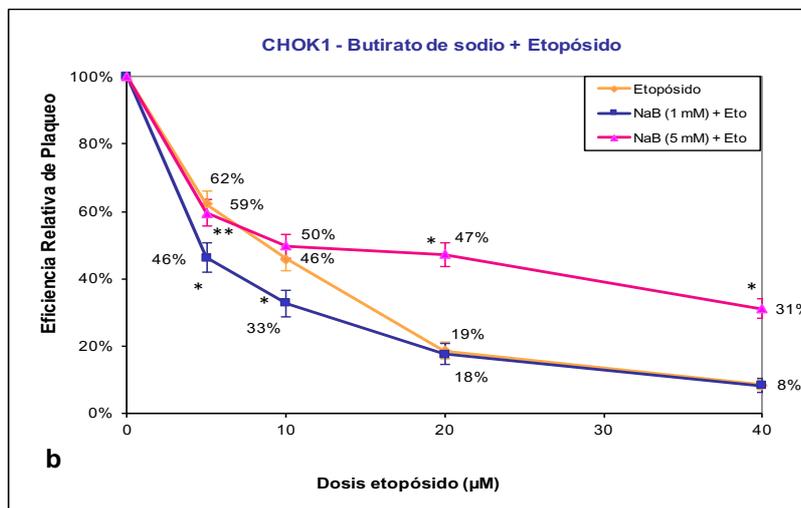
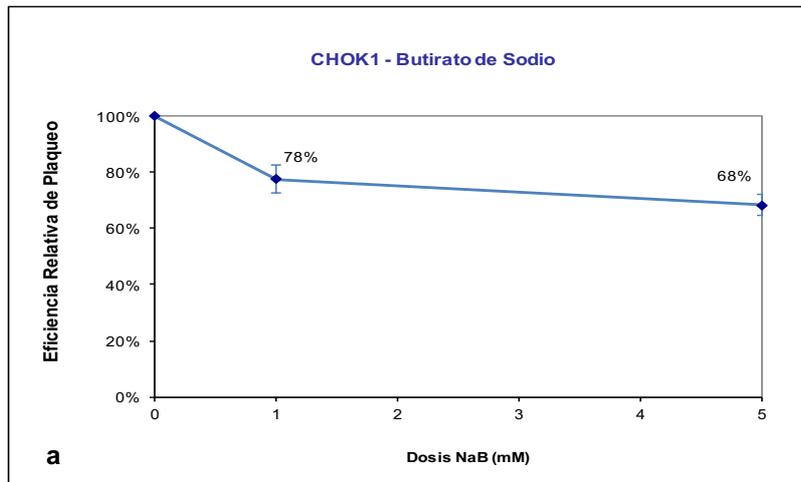
**Tabla 8** – Resultados de los contrastes de igualdad de proporciones para dos muestras realizados para determinar si la sobrevida entre el tratamiento combinado con las diferentes dosis de butirato de sodio y etoposido (NaB 1, 5 y 10 mM + Eto) es significativamente diferente (al 1% de significación) de la sobrevida obtenida con el tratamiento con etoposido solamente en la línea celular T24. H0 es la hipótesis nula y H1 la hipótesis alternativa. Los tres contrastes realizados fueron de una cola (H1:  $pX < pY$ ).

A diferencia de lo observado en las líneas celulares tumorales de vejiga humanas, en la línea celular de hámster chino CHO K1 solo el tratamiento combinado con **NaB 1 mM sensibilizó a las células al tratamiento con etopósido para las dosis de 5 y 10  $\mu$ M, aunque no para las dosis de etopósido mayores**. En estos dos tratamientos combinados (NaB 1 mM + Etopósido 5 y 10  $\mu$ M) la sobrevida resultó significativamente menor ( $\alpha=1\%$ ) que en el tratamiento con etopósido solamente (Figura 26b, Tabla 9). Como puede apreciarse en la Figura 27, con NaB 1 mM en las dosis de etopósido 5 y 10  $\mu$ M en el tratamiento combinado se obtuvo una sobrevida 1.4 veces menor que la observada con etopósido solamente. Sin embargo, en el caso de las dosis de etopósido 20 y 40  $\mu$ M, la sobrevida con la combinación con NaB 1 mM resultó prácticamente igual que en el tratamiento solo con etopósido (Figuras 26b y 27, Tabla 9). A pesar de que el tratamiento solamente con NaB 1 mM provocó la disminución de la sobrevida a un 78% en comparación con el control negativo (Figura 26a), la sobrevida del tratamiento combinado (NaB 1 mM + Etopósido 5 y 10  $\mu$ M) fue significativamente menor (Figura 26b). Por lo tanto, la disminución de la sobrevida observada en el tratamiento combinado en comparación con la del tratamiento solo con etopósido para las dosis de 5 y 10  $\mu$ M puede ser atribuida a la potenciación del efecto de etopósido por esta dosis de NaB (1 mM).

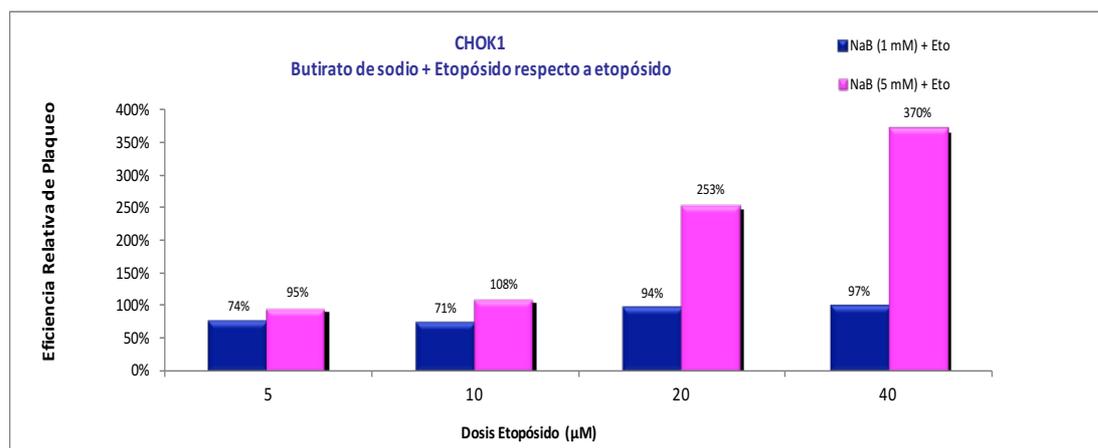
En el caso de **NaB 5 mM**, esta dosis de NaB no tuvo efecto potenciador del etopósido en el tratamiento combinado (NaB 5 mM + Etopósido), sino que por el contrario, **la sobrevida resultó significativamente mayor que en el tratamiento solo con etopósido** (dosis de 20 y 40  $\mu$ M) (Figura 26b). En la Figura 27 se puede apreciar que la sobrevida de las células expuestas a la combinación de NaB 5 mM + Etopósido 20 y 40  $\mu$ M resultó 2.5 y 3.7 veces mayor, respectivamente, que la de las células tratadas solo con etopósido.

En la Tabla 9 se presentan las pruebas de hipótesis realizadas para contrastar los resultados obtenidos en los tratamientos combinados en comparación con etopósido solamente. En ambas dosis de NaB la hipótesis nula ( $H_0$ ) supone que la sobrevida en ambos tipos de tratamientos fue igual. Sin embargo, a diferencia de NaB 1 mM, en el caso de NaB 5 mM la hipótesis alternativa ( $H_1$ ) considera que la sobrevida en el tratamiento combinado fue mayor que en el tratamiento solo con etopósido. En esta dosis de NaB, para las dosis de etopósido 5 y 10  $\mu$ M no fue posible rechazar la  $H_0$ , por lo que los valores de sobrevida obtenidos no presentan una diferencia estadísticamente significativa en el tratamiento combinado (NaB 5 mM + Etopósido) en comparación con la sobrevida de etopósido solamente. Pero en el caso de las dosis de etopósido 20 y 40  $\mu$ M, la diferencia observada en los tratamientos combinados resultó estadísticamente significativa ( $\alpha= 1 \%$ ).

En el caso de CHOK1, la combinación de dosis efectiva resultó ser NaB 1 mM combinada con Etopósido 5  $\mu$ M, que redujo la sobrevida 1.4 veces en comparación con el tratamiento con etopósido solamente (Figura 27).



**Figura 26** – Eficiencia relativa de plaqueo obtenida en los ensayos clonogénicos realizados en la línea celular de hámster chino CHOK1. **a)** Datos obtenidos en las células tratadas con butirato de sodio (NaB) (1 y 5 mM) por 24 horas. **b)** Datos obtenidos luego del tratamiento con etopósido (5, 10, 20 y 40 μM) con y sin pre-tratamiento con NaB durante 24 horas. Pool de datos de 3 experimentos independientes, cada uno realizado en cuadruplicado. Las barras de error representan los intervalos de confianza del 99%. (\*) y (\*\*) Datos que presentan una diferencia estadísticamente significativa a un nivel de significación del 1% y 5 % respectivamente en comparación con el porcentaje de sobrevivencia del tratamiento con etopósido solamente.



**Figura 27** - Eficiencia relativa de plaqueo de la línea celular CHOK1 en los tratamientos combinados con cada una de las dosis de butirato de sodio (NaB) (1 y 5 mM) con respecto al tratamiento con etoposido solamente (5, 10, 20 y 40 µM).

$H_0$ : Sobrevida CHOK1 con NaB (1mM) + Eto = Sobrevida CHOK1 con Eto			
$H_1$ : Sobrevida CHOK1 con NaB (1mM) + Eto < Sobrevida CHOK1 con Eto			
Valor Crítico	2,326	Nivel Significación	1%
Estadístico:	Resultado:		
Eto 5 µM	6,868	Se Rechaza $H_0$	
Eto 10 µM	5,838	Se Rechaza $H_0$	
Eto 20 µM	0,639	No Se Rechaza $H_0$	
Eto 40 µM	0,226	No Se Rechaza $H_0$	

$H_0$ : Sobrevida CHOK1 con NaB (5mM) + Eto = Sobrevida CHOK1 con Eto			
$H_1$ : Sobrevida CHOK1 con NaB (5mM) + Eto > Sobrevida CHOK1 con Eto			
Valor Crítico	2,326	Nivel Significación	1%
Estadístico:	Resultado:		
Eto 5 µM	-1,410	No Se Rechaza $H_0$	
Eto 10 µM	1,980	No Se Rechaza $H_0$	
Eto 20 µM	16,143	Se Rechaza $H_0$	
Eto 40 µM	15,327	Se Rechaza $H_0$	

**Tabla 9** – Resultados de los contrastes de igualdad de proporciones para dos muestras realizados para determinar si la sobrevida entre el tratamiento combinado con las diferentes dosis de butirato de sodio y etoposido (NaB 1 y 5 mM + Eto 5, 10, 20 y 40 µM) es significativamente diferente (al 1% de significación) de la sobrevida obtenida con el tratamiento con etoposido solamente en la línea celular CHOK1.  $H_0$  es la hipótesis nula y  $H_1$  la hipótesis alternativa. Los dos contrastes realizados fueron de una cola. En el caso de NaB 1 mM  $H_1$ :  $pX < pY$  y en el de NaB 5 mM  $H_1$ :  $pX > pY$ .

## **7.2– Efecto de inhibidores de desacetilasas de histonas en el daño producido por agentes genotóxicos**

Uno de los mecanismos subyacentes a la sensibilización generada por los inhibidores de desacetilasas de histonas (HDACi) descrita en la sección 7.1, podría ser un mayor daño inducido en el ADN cuando las células son pre-tratadas con estos inhibidores. Esto podría conducir a la menor sobrevivencia de las células expuestas al tratamiento combinado del HDACi y el inductor de daño en el ADN, en comparación con las células tratadas solamente con este último.

De los tres HDACi cuyo efecto en la sobrevivencia fue analizado en la sección 7.1, se seleccionaron VPA y NaB para profundizar en su influencia en el daño producido por diferentes agentes inductores de rupturas de doble cadena (RDC) en el ADN. Mientras que el efecto de TSA fue analizado en el daño inducido por la radiación UVC. Los motivos de esta selección se detallan a continuación.

En el caso de **VPA**, éste fue el único de los tres HDACi analizados que no presentó disminución de la sobrevivencia cuando las células fueron expuestas en forma aislada a este agente (Figura 18a). Por lo tanto, su efecto en la menor sobrevivencia en el tratamiento combinado (VPA + Etopósido) en comparación con la sobrevivencia de las células expuestas solo a etopósido (Figura 18b), puede ser atribuido enteramente a la potenciación del efecto del etopósido. Por consiguiente, si existiera una relación directa entre la disminución de la sobrevivencia y una mayor inducción de daño en el ADN por parte del etopósido, la misma quedaría en evidencia en los ensayos combinados realizados con este agente.

Por otra parte, en el caso de **NaB** en los análisis de sobrevivencia, las diferentes líneas celulares evaluadas presentaron diferencias en la sensibilidad al tratamiento combinado con las diversas dosis de este agente y etopósido (Figuras 22b, 24b y 26b). Por lo tanto, si el nivel de daño inducido en el ADN estuviera en la base de la sensibilización al etopósido, se esperaría que las diferencias observadas en términos de sobrevivencia entre las diferentes dosis de NaB también se vieran reflejadas en diferencias en el daño inducido en el ADN.

En el caso de **TSA**, los análisis de sobrevivencia realizados evidenciaron sensibilización de la línea celular tumoral 253J al ser expuesta al tratamiento combinado de este HDACi y etopósido (Figura 20b). A su vez, ensayos clonogénicos empleando UVC como agente genotóxico realizados en nuestro laboratorio, en la línea celular de hámster chino AA8, también demostraron la sensibilización de estas células al ser pre-tratadas con este HDACi (Bervejillo 2009 y Valencia-Payán 2016). Asimismo, se encontró un elevado nivel de aberraciones cromosómicas y de células apoptóticas en esta línea celular sometida al tratamiento combinado TSA+UVC (Moreno-Ortega 2016 y Valencia-Payán 2016). Por lo tanto, resulta de interés analizar la influencia de este HDACi en la inducción de daño por UVC, que induce dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs) y 6-4 fotoproductos como lesión primaria sobre el ADN.

A continuación se presentan los resultados del efecto de los HDACi VPA, NaB y TSA en el daño inducido por agentes genotóxicos con diferente mecanismo de acción sobre el ADN: etopósido (inhibidor de la topoisomerasa II) y radiaciones ionizantes (rayos X y rayos  $\gamma$ ), inductores de RDCs en forma indirecta y directa respectivamente; y radiación UV-C, inductor de dímeros de pirimidina.

Para esta evaluación se empleó el ensayo cometa (versión alcalina) que permite evidenciar un amplio rango de lesiones en el ADN como rupturas de simple y doble cadena, sitios de reparación por escisión y sitios álcali-lábiles. En el caso de VPA, su efecto en el daño inducido por radiaciones ionizantes también fue analizado mediante la cuantificación de foci  $\gamma$ H2AX además de por el ensayo cometa.

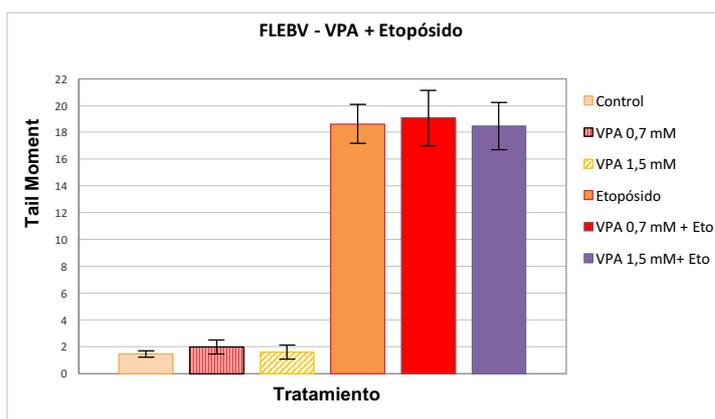
### ***7.2.1 - Efecto de inhibidores de desacetilasas de histonas en el daño en el ADN inducido por etopósido***

Se empleó la dosis de etopósido 20  $\mu$ M dado que entre las dosis utilizadas en combinación con los diferentes HDACi en los ensayos clonogénicos (Sección 7.1), ésta fue en la que se observaron las mayores diferencias en términos de sobrevivencia entre las distintas dosis de los tres HDACi analizados.

#### ***7.2.1.1- Acido valproico***

La influencia de ácido valproico (VPA) en el daño en el ADN inducido por etopósido fue evaluada en la línea celular linfoblastoide humana FLEBV con y sin pre-tratamiento con este HDACi durante 24 horas.

Como puede verse en la Figura 28, el nivel de daño inducido por etopósido con la combinación de las dos dosis de VPA ensayadas (0.7 y 1.5 mM) no resultó significativamente diferente ( $\alpha=1\%$ ) al inducido en las células expuestas a etopósido solamente. Es decir que los valores de nivel de daño (Tail Moment) de los tratamientos combinados se encontraron en el mismo rango que el daño inducido por etopósido en forma aislada. En la Tabla 10 se presentan las pruebas de hipótesis realizadas para contrastar dichos resultados.



**Figura 28** – Daño inducido en el ADN por etopósido (20  $\mu$ M) con y sin pre-tratamiento con el inhibidor de desacetilasas de histonas ácido valproico (VPA) (0.7 y 1.5 mM) evaluado mediante el ensayo cometa (Tail moment) en la línea celular linfoblastoide humana FLEBV. Datos promediados del análisis de 100 células  $\pm$  SEM.

<b>H0: Daño en el ADN FLEBV con VPA (0,7 mM) + Eto = Daño en el ADN FLEBV con Eto</b>		
<b>H1: Daño en el ADN FLEBV con VPA (0,7 mM) + Eto &gt; Daño en el ADN FLEBV con Eto</b>		
Nivel Significación		1%
Dosis:	p-value	Resultado:
Eto 20 $\mu$ M	0,429	No Rechaza H0

<b>H0: Daño en el ADN FLEBV con VPA ( 1.5 mM) + Eto = Daño en el ADN FLEBV con Eto</b>		
<b>H1: Daño en el ADN FLEBV con VPA ( 1.5 mM)+ Eto &lt; Daño en el ADN FLEBV con Eto</b>		
Nivel Significación		1%
Dosis:	p-value	Resultado:
Eto 20 $\mu$ M	0,527	No Rechaza H0

**Tabla 10** – Resultados de los contrastes de igualdad de proporciones para dos muestras realizados para determinar si el nivel de daño inducido por el tratamiento combinado con las diferentes dosis de ácido valproico y etopósido (VPA 0.7 y 1.5 mM + Eto 20  $\mu$ M) es significativamente diferente ( $\alpha=1\%$ ) del daño inducido luego del tratamiento solo con etopósido en la línea celular FLEBV. H0 es la hipótesis nula y H1 la hipótesis alternativa. Los dos contrastes realizados fueron de una cola. En el caso de VPA 0.7 mM H1:  $pX > pY$  y en el de VPA 1.5 mM H1:  $pX < pY$ .

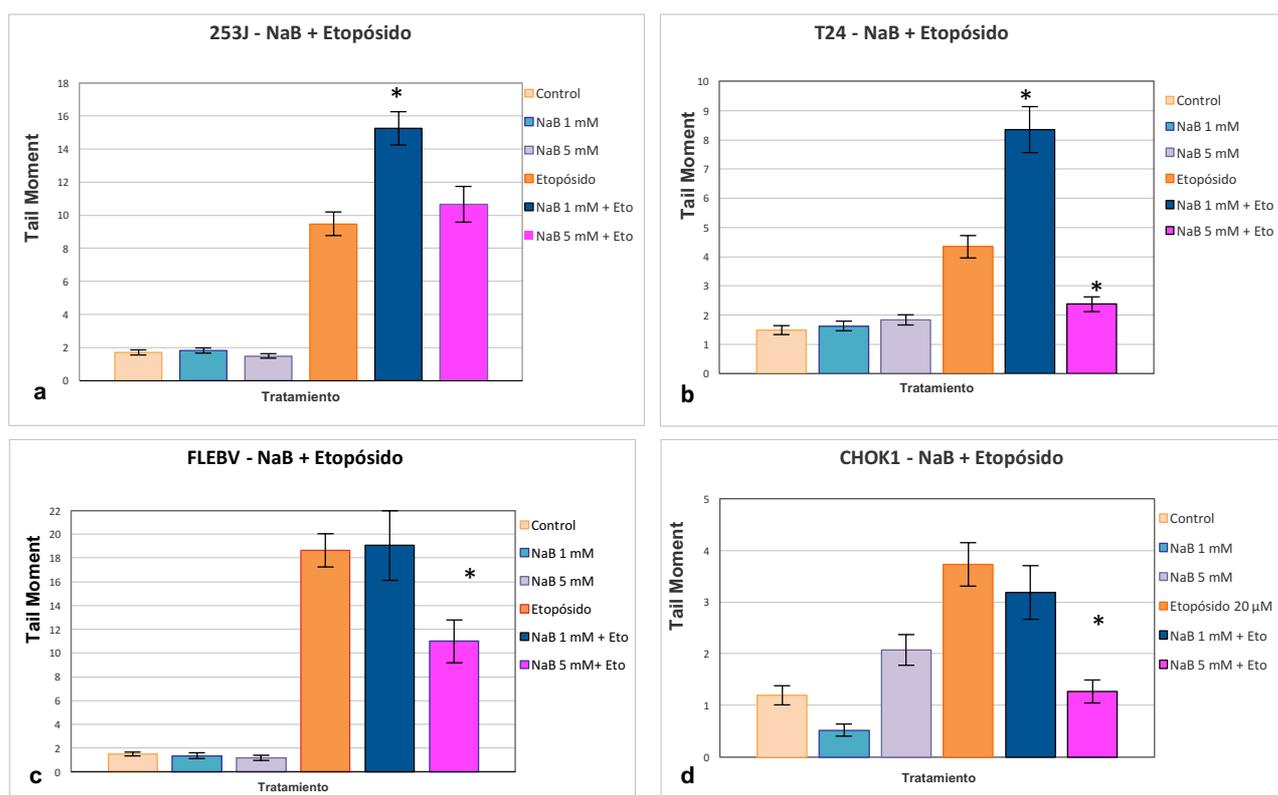
### 7.2.1.2- Butirato de sodio

El daño inducido en el ADN por etopósido con y sin pre-tratamiento con butirato de sodio (NaB) (1 y 5 mM), fue evaluado en las líneas celulares humanas tumorales de vejiga 253J y T24, en la línea linfoblastoide humana FLEBV y en las líneas de hámster chino CHOK1 y CHOxrs5.

Como se puede apreciar en la Figura 29 (a y b), en las dos líneas celulares tumorales de vejiga en el tratamiento combinado de NaB 1 mM + Etopósido el daño inducido en el ADN resultó significativamente mayor ( $\alpha=1\%$ ) que en las células expuestas a etopósido solamente (Tabla 11)

Sin embargo, en la línea linfoblastoide humana FLEBV y en CHOK1 no existió diferencia estadísticamente significativa entre ambos tratamientos (Figura 29 c y d) (Tabla 11).

Por el contrario, en el caso de la combinación de etopósido con NaB 5 mM, el daño inducido en el ADN resultó significativamente menor ( $\alpha=1\%$ ) que en el tratamiento con etopósido solamente, exceptuando a 253J (Figura 29 a-d) (Tabla 11) (Méndez-Acuña et al. 2017, *manuscrito en preparación*).



**Figura 29** – Daño inducido en el ADN por etopósido (20  $\mu$ M) con y sin pre-tratamiento con el inhibidor de desacetilasas de histonas butirato de sodio (NaB) (1 y 5 mM) durante 24 horas evaluado mediante el ensayo cometa (Tail moment) en las líneas celulares tumorales de vejiga humanas: 253J y T24 (a y b respectivamente), en la línea celular linfoblastoide humana FLEBV (c) y en la línea celular de hámster chino CHOK1 (d). Datos promediados de experimentos independientes  $\pm$  SEM. (\*) Datos que presentan una diferencia estadísticamente significativa (a un nivel de significación ( $\alpha$ ) del 1%) en comparación con los obtenidos en los tratamientos solamente con etopósido.

H0: Daño en el ADN 253J con NaB (1 mM) + Eto = Daño en el ADN 253J con Eto		
H1: Daño en el ADN 253J con NaB (1 mM) + Eto > Daño en el ADN 253J con Eto		
Nivel Significación		1%
Dosis:	p-value	Resultado:
Eto 20 µM	0,000	Rechaza H0

H0: Daño en el ADN 253J con NaB (5 mM) + Eto = Daño en el ADN 253J con Eto		
H1: Daño en el ADN 253J con NaB (5 mM) + Eto > Daño en el ADN 253J con Eto		
Nivel Significación		1%
Dosis:	p-value	Resultado:
Eto 20 µM	0,178	No Rechaza H0

H0: Daño en el ADN T24 con NaB (1 mM) + Eto = Daño en el ADN T24 con Eto		
H1: Daño en el ADN T24 con NaB (1 mM) + Eto > Daño en el ADN T24 con Eto		
Nivel Significación		1%
Dosis:	p-value	Resultado:
Eto 20 µM	0,000004	Rechaza H0

H0: Daño en el ADN T24 con NaB (5 mM) + Eto = Daño en el ADN T24 con Eto		
H1: Daño en el ADN T24 con NaB (5 mM) + Eto < Daño en el ADN T24 con Eto		
Nivel Significación		1%
Dosis:	p-value	Resultado:
Eto 20 µM	0,00001	Rechaza H0

H0: Daño en el ADN FLEBV con NaB (1 mM) + Eto = Daño en el ADN FLEBV con Eto		
H1: Daño en el ADN FLEBV con NaB (1 mM) + Eto > Daño en el ADN FLEBV con Eto		
Nivel Significación		1%
Dosis:	p-value	Resultado:
Eto 20 µM	0,39490	No Rechaza H0

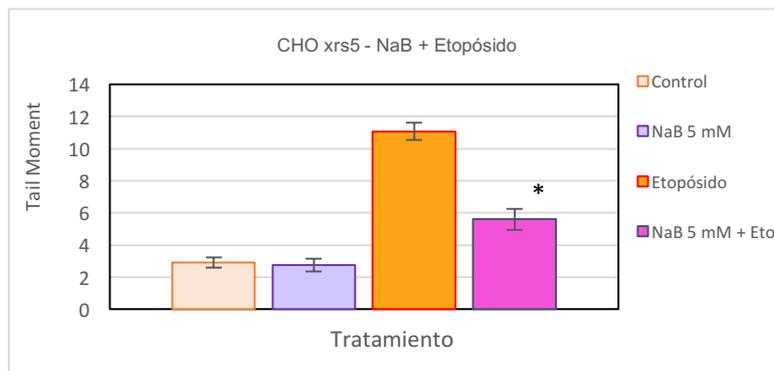
H0: Daño en el ADN FLEBV con NaB (5 mM) + Eto = Daño en el ADN FLEBV con Eto		
H1: Daño en el ADN FLEBV con NaB (5 mM) + Eto < Daño en el ADN FLEBV con Eto		
Nivel Significación		1%
Dosis:	p-value	Resultado:
Eto 20 µM	0,00029	Rechaza H0

H0: Daño en el ADN CHOK1 con NaB (5mM) + Eto = Daño en el ADN CHOK1 con Eto		
H1: Daño en el ADN CHOK1 con NaB (5 mM) + Eto < Daño en el ADN CHOK1 con Eto		
Nivel Significación		1%
Dosis:	p-value	Resultado:
Eto 20 µM	0,0000004	Rechaza H0

H0: Daño en el ADN CHOK1 con NaB (1mM) + Eto = Daño en el ADN CHOK1 con Eto		
H1: Daño en el ADN CHOK1 con NaB (1mM) + Eto < Daño en el ADN CHOK1 con Eto		
Nivel Significación		1%
Dosis:	p-value	Resultado:
Eto 20 µM	0,2102271	No Rechaza H0

**Tabla 11** – Resultados de los contrastes de igualdad de proporciones para dos muestras realizados para determinar si el daño inducido en el ADN en el tratamiento combinado con las diferentes dosis de butirato de sodio y etopósido (NaB 1 y 5 mM + Eto 20 µM) es significativamente diferente ( $\alpha=1\%$ ) del inducido con el tratamiento con etopósido solamente en las líneas celulares 253J, T24, FLEBV y CHOK1. H0 es la hipótesis nula y H1 la hipótesis alternativa. Los dos contrastes realizados fueron de una cola.

Una posible explicación al menor daño inducido en los tratamientos combinados de etopósido con NaB 5 mM, podría ser una mayor eficiencia de reparación del daño en el ADN en las células pre-tratadas con este agente durante el tiempo de exposición a etopósido (1 hora). Para evaluar esta posibilidad se analizó el daño genético inducido por este agente con y sin pre-tratamiento con NaB (5 mM) en la línea celular CHOxrs5, deficiente en el sistema de reparación de RDCs por reasociación de extremos no homólogos (NHEJ), mediante el cual se reparan las lesiones inducidas por etopósido. Como se puede ver en la Figura 30, CHOxrs5 presentó un nivel de daño significativamente menor en las células pre-tratadas con NaB (5 mM) en comparación con las expuestas a etopósido solamente, al igual que CHOK1 (Tabla 12) (Méndez-Acuña et al. 2017, *manuscrito en preparación*). Por lo tanto, este resultado indica que el menor nivel de daño genético inducido en CHOK1 sometida al tratamiento combinado con NaB (5mM) no es debido a un estímulo del proceso de reparación durante el tiempo de tratamiento con etopósido.



**Figura 30** – Daño inducido en el ADN por etopósido (20  $\mu$ M) con y sin pre-tratamiento con butirato de sodio (NaB) (5 mM) cuantificado mediante el ensayo cometa (Tail Moment) en la línea celular CHO xrs5, deficientes en el sistema de reparación NHEJ. Datos promediados de tres experimentos independientes +/- SEM. (\*) Datos que presentan una diferencia estadísticamente significativa (a un nivel de significación ( $\alpha$ ) del 1%) en comparación con los obtenidos en los tratamientos solamente con etopósido.

<b>H0: Daño en el ADN CHO xrs-5 con NaB (5mM) + Eto = Daño en el ADN CHO xrs-5 con Eto</b>		
<b>H1: Daño en el ADN CHOK1 con NaB (5 mM) + Eto &lt; Daño en el ADN CHOK1 con Eto</b>		
<b>Nivel Significación</b>		<b>1%</b>
<b>Dosis:</b>	<b>p-value</b>	<b>Resultado:</b>
<b>Eto 20 <math>\mu</math>M</b>	<b>0,00000</b>	<b>Rechaza H0</b>

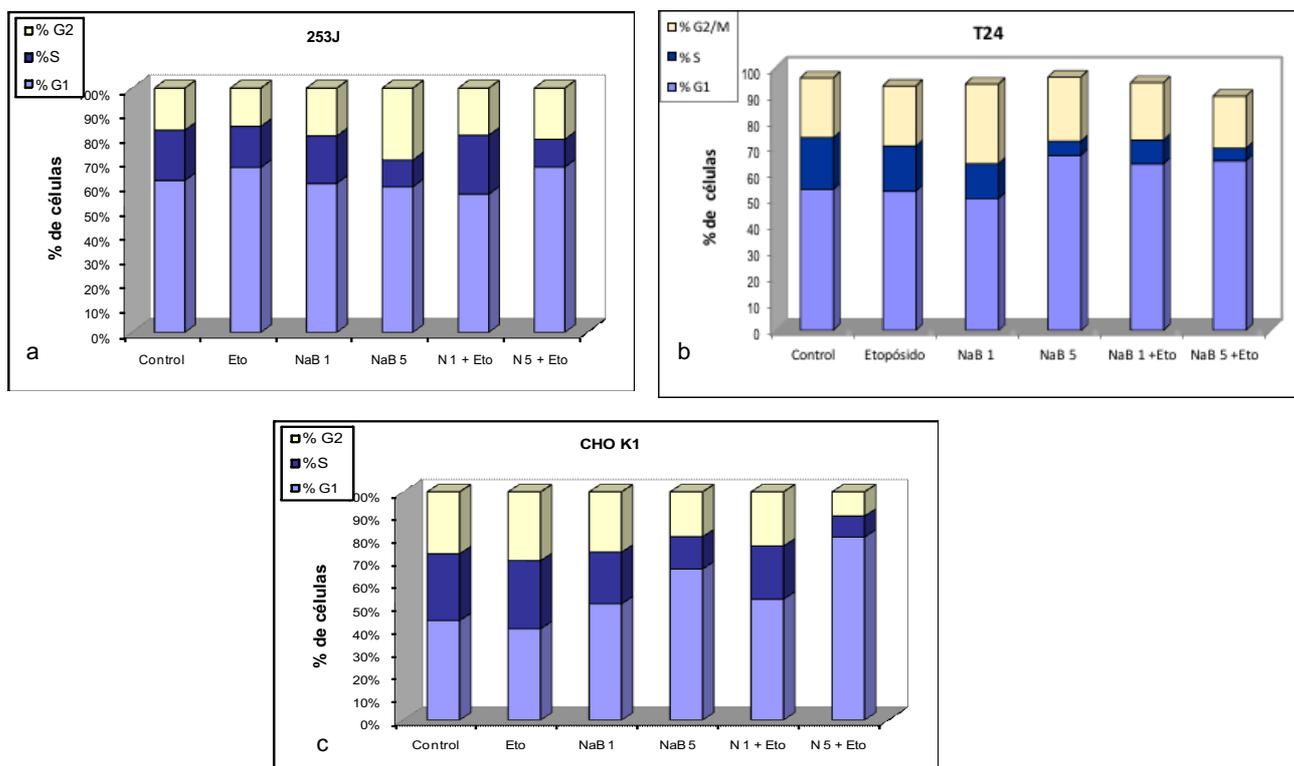
**Tabla 12** – Resultado del contraste de igualdad de proporciones para dos muestras realizados para determinar si el daño inducido en el ADN en el tratamiento combinado con butirato de sodio y etopósido (NaB 5 mM + Eto 20  $\mu$ M) es significativamente diferente ( $\alpha= 1\%$ ) del inducido con el tratamiento con etopósido solamente en la línea celular CHO xrs5. H0 es la hipótesis nula y H1 la hipótesis alternativa. Los dos contrastes realizados fueron de una cola. H1:  $pX < pY$ .

A los efectos de poder explicar los diferentes resultados obtenidos a nivel del daño en el ADN inducido por etopósido en presencia de NaB, se analizó el efecto de este HDACi en la progresión del ciclo celular.

### 7.2.1.2.1- Efecto de butirato de sodio en la progresión del ciclo celular

Se ha constatado que algunos HDACi como el NaB pueden afectar la progresión del ciclo celular (Munshi et al. 2005; Yaneva et al. 2005). A su vez, las células que se encuentran en diferentes fases del ciclo celular presentan diferente sensibilidad al etopósido (Johnson et al. 2001; Adachi et al. 2003). Tomando en cuenta estos dos hechos, se consideró la posibilidad de que los resultados obtenidos en relación a supervivencia celular (Sección 7.1.3) e inducción de daño en el ADN en los tratamientos combinados de butirato de sodio (NaB) y etopósido (Sección 7.2.1.2) pudieran estar afectados por un cambio en la progresión del ciclo celular inducido por NaB. Dado que los cultivos celulares fueron pre-tratados con NaB durante 24 horas, esto podría conducir a

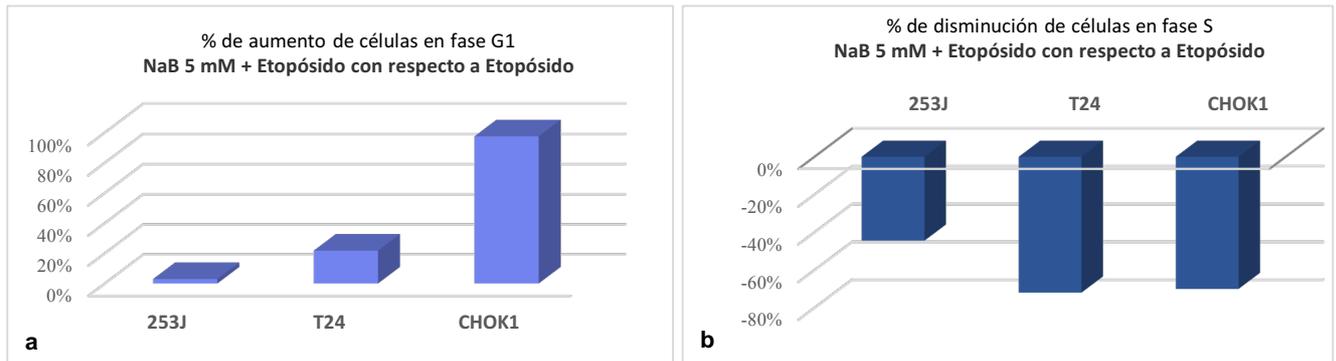
que la población celular expuesta a etopósido en forma posterior haya resultado enriquecida en alguna de las fases del ciclo, lo cual incluso podría ser diferente en las distintas líneas celulares. Con el fin de corroborar esta hipótesis, se analizó la progresión del ciclo celular en presencia y ausencia de este HDACi, evaluando el contenido de ADN mediante citometría de flujo en las líneas celulares 253J, T24 y CHOK1. Como puede apreciarse en la Figura 31, en el caso del tratamiento con NaB 1 mM los porcentajes de células en cada una de las fases del ciclo (G1, S o G2/M) se encontraron en el mismo rango que los de los controles negativos para las tres líneas celulares evaluadas (Méndez-Acuña et al. 2017, *manuscrito en preparación*). Por lo tanto, es posible concluir que esta dosis de NaB no tuvo efecto en la progresión del ciclo celular en ninguna de ellas.



**Figura 31** – Análisis del contenido de ADN mediante citometría de flujo en las líneas celulares 253J (a), T24 (b) y CHOK1 (c) tratadas con etopósido en presencia y ausencia de butirato de sodio (NaB o N) (1 o 5 mM). En base al contenido de ADN se presenta el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular (G1, S y G2/M).

Sin embargo, a diferencia de lo observado para NaB 1 mM, en los tratamientos con NaB 5 mM tanto solo como en combinación con etopósido en las tres líneas celulares, se observó una disminución significativa del porcentaje de células en la fase S, con el consiguiente aumento del porcentaje de células en la fase G1 en dos de ellas (T24 y CHOK1). En la Figura 32 se presentan los porcentajes de aumento y disminución de las células en las fases del ciclo celular G1 y S respectivamente en el tratamiento combinado NaB 5 mM + etopósido en comparación con el tratamiento solo con etopósido para cada una de las líneas celulares. Como puede verse en esta

Figura en el caso de la línea celular **T24** el porcentaje de células en la fase S se redujo un 72% (Figura 32 b) y el de las células en G1 aumentó un 22% (Figura 32 a). En la línea celular **253J** la reducción en el porcentaje de células en la fase S fue de un 44% (Figura 32 b) pero no se observó un aumento significativo en el porcentaje de células en G1 (Figura 32 a), mientras que en la línea celular **CHOK1** la disminución en S fue de un 70% (Figura 32 b) y el porcentaje de células en G1 aumentó un 98% con respecto al tratamiento solo con etopósido (Figura 32 a).



**Figura 32** – Variación de los porcentajes de células en las fases G1 y S (a y b respectivamente) en el tratamiento combinado NaB 5 mM y Etopósido en comparación con el tratamiento solo con etopósido en las líneas celulares 253J, T24 y CHOK1.

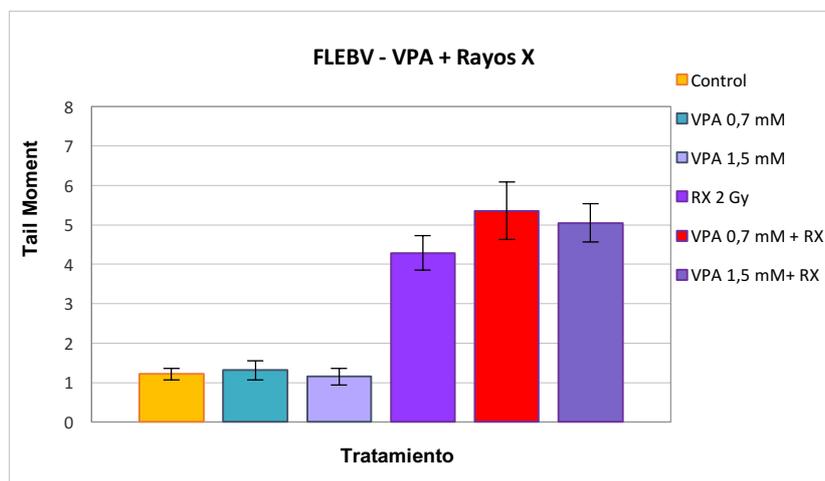
## 7.2.2 - Efecto de inhibidores de desacetilasas de histonas en el daño inducido en el ADN por radiaciones ionizantes

### 7.2.2.1 - Rayos X

Se analizó el daño inducido por rayos X (2 Gy) con y sin pre-tratamiento con ácido valproico (VPA) y butirato de sodio (NaB) durante 24 horas en la línea celular linfoblastoide humana FLEBV.

#### 7.2.2.1.1- Acido valproico

Como puede verse en la Figura 33, el nivel de daño inducido por 2 Gy de rayos X en combinación con las dos dosis de VPA ensayadas (0.7 y 1.5 mM), a diferencia de lo observado en el caso de etopósido (Figura 28), resultó levemente superior al inducido en ausencia de VPA. Sin embargo, al realizar las pruebas de hipótesis para contrastar estos resultados, dicha diferencia no resultó estadísticamente significativa para ninguna de las dos dosis de VPA ensayadas (Tabla 13).



**Figura 33** - Daño inducido en el ADN por rayos X (2 Gy) en la línea celular FLEBV con y sin pre-tratamiento con ácido valproico (VPA) (0.7 y 1.5 mM) cuantificado mediante el ensayo cometa (Tail Moment). Datos promediados del análisis de 100 células +/- SEM.

H0: Daño en el ADN FLEBV con VPA (0.7 mM) + RX = Daño en el ADN FLEBV con RX		
H1: Daño en el ADN FLEBV con NaB (0.7 mM) + RX > Daño en el ADN FLEBV con RX		
Nivel Significación		1%
Dosis:	p-value	Resultado:
Rayos X 2 Gy	0,106	No Rechaza H0

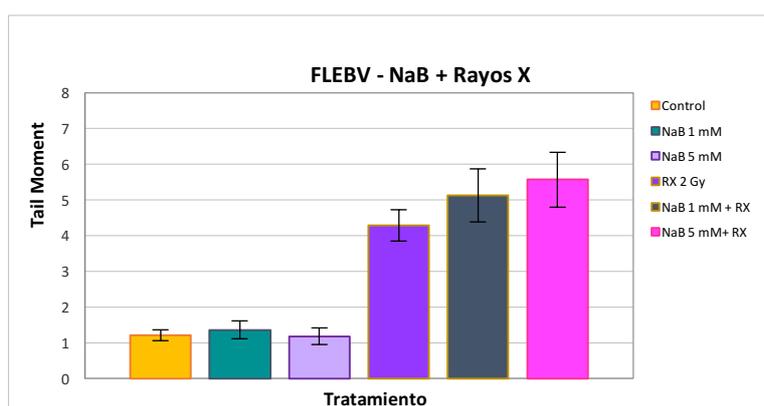
  

H0: Daño en el ADN FLEBV con VPA (1.5 mM) + RX = Daño en el ADN FLEBV con RX		
H1: Daño en el ADN FLEBV con NaB (1.5 mM) + RX > Daño en el ADN FLEBV con RX		
Nivel Significación		1%
Dosis:	p-value	Resultado:
Rayos X 2 Gy	0,122	No Rechaza H0

**Tabla 13** – Resultados de los contrastes de igualdad de proporciones para dos muestras realizados para determinar si el daño inducido en el ADN en el tratamiento combinado con ácido valproico y rayos X (VPA 0.7 y 1.5 mM + RX 2 Gy) es significativamente diferente (al 1% de significación ( $\alpha$ )) del inducido con el tratamiento solamente con rayos X en la línea celular FLEBV. H0 es la hipótesis nula y H1 la hipótesis alternativa. Los dos contrastes realizados fueron de una cola. H1:  $pX > pY$

#### 7.2.2.1.2- Butirato de sodio

Los resultados obtenidos en el caso de butirato de sodio (NaB) coinciden con lo observado con VPA. Si bien los niveles de daño inducido en los tratamientos combinados (NaB 1 y 5 mM + Rayos X) son mayores que el inducido por la exposición a rayos X en ausencia de este HDACi (Figura 34), esta diferencia no resultó estadísticamente significativa para ninguna de las dos dosis de NaB analizadas (Tabla 14).



**Figura 34-** Daño inducido en el ADN por rayos X (2 Gy) en la línea celular FLEBV con y sin pre-tratamiento con butirato de sodio (NaB) (1 y 5 mM) cuantificado mediante el ensayo cometa (Tail Moment). Datos promediados del análisis de 100 células +/- SEM.

<b>H0: Daño en el ADN FLEBV con NaB (1 mM) + RX = Daño en el ADN FLEBV con RX</b>		
<b>H1: Daño en el ADN FLEBV con NaB (1 mM) + RX &gt; Daño en el ADN FLEBV con RX</b>		
<b>Nivel Significación</b>		<b>1%</b>
<b>Dosis:</b>	<b>p-value</b>	<b>Resultado:</b>
<b>Rayos X 2 Gy</b>	<b>0,168</b>	<b>No Rechaza H0</b>

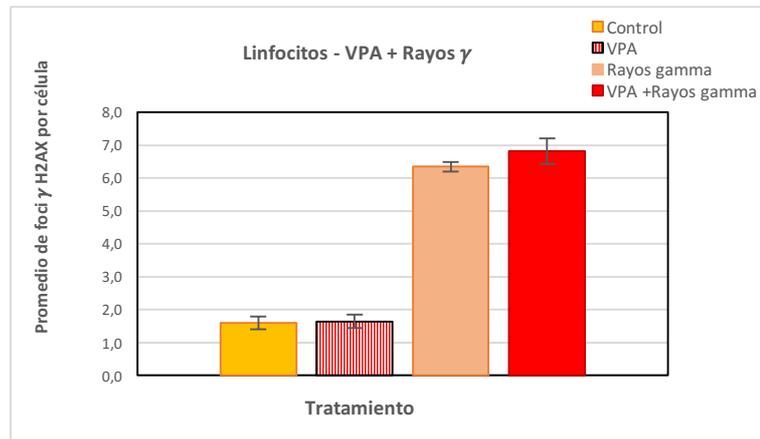
<b>H0: Daño en el ADN FLEBV con NaB (5 mM) + RX = Daño en el ADN FLEBV con RX</b>		
<b>H1: Daño en el ADN FLEBV con NaB (5 mM) + RX &gt; Daño en el ADN FLEBV con RX</b>		
<b>Nivel Significación</b>		<b>1%</b>
<b>Dosis:</b>	<b>p-value</b>	<b>Resultado:</b>
<b>Rayos X 2 Gy</b>	<b>5,568</b>	<b>No Rechaza H0</b>

**Tabla 14** – Resultados de los contrastes de igualdad de proporciones para dos muestras realizados para determinar si el daño inducido en el ADN en el tratamiento combinado con butirato de sodio y rayos X (NaB 1 y 5 mM + RX 2 Gy) es significativamente diferente (al 1% de significación ( $\alpha$ )) del inducido con el tratamiento solamente con rayos X en la línea celular FLEBV. H0 es la hipótesis nula y H1 la hipótesis alternativa. Los dos contrastes realizados fueron de una cola. H1:  $pX > pY$

#### 7.2.2.2 - Rayos $\gamma$

El daño inducido por rayos  $\gamma$  (0,5 Gy) con y sin pre-tratamiento con ácido valproico (VPA) (0.7 mM) durante 20 horas fue cuantificado mediante el recuento de foci  $\gamma$ H2AX en linfocitos de sangre periférica de donantes sanos. Dicha evaluación se realizó a los 30 minutos luego de la irradiación dado que se ha descrito que en este intervalo de tiempo se produce la expresión máxima de foci  $\gamma$ H2AX en los núcleos de las células irradiadas (Roch-Lefèvre et al. 2010).

Como puede verse en la Figura 35, al igual que lo observado en el caso de rayos X y etopósido (Figuras 28 y 33), el nivel de daño inducido por rayos  $\gamma$  en las células pre-tratadas con VPA no se diferenció significativamente del inducido en ausencia de este HDACi. Esto fue confirmado por la prueba de hipótesis realizada para contrastar estos resultados, en la que no fue posible rechazar la hipótesis nula ( $H_0$ ) que establecía la igualdad del promedio de foci  $\gamma$ H2AX inducido en ambos tratamientos a los 30 minutos post-irradiación (Tabla 15).



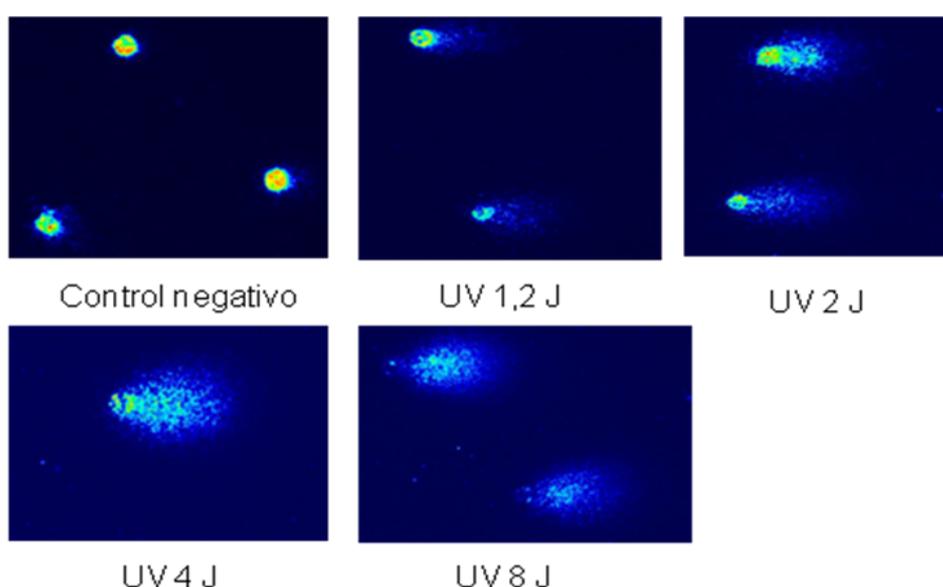
**Figura 35-** Daño inducido en el ADN por rayos  $\gamma$  (0,5 Gy) en linfocitos de sangre periférica con y sin pre-tratamiento con ácido valproico (VPA) (0,7 mM) cuantificado mediante el recuento de foci  $\gamma$ H2AX. Datos promediados del análisis de 300 células por preparado +/- SEM.

<b>H0: Media de Foci <math>\gamma</math>H2AX en VPA + Rayos <math>\gamma</math></b>		<b>30' = Media de Foci <math>\gamma</math>H2AX</b>
<b>H1: Media de Foci <math>\gamma</math>H2AX en VPA + Ry 30' &gt; Media de Foci <math>\gamma</math>H2AX Ry 30'</b>		
<b>Nivel Significación</b>		<b>1%</b>
<b>Dosis:</b>	<b>p-value</b>	<b>Resultado:</b>
<b>Rayos <math>\gamma</math> 2 Gy</b>	<b>0,136</b>	<b>No Rechaza H0</b>

**Tabla 15** – Resultados del contraste de igualdad de proporciones para dos muestras realizados para determinar si el promedio de foci  $\gamma$ H2AX por célula inducido por el tratamiento combinado de ácido valproico (VPA) 0.7 mM y rayos  $\gamma$  (0,5 Gy) es significativamente diferente ( $\alpha=1\%$ ) del inducido luego del tratamiento solo con rayos  $\gamma$  linfocitos de sangre periférica. H0 es la hipótesis nula y H1 la hipótesis alternativa. Los dos contrastes realizados fueron de una cola (H1:  $pX > pY$ ).

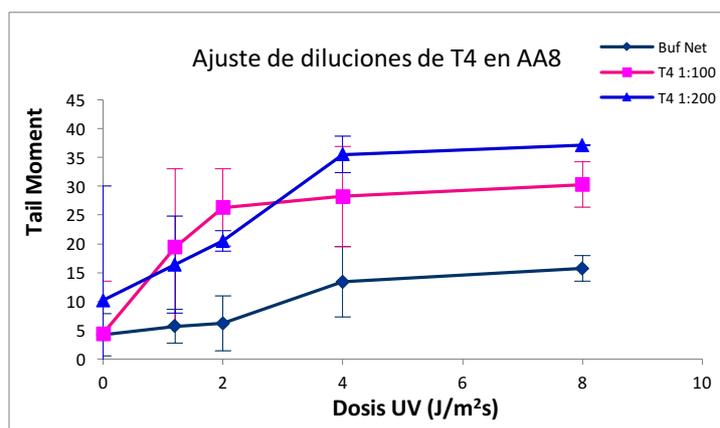
### 7.2.3 - Efecto de inhibidores de desacetilasas de histonas en el daño en el ADN inducido por la radiación UVC

Empleando una versión modificada del ensayo cometa alcalino para la detección de lesiones inducidas por la luz UV, se analizó el daño genético producido por la radiación UVC con y sin pre-tratamiento con el HDACi tricostatina A (TSA) en la línea celular de ovario de hámster chino AA8. La modificación de este ensayo para la detección de las lesiones inducidas por UVC implica la inclusión de la endonucleasa T4 bacteriana que reconoce en forma específica los dímeros de pirimidina (CPDs) generados por este tipo de radiación y produce un corte a nivel de la cadena de ADN en ese sitio. En primer lugar, debió ajustarse la concentración óptima de esta enzima para la detección de dímeros de pirimidina en la línea celular AA8 realizando ensayos con diferentes dosis de UV-C (1.2, 2, 4 y 8 J/m<sup>2</sup>s) (Figura 36).



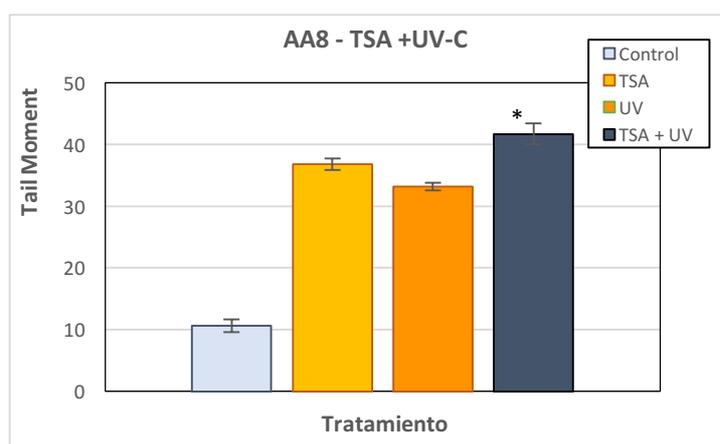
**Figura 36**– Imágenes de núcleos obtenidas mediante el ensayo cometa luego de la exposición de células de la línea de hámster chino AA8 a UV-C (0, 1.2, 2, 4 y 8 J/m<sup>2</sup>s) tratadas con la endonucleasa T4 (dilución 1:400) procesadas con el software Comet Imager 4.2.14 (MetaSystems) (10X).

Como puede verse en la Figura 37, si bien con las dos diluciones de T4 ensayadas (1:100 y 1:200) hubo un aumento del nivel de daño al incrementar la dosis de UV, con la dilución 1:100 se observó la saturación a partir de la dosis de UVC de 2 J/m<sup>2</sup>s. Mientras que con la dilución 1:200 se constató un aumento significativo del nivel de daño de 2 a 4 J/m<sup>2</sup>s. Por lo tanto, ésta fue la dilución seleccionada para los ensayos posteriores con el HDACi tricostatina A en combinación con UVC (4 J/m<sup>2</sup>s).



**Figura 37-** Daño inducido a nivel del ADN luego de la exposición de células de hámster chino AA8 a diferentes dosis de UV-C (0, 1.2, 2 y 4 J/m<sup>2</sup>s), evaluado mediante el ensayo cometa alcalino modificado para la detección de dímeros de pirimidinas. Se presentan los datos del parámetro Tail Moment (producto de la Intensidad de Fluorescencia y la Longitud de la Migración en la cola de los cometas resultantes) como la media de los 6 ensayos realizados  $\pm$  SD para las dos diluciones de la endonucleasa T4 ensayadas (1:100 y 1:200).

Como se aprecia en la Figura 38, al igual que en lo observado para la combinación de NaB 1 mM con etopósido en las líneas celulares tumorales 253J y T24 (Figura 29 a y b), el pre-tratamiento con TSA (50 ng/ml) condujo a una mayor inducción de daño en el ADN por UV-C, observándose una diferencia estadísticamente significativa en el nivel de daño con y sin exposición previa a TSA (Tabla 16).



**Figura 38-** Daño inducido en el ADN por UVC (4 J/m<sup>2</sup>s) en la línea celular AA8 con y sin pre-tratamiento con tricostatina A (TSA) (50 ng/ml) cuantificado mediante el ensayo cometa (Tail Moment) modificado con la endonucleasa T4 (dilución 1:200) que reconoce en forma específica los dímeros de pirimidina. Datos promediados de 6 experimentos independientes  $\pm$  SEM. (\*) Datos que presentan una diferencia estadísticamente significativa ( $\alpha = 1\%$ ) en comparación con los obtenidos en el tratamiento solamente con UVC.

H0: Daño en el ADN AA8 con TSA (50 ng/ml) + UV-C = Daño en el ADN AA8 con UV-C		
H1: Daño en el ADN AA8 con TSA (50 ng/ml) + UV-C > Daño en el ADN AA8 con UV-C		
Nivel Significación		1%
Dosis:	p-value	Resultado:
UV-C 4J/m <sup>2</sup>	0,000	Rechaza H0

**Tabla 16** – Resultados del contraste de igualdad de proporciones para dos muestras realizados para determinar si el daño inducido en el ADN en el tratamiento combinado con Tricostatina A (50 ng/ml) y UVC (4 J/m<sup>2</sup>s) es significativamente diferente ( $\alpha=1\%$ ) del inducido con el tratamiento solamente con UV en la línea celular AA8. H0 es la hipótesis nula y H1 la hipótesis alternativa. El contraste realizado fue de una cola: H1:  $pX > pY$ .

### ***7.3- Efecto de inhibidores de desacetilasas de histonas en la cinética de reparación del daño genético inducido por diferentes agentes genotóxicos***

Además del nivel de daño inducido inicialmente en el ADN discutido en la sección 7.2, otro factor que podría estar involucrado en la sensibilización generada por los HDACi, podría ser una menor eficiencia de remoción del daño genético inducido en presencia de estos agentes. Esto podría conducir a la menor sobrevivencia de las células expuestas al tratamiento combinado del HDACi y el agente genotóxico, en comparación con la de las células tratadas solamente con este último.

Para este análisis se estudió el efecto de los HDACi NaB, VPA y TSA en la cinética de remoción del daño genético inducido por radiaciones ionizantes: rayos X y rayos  $\gamma$ , y radiación UVC, respectivamente. No se empleó en este caso etopósido dado que al ser un agente inductor de daño indirecto, tal como se observó en la sección 7.2, el efecto de los HDACi en la progresión del ciclo celular puede afectar la inducción de daño genético inicial por este agente, lo cual agregaría un factor extra al análisis de los resultados y complejizaría su interpretación.

Para la evaluación de la cinética de reparación se utilizaron dos metodologías. Mientras que en los experimentos con NaB en combinación con rayos X y los de TSA combinada con UVC se empleó el ensayo cometa, en el caso de la combinación de VPA y rayos  $\gamma$  se realizó la cuantificación de foci  $\gamma$ H2AX por célula a diferentes tiempos luego de la irradiación.

### 7.3.1 – Radiaciones ionizantes

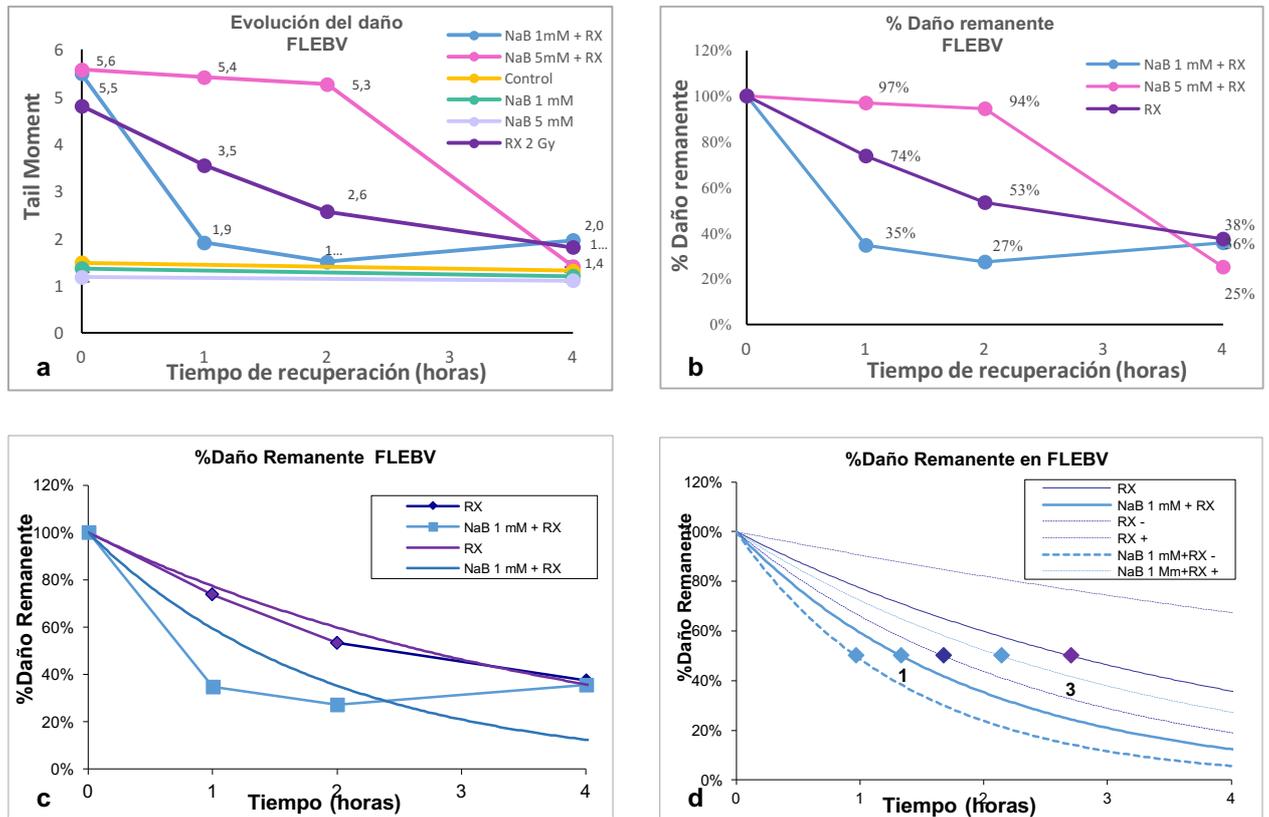
#### 7.3.1-1 - Butirato de sodio y rayos X

Se analizó la influencia de butirato de sodio (NaB) en la cinética de reparación del daño en el ADN inducido por rayos X (2 Gy) en la línea celular linfoblastoide humana FLEBV. Para ello se realizaron determinaciones con el ensayo cometa a diferentes tiempos de recuperación luego de la irradiación (0, 1, 2 y 4 horas) con y sin tratamiento con NaB (1 y 5 mM). Este tratamiento se realizó en forma continua, tanto antes de la irradiación (24 horas) como durante el período de recuperación (4 horas).

En la Figura 39a se presenta la evolución del nivel de daño en los diferentes tiempos de recuperación evaluados, graficando los valores de Tail Moment (TM) obtenidos mediante el ensayo cometa. Mientras que en la Figura 39b se grafica el porcentaje de daño remanente en cada tiempo de recuperación, considerando como 100% el daño inducido inicialmente ( $t=0$ ). Este parámetro fue calculado como el cociente entre el nivel de daño en un tiempo dado ( $TM_t$ ) y el daño observado inicialmente ( $TM_0$ ) multiplicado por 100.

Como puede verse en esta figura, el daño inducido por los rayos X con y sin incubación con las dos dosis de NaB llegó al nivel del control negativo en las 4 horas posteriores al tratamiento. Sin embargo, en la primer hora luego de la irradiación se observó una gran diferencia en presencia y ausencia de NaB. Mientras que en las células tratadas solamente con rayos X se observó un nivel de daño intermedio ( $TM= 3.5$ ) correspondiendo a un 74% de daño remanente, en presencia de NaB 1 mM el nivel de daño fue significativamente menor que en ausencia de éste ( $TM= 1.9$ ), representando un 35% del daño inducido inicialmente. En cambio, en presencia de NaB 5 mM el daño resultó significativamente mayor que sin este HDACi ( $TM= 5.4$ ), significando un 97% de daño remanente. Tanto en presencia de NaB 1 mM como en ausencia de este HDACi, a medida que transcurrió el tiempo el nivel de daño continuó descendiendo. En cambio, en el pre-tratamiento con NaB 5 mM hasta las 2 horas post-irradiación prácticamente no se constató descenso en el daño inducido en el ADN.

Con el fin de corroborar estadísticamente las diferencias en la cinética de reparación entre los tratamientos realizados, se llevó a cabo un análisis de regresión lineal aplicando el método de los mínimos cuadrados para estimar la curva exponencial ( $y=K\beta^x$ ; donde  $y=TM$ ,  $x=tiempo$ ) de mejor ajuste a las curvas de cinética de reparación obtenidas de acuerdo a Olive y Banáth (1993). En la Figura 39c se presentan las curvas exponenciales obtenidas para los tratamientos con NaB 1 mM y en ausencia de este HDACi. En el caso de la combinación de RX con NaB 5 mM no fue posible realizar este análisis, dado que la curva de cinética de reparación no se ajustó a una exponencial. En la Figura 39d se grafican los intervalos de confianza ( $\alpha=0,05$ ) para las curvas de ajuste exponencial obtenidas en cada uno de los tratamientos.



**Figura 39** - Cinética de remoción del daño genético inducido en células de la línea linfoblastoide humana FLEBV luego de su exposición a rayos X (2 Gy) con y sin tratamiento con NaB (1 y 5 mM) evaluada mediante el ensayo cometa. **a)** Curva de cinética de reparación: se presentan los datos de Tail Moment a las 0, 1, 2 y 4 horas luego de la irradiación obtenidos mediante el software Comet Assay III (Perceptive Instruments). **b)** Porcentaje del daño inicial remanente en los diferentes tiempos de recuperación. **c)** Curvas de porcentaje de daño remanente para los tratamientos de rayos X y NaB 1mM + RX y sus correspondientes curvas de ajuste exponencial. **d)** Curvas de ajuste exponencial presentadas en c) junto con sus intervalos de confianza ( $\alpha=0,05$ ).

Mediante la prueba t de Student se compararon los parámetros de las curvas exponenciales para evaluar la existencia de reparación en los tratamientos realizados en presencia y ausencia de NaB 1 mM, tomando como hipótesis nula ( $H_0$ ) la no reparación ( $\beta=1$ ) en el período de recuperación estudiado (4 horas). Tal como se desprende de los datos presentados en la Tabla 17 A, en el caso de los dos tratamientos fue posible rechazar la  $H_0$ , por lo que puede concluirse que se reparó el daño inducido inicialmente.

A su vez, a partir de las curvas de ajuste exponencial obtenidas (Figura 39d) se calculó el tiempo medio de reparación (TMR) para cada tratamiento. Es decir, el tiempo en el que se repararía el 50% del daño inducido inicialmente. Como se puede apreciar en la Tabla 17 A, el TMR obtenido en ausencia de NaB fue de 3 horas, mientras que en presencia de NaB 1 mM éste fue de 1 hora.

Por medio de un contraste de homogeneidad entre regresiones lineales, se compararon las curvas exponenciales para determinar si la diferencia observada entre los TMR obtenidos es

estadísticamente significativa (Tabla 17 B). Fue posible constatar que el TMR en la combinación de NaB 1 mM y RX difirió en forma significativa del obtenido con el tratamiento solo con rayos X. Por lo tanto, dados los resultados presentados, es posible afirmar que la combinación de RX con NaB 1 mM fue la que presentó la mayor eficiencia de reparación, ya que en un intervalo de 1 hora las células expuestas a este tratamiento fueron capaces de reparar el 50% del daño inducido inicialmente, mientras que en el tratamiento solo con rayos X esto ocurrió a las 3 horas. En el caso de la combinación de RX con NaB 5 mM, si bien no fue posible estimar el TMR, es claro que fue el tratamiento que presentó una cinética de reparación menor, ya que a las 2 horas post-irradiación el daño inducido permaneció prácticamente al mismo nivel del inicio.

A modo de resumen puede decirse que el tratamiento con NaB afectó la cinética de remoción del daño inducido por rayos X (2 Gy) en la línea celular FLEBV, observándose diferentes resultados con las dos dosis de NaB empleadas. Mientras que con NaB 1 mM se observó una mayor eficiencia de reparación, con NaB 5 mM ocurrió lo contrario, constatándose un enlentecimiento en la remoción del daño genético inducido por este agente genotóxico.

A	Análisis Estadístico	
	RX	NaB 1 mM + RX
<b>Prueba t</b>		
<b>Hipótesis</b>	$H_0: \beta_1=1$	$H_0: \beta_2=1$
Valor t	3,200	5,215
Grados de Libertad	249	199
Valor Crítico 95%	1,970	1,972
<b>Resultado</b>	Rechazada	Rechazada
<b>Int. Confianza 95%</b>		
Cota Inferior $\beta$	0,661	0,488
Cota Superior $\beta$	0,906	0,723
Cota Inferior K	1,298	1,027
Cota Superior K	2,476	2,545
<b>Tiempo Medio de reparación (TMR) (horas)</b>		
Estimación	3	1

B		Contraste entre Regresiones	
		RX	
Estimación $\beta_1'$			-0,257
$E(X-X_m)^2$			560
Sumas Resid.			896
Tamaño Muestral			251
		NaB 1 mM + RX	
Estimación $\beta_2'$			-0,521
$E(X-X_m)^2$			443
Sumas Resid.			879
Tamaño Muestral			201
		Contraste de Homogeneidad	
<b>Hipótesis</b>			$H_0: \beta_1=\beta_2$
Valor t			2,088
Grados Libertad			448
Valor Crítico 95%			1,965
<b>Resultado</b>			Rechazada

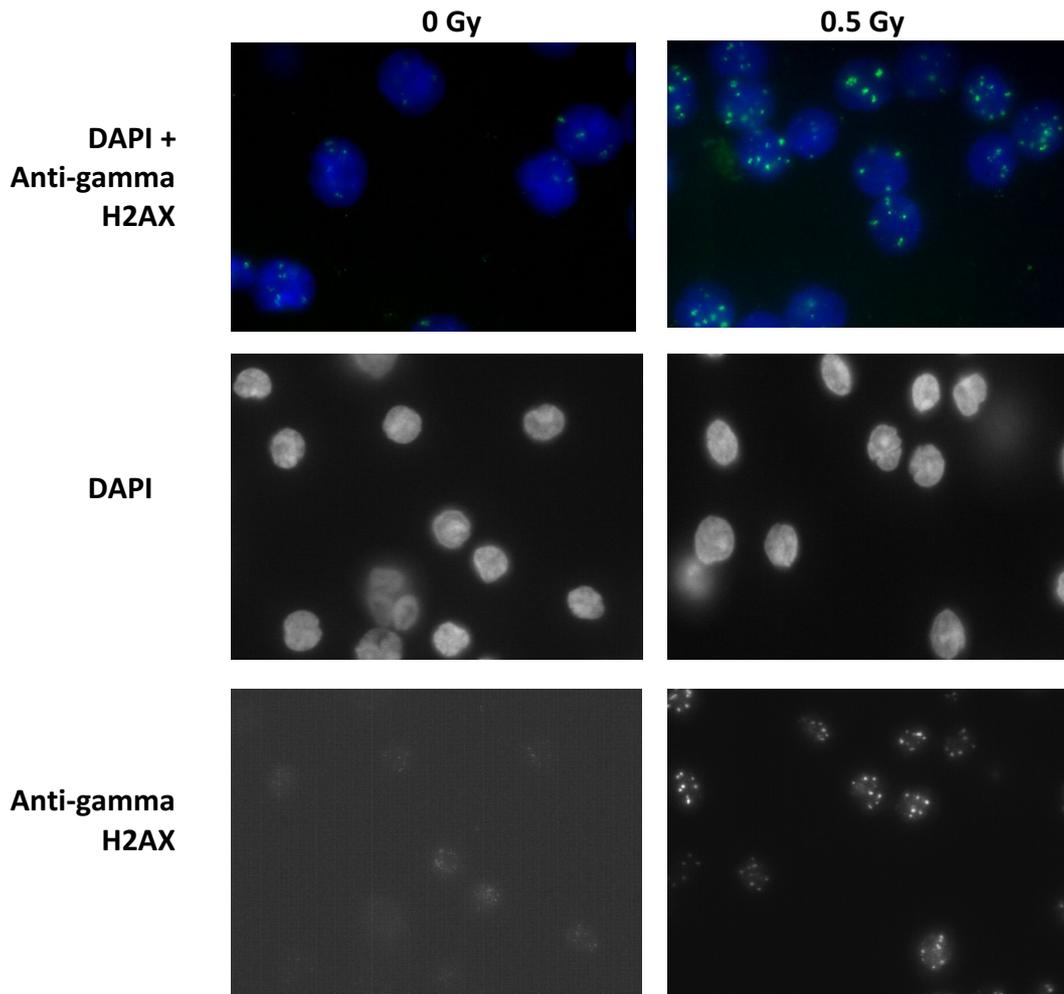
**Tabla 17 - (A)** Resultado del análisis estadístico (Prueba T de Student) y parámetros estimados en las curvas de ajuste exponencial de las curvas de cinética de reparación (Figura 39 d) para determinar la existencia de reparación en el tratamiento con rayos X en presencia como en ausencia de NaB 1mM (A) en el período de recuperación estudiado (4 horas) y calcular el tiempo medio de reparación en ambos tratamientos. **(B)** Prueba de hipótesis realizada para contrastar la homogeneidad entre los parámetros estimados y determinar si la diferencia entre los TMR estimados es estadísticamente significativa.

### **7.3.1.2 - Acido valproico y rayos gamma**

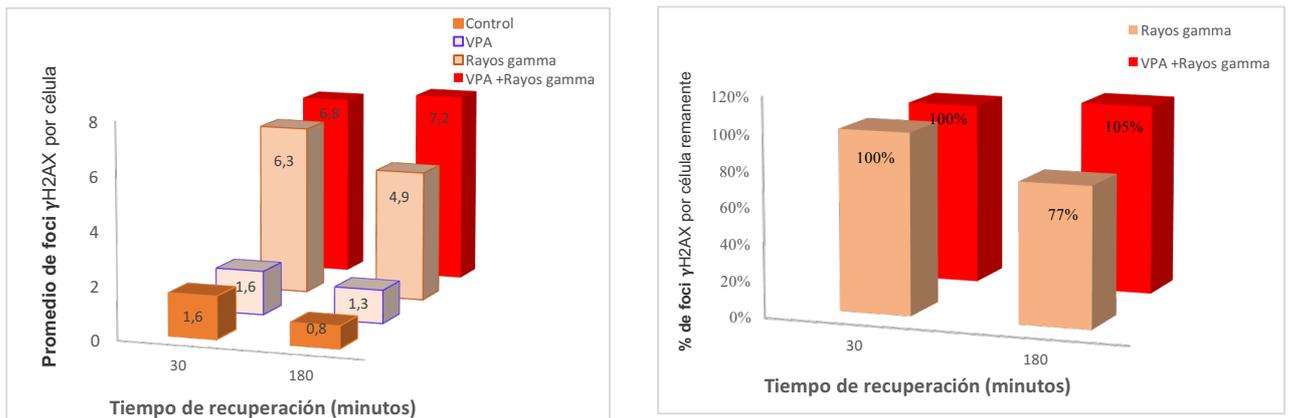
Para evaluar el efecto de ácido valproico (VPA) (0.7 mM) en la eficiencia de remoción del daño genético inducido por rayos  $\gamma$  (0.5 Gy) se realizó el recuento de foci  $\gamma$ H2AX a los 30 y 180 minutos luego de la irradiación, con y sin tratamiento con este HDACi en linfocitos de sangre periférica de donantes sanos (Figura 40). Este tratamiento se realizó de manera continua, tanto en forma previa a la irradiación (20 horas) como durante el tiempo de recuperación posterior.

En la Figura 41a se presenta el número promedio de foci  $\gamma$ H2AX por célula en los tiempos de recuperación estudiados y en la Figura 41b se grafican los porcentajes de foci  $\gamma$ H2AX remanentes, tomando como el 100% los contabilizados a los 30 minutos luego de la radiación. Se tomó este tiempo como referencia, dado que luego de realizada la irradiación el número de foci  $\gamma$ H2AX aumenta paulatinamente teniendo su máximo a los 30 minutos (Roch-Lefevre et al. 2010). Como se aprecia en esta figura, mientras que en las células no tratadas con VPA el promedio de foci  $\gamma$ H2AX por célula disminuyó a las 3 horas luego de la irradiación, por el contrario en presencia de este HDACi se observó una acumulación de los mismos en este tiempo de recuperación (Figura 41a). En términos del porcentaje de daño remanente, se puede ver que a las 3 horas la cantidad de foci  $\gamma$ H2AX se redujo a un 77% en las células expuestas solamente a rayos  $\gamma$ , mientras que en presencia de VPA dicho porcentaje se mantuvo en el 100% (Figura 41b).

A los efectos de confirmar en forma estadística la disminución de foci  $\gamma$ H2AX observada a las 3 horas en las células expuestas solamente a rayos  $\gamma$  se realizó un contraste de igualdad de proporciones (Test de Student). Se tomó como hipótesis nula ( $H_0$ ) la igualdad de las medias de foci  $\gamma$ H2AX a los 30 y 180 minutos post-irradiación y como hipótesis alternativa ( $H_1$ ) una menor cantidad de foci  $\gamma$ H2AX a los 180 minutos (3 horas) post-irradiación. Como puede verse en la Tabla 18, fue posible rechazar la  $H_0$  confirmándose la disminución del daño inducido inicialmente en el tratamiento solo con rayos  $\gamma$  (2 Gy).



**Figura 40**– Imágenes de linfocitos de sangre periférica teñidos con DAPI y/o inmunotinción con anticuerpos anti-gamma H2AX con y sin exposición a rayos  $\gamma$  (0.5 Gy) (100X).



**Figura 41** – a) Promedio de foci  $\gamma$ -H2AX por célula a diferentes tiempos de recuperación (30 y 180 minutos) luego de la exposición de linfocitos de sangre periférica a rayos  $\gamma$  (0.5 Gy) con y tratamiento con ácido valproico (VPA) (0.7 mM). b) Porcentaje de foci  $\gamma$ -H2AX por célula remanente a los 30 y 180 minutos luego de la irradiación, en presencia y ausencia de VPA (0,7 mM).

H0: Media de Foci $\gamma$ H2AX en Ry 30' = Media de Foci $\gamma$ H2AX en Ry 180'		
H1: Media de Foci $\gamma$ H2AX en Ry 30' > Media de Foci $\gamma$ H2AX en Ry 180'		
Nivel Significación		1%
Dosis:	p-value	Resultado:
Rayos $\gamma$ 2 Gy	0,000	Rechaza H0

**Tabla 18-** Resultados del contraste de igualdad de proporciones para dos muestras realizados para determinar si el nivel de foci  $\gamma$ -H2AX inducido por el tratamiento combinado de ácido valproico (VPA) 0.7 mM y rayos  $\gamma$  (0,5 Gy) es significativamente diferente ( $\alpha=1\%$ ) del inducido luego del tratamiento solo con rayos  $\gamma$  linfocitos de sangre periférica. H0 es la hipótesis nula y H1 la hipótesis alternativa. Los dos contrastes realizados fueron de una cola. En el caso de VPA 0.7 mM H1:  $pX > pY$  y en el de VPA 1.5 mM H1:  $pX < pY$ .

Esta acumulación de foci  $\gamma$ H2AX en las células pre-tratadas con VPA refleja la acumulación de lesiones inducidas por la irradiación no reparadas.

Por lo tanto, los datos obtenidos con radiaciones ionizantes en combinación con NaB y VPA muestran que la inhibición de HDACs incide en la tasa de reparación del daño genético inducido, ya sea disminuyéndola, como en el caso de NaB (5 mM) en combinación con rayos X y VPA (0,7 mM) en combinación con rayos  $\gamma$ , o aumentándola como en el caso de NaB 1 mM en combinación con rayos X.

### 7.3.2 - Radiación UVC

El efecto de tricostatina A (TSA) en la cinética de reparación del daño en el ADN inducido por UVC (4 J/m<sup>2</sup>s) fue analizado en células de la línea de hámster chino AA8. Para ello se empleó el ensayo cometa modificado mediante la incorporación de la endonucleasa T4 para la detección de los dímeros de pirimidina (CPDs) inducidos por UVC. El nivel de daño genético fue analizado a diferentes tiempos de recuperación (0, 1, 4 y 24 horas) con y sin tratamiento con TSA (50 ng/ml). El tratamiento con este HDACi se realizó en forma continua, tanto previa a la irradiación (4 horas) como en forma posterior.

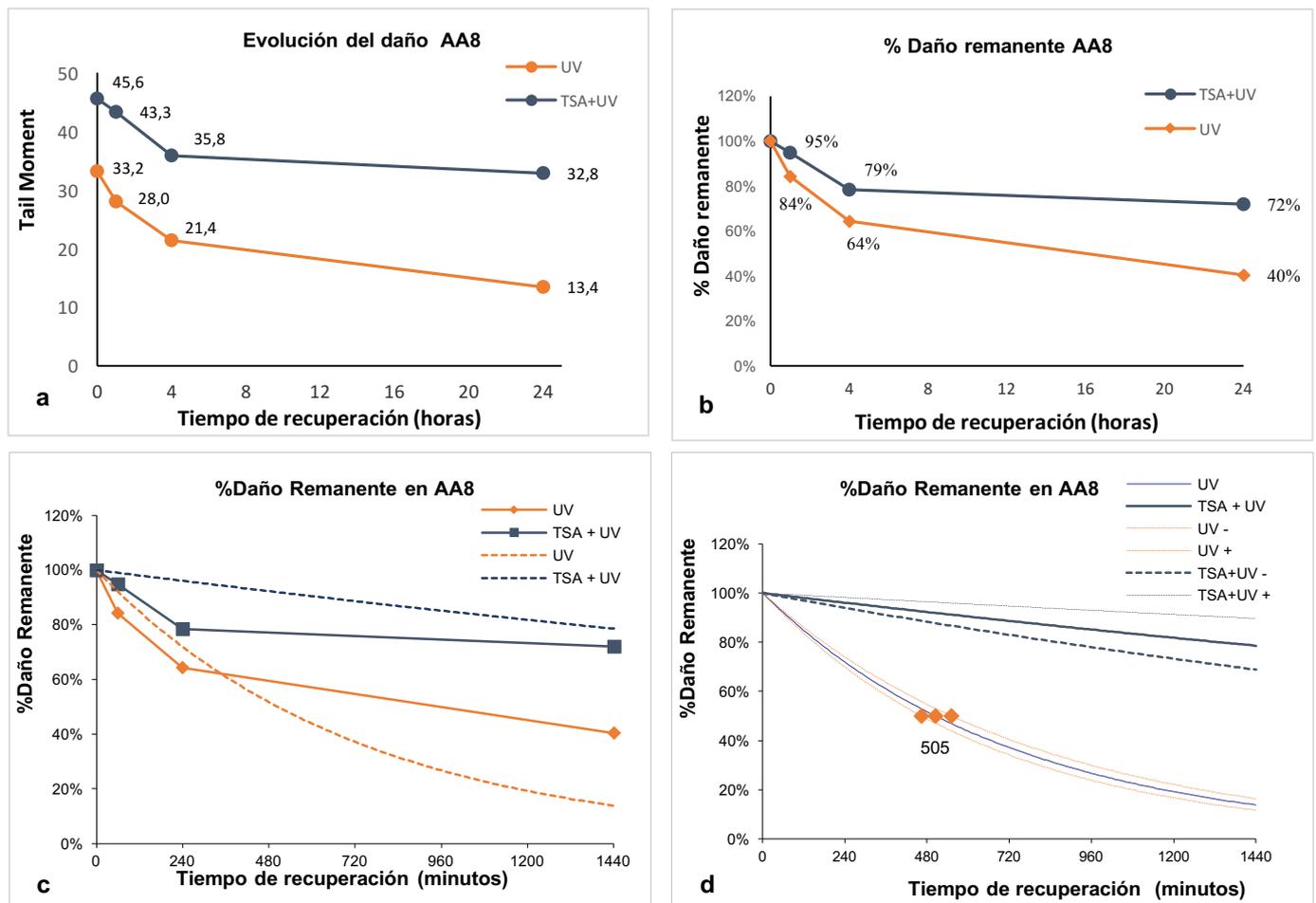
Debido a la diferencia inicial en el nivel de daño inducido por UVC entre los tratamientos con y sin TSA (Figura 42a), la comparación de la cinética de reparación entre ambos se realizó mediante el cálculo del porcentaje de daño remanente en cada tiempo de recuperación. Como se aprecia en la Figura 42b, la disminución del daño genético inducido por UVC resultó más pronunciada en ausencia de TSA, constatándose un 64% del daño inicial a las 4 horas de recuperación, mientras que en presencia de este HDACi a las 4 horas el porcentaje de daño remanente fue de 79%. A su vez, a las 24 horas en las células expuestas solamente a UVC el porcentaje de daño remanente descendió al 40%, mientras que en presencia de TSA se mantuvo

en un 72%. Es decir que al final del tiempo de recuperación en este tratamiento se reparó solamente un 28% de las lesiones inducidas inicialmente, mientras que en ausencia de TSA la reparación alcanzó el 60% de las lesiones.

Se realizó el análisis estadístico de estos resultados mediante curvas potenciales de mejor ajuste a las curvas de cinética obtenidas en la porción exponencial de las mismas, que en este caso es el período de 0 a 4 horas (Figura 42 c y d).

Se evaluó la existencia de reparación en el período de recuperación analizado (4 horas) en ambos tratamientos mediante la prueba T de Student, realizando la comparación de los parámetros de las curvas potenciales (Tabla 19). Como se aprecia en la Tabla 19 A, tanto en presencia como en ausencia de TSA fue posible rechazar la hipótesis nula que indicaba la no reparación ( $\beta=1$ ), concluyendo por tanto que existió reparación de las lesiones inducidas por UVC en ambos tratamientos. Sin embargo, el tiempo medio de reparación (TMR) resultó significativamente mayor en las células tratadas con TSA (69 horas), mientras que en ausencia de este HDACi el tiempo en el que se repararían el 50% de las lesiones inducidas inicialmente (TMR) fue de 21 horas. El contraste de homogeneidad entre regresiones lineales realizado determinó que la diferencia observada entre los TMR obtenidos es estadísticamente significativa (Tabla 19 B).

Por lo tanto, dados los resultados obtenidos puede concluirse que en presencia de TSA la reparación de las lesiones inducidas por UVC resultó menos eficiente que en ausencia de ella.



**Figura 42** - Cinética de reparación del daño inducido en el ADN en células de la línea de hámster chino AA8 luego del tratamiento con UVC ( $4 \text{ J/m}^2\text{s}$ ) con y sin tratamiento con TSA ( $50 \text{ ng/ml}$ ) evaluada mediante el ensayo cometa. **a)** Curva de cinética de reparación: se presentan los datos de Tail Moment a las 0, 1, 4 y 24 horas luego de la irradiación obtenidos mediante el software Comet Imager (Metasystems). **b)** Porcentaje de daño remanente a los diferentes tiempos de recuperación tomando como 100% el daño inicial. **c)** Curvas de porcentaje de daño remanente para los tratamientos con UV-C y TSA + UV-C y sus correspondientes curvas de ajuste exponencial. **d)** Curvas de ajuste exponencial presentadas en c) junto con sus intervalos de confianza ( $\alpha=0,05$ ).

A	Análisis Estadístico	
	UV	TSA + UV
<b>Prueba t</b>		
<b>Hipótesis</b>	$H_0: \beta_1=1$	$H_0: \beta_2=1$
Valor t	22,820	3,594
Grados de Libertad	1729	571
Valor Crítico 95%	1,961	1,964
<b>Resultado</b>	<b>Rechazada</b>	<b>Rechazada</b>
<b>Int. Confianza 95%</b>		
Cota Inferior $\beta$	0,999	1,000
Cota Superior $\beta$	0,999	1,000
Cota Inferior K	23,919	34,092
Cota Superior K	28,830	38,213
<b>Tiempo Medio (minutos)</b>		
<b>Estimación</b>	<b>505</b>	<b>4138</b>

B Contraste entre Regresiones	
UV	
Estimación $\beta'$	-0,001
$E(X-X_m)^2$	657592326
Sumas Resid.	4121
Tamaño Muestral	1731
TSA + UV	
Estimación $\beta'$	0,000
$E(X-X_m)^2$	149438953
Sumas Resid.	185
Tamaño Muestral	573
Contraste de Homogeneidad	
<b>Hipótesis</b>	$H_0: \beta_1=\beta_2$
Valor t	9,728
Grados Libertad	2300
Valor Crítico 95%	1,961
<b>Resultado</b>	<b>Rechazada</b>

**Tabla 19 - (A)** Resultado del análisis estadístico (Prueba T de Student) y parámetros estimados en las curvas de ajuste exponencial de las curvas de cinética de reparación (Figura 41 c y d) para: i) determinar la existencia de reparación en el tratamiento con UVC, tanto en presencia como en ausencia de TSA (50 ng/ml) en el período de recuperación estudiado (4 horas); ii) calcular el tiempo medio de reparación (TMR) en ambos tratamientos.

**(B)** Prueba de hipótesis realizada para contrastar la homogeneidad entre los parámetros estimados y determinar si la diferencia entre los TMR estimados es estadísticamente significativa.

## 8- DISCUSION

### ***8.1- Efecto de los inhibidores de desacetilasas de histonas en la sobrevida y proliferación celular luego del tratamiento con etopósido***

El tratamiento con etopósido durante 1 hora causó la disminución de la sobrevida y proliferación celular de manera dependiente de la dosis tanto en las líneas celulares tumorales de vejiga 253J y T24 como en la línea de hámster chino CHOK1 (Figuras 22b, 24b y 26b). La línea 253J resultó ser la más resistente de las tres al etopósido, ya que la concentración inhibitoria del 50% de la sobrevida ( $IC_{50}$ ) en esta línea celular fue la dosis de 20  $\mu$ M (Figura 22b). En cambio para T24 el  $IC_{50}$  fue la dosis de 16  $\mu$ M (Figura 24b) y en el caso de CHOK1, 9  $\mu$ M (Figura 26b). Esta mayor resistencia a etopósido de 253J comparada con T24 coincide con lo observado por Yoon et al. (2011), quienes constataron que 253J fue 8.3 veces más resistente a cisplatino que T24. Estos resultados son consistentes con el origen de ambas líneas celulares, ya que 253J deriva de un estadio tumoral más avanzado (metastásico) mientras que T24 es derivada de un carcinoma localizado.

Los resultados obtenidos en relación al efecto de los HDACi VPA, TSA y NaB en la sobrevida a la exposición a etopósido, confirmaron la hipótesis planteada inicialmente, ya que se observó sensibilización en el tratamiento combinado con los tres HDACi. Es decir que el pre-tratamiento con estos inhibidores potenció el efecto del etopósido a nivel de la sobrevida celular, existiendo en algunos casos ciertas variantes entre las diferentes líneas celulares analizadas con las distintas dosis de los HDACi empleadas.

En los análisis realizados en la **línea celular tumoral 253J** la exposición previa durante 24 horas a todas las dosis ensayadas de estos **tres HDACi** tuvo un **efecto sinérgico** con el tratamiento con etopósido, ya que en los tres casos la sobrevida en los tratamientos combinados resultó significativamente menor que en las células tratadas solo con etopósido (Figuras 18, 20 y 22). De los tres HDACi estudiados, el que sensibilizó en mayor medida a esta línea celular fue TSA (100 ng/ml), ya que la sobrevida con esta combinación de tratamientos resultó ser un 20% y 22% de la sobrevida observada en las células expuestas solo a etopósido 20 y 50  $\mu$ M respectivamente (Figura 21). En el caso de la mayor dosis de NaB empleada (10 mM) estos porcentajes fueron 22% y 26%, y en el de VPA (1.5 mM) 36% y 27% para etopósido 20 y 50  $\mu$ M respectivamente (Figuras 23 y 19 respectivamente). En base a estos resultados es posible estimar que en los tratamientos combinados para obtener una reducción en la sobrevida a un 20% de la observada con etopósido 20  $\mu$ M se requiere una dosis de TSA de 0.1 mM. Sin embargo, en el caso de VPA y NaB las dosis requeridas serían aproximadamente 3 mM y 10 mM respectivamente, es decir dosis 30 y 100 veces mayores que con TSA.

Las diferencias en sensibilización observadas entre estos tres HDACi podrían ser explicadas por sus características químicas y farmacológicas específicas. NaB y VPA son químicamente similares ya que ambos son ácidos grasos de cadena corta. En ambos casos para sensibilizar a

las células 253J fue necesario el uso de dosis en el rango milimolar, resultando VPA más potente que NaB ya que se requirieron dosis menores para lograr el mismo efecto. En cambio en el caso de TSA, se trata de un inhibidor perteneciente a la clase de HDACi de los ácidos hidroxámicos, y presentó un efecto mayor sobre la línea 253J que NaB y VPA, ya que concentraciones nanomolares fueron suficientes para sensibilizar a las células frente al tratamiento con etopósido.

Estas diferencias en el potencial sensibilizador entre los tres HDACi empleados podrían estar basadas en las actividades de las HDACs que son blanco de cada tipo de inhibidor. En el caso de TSA, a diferencia de NaB y VPA, además de las HDACs de clase I, inhibe a las de clase IIb: HDAC6 y HDAC10; y a las HDAC7 y HDAC11, pertenecientes a las clases IIa y IV respectivamente.

HDAC11 regula negativamente la expresión de genes involucrados en la respuesta inmune (Marks 2010), mientras que no se conoce mucho aún sobre la función de HDAC10. Sin embargo, en el caso de HDAC6 y HDAC7, ejercen su acción sobre proteínas no histónicas. HDAC7 se localiza en el espacio intermembranoso mitocondrial, relocalizándose en el citoplasma en respuesta al inicio del proceso apoptótico (Bakin y Jung 2004). HDAC6 ha sido reconocida como una desacetilasa de tubulina, ya que su inhibición selectiva mediada por tubacina produjo la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina en células de mamíferos sin afectar el nivel de acetilación de histonas, los patrones de expresión génica o la progresión del ciclo celular. A su vez, el tratamiento con tubacina no afectó la estabilidad de los microtúbulos pero sí la motilidad celular. La acetilación de  $\alpha$ -tubulina participaría en la localización celular de proteínas que median la unión de elementos del Golgi a los microtúbulos (Haggarty et al. 2003). La inhibición de HDAC6 tendría un rol importante en la sensibilización producida por TSA, ya que su inhibición mediada por tubacina aumentó la respuesta apoptótica al tratamiento con etopósido en células transformadas (LNCaP, MCF-7) (Namdar et al. 2010).

Por lo tanto, el efecto inhibitor más potente de TSA podría deberse, además de su efecto sobre las histonas, a su acción sobre proteínas no histónicas que participan en procesos celulares clave tal como la inducción de apoptosis. En cambio, en el caso de VPA y NaB, pertenecientes a la clase de HDACi de los ácidos grasos de cadena corta, quizás desencadenen la muerte celular de las células cancerígenas por vías diferentes a TSA, por medio de diferentes blancos celulares.

Comparando el efecto de **NaB entre las tres líneas celulares analizadas**, se pudo ver que la que resultó más sensibilizada a la combinación de tratamientos fue **253J**, dado que las tres dosis de NaB ensayadas en combinación con las tres dosis de etopósido disminuyeron la sobrevivencia de forma significativa en comparación con las células expuestas a etopósido solamente (Figura 22b). Sin embargo en **T24** esto ocurrió solo con la menor dosis de etopósido empleada (5  $\mu$ M), ya que con las dosis de 20 y 50  $\mu$ M solo se observó sensibilización con las dos dosis de NaB mayores (5 y 10 mM) (Figura 24b). La mayor diferencia entre 253J y T24 en cuanto a la sensibilización en presencia de NaB se encontró con la dosis de 1 mM, donde se observó una mayor disminución en la sobrevivencia en el tratamiento combinado con respecto a etopósido en la

línea celular 253J. Mientras que 253J fue sensibilizada por el tratamiento combinado de NaB 1 mM con todas las dosis de etopósido, donde la sobrevida resultó ser el 67% de la observada con etopósido 5  $\mu$ M y el 30% de la obtenida con etopósido 20 y 50  $\mu$ M (Figura 23); T24 solo fue sensibilizada por esta dosis de NaB en combinación con etopósido 5  $\mu$ M, donde su sobrevida fue el 79% de la que presentó etopósido (5  $\mu$ M). Con las dosis de etopósido 20 y 50  $\mu$ M en combinación con NaB 1 mM T24 presentó una sobrevida que correspondió al 108% y 92% de la obtenida con ambas dosis de etopósido respectivamente (Figura 25).

En el caso de **CHOK1** solo ocurrió sensibilización a este agente genotóxico con NaB 1 mM en combinación con etopósido 5 y 10  $\mu$ M (Figura 26).

Estas diferencias entre las tres líneas celulares en su sensibilización al etopósido por parte de NaB podrían estar vinculadas con el estatus de p53 en cada una de ellas, dado que existen evidencias que asocian la actividad de este HDACi con la presencia de p53 funcional. En este sentido, Joseph et al. (2005) constataron que el NaB suprimió más eficientemente el crecimiento de células que contenían p53 en su forma nativa (WT) en comparación con células sin p53 WT. Estas últimas luego del tratamiento con NaB se acumulaban principalmente en la fase G1 del ciclo celular y presentaban una menor inducción de apoptosis. Esta evidencia coincide con los resultados obtenidos sobre el efecto de NaB en la progresión del ciclo celular presentados en la Sección 7.1.3, donde puede apreciarse que en 253J no ocurrió detención del ciclo celular por exposición a este HDACi, mientras que T24 y CHOK1 presentaron acumulación de células en la fase G1 del ciclo (Figuras 31 y 32). En particular, CHOK1, que no posee p53 funcional (Hu et al. 1999), fue la línea celular en la que ocurrió la mayor acumulación de células en G1 luego del tratamiento con NaB (5 mM) (Figura 32a), y presentó el menor nivel de sensibilización frente a etopósido. En el caso de T24, que posee una mutación sin sentido en el gen que codifica para p53, produciendo la proteína en forma truncada y no funcional (Kawasaki et al. 1996), también presentó acumulación de células en la fase G1, y un nivel de sensibilización por NaB intermedio en comparación con las otras dos líneas celulares. En cambio, en el caso de 253J que posee p53 WT (Gruis et al. 1995), tal como postularon Joseph et al. (2005), no presentó detención del ciclo celular en la fase G1 luego de la exposición a NaB, siendo la línea celular que fue sensibilizada en mayor medida frente al etopósido por este HDACi.

Considerando la **combinación de dosis efectiva** como la menor dosis de ambos agentes a la que la sobrevida se reduce más de un 50% en relación al control negativo, se puede ver que la misma coincide para las líneas celulares tumorales de vejiga 253J y T24. En ambas dicha combinación resultó ser la de NaB 5 mM con etopósido 5  $\mu$ M, produciendo una disminución de la sobrevida en el orden de 4.5 veces en comparación con el tratamiento con etopósido solamente (Figuras 23 y 25). Esta combinación difiere para el caso de CHOK1, en la que resultó ser NaB 1 mM combinada con etopósido 5  $\mu$ M, obteniéndose una reducción en la sobrevida 1.4 veces en comparación con las células expuestas solo a etopósido (Figura 27).

Aplicando la dosis más baja de etopósido (5  $\mu$ M) como único agente la sobrevida observada fue de 76%, 98% y 62% en 253J, T24 y CHOK1 respectivamente (Figuras 22, 24 y 26). Sin embargo, con esta misma dosis de etopósido pero combinada con NaB 5 mM fue posible reducir la sobrevida a 18% en 253J y a 22% en T24; y combinada con NaB 1 mM a 46% en CHOK1.

Estos resultados refuerzan evidencias previas obtenidas por Wang et al. (2008) en otras líneas celulares tumorales de vejiga (5637, EJ y BIU87) empleando NaB en combinación con otro agente genotóxico como el cisplatino, constituyendo importantes antecedentes para el diseño de estrategias para el tratamiento de tumores de vejiga. Asimismo, demuestran la ventaja de combinar inhibidores de HDACs con un agente genotóxico como el etopósido, haciendo posible la maximización de su eficacia terapéutica y la disminución de la dosis empleada, lo que en la clínica contribuiría a la reducción de sus efectos colaterales.

## ***8.2- Efecto de los inhibidores de desacetilasas de histonas en el daño producido por agentes genotóxicos***

Al tomar en conjunto los resultados sobre el efecto de los HDACi en la sobrevida y proliferación celular (Sección 7.1) y los obtenidos en relación al daño inducido en el ADN (Sección 7.2) se pueden realizar las siguientes apreciaciones.

### ***8.2.1- Posible efecto genotóxico de los inhibidores de desacetilasas de histonas***

Analizando el efecto de los HDACi aplicados como único agente, se pudo ver que en el caso de **NaB** éste disminuyó la sobrevida y proliferación celular en forma dependiente de la dosis en las líneas celulares 253J, T24 y CHOK1. Esta disminución en la sobrevida no estaría asociada a la inducción de daño en el ADN por este HDACi en la mayoría de los casos, ya que el nivel de daño observado en el tratamiento solo con NaB se encontró en el rango del control negativo en las tres líneas celulares para casi todas las dosis evaluadas. La única excepción fue el caso de NaB 5 mM en CHOK1, donde se observó un nivel de daño significativo, el cual se correlacionó con la disminución de la sobrevida de esta línea celular a un 64% de la observada en el control negativo.

El resultado obtenido relativo a la sobrevida en 253J y T24 concuerda con lo observado por Wang et al. (2008), quienes constataron la disminución de la viabilidad celular de manera dependiente de la dosis por el tratamiento con NaB en otras tres líneas celulares tumorales de vejiga (5637, EJ y BIU87) y concluyeron que NaB 5 mM sería la concentración óptima para tratar este tipo de cáncer cuando es empleado como agente único. Sin embargo, estos autores no evaluaron el nivel de daño inducido en el ADN en presencia de NaB y asociaron el efecto de este HDACi en la sobrevida celular a cambios en la expresión de proteínas que participan en la apoptosis: disminución en los niveles de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y aumento en la expresión de la caspasa-3 que participa en la vía mitocondrial de inducción de apoptosis. Por otra parte, en ensayos realizados *in vivo*, la aplicación intravesical de NaB (5 mM) no tuvo un efecto significativo en el crecimiento tumoral en ratones.

En el caso de **VPA**, este HDACi no causó la reducción de la sobrevida y proliferación de las líneas celulares 253J y T24, observándose un nivel de sobrevida similar a la del control negativo con las tres dosis aplicadas (0.7, 1.5 y 3 mM). Incluso en T24 con la dosis de VAP de 0.7 mM se observó un nivel de sobrevida mayor al del control negativo (Figura 18a). Los resultados sobre el efecto de este HDACi en el daño genético inducido, obtenidos mediante el ensayo cometa en la línea linfoblastoide humana FLEBV y mediante la cuantificación de foci  $\gamma$ H2AX en linfocitos humanos de sangre periférica, mostraron que el nivel de daño inducido se ubicó en el rango de los controles negativos. Esta no inducción de daño por VPA se correlacionaría con lo observado a nivel de sobrevida en 253J y T24.

Coincidente con este resultado fue la observación de Marchion et al. (2005 b), quienes no observaron efectos antitumorales de VPA en tumores de mama de ratones tratados solo con esta droga a una concentración en el plasma de 3 mM. Estos autores sugirieron que VPA tendría más relevancia en potenciar el efecto de agentes citotóxicos que al ser usado como agente único en el tratamiento anticancerígeno.

Por otra parte, Wang et al. (2013) observaron la inhibición de la proliferación celular al emplear VPA (0.5 a 3 mM) como agente único en la línea celular T24 y otras líneas de cáncer de vejiga (BIU87 y 5637), pero en este caso el tratamiento con este HDACi fue realizado por 1 a 10 días de forma continua. Mientras que los ensayos realizados en el presente trabajo se llevaron a cabo con exposición a VPA durante 24 horas con la posterior recuperación en ausencia de la droga durante 10 días.

En el tratamiento con **TSA** se observó una disminución significativa de la sobrevida en las líneas celulares tumorales 253J y T24 con las 3 dosis de este HDACi ensayadas (50, 100 y 200 ng/ml) (Figura 20a). Asimismo, ensayos clonogénicos realizados en nuestro laboratorio en la línea celular de ovario de hámster chino AA8 también demostraron la reducción de la sobrevida de esta línea celular al ser expuesta a TSA 50 ng/ml, observándose un 11% de sobrevida con respecto al control negativo (Bervejillo 2009). Estos resultados se correlacionan con lo observado en relación al daño genético inducido en AA8 en las células tratadas con TSA (50 ng/ml) como único agente, donde se apreció un nivel de daño significativo con esta dosis de este HDACi (Figura 38). Es decir que la disminución de la sobrevida en 253J y T24 por exposición a TSA podría estar vinculada con daño inducido a nivel del ADN por este HDACi.

Esto es coincidente con lo observado por Pang et al. (2016) quienes encontraron un nivel de daño en el ADN significativo inducido por TSA (200 ng/ml) en células de cáncer esofágico, y por Smith et al. (2014) en la línea celular embrionaria de riñón HEK293T (TSA 50  $\mu$ M y 100  $\mu$ M).

En este sentido, se ha propuesto que el efecto pro-apoptótico de los HDACi estaría asociado a la generación de estrés oxidativo. Éste se refiere a un estado de desequilibrio redox (reducción-oxidación) en el cual la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) sobrepasa los mecanismos celulares de defensa antioxidante, en los que participan diversas enzimas. Li et al. (2016) observaron que el tratamiento de células de cáncer de vejiga con TSA disminuyó la

expresión de dos de ellas: glutatión reductasa y tioredoxin reductasa 2, y aumentó la de la xantino deshidrogenasa/oxidasa, lo que condujo a la formación de ROS. A su vez, se ha propuesto que el NaB también alteraría el sistema de defensa antioxidante y los mecanismos redox en las células, ya que se observó cambios en la actividad de varias enzimas antioxidantes (glutatión reductasa, glutatión peroxidasa y catalasa) en células de cáncer de mama tratadas con este HDACi (Louis et al. 2004).

Las ROS generadas a nivel celular son capaces de inducir daño oxidativo a nivel del ADN. Por lo tanto, la inducción de daño genético observada en CHOK1 tratada con NaB (5 mM), y en AA8 expuesta a TSA (50 nM), podría estar vinculada a la inducción de ROS por acción de estos HDACi. A su vez, en ambos casos, así como en los resultados obtenidos por exposición a VPA, se observó una correlación negativa entre el nivel de sobrevida y la inducción de daño a nivel del ADN.

### ***8.2.2- Efecto de la combinación de HDACi y agentes genotóxicos***

#### ***HDACi en combinación con etopósido***

De acuerdo a la hipótesis (#2) planteada inicialmente, se esperaba una correlación negativa entre la sobrevida y proliferación celular luego del tratamiento combinado de HDACi con etopósido y el nivel de daño inducido en el ADN en presencia del HDACi. Al comparar estos dos sets de datos (Secciones 7.1 y 7.2.1) se observaron diferencias en las distintas líneas celulares analizadas y con los diferentes HDACi.

En el caso de NaB se obtuvieron diferentes resultados con las dos dosis ensayadas. Con **NaB 1 mM** en el caso de las líneas celulares 253J y CHOK1 fue posible confirmar la hipótesis planteada. En la línea 253J la reducción en la sobrevida observada en el tratamiento combinado (NaB 1mM + etopósido 20  $\mu$ M) (Figura 22b) se correlacionó con un mayor nivel de daño genético inducido en comparación con el tratamiento solo con etopósido (Figura 29a). En el caso de CHOK1, donde no se observó sensibilización con la combinación de esta dosis de NaB y etopósido (20  $\mu$ M), constatándose el mismo nivel de sobrevida en presencia y ausencia de NaB (Figura 26b), esto se correlacionó con un nivel de daño que no resultó significativamente diferente entre ambos tipos de tratamientos (Figura 29d). Sin embargo, en la línea celular T24, en la que si bien al igual que en 253J en las células pre-tratadas con NaB 1 mM se observó un mayor nivel de daño inducido (Figura 29b), con la dosis de etopósido 20  $\mu$ M no existió reducción de la sobrevida en comparación con el tratamiento con etopósido solamente (Figura 24b).

En el caso de **NaB 5 mM** en la línea celular CHOK1 se confirmó la hipótesis planteada, ya que la mayor sobrevida observada en la combinación NaB 5 mM y etopósido (20  $\mu$ M) (Figura 26b) se correlacionó con una menor inducción de daño genético en comparación con el tratamiento con etopósido solamente (Figura 29d). Sin embargo, esto no fue así para 253J y T24, ya que en ambas existió sensibilización en las células pre-tratadas con esta dosis de NaB para etopósido

20  $\mu$ M (Figuras 22b y 24b), pero el daño inducido en el ADN con esta combinación de tratamientos no resultó mayor que en las células expuestas solo a etopósido, incluso en el caso de T24 éste fue significativamente menor.

Para **VPA**, los resultados de sobrevivencia mostraron la sensibilización de la línea celular 253J con el tratamiento combinado empleando ambas dosis de este HDACi en comparación con las células expuestas a etopósido solamente (Figura 18b). Los datos obtenidos acerca del daño inducido en el ADN por etopósido en combinación con VPA mostraron niveles similares tanto en presencia como ausencia de este HDACi (Figura 28). Sin embargo, los mismos fueron obtenidos en la línea celular linfoblastoide humana FLEBV y quizás no puedan ser extrapolables a 253J, ya que los HDACi en diferentes tipos celulares podrían desencadenar la muerte celular por diferentes mecanismos, actuando sobre diferentes blancos celulares.

Por otra parte, en células de cáncer de mama (MCF-7) Marchion et al. (2005a) observaron que el daño inducido por epirrubicina (agente intercalante) aumentó significativamente cuando las células fueron pre-tratadas con VPA (2 mM) por 48 horas. Este efecto estuvo asociado al aumento de la apoptosis. A su vez, Marchion et al. (2005a) evaluaron la sobrevivencia celular mediante ensayos clonogénicos y encontraron que el pre-tratamiento con VPA disminuyó la sobrevivencia de las células comparada con la de las tratadas con epirrubicina solamente. Estos autores asociaron la capacidad de potenciación de la epirrubicina por parte de VPA con la descondensación que genera a nivel de la cromatina. Esta mayor descondensación fue confirmada por el aumento en la sensibilidad del ADN a nucleasas producida por VPA, lo que permitió una mayor asociación al ADN de este agente intercalante.

Por lo tanto, **el efecto de la inhibición de HDACs en la sobrevivencia de las células tratadas con etopósido, dependiendo de la dosis empleada y de la línea celular analizada, puede tener una correlación negativa con el nivel de daño inducido en el ADN.** Tal como ocurrió en el caso de las líneas celulares 253J con la dosis de NaB 1 mM y CHO K1 con ambas dosis de NaB, **corroborándose en estos casos la hipótesis (#2) planteada.**

Sin embargo, dado que no puede establecerse una conclusión general para todas las líneas celulares estudiadas, es probable que existan otros factores además del daño genético inducido, que incidan en la potenciación del efecto del etopósido por parte de los HDACi.

### ***HDACi en combinación con etopósido vs HDACi en combinación con radiaciones ionizantes***

En el caso de los tratamientos combinados de HDACi con otro inductor de RDCs como los **rayos X** en la línea celular FLEBV (Sección 7.2.2), tanto en presencia de **VPA** como de **NaB**, el nivel de daño genético inducido no se diferenció significativamente del generado en ausencia de ellos (Figuras 33 y 34).

En cambio, en la combinación de los mismos con **etopósido** existieron diferencias entre el efecto de ambos en el daño genético inducido en FLEBV. En el caso de **VPA** el resultado fue similar al de la combinación con rayos X, dado que el nivel de daño en presencia de este HDACi no fue significativamente diferente al obtenido en ausencia de él (Figuras 28). Sin embargo, con **NaB** en la combinación con etopósido el resultado fue similar a lo obtenido con rayos X solo para la dosis de 1 mM, observándose que el daño genético inducido se encontró en el mismo nivel con y sin pre-tratamiento con NaB (Figura 29c). A diferencia de lo observado para rayos X, el nivel de daño genético observado en el tratamiento combinado de NaB 5 mM y etopósido resultó significativamente menor que en ausencia de este HDACi (Figura 29c). Como se comentó anteriormente, en las líneas celulares T24 y CHOK1 también se observó el mismo resultado (Figura 29 b y d).

Esta diferencia en el nivel de daño genético inducido en FLEBV, con la combinación de NaB 5 mM entre ambos agentes inductores de RDCs, podría estar relacionada con el mecanismo de acción de los mismos. Mientras que los rayos X inducen RDCs en forma directa sobre el ADN, el etopósido lo hace de manera indirecta al estabilizar el complejo clivable generado por la topoisomerasa II, fundamentalmente por la isoforma  $\alpha$  (TopoII $\alpha$ ). La acción de esta enzima, y por ende la acción genotóxica del etopósido, se encuentran asociadas a las fases S y G2 del ciclo celular. Por lo tanto, una explicación sobre el efecto diferencial de NaB 5 mM en su combinación con rayos X y etopósido podría estar dada por los resultados obtenidos acerca del efecto de esta dosis de NaB en la progresión del ciclo celular (Sección 7.2.1). Los resultados de los análisis de citometría de flujo realizados mostraron que el pre-tratamiento con NaB 5 mM condujo al enriquecimiento del cultivo celular en la fase G1 del ciclo, con la consiguiente reducción de la proporción de células en la fase S en T24 y CHOK1 (Figuras 31 y 32). Dado que la topoisomerasa II no es activa en G1, las células que se encontraban en esta fase del ciclo celular resultaron menos sensibles al etopósido, ya que éste no fue capaz de inducir daño en el ADN por no formarse el complejo clivable sobre el que actúa. En el caso de los rayos X, al inducir daño de forma directa sobre el ADN, su efecto es independiente de la fase del ciclo celular en la que se encuentran las células en el cultivo en el momento del tratamiento.

Por lo tanto, tomando en cuenta los resultados obtenidos sobre el efecto de NaB en la progresión del ciclo celular, es posible explicar el menor daño inducido por etopósido en los pre-tratamientos con NaB 5 mM en las líneas celulares T24 y CHOK1 en comparación con las células expuestas solo a etopósido (Figura 29 b-d). Si bien no se cuenta con datos sobre el efecto de NaB en la

progresión del ciclo celular en FLEBV y CHO xrs-5, esta explicación podría hacerse extensiva a estas líneas celulares en las que también se observó una menor inducción de daño en presencia de NaB 5 mM, en comparación con el inducido en las células tratadas solo con etopósido (Figuras 29 c y 30). En el caso de CHOK1, donde en el tratamiento combinado de etopósido con NaB 5 mM la acumulación de células en la fase G1 del ciclo celular fue aún mayor que en T24 (Figura 31a), la diferencia en el nivel de daño inducido luego de dicho tratamiento y el inducido solo con etopósido fue también mayor. Estos resultados obtenidos en CHOK1 sobre el enriquecimiento de la población celular pre-tratada con NaB 5 mM en la fase G1 del ciclo celular, y al menor daño inducido en presencia de esta dosis de NaB, se correlacionan con la mayor sobrevida celular observada luego de este tratamiento (Figura 26 b). En el mismo sentido, en el caso del pre-tratamiento con NaB 1 mM, el cual no provocó la detención del ciclo celular en CHOK1 (Figura 38c), se observaron niveles similares de sobrevida y de daño inducido en el ADN entre el tratamiento solo con etopósido (20  $\mu$ M) así como en la combinación de NaB 1mM y etopósido. Por el contrario, en la línea celular tumoral 253J, la no detención del ciclo celular con el pre-tratamiento con NaB 1 mM (Figura 38a) se correlaciona con la mayor sensibilidad observada en términos de sobrevida y mayor daño inducido en el ADN en comparación con el tratamiento solo con etopósido (Figuras 22b y 29a). Asimismo, el menor efecto de NaB 5 mM en el ciclo celular en el tratamiento combinado (NaB 5 mM + Etopósido) en esta línea celular (Figuras 31a y 32) se correlaciona con el nivel de daño observado el cual no resultó significativamente diferente del inducido por el tratamiento solo con etopósido (Figura 29 a).

### ***HDACi en combinación con radiaciones no ionizantes***

En relación al efecto de **TSA** (50 ng/ml) en la inducción de daño en el ADN por **UVC** (4 J/m<sup>2</sup>s) en la línea celular AA8, se observó que esta combinación de tratamientos indujo un nivel de daño significativamente mayor en comparación al inducido en las células expuestas solamente a UVC (Figura 38). Este resultado se correlaciona con la sensibilización observada en esta línea celular luego del tratamiento combinado de estas dosis de TSA y UVC (Bervejillo 2009 y Valencia-Payán 2016) y en la línea 253J en combinación con etopósido (Figura 20b).

En resumen, dados los resultados obtenidos, **en el caso de NaB (1 mM) combinado con etopósido en 253J y T24; y TSA (50 ng/ml) combinada con UVC en AA8 fue posible confirmar la hipótesis planteada (#2)**, ya que se observó un mayor nivel de daño genético en presencia de estos HDACi lo que se correlacionó con sensibilización a nivel de sobrevida celular.

Sin embargo, con VPA si bien se observó sensibilización al etopósido en 253J, no se constató un mayor nivel de daño inducido en su combinación con etopósido o con rayos X en comparación con el generado por estos agentes genotóxicos en forma aislada. Por lo tanto, una mayor inducción de daño podría ser uno de los factores involucrados en la sensibilización observada.

### ***8.3- Efecto de los HDACi en la cinética de remoción del daño genético inducido***

El tratamiento con los tres HDACi analizados (NaB, VPA y TSA) alteró la tasa de reparación del daño genético inducido por diferentes agentes genotóxicos, ya sea disminuyéndola o aumentándola. Por lo tanto, el mantenimiento de la acetilación de histonas inducido por los HDACi y los efectos que esto genera a nivel celular, interfiere en la remoción del daño por diferentes sistemas de reparación del ADN.

En la mayoría de las combinaciones analizadas se observó una reducción de la eficiencia de remoción del daño. Este fue el caso de NaB (5 mM) en combinación con rayos X, VPA (0.7 mM) en combinación con rayos  $\gamma$  y TSA combinada con UVC. La única excepción fue el caso de NaB 1 mM en combinación con rayos X en la línea celular FLEBV, donde se observó una mayor eficiencia de reparación.

La influencia de los HDACi en la cinética de reparación podría estar dada tanto por la modificación que inducen en la conformación de la cromatina, como por su acción sobre las actividades enzimáticas implicadas en la reparación del ADN, o incluso por acetilación de factores involucrados en la reparación.

#### ***Efecto de los HDACi en los diferentes sistemas de reparación***

##### ***Reparación de rupturas de doble cadena en el ADN (RDCs)***

Se ha constatado que tanto la actividad HAT como HDAC estarían implicadas en la reparación de RDCs. Por ejemplo en levaduras, mutaciones en múltiples residuos de lisina de la histona H4 o mutaciones en HATs confieren sensibilidad frente a agentes que inducen RDCs (Qin y Parthun 2002). A su vez, la desacetilación de diferentes lisinas acetiladas también se ha visto que es necesaria para la reparación de RDCs (Ikura et al. 2000; Jazayeri et al. 2004; Tamburini y Tyler 2005). En este sentido, se ha constatado que las HDAC1 y HDAC2 humanas participan en la respuesta al daño en el ADN promoviendo el NHEJ (Miller et al 2010). Ambas HDACs son

inhibidas por los HDACi empleados en este trabajo, por lo tanto al no estar activas es probable que la activación de esta vía de reparación resulte afectada.

Wurtele y Verreault (2006) plantearon que si bien se ha visto que la unión de HDACs a sitios de RDCs coincide temporalmente con la remoción de la acetilación, aún no se conoce si la desacetilación de histonas en los sitios dañados participa directamente en la reparación o si actúa restaurando el ambiente cromatínico local que existía en forma previa a la producción de la lesión.

Por otra parte, la desacetilación de histonas en lisinas específicas podría constituir un mecanismo de señalización del sitio dañado. Dado que luego de la exposición a HDACi se produce la acetilación generalizada de histonas, sería posible que el enlentecimiento de la reparación observado con el pre-tratamiento con estos agentes, interfiera en la señalización del daño o en el procesamiento del mismo, alterando el equilibrio de acetilación/desacetilación necesario para que estos procesos ocurran, conduciendo a una reparación menos eficiente.

En el caso de la combinación de NaB 1 mM con rayos X, quizás en este caso una cromatina más laxa propicie la reparación, ya sea permitiendo un mejor acceso al sitio dañado de los complejos sensores del daño o de la maquinaria de reparación.

### ***Reparación de dímeros de pirimidinas***

Los resultados presentados en este trabajo sobre el efecto de TSA en la cinética de remoción del daño inducido por UVC en células AA8 coinciden con otros obtenidos en nuestro laboratorio en estas células mediante la técnica de dot-blot empleando anticuerpos anti-CPDs (Valencia-Payán 2016). En dichos ensayos se observó que los dímeros de pirimidina (CPDs) persisten en presencia de TSA (50 ng/ml) a las 2 horas luego de la irradiación con UVC (4 J/m<sup>2</sup>s), mientras que en ausencia de este HDACi se encuentran al nivel del control negativo. Ambos resultados demuestran que el tratamiento previo con TSA impide la correcta remoción de los dímeros de pirimidina (CPDs) inducidos por UVC en células AA8. A su vez, ensayos de digestión del ADN con nucleasa micrococcal sugirieron que cuando las células son irradiadas con UVC en presencia de tricostatina A podría ocurrir una remodelación diferencial de la cromatina (Valencia-Payán 2016), lo que impediría la correcta interacción entre las proteínas del sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER) y las lesiones producidas en el ADN por UVC.

En este sentido, ha sido demostrada la interacción entre diferentes mecanismos epigenéticos durante el NER. Wang et al. (2006) observaron que un proceso de ubiquitinación de histonas en las primeras horas luego de la irradiación UVC es necesario para permitir una correcta remoción de las histonas del octámero, dejando el ADN libre para que las proteínas del sistema de reparación actúen de manera eficiente. Por otro lado, se ha constatado que altas concentraciones de TSA activan a deubiquitininas de histonas (2A-DUB (H2A)), impidiendo el correcto desensamblaje nucleosómico necesario para una correcta actividad del NER (Zhu et al. 2009).

Por lo tanto, los resultados presentados en este trabajo junto con evidencias experimentales previas, permiten proponer que la alteración del balance acetilación/desacetilación, generado por el pre-tratamiento con HDACi, podría estar en la base de la disminución de la eficiencia de remoción del daño inducido en el ADN por diferentes sistemas de reparación. Esto podría ser explicado por una reducción en la interacción de las proteínas de los sistemas de reparación a nivel de los sitios de ADN dañados, debido a cambios en la conformación de la cromatina.

## 9- CONCLUSIONES

- Los HDACi VPA, NaB y TSA sensibilizaron a la línea celular tumoral de vejiga 253J al tratamiento con etopósido, siendo TSA la que indujo la mayor disminución de la sobrevivencia celular.
- El HDACi NaB sensibilizó a la exposición a etopósido a las líneas celulares tumorales de vejiga 253J, T24 y a la línea de ovario de hámster chino CHOK1, existiendo diferencias entre ellas en las dosis de NaB más efectivas y el grado de sensibilización alcanzado.
- El tratamiento solo con TSA indujo un aumento en el nivel de daño en el ADN en la línea celular de hámster chino AA8, lo que se correlacionó con la disminución de la sobrevivencia inducida por este HDACi.
- El efecto sensibilizador del NaB al etopósido podría ser explicado por un aumento del daño genético inducido, el que estaría inversamente relacionado a la detención del ciclo celular inducida por este HDACi, sobretodo para las líneas celulares 253J y CHOK1, ya que dosis altas de este HDACi (5 mM) puede causar el enriquecimiento de la población celular en la fase G1 del ciclo, lo que estaría asociado a una menor actividad de Topo II.
- Los resultados obtenidos sobre el efecto de HDACi en la cinética de remoción del daño en el ADN inducido por rayos X, rayos gamma y UVC permiten proponer que la alteración del balance de acetilación/desacetilación generado por el pre-tratamiento con dosis elevadas de estos inhibidores reduce la eficiencia de la reparación de RDCs y CPDs.

## 10- PERSPECTIVAS

- Analizar el efecto de inhibidores específicos de determinadas HDACs (HDACi) sobre la acción de agentes genotóxicos, de manera de lograr una mayor profundización sobre los mecanismos involucrados en la potenciación de los mismos. Por ejemplo usando inhibidores específicos de las HDAC1 y HDAC2 que se han visto involucradas en la vía de reparación de RDCs NHEJ.
- Evaluar el efecto de la inhibición de HDACs en diferentes etapas de la respuesta celular al daño en el ADN. Por ejemplo, estudiando la posible incidencia de los HDACi en la detección del sitio dañado y el reclutamiento de la maquinaria de reparación, analizando su efecto en la afinidad de unión al ADN de los complejos proteicos involucrados mediante inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). O evaluando el efecto de HDACi en la amplificación de la señal de daño, en la actividad de proteínas integrantes de la cascada de señalización, como por ejemplo ATM, mediante western blots empleando anticuerpos que reconozcan en forma específica a dichas proteínas fosforiladas.
- Estudiar el efecto de HDACi en la expresión de proteínas que participan en los diferentes sistemas de reparación del ADN como Ku70 y Ku80 del sistema NHEJ o proteínas del sistema NER, mediante western blots realizados a partir de células expuestas a estos inhibidores. De esta manera, se podría evaluar si la menor eficiencia en la remoción del daño en presencia de los HDACi podría ser causada por la disminución de los niveles de proteínas involucradas en estos sistemas de reparación del ADN.

## 11- BIBLIOGRAFIA

- Acharya, M. R., Sparreboom, A., Venitz, J., & Figg, W. D. (2005). Rational development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents: a review. *Molecular pharmacology*, 68(4), 917-932.
- Adachi, N., Suzuki, H., Iizumi, S., & Koyama, H. (2003). Hypersensitivity of Nonhomologous DNA End-joining Mutants to VP-16 and ICRF-193 Implications for the repair of topoisomerase II-mediated DNA damage. *Journal of Biological Chemistry*, 278(38), 35897-35902.
- Ahmad, K., & Henikoff, S. (2002). The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Molecular Cell*, 9(6), 1191-1200.
- Arents, G., & Moudrianakis, E. N. (1995). The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(24), 11170-11174.
- Aucamp, P. J., Björn, L. O., & Lucas, R. (2011). Questions and answers about the environmental effects of ozone depletion and its interactions with climate change: 2010 assessment. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 10(2), 301-316.
- Ayene, I. S., Ford, L. P., & Koch, C. J. (2005). Ku protein targeting by Ku70 small interfering RNA enhances human cancer cell response to topoisomerase II inhibitor and  $\gamma$  radiation. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(4), 529-536.
- Azarova, A. M., Lyu, Y. L., Lin, C. P., Tsai, Y. C., Lau, J. Y. N., Wang, J. C., & Liu, L. F. (2007). Roles of DNA topoisomerase II isozymes in chemotherapy and secondary malignancies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(26), 11014-11019.
- Bakin, R. E., & Jung, M. O. (2004). Cytoplasmic sequestration of HDAC7 from mitochondrial and nuclear compartments upon initiation of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(49), 51218-51225.
- Bassal, S., & El-Osta, A. (2005). DNA damage detection and repair, and the involvement of epigenetic states. *Human mutation*, 25(2), 101-109.
- Bassett, A., Cooper, S., Wu, C., & Travers, A. (2009). The folding and unfolding of eukaryotic chromatin. *Current opinion in genetics & development*, 19(2), 159-165.
- Beck, W. T., Danks, M. K., Wolverson, J. S., Kim, R., & Chen, M. (1993). Drug resistance associated with altered DNA topoisomerase II. *Advances in enzyme regulation*, 33, 113-116.
- Bervejillo, V. (2009). Estudio del mecanismo de acetilación de histonas inducida por UV-C en células proficientes y deficientes en el sistema de reparación por escisión de nucleótidos. Tesis de grado, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay.
- Bender, R. P., Jablonksy, M. J., Shadid, M., Romaine, I., Dunlap, N., Anklin, C., Graves, D. E., Osheroff, N. (2008). Substituents on Etoposide That Interact with Human Topoisomerase II $\alpha$  in the Binary Enzyme- Drug Complex: Contributions to Etoposide Binding and Activity. *Biochemistry*, 47(15), 4501-4509.
- Bottomley M. J. (2004). Structures of protein domains that create or recognize histone modifications. *EMBO reports* 5 (5): 464-469.
- Botuyan, M. V., Lee, J., Ward, I. M., Kim, J. E., Thompson, J. R., Chen, J., & Mer, G. (2006). Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair. *Cell*, 127(7), 1361-1373.

- Bubenik, J., Barešová, M., Viklický, V., Jakoubkova, J., Sainerova, H., & Donner, J. (1973). Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumour-specific antigen. *International journal of cancer*, 11(3), 765-773.
- Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., A, K., J, C. D. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 276, 42462-42467.
- Camphausen, K., Burgan, W., Cerra, M., Oswald, K. A., Trepel, J. B., Lee, M.-J., Tofilon, P. J. (2004). Enhanced radiation-induced cell killing and prolongation of  $\gamma$ H2AX foci expression by the histone deacetylase inhibitor MS-275. *Cancer Res*, 64, 316-32
- Campisi, J. y d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 728-739.
- Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M. J., Pilch, D. R., Staudt, D. W., Lee, A., Bonner, R. F., Bonner, W. M., Nussenzweig, A. (2003). Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nature cell biology*, 5(7), 675.
- Cheriyath, V., Kuhns, M. A., Kalaycio, M. E., & Borden, E. C. (2011). Potentiation of apoptosis by histone deacetylase inhibitors and doxorubicin combination: cytoplasmic cathepsin B as a mediator of apoptosis in multiple myeloma. *British journal of cancer*, 104(6), 957-967.
- Cheung, W., Turner, F., Krishnamoorthy, T., Wolner, B., Ahn, S., al, F. M. e. (2005). Phosphorylation of histone H4 serine 1 during DNA damage requires casein kinase II in *S. cerevisiae*. *Curr Biol*, 15, 656-660.
- Chowdhury, D., Keogh, M., Ishii, H., Peterson, C., Buratowski, S., Lieberman, J. (2005). gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *J Mol Cell*, 20, 801-809.
- Ciccia, A., & Elledge, S. J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular cell*, 40(2), 179-204.
- Cleaver, J. E., Lam, E. T., & Revet, I. (2009). Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity. *Nature Reviews Genetics*, 10(11), 756-768.
- Collins, A. R., Duthie, S. J., & Dobson, V. L. (1993). Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis*, 14(9), 1733-1735.
- Costanzi, C., & Pehrson, J. R. (1998). Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature*, 393(6685), 599-601.
- Corpet, A., & Almouzni, G. (2009). A histone code for the DNA damage response in mammalian cells?. *The EMBO journal*, 28(13), 1828-1830.
- Cortés-Ledesma, F. C., El Khamisy, S. F., Zuma, M. C., Osborn, K., & Caldecott, K. W. (2009). A human 5'-tyrosyl DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase-mediated DNA damage. *Nature*, 461(7264), 674-678.
- Cortez, D., Wang, Y., Qin, J., & Elledge, S. J. (1999). Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science*, 286(5442), 1162-1166.
- Cosgrove M. S., Boeke J. D., Wolberger C. (2004). Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nature Struct Mol Biol* 11 (11): 1037–1043.

- Cowell, I. G., Sondka, Z., Smith, K., Lee, K. C., Manville, C. M., Sidorchuk-Lesthuruge, M., Rance, H. A., Padget, K., Jackson, G. H., Adachi, N., Austin, C. A. (2012). Model for MLL translocations in therapy-related leukemia involving topoisomerase II $\beta$ -mediated DNA strand breaks and gene proximity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(23), 8989-8994.
- Darroudi, F., & Natarajan, A. T. (1989). Cytogenetical characterization of Chinese hamster ovary X-ray-sensitive mutant cells, xrs 5 and xrs 6 IV. Study of chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges by restriction endonucleases and inhibitors of DNA topoisomerase II. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 212(2), 137-148.
- Darroudi, F., & Natarajan, A. T. (1987). Cytological characterization of Chinese hamster ovary X-ray-sensitive mutant cells xrs 5 and xrs 6: I. Induction of chromosomal aberrations by X-irradiation and its modulation with 3-aminobenzamide and caffeine. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 177(1), 133-148.
- Das, C., Lucia, M. S., Hansen, K. C., & Tyler, J. K. (2009). CBP/p300-mediated acetylation of histone H3 on lysine 56. *Nature*, 459(7243), 113-117.
- Das, C. M., Aguilera, D., Vasquez, H., Prasad, P., Zhang, M., Wolff, J. E., & Gopalakrishnan, V. (2007). Valproic acid induces p21 and topoisomerase-II ( $\alpha/\beta$ ) expression and synergistically enhances etoposide cytotoxicity in human glioblastoma cell lines. *Journal of neuro-oncology*, 85(2), 159-170.
- Davey, C. A., Sargent, D. F., Luger, K., Maeder, A. W., & Richmond, T. J. (2002). Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. *Journal of molecular biology*, 319(5), 1097-1113.
- Davie J. R. (2003). Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *American Society for Nutritional Sciences: 2485S-2493S*.
- Deweese, J. E., & Osheroff, N. (2009). The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing. *Nucleic acids research*, 37(3), 738-748.
- De Boer, J., & Hoeijmakers, J. H. (2000). Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*, 21(3), 453-460.
- Di Tomaso, M. V., Martínez-López, W., Méndez-Acuña, L., Lafon-Hughes, L., & Folle, G. A. (2008). Factors leading to the induction and conversion of DNA damage into structural chromosomal aberrations. *Progress in DNA Damage Research*, 55-110.
- Dinant, C., Houtsmuller, A. B., & Vermeulen, W. (2008). Chromatin structure and DNA damage repair. *Epigenetics & chromatin*, 1(1), 1.
- Dokmanovic, M., & Marks, P. A. (2005). Prospects: histone deacetylase inhibitors. *Journal of Cellular Biochemistry*, 96(2), 293-304.
- Egger G., Liang G., Aparicio A., Jones P. A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429: 457-463.
- Elliott, A. Y., Cleveland, P., Cervenka, J., Castro, A. E., Stein, N., Hakala, T. R., & Fraley, E. E. (1974). Characterization of a cell line from human transitional cell cancer of the urinary tract. *Journal of the National Cancer Institute*, 53(5), 1341-1349.
- Escargueil, A. E., Soares, D. G., Salvador, M., Larsen, A. K., & Henriques, J. A. P. (2008). What histone code for DNA repair?. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 658(3), 259-270.

- Esteller, M., Almouzni, G. (2005). Workshop on Epigenetics and Chromatin: Transcriptional Regulation and Beyond. *EMBO Rep*, 6(7), 624-628.
- Fan, J. R., Peng, A. L., Chen, H. C., Lo, S. C., Huang, T. H., & Li, T. K. (2008). Cellular processing pathways contribute to the activation of etoposide-induced DNA damage responses. *DNA repair*, 7(3), 452-463.
- Farria, A., Li, W., & Dent, S. Y. R. (2015). KATs in cancer: functions and therapies. *Oncogene*, 34(38):4901–13.
- Felsenfeld, G., Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature*, 421, 448-453.
- Fernandez-Capetillo, O., Allis, C., Nussenzweig, A. (2004a). Phosphorylation of histone H2B at DNA double-strand breaks. *J Exp Med*, 199, 1671-1677.
- Fernandez-Capetillo, O., Lee, A., Nussenzweig, M., Nussenzweig, A. (2004b). H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair*, 3, 959-967.
- Filippakopoulos, P., Picaud, S., Mangos, M., Keates, T., Lambert, J. P., Barsyte-Lovejoy, D., Felletar, I., Volkmer, R., Müller, S., Pawson, T., Gingras, A. C., Arrowsmith, C. H., Knapp, S. (2012). Histone recognition and large-scale structural analysis of the human bromodomain family. *Cell*, 149(1), 214-231.
- Fischle, W., Wang, Y., Allis, C. D. (2003). Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol*, 15, 172-183.
- Folco, H. D., Pidoux, A. L., Urano, T., & Allshire, R. C. (2008). Heterochromatin and RNAi are required to establish CENP-A chromatin at centromeres. *Science*, 319(5859), 94-97.
- Ford, J. M. (2005). Regulation of DNA damage recognition and nucleotide excision repair: another role for p53. *Mutat Res*, 577, 195-202.
- Frew, A. J., Johnstone, R. W., & Bolden, J. E. (2009). Enhancing the apoptotic and therapeutic effects of HDAC inhibitors. *Cancer letters*, 280(2), 125-133.
- Friedberg EC, Walker GC, Siede W, Wood RW, Schultz RA, Ellenberger T. *DNA Repair and Mutagenesis*, 2nd ed. 2006. ASM Press, Washington, DC.
- Gao, R., Schellenberg, M. J., Shar-yin, N. H., Abdelmalak, M., Marchand, C., Nitiss, K. C., ... & Pommier, Y. (2014). Proteolytic degradation of topoisomerase II (Top2) enables the processing of Top2· DNA and Top2· RNA covalent complexes by tyrosyl-DNA-phosphodiesterase 2 (TDP2). *Journal of Biological Chemistry*, 289(26), 17960-17969.
- Garcia-Ramirez M., Rocchini C., Ausio J. (1995). Modulation of chromatin folding by histone acetylation. *J. Biol. Chem.* 270: 17923-17928.
- Gaymes, T. J., Padua, R. A., Pla, M., Orr, S., Omidvar, N., Chomienne, C., Mufti, G. J., Rassool, F. V. (2006). Histone deacetylase inhibitors (HDI) cause DNA damage in leukemia cells: a mechanism for leukemia-specific HDI-dependent apoptosis?. *Molecular cancer research*, 4(8), 563-573.
- Geng, L., Cuneo, K. C., Fu, A., Tu, T., Atadja, P. W., & Hallahan, D. E. (2006). Histone deacetylase (HDAC) inhibitor LBH589 increases duration of  $\gamma$ -H2AX Foci and confines HDAC4 to the cytoplasm in irradiated non-small cell lung cancer. *Cancer Research*, 66(23), 11298-11304.
- Glozak, M. A., & Seto, E. (2007). Histone deacetylases and cancer. *Oncogene*, 26(37), 5420-5432.

- Gong, F., Chiu, L. Y., & Miller, K. M. (2016). Acetylation Reader Proteins: Linking Acetylation Signaling to Genome Maintenance and Cancer. *PLoS Genet*, 12(9), e1006272.
- Gong, F., & Miller, K. M. (2013). Mammalian DNA repair: HATs and HDACs make their mark through histone acetylation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 750(1), 23-30.
- Goodarzi, A. A., Jeggo, P., & Lobrich, M. (2010). The influence of heterochromatin on DNA double strand break repair: Getting the strong, silent type to relax. *DNA repair*, 9(12), 1273-1282.
- Goodhead, D. T. (1989). The initial physical damage produced by ionizing radiations. *International Journal of Radiation Biology*, 56(5), 623-634.
- Goodhead, D. T. (1999). Mechanisms for the biological effectiveness of high-LET radiations. *Journal of radiation research*, 40(Suppl), S1-S13.
- Grant, S., Easley, C., & Kirkpatrick, P. (2007). Vorinostat. *Nature reviews Drug discovery*, 6(1), 21-22.
- Gruis, N. A., Weaver-Feldhaus, J., Liu, Q., Frye, C., Eeles, R., Orlow, I., Lacombe, L., Ponce-Castaneda, V., Lianes, P., Latres, E., Skolnick, M., Cordon-Cardo, C., Kamb, A. (1995). Genetic evidence in melanoma and bladder cancers that p16 and p53 function in separate pathways of tumor suppression. *The American journal of pathology*, 146(5), 1199.
- Gudkov, A. V., Zelnick, C. R., Kazarov, A. R., Thimmapaya, R., Suttle, D. P., Beck, W. T., & Roninson, I. B. (1993). Isolation of genetic suppressor elements, inducing resistance to topoisomerase II-interactive cytotoxic drugs, from human topoisomerase II cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(8), 3231-3235.
- Gudmundsdottir, K., Ashworth, A. (2006). The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene*, 25, 5864–5874.
- Gui, Y., Guo, G., Huang, Y., Hu, X., Tang, A., Gao, S., et al. (2011). Frequent mutations of chromatin remodeling genes in transitional cell carcinoma of the bladder. *Nature genetics*, 43(9), 875-878.
- Haggarty, S. J., Koeller, K. M., Wong, J. C., Grozinger, C. M., & Schreiber, S. L. (2003). Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(8), 4389-4394.
- Hanasoge, S., & Ljungman, M. (2007). H2AX phosphorylation after UV irradiation is triggered by DNA repair intermediates and is mediated by the ATR kinase. *Carcinogenesis*, 28(11), 2298-2304.
- Hande, K. R. (1998). Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *European Journal of Cancer*, 34(10), 1514-1521.
- Harper, J. W., & Elledge, S. J. (2007). The DNA damage response: ten years after. *Molecular cell*, 28(5), 739-745.
- Hartsuiker, E., Neale, M. J., & Carr, A. M. (2009). Distinct requirements for the Rad32 Mre11 nuclease and Ctp1 CtIP in the removal of covalently bound topoisomerase I and II from DNA. *Molecular cell*, 33(1), 117-123.
- Hassa, P. O., & Hottiger, M. O. (2005). An epigenetic code for DNA damage repair pathways?. *Biochemistry and cell biology*, 83(3), 270-285.

- Hebbes T. R., Clayton A. L., Thorne A. W., Crane-Robinson C. (1994). Core histone hyperacetylation co-maps with generalized DNase I sensitivity in the chicken beta-globin chromosomal domain. *EMBO J.* 13: 1823-1830.
- Hideshima, T., & Anderson, K. C. (2013). Histone deacetylase inhibitors in the treatment for multiple myeloma. *International journal of hematology*, 97(3), 324-332.
- Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411(6835), 366-374.
- Hoshikawa, Y., Kwon, H. J., Yoshida, M., Horinouchi, S., & Beppu, T. (1994). Trichostatin A induces morphological changes and gelsolin expression by inhibiting histone deacetylase in human carcinoma cell lines. *Experimental cell research*, 214(1), 189-197.
- Hrebackova, J., Hrabeta, J., & Eckschlager, T. (2010). Valproic acid in the complex therapy of malignant tumors. *Current drug targets*, 11(3), 361-379.
- Hu, T., Miller, C. M., Ridder, G. M., & Aardema, M. J. (1999). Characterization of p53 in Chinese hamster cell lines CHO-K1, CHO-WBL, and CHL: implications for genotoxicity testing. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 426(1), 51-62.
- Hunt, C. R., Ramnarain, D., Horikoshi, N., Iyengar, P., Pandita, R. K., Shay, J. W., & Pandita, T. K. (2013). Histone modifications and DNA double-strand break repair after exposure to ionizing radiations. *Radiation Research*, 179(4), 383-392.
- Huyen, Y., Zgheib, O., DiTullio Jr, R. A., Gorgoulis, V. G., Zacharatos, P., Petty, T. J., Sheston, E.A., Mellert, H.S., Stavridi, E.S., Halazonetis, T.D. (2004). Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature*, 432(7015), 406-411.
- Ikura, T., Tashiro, S., Kakino, A., Shima, H., Jacob, N., Amunugama, R., et al. (2007). DNA damage-dependent acetylation and ubiquitination of H2AX enhances chromatin dynamics. *Molecular and cellular biology*, 27(20), 7028-7040.
- Jackson, S. P. (2002). Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*, 23(5), 687-696.
- Järvinen, T. A. H., & Liu, E. T. (2003). Topoisomerase II $\alpha$  gene (TOP2A) amplification and deletion in cancer—more common than anticipated. *Cytopathology*, 14(6), 309-313.
- Jeggo, P. A., & Kemp, L. M. (1983). X-ray-sensitive mutants of Chinese hamster ovary cell line isolation and cross-sensitivity to other DNA-damaging agents. *Mutation Research/DNA Repair Reports*, 112(6), 313-327.
- Jeggo, P. A., Kemp, L. M., & Holliday, R. (1982). The application of the microbial “tooth-pick” technique to somatic cell genetics, and its use in the isolation of X-ray sensitive mutants of Chinese hamster ovary cells. *Biochimie*, 64(8-9), 713-715.
- Jeggo, P. A., & Löbrich, M. (2007). DNA double-strand breaks: their cellular and clinical impact?. *Oncogene*, 26(56), 7717-7719.
- Jeggo, P., & Löbrich, M. (2006). Radiation-induced DNA damage responses. *Radiation protection dosimetry*, 122(1-4), 124-127.
- Jenuwein, T., Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science*, 293, 1074-1080.
- Jeppesen P. (1997). Histone acetylation: a possible mechanism for the inheritance of cell memory at mitosis. *BioEssays* 19 (1): 67-74.

- Johnson, C. A., Padget, K., Austin, C. A., & Turner, B. M. (2001). Deacetylase activity associates with topoisomerase II and is necessary for etoposide-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 276(7), 4539-4542.
- Joseph, J., Wajapeyee, N., & Somasundaram, K. (2005). Role of p53 status in chemosensitivity determination of cancer cells against histone deacetylase inhibitor sodium butyrate. *International journal of cancer*, 115(1), 11-18.
- Ju, B. G., Lunyak, V. V., Perissi, V., Garcia-Bassets, I., Rose, D. W., Glass, C. K., & Rosenfeld, M. G. (2006). A topoisomerase II $\beta$ -mediated dsDNA break required for regulated transcription. *science*, 312(5781), 1798-1802.
- Kamakaka, R. T., & Biggins, S. (2005). Histone variants: deviants?. *Genes & development*, 19(3), 295-316.
- Khanna, K. K., & Jackson, S. P. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature genetics*, 27(3), 247-254.
- Kantidze, O. L., & Razin, S. V. (2007). Chemotherapy-related secondary leukemias: A role for DNA repair by error-prone non-homologous end joining in topoisomerase II—Induced chromosomal rearrangements. *Gene*, 391(1), 76-79.
- Karagiannis, T. C., & El-Osta, A. (2007). Chromatin modifications and DNA double-strand breaks: the current state of play. *Leukemia*, 21(2), 195-200.
- Kaufmann, W. K., Carson, C. C., Omolo, B., Filgo, A. J., Sambade, M. J., Simpson, D. A., ... & Thomas, N. E. (2014). Mechanisms of chromosomal instability in melanoma. *Environmental and molecular mutagenesis*, 55(6), 457-471.
- Kawasaki, T., Tomita, Y., Bilim, V., Takeda, M., Takahashi, K., & Kumanishi, T. (1996). Abrogation of apoptosis induced by DNA-damaging agents in human bladder-cancer cell lines with p21/WAF1/CIP1 and/or p53 gene alterations. *International journal of cancer*, 68(4), 501-505.
- Keogh, M., Kim, J., Downey, M., Fillingham, J., Chowdhury, D., Harrison, J., Onishi, M., Datta, N., Galicia, S., Emili, A., Lieberman, J., Shen, X., Buratowski, S., Haber, J., Durocher, D., Greenblatt, J., Krogan, N. (2006). A phosphatase complex that dephosphorylates gammaH2AX regulates DNA damage checkpoint recovery. *Nature* 439, 497-501.
- Kim, H. J., & Bae, S. C. (2011). Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *Am J Transl Res*, 3(2), 166-179.
- Kim, M. S., Blake, M., Baek, J. H., Kohlhagen, G., Pommier, Y., & Carrier, F. (2003). Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA. *Cancer research*, 63(21), 7291-7300.
- Kim, J., Park, H., Im, J. Y., Choi, W. S., & KIM, H. S. (2007). Sodium butyrate regulates androgen receptor expression and cell cycle arrest in human prostate cancer cells. *Anticancer research*, 27(5A), 3285-3292.
- Kinner, A., Wu, W., Staudt, C., & Iliakis, G. (2008).  $\gamma$ -H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic acids research*, 36(17), 5678-5694.
- Kolesnick, R., & Fuks, Z. (2003). Radiation and ceramide-induced apoptosis. *Oncogene*, 22(37), 5897-5906.
- Kornberg R. D., Lorch Y. (1999). Twenty-five years of the nucleosome. *Cell* 98: 285-294.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128, 693–705.

- Lafon-Hughes, L., Di Tomaso, M. V., Méndez-Acuña, L., & Martínez-López, W. (2008). Chromatin-remodelling mechanisms in cancer. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 658(3), 191-214.
- Lane, A. A., & Chabner, B. A. (2009). Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 27(32), 5459-5468.
- Lans, H., Marteijn, J. A., & Vermeulen, W. (2012). ATP-dependent chromatin remodeling in the DNA-damage response. *Epigenetics & chromatin*, 5(1), 1.
- Lavin, M. F. (2007). ATM and the Mre11 complex combine to recognize and signal DNA double-strand breaks. *Oncogene*, 26(56), 7749-7758.
- Lazzaro, F., Giannattasio, M., Puddu, F., Granata, M., Pelliccioli, A., Plevani, P., & Muzi-Falconi, M. (2009). Checkpoint mechanisms at the intersection between DNA damage and repair. *DNA repair*, 8(9), 1055-1067.
- Lee, K. K., & Workman, J. L. (2007). Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(4), 284-295.
- Lees-Miller, S. P., & Meek, K. (2003). Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining. *Biochimie*, 85(11), 1161-1173.
- Legube, G., & Trouche, D. (2003). Regulating histone acetyltransferases and deacetylases. *EMBO reports*, 4(10), 944-947.
- Lejeune, J., Lafourcade, J., Berger, R., Vialatte, J., Boeswillwald, M., Seringe, P., Turpin, R. (1963). Trois cas de délétion partielle du bras court d'un chromosome 5. *Acad. Sci. Paris*, 257, 3098-3102.
- Li, Q.Q., Hao, J.J., Zhang, Z., Hsu, I., Liu, Y., Tao, Z., Lewi, K., Metwalli, A.R. y Agarwal, P.K. (2016). Histone deacetylase inhibitor-induced cell death in bladder cancer is associated with chromatin modification and modifying protein expression: A proteomic approach. *International Journal Of Oncology* 48, 2591-2607.
- Li, Y, Wen H, Xi Y, Tanaka K, Wang H, Peng D, et al. AF9 YEATS domain links histone acetylation to DOT1L-mediated H3K79 methylation. *Cell*. 2014; 159(3):558–71.
- Li, L., Zhang, G., Zhang, Y., Tan, J., Huang, H., Huang, B., & Lu, J. (2008). Sodium butyrate-induced upregulation of p18 INK4C gene affects K562 cell G0/G1 arrest and differentiation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 319(1-2), 9-15.
- Li, G., & Zhu, P. (2015). Structure and organization of chromatin fiber in the nucleus. *FEBS letters*, 589(20PartA), 2893-2904.
- Lindahl, T. (2000). Suppression of spontaneous mutagenesis in human cells by DNA base excision–repair. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 462(2), 129-135.
- Liu, C., Pouliot, J. J., & Nash, H. A. (2004). The role of TDP1 from budding yeast in the repair of DNA damage. *DNA repair*, 3(6), 593-601.
- Loizou, J. I., Murr, R., Finkbeiner, M. G., Sawan, C., Wang, Z. Q., & Herceg, Z. (2006). Epigenetic information in chromatin: the code of entry for DNA repair. *Cell Cycle*, 5(7), 696-701.
- Lord, C. J., & Ashworth, A. (2012). The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*, 481(7381), 287.

- Louis, M., Rosato, R. R., Brault, L., Osbild, S., Battaglia, E., Yang, X. H., Grant, S., Bagrel, D. (2004). The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate induces breast cancer cell apoptosis through diverse cytotoxic actions including glutathione depletion and oxidative stress. *International journal of oncology*, 25(6), 1701-1712.
- Lovejoy, C. A., & Cortez, D. (2009). Common mechanisms of PIKK regulation. *DNA repair*, 8(9), 1004-1008.
- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648), 251-260.
- Lyu, Y. L., Lin, C. P., Azarova, A. M., Cai, L., Wang, J. C., & Liu, L. F. (2006). Role of topoisomerase II $\beta$  in the expression of developmentally regulated genes. *Molecular and cellular biology*, 26(21), 7929-7941.
- Malik, M., & Nitiss, J. L. (2004). DNA repair functions that control sensitivity to topoisomerase-targeting drugs. *Eukaryotic cell*, 3(1), 82-90.
- Malik, M., Nitiss, K. C., Enriquez-Rios, V., & Nitiss, J. L. (2006). Roles of nonhomologous end-joining pathways in surviving topoisomerase II-mediated DNA damage. *Molecular cancer therapeutics*, 5(6), 1405-1414.
- Marchion, D. C., Bicaku, E., Daud, A. I., Sullivan, D. M., & Munster, P. N. (2005 a). Valproic acid alters chromatin structure by regulation of chromatin modulation proteins. *Cancer Research*, 65(9), 3815-3822.
- Marchion, D. C., Bicaku, E., Daud, A. I., Sullivan, D. M., & Munster, P. N. (2005 b). *In vivo* synergy between topoisomerase II and histone deacetylase inhibitors: predictive correlates. *Molecular cancer therapeutics*, 4(12), 1993-2000.
- Mariño-Ramírez, L., Kann, M. G., Shoemaker, B. A., Landsman, D. (2005). Histone structure and nucleosome stability. *Expert Rev Proteomics*, 2 (5), 719-729.
- Marks, P. A. (2010). Histone deacetylase inhibitors: a chemical genetics approach to understanding cellular functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1799(10), 717-725.
- Marks, P. A., Rifkind, R. A., Richon, V. M., Breslow, R., Miller, T., & Kelly, W. K. (2001). Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nature Reviews Cancer*, 1(3), 194-202.
- Marks, P. A., & Xu, W. S. (2009). Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. *Journal of cellular biochemistry*, 107(4), 600-608.
- Marple, T., Li, H., & Hasty, P. (2004). A genotoxic screen: rapid analysis of cellular dose-response to a wide range of agents that either damage DNA or alter genome maintenance pathways. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 554(1), 253-266.
- Martínez-López, W., Folle, G. A., Cassina, G., Méndez-Acuña, L., Di-Tomaso, M. V., Obe, G., & Palitti, F. (2004). Distribution of breakpoints induced by etoposide and X-rays along the CHO X chromosome. *Cytogenetic and Genome Research*, 104(1-4), 182-187.
- Martínez-López, W., Méndez-Acuña, L., Bervejillo, V., Valencia-Payan, J., & Moreno-Ortega, D. (2013). Chromatin Remodeling in Nucleotide Excision Repair in Mammalian Cells. *DNA Repair - New Research Directions*. Intech Open.

- McKenzie, R. L., Aucamp, P. J., Bais, A. F., Björn, L. O., Ilyas, M., & Madronich, S. (2011). Ozone depletion and climate change: impacts on UV radiation. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 10(2), 182-198.
- Méndez-Acuña, L., Palitti, F., Martínez-López, W. (2017). HDACi sensitization to etoposide treatment (*manuscrito en preparación*).
- Méndez-Acuña, L., Di Tomaso, M. V., Palitti, F., Martínez-López, W. (2010). Histone post-translational modifications in DNA damage response. *Cytogenetic and genome research*, 128(1-3), 28-36.
- Mersfelder, E. L., & Parthun, M. R. (2006). The tale beyond the tail: histone core domain modifications and the regulation of chromatin structure. *Nucleic Acids Research*, 34(9), 2653-2662.
- Miller, K. M., Tjeertes, J. V., Coates, J., Legube, G., Polo, S. E., Britton, S., & Jackson, S. P. (2010). Human HDAC1 and HDAC2 function in the DNA-damage response to promote DNA nonhomologous end-joining. *Nature structural & molecular biology*, 17(9), 1144-1151.
- Mimitou, E. P., & Symington, L. S. (2009). DNA end resection: many nucleases make light work. *DNA repair*, 8(9), 983-995.
- Minucci, S., & Pelicci, P. G. (2006). Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nature reviews. Cancer*, 6(1), 38.
- Mitchell, J. R., Hoeijmakers, J. H., & Niedernhofer, L. J. (2003). Divide and conquer: nucleotide excision repair battles cancer and ageing. *Current opinion in cell biology*, 15(2), 232-240.
- Mladenov, E., & Iliakis, G. (2011 a). Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 711(1), 61-72.
- Mladenov, E., & Iliakis, G. (2011 b). The pathways of double-strand break repair. *DNA Repair—On the Pathways to Fixing DNA Damage and Errors*. InTech, 143-168.
- Moore, J. D., Yazgan, O., Ataian, Y., & Krebs, J. E. (2007). Diverse roles for histone H2A modifications in DNA damage response pathways in yeast. *Genetics*, 176(1), 15-25.
- Moreno-Ortega, D. (2016). Influencia de la remodelación de la cromatina en la remoción del daño inducido por UVC en células deficientes en la reparación acoplada a la transcripción. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), Universidad de la República/Ministerio de Educación y Cultura, Uruguay.
- Munshi A., Kurland J. F., Nishikawa T., Tanaka T., Hobbs M. L., Tucker S. L., Ismail S., Stevens C., Meyn R. E. (2005). Histone deacetylase inhibitors radiosensitize human melanoma cells by suppressing DNA repair activity. *Clinical Cancer Research* 11 (13): 4912-4922.
- Musselman, C. A., Lalonde, M. E., Côté, J., & Kutateladze, T. G. (2012). Perceiving the epigenetic landscape through histone readers. *Nature structural & molecular biology*, 19(12), 1218-1227.
- Namdar, M., Perez, G., Ngo, L., & Marks, P. A. (2010). Selective inhibition of histone deacetylase 6 (HDAC6) induces DNA damage and sensitizes transformed cells to anticancer agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(46), 20003-20008.
- Ng, H. H., Feng, Q., Wang, H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Zhang, Y., & Struhl, K. (2002). Lysine methylation within the globular domain of histone H3 by Dot1 is important for telomeric silencing and Sir protein association. *Genes & Development*, 16(12), 1518-1527.

- Nitiss, J. L. (2009). Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 9(5), 338-350.
- Nitiss, J. L., & Beck, W. T. (1996). Antitopoisomerase drug action and resistance. *European Journal of Cancer*, 32(6), 958-966.
- Norval, M., Cullen, A. P., De Gruijl, F. R., Longstreth, J., Takizawa, Y., Lucas, R. M., Noonang, F. P., Van der Leun, J. C. (2007). The effects on human health from stratospheric ozone depletion and its interactions with climate change. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 6(3), 232-251.
- Nyberg, K. A., Michelson, R. J., Putnam, C. W., & Weinert, T. A. (2002). Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annual review of genetics*, 36(1), 617-656.
- Obe, G., Johannes, C., & Schulte-Frohlinde, D. (1992). DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death, chromosomal aberrations, mutations and oncogenic transformation. *Mutagenesis*, 7(1), 3-12.
- Olive, P. L., & Banánth, J. P. (1993). Induction and rejoining of radiation-induced DNA single-strand breaks: "tail moment" as a function of position in the cell cycle. *Mutation Research/DNA Repair*, 294(3), 275-283.
- Ozawa, A., Tanji, N., Kikugawa, T., Sasaki, T., Yanagihara, Y., Miura, N., & Yokoyama, M. (2010). Inhibition of bladder tumour growth by histone deacetylase inhibitor. *BJU international*, 105(8), 1181-1186.
- Özdağ, H., Teschendorff, A. E., Ahmed, A. A., Hyland, S. J., Blenkiron, C., Bobrow, L., ... & Collins, V. P. (2006). Differential expression of selected histone modifier genes in human solid cancers. *BMC genomics*, 7(1), 1.
- Palitti, F., Degrassi, F., De Salvia, R., Fiore, M., & Tanzarella, C. (1990). Inhibitors of DNA topoisomerases and chromosome aberrations. In *Chromosomal Aberrations* (pp. 50-60). Springer Berlin Heidelberg.
- Palitti, F., Mosesso, P., Dichiara, D., Schinoppi, A., Fiore, M., & Bassi, L. (1994). Use of antitopoisomerase drugs to study the mechanisms of induction of chromosomal damage. In *Chromosomal Alterations* (pp. 103-115). Springer Berlin Heidelberg.
- Pandita, T. K., & Richardson, C. (2009). Chromatin remodeling finds its place in the DNA double-strand break response. *Nucleic acids research*, 37(5), 1363-1377.
- Pang, X., He, G., Luo, C., Wang, Y., & Zhang, B. (2016). Knockdown of Rad9A enhanced DNA damage induced by trichostatin A in esophageal cancer cells. *Tumor Biology*, 37(1), 963-970.
- Perego, P., Zuco, V., Gatti, L., & Zunino, F. (2012). Sensitization of tumor cells by targeting histone deacetylases. *Biochemical pharmacology*, 83(8), 987-994.
- Peterson, C. L., & Côté, J. (2004). Cellular machineries for chromosomal DNA repair. *Genes & development*, 18(6), 602-616.
- Peterson, C. L., & Laniel, M. A. (2004). Histones and histone modifications. *Current Biology*, 14(14), R546-R551.
- Peterson C.L., Workman J.L. (2000). Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Current Opinion in Genetics & Development* 10: 187-192.
- Pfeiffer, P., Goedecke, W., & Obe, G. (2000). Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis*, 15(4), 289-302.

- Polo, S. E., & Almouzni, G. (2007). DNA damage leaves its mark on chromatin. *Cell Cycle*, 6(19), 2355-2359.
- Potten, C., & Wilson, J. (2004). *Apoptosis: the life and death of cells*. Cambridge University Press.
- Pouliot, J. J., Yao, K. C., Robertson, C. A., & Nash, H. A. (1999). Yeast gene for a Tyr-DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase I complexes. *Science*, 286(5439), 552-555.
- Powell, S. N., & Kachnic, L. A. (2008). Therapeutic exploitation of tumor cell defects in homologous recombination. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 8(4), 448-460.
- Prise, K. M. (1994). Use of radiation quality as a probe for DNA lesion complexity. *International Journal of Radiation Biology*, 65(1), 43-48.
- Purrucker, J. C., & Mahlknecht, U. (2010). Targeting the epigenome: effects of epigenetic treatment strategies on genomic stability in healthy human cells. *Clinical epigenetics*, 1(1), 45.
- Ramanathan, B., & Smerdon, M. J. (1986). Changes in nuclear protein acetylation in uv-damaged human cells. *Carcinogenesis*, 7(7), 1087-1094.
- Ramus, S., Harrington, P., Pye, C., DiCioccio, R., Cox, M., Garlinghouse-Jones, K., Oakley-Girvan, I., Jacobs, I., Hardy, R., Whittemore, A., Ponder, B., Piver, M., Pharoah, P., Gayther, S. (2007). Contribution of BRCA1 and BRCA2 mutations to inherited ovarian cancer. *Hum Mutat*, 28 (12), 1207-1215.
- Rangasamy, D., Berven, L., Ridgway, P., & Tremethick, D. J. (2003). Pericentric heterochromatin becomes enriched with H2A. Z during early mammalian development. *The EMBO journal*, 22(7), 1599-1607.
- Roch-Lefèvre, S., Mandina, T., Voisin, P., Gaëtan, G., Mesa, J. E. G., Valente, M., Bonnesoeur, P., García, O., Voisin, P. & Roy, L. (2010). Quantification of  $\gamma$ -H2AX foci in human lymphocytes: A method for biological dosimetry after ionizing radiation exposure. *Radiation Research*, 174(2), 185-194.
- Rogakou, E. P., Boon, C., Redon, C., & Bonner, W. M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *The Journal of Cell Biology*, 146(5), 905-916.
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., & Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *Journal of Biological Chemistry*, 273(10), 5858-5868.
- Saha, A., Wittmeyer, J., & Cairns, B. R. (2006). Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7(6), 437-447.
- Schuch, A. P., Garcia, C. C. M., Makita, K., & Menck, C. F. M. (2013). DNA damage as a biological sensor for environmental sunlight. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 12(8), 1259-1272.
- Shahbazian, M. D., & Grunstein, M. (2007). Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu. Rev. Biochem.*, 76, 75-100.
- Sharma, G. G., So, S., Gupta, A., Kumar, R., Cayrou, C., Avvakumov, N., Bhadra, U., Pandita, R.K., Porteus, M., Chen, D.J., Cote, J., Pandita, T.K. (2010). MOF and histone H4 acetylation at lysine 16 are critical for DNA damage response and double-strand break repair. *Molecular and Cellular Biology*, 30(14), 3582-3595.

- Shen, Z., & Nickoloff, J. A. (2007). Mammalian homologous recombination repair and cancer intervention. *DNA repair, genetic instability, and cancer*. World Scientific Publishing Co., Singapore, 119-156.
- Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J. M., Pazin, M. J., Davie, J. R., & Peterson, C. L. (2006). Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science*, 311(5762), 844-847.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2016). Cancer statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians*, 66(1), 7-30.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, 175(1), 184-191.
- Slingerland M., Guchelaar H.-J., Gelderblom H. (2014). Histone deacetylase inhibitors: an overview of the clinical studies in solid tumors. *Anti-Cancer Drugs* 25: 140-149.
- Smith, S., Fox, J., Mejia, M., Ruangpradit, W., Saberi, A., Kim, S., Choi, Y., Oh, S., Wang, Y., Choi, K., Li, L., Hendrickson, E. A., Takeda, S., Muller, M., Myung, K. (2014). Histone deacetylase inhibitors selectively target homology dependent DNA repair defective cells and elevate non-homologous endjoining activity. *PloS one*, 9(1), e87203.
- Smith, K. T., & Workman, J. L. (2009). Histone deacetylase inhibitors: anticancer compounds. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(1), 21-25.
- Sonoda, E., Hohegger, H., Saberi, A., Taniguchi, Y., & Takeda, S. (2006). Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. *DNA repair*, 5(9), 1021-1029.
- Soria, G., Polo, S. E., & Almouzni, G. (2012). Prime, repair, restore: the active role of chromatin in the DNA damage response. *Molecular cell*, 46(6), 722-734.
- Speit, G., & Hartmann, A. (1999). The comet assay (single-cell gel test). *DNA Repair Protocols: Eukaryotic Systems*, 203-212.
- Steel R., Torrie J. (1985). *Bioestadística: Principios y Procedimientos*. 2da. edición ed. Bogotá: Ed. McGraw-Hill.
- Stenzl, A., Cowan, N. C., De Santis, M., Kuczyk, M. A., Merseburger, A. S., Ribal, M. J., Sherif, A. Witjes, J. A. (2011). Treatment of muscle-invasive and metastatic bladder cancer: update of the EAU guidelines. *European urology*, 59(6), 1009-1018.
- Stiborová, M., Eckschlager, T., Poljaková, J., Hrabeta, J., Adam, V., Kizek, R. y Fri, E. (2012). The synergistic effects of DNA-targeted chemotherapeutics and histone deacetylase inhibitors as therapeutic strategies for cancer treatment. *Current Medicinal Chemistry* 19, 4218-4238.
- Stiff, T., O'Driscoll, M., Rief, N., Iwabuchi, K., Lobrich, M., Jeggo, P. A. (2004). ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res*, 64, 2390-2396.
- Stiborova, M., Eckschlager, T., Poljakova, J., Hrabeta, J., Adam, V., Kizek, R., & Frei, E. (2012). The synergistic effects of DNA-targeted chemotherapeutics and histone deacetylase inhibitors as therapeutic strategies for cancer treatment. *Current medicinal chemistry*, 19(25), 4218-4238.
- Strahl, B. D., Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.

- Stucki, M., Clapperton, J. A., Mohammad, D., Yaffe, M. B., Smerdon, S. J., & Jackson, S. P. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell*, 123(7), 1213-1226.
- Stucki, M., & Jackson, S. P. (2004). MDC1/NFBD1: a key regulator of the DNA damage response in higher eukaryotes. *DNA repair*, 3(8), 953-957.
- Sun, J. M., Chen, H. Y., & Davie, J. R. (2001). Effect of estradiol on histone acetylation dynamics in human breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276(52), 49435-49442.
- Tjeertes, J. V., Miller, K. M., & Jackson, S. P. (2009). Screen for DNA-damage-responsive histone modifications identifies H3K9Ac and H3K56Ac in human cells. *The EMBO journal*, 28(13), 1878-1889.
- Thiriet, C., Hayes, J. (2005). Chromatin in need of a fix: phosphorylation of H2AX connects chromatin to DNA repair. *Mol Cell*, 18 (6), 617-622.
- Thompson, L. H., Fong, S., & Brookman, K. (1980). Validation of conditions for efficient detection of HPRT and APRT mutations in suspension-cultured Chinese hamster ovary cells. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 74(1), 21-36.
- Thompson, L. H. (2012). Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: the molecular choreography. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 751(2), 158-246.
- Tice, R. R., Andrews, P. W., & Singh, N. P. (1990). The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. In *DNA damage and repair in human tissues* (pp. 291-301). Springer US.
- Tóth, K. F., Knoch, T. A., Wachsmuth, M., Frank-Stöhr, M., Stöhr, M., Bacher, C. P., Müller, G., Rippe, K. (2004). Trichostatin A-induced histone acetylation causes decondensation of interphase chromatin. *Journal of cell science*, 117(18), 4277-4287.
- Toyoda, E., Kagaya, S., Cowell, I. G., Kurosawa, A., Kamoshita, K., Nishikawa, Iizumi, S., Koyama, H., Austin, C. A., Adachi, N. (2008). NK314, a topoisomerase II inhibitor that specifically targets the  $\alpha$  isoform. *Journal of Biological Chemistry*, 283(35), 23711-23720.
- Treszezamsky, A. D., Kachnic, L. A., Feng, Z., Zhang, J., Tokadjian, C., & Powell, S. N. (2007). BRCA1-and BRCA2-deficient cells are sensitive to etoposide-induced DNA double-strand breaks via topoisomerase II. *Cancer research*, 67(15), 7078-7081.
- Tse C., Sera T., Wolffe A. P., Hansen J. C. (1998). Disruption of higher order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol. Cell. Biol.* 18: 4629-4638.
- Tsukiyama, T. (2002). The in vivo functions of ATP-dependent chromatin-remodelling factors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(6), 422-429.
- Turner, B. (1998). Histone acetylation as an epigenetic determinant of long-term transcriptional competence. *Cell Mol Life Sci*, 54, 21-31.
- Turner, B. M. (2005). Reading signals on the nucleosome with a new nomenclature for modified histones. *Nature Structural & Molecular Biology*, 12(2), 110-112.
- Utley, R. T., Lacoste, N., Jobin-Robitaille, O., Allard, S., Côté, J. (2005). Regulation of NuA4 histone acetyltransferase activity in transcription and DNA repair by phosphorylation of histone H4. *Mol Cell Biol*, 25 (18), 8179-8190.

- Valencia Payán J. (2016). Rol de la remodelación nucleosómica en células símil Síndrome de Cockayne. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), Universidad de la República/Ministerio de Educación y Cultura, Uruguay.
- Valente, M., Voisin, P., Laloi, P., Roy, L., & Roch-Lefèvre, S. (2011). Automated gamma-H2AX focus scoring method for human lymphocytes after ionizing radiation exposure. *Radiation Measurements*, 46(9), 871-876.
- Van Attikum H, Gasser SM. (2009). Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response. *Trends Cell Biol*; 19(5):207–17.
- Van Gent, D. C., & Van Der Burg, M. (2007). Non-homologous end-joining, a sticky affair. *Oncogene*, 26(56), 7731-7740.
- Venkatesh, S., & Workman, J. L. (2015). Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. *Nature reviews Molecular cell biology*, 16(3), 178-189.
- Verdin, E., & Ott, M. (2015). 50 years of protein acetylation: from gene regulation to epigenetics, metabolism and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(4), 258-264.
- Volker, M., Mone, M., Karmakar, P., van Hoffen, A., Schul, W., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J., van Driel, R., van Zeeland, A., Mullenders, L. (2001). Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Mol Cell*, 8, 213-224.
- Walker, J. V., & Nitiss, J. L. (2002). DNA topoisomerase II as a target for cancer chemotherapy. *Cancer investigation*, 20(4), 570-589.
- Wang, J. C. (1985). DNA topoisomerases. *Annual review of biochemistry*, 54(1), 665-697.
- Wang, D., Jing, Y., Ouyang, S., Liu, B., Zhu, T., Niu, H., & Tian, Y. (2013). Inhibitory effect of valproic acid on bladder cancer in combination with chemotherapeutic agents in vitro and in vivo. *Oncology letters*, 6(5), 1492-1498.
- Wang X., He C., Moore S. C., Ausio J. (2001). Effects of histone acetylation on the solubility and folding of the chromatin fiber. *J. Biol. Chem.* 276: 12764-12768.
- Wang, H. P., Long, X. H., Sun, Z. Z., Rigaud, O., Xu, Q. Z., Huang, Y. C., ... & Zhou, P. K. (2006). Identification of differentially transcribed genes in human lymphoblastoid cells irradiated with 0.5 Gy of  $\gamma$ -ray and the involvement of low dose radiation inducible CHD6 gene in cell proliferation and radiosensitivity. *International journal of radiation biology*, 82(3), 181-190.
- Wang, D., Wang, Z., Tian, B., Li, X., Li, S., & Tian, Y. (2008). Two hour exposure to sodium butyrate sensitizes bladder cancer to anticancer drugs. *International journal of urology*, 15(5), 435-441.
- Ward, I. M., Chen, J. (2001). Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem*, 276, 47759-47762.
- Watanabe, T. (2010). Investigational histone deacetylase inhibitors for non-Hodgkin lymphomas. *Expert opinion on investigational drugs*, 19(9), 1113-1127.
- West, A. G., & van Attikum, H. (2006). Chromatin at the crossroads. Meeting on Signalling to Chromatin Epigenetics. *EMBO reports*, 7(12), 1206-1210.

- Wilstermann, A. M., Bender, R. P., Godfrey, M., Choi, S., Anklin, C., Berkowitz, D. B., Osheroff, N., & Graves, D. E. (2007). Topoisomerase II-drug interaction domains: identification of substituents on etoposide that interact with the enzyme. *Biochemistry*, 46(28), 8217-8225.
- Witt, O., Deubzer, H. E., Milde, T., & Oehme, I. (2009). HDAC family: What are the cancer relevant targets?. *Cancer letters*, 277(1), 8-21.
- Wolffe, A. P. (1998). *Chromatin. Structure and Function (Third Edition ed.)*: Academic Press.
- Wood, R. D., Mitchell, M., Sgouros, J., & Lindahl, T. (2001). Human DNA repair genes. *Science*, 291(5507), 1284-1289.
- Woollons, A., Clingen, P. H., Price, M. L., Farlett, C., & Green, M. H. L. (1997). Induction of mutagenic DNA damage in human fibroblasts after exposure to artificial tanning lamps. *British Journal of Dermatology*, 137(5), 687-692.
- Wu, C. C., Li, T. K., Farh, L., Lin, L. Y., Lin, T. S., Yu, Y. J., Yen, T. J., Chiang, C. W., Chan, N. L. (2011). Structural basis of type II topoisomerase inhibition by the anticancer drug etoposide. *Science*, 333(6041), 459-462.
- Wu, X. R. (2005). Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. *Nature Reviews Cancer*, 5(9), 713-725.
- Wurtele H., Verreault A. (2006). Histone post-translational modifications and the response to DNA double-strand breaks. *Current Opinion in Cell Biology* 18: 137-144.
- Xie, A., Odate, S., Chandramouly, G., & Scully, R. A. (2010). H2AX post-translational modifications in the ionizing radiation response and homologous recombination. *Cell Cycle*, 9(17), 3602-3610.
- Xu, B., Kim, S. T., & Kastan, M. B. (2001). Involvement of Brca1 in S-phase and G2-phase checkpoints after ionizing irradiation. *Molecular and cellular biology*, 21(10), 3445-3450.
- Xu, W. S., Parmigiani, R. B., & Marks, P. A. (2007). Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene*, 26(37), 5541-5552.
- Yaneva, M., Li, H., Marple, T., & Hasty, P. (2005). Non-homologous end joining, but not homologous recombination, enables survival for cells exposed to a histone deacetylase inhibitor. *Nucleic acids research*, 33(16), 5320-5330.
- Yagura, T., Makita, K., Yamamoto, H., Menck, C. F., & Schuch, A. P. (2011). Biological sensors for solar ultraviolet radiation. *Sensors*, 11(4), 4277-4294.
- Yang, X. J., & Seto, E. (2008). The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 9(3), 206-218.
- Zhang, Y. (2003). Transcriptional regulation by histone ubiquitination and deubiquitination. *Genes & development*, 17(22), 2733-2740.
- Zhang, A., Lyu, Y. L., Lin, C. P., Zhou, N., Azarova, A. M., Wood, L. M., & Liu, L. F. (2006). A protease pathway for the repair of topoisomerase II-DNA covalent complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 281(47), 35997-36003.
- Zhang, K., Dent, S. Y. (2005). Histone modifying enzymes and cancer: going beyond histones. *J Cell Biochem*, 96, 1137-1148.
- Zheng, C., & Hayes, J. J. (2003). Structures and interactions of the core histone tail domains. *Biopolymers*, 68(4), 539-546.

Zhu, Q., Wani, G., Arab, H. H., El-Mahdy, M. A., Ray, A., & Wani, A. A. (2009). Chromatin restoration following nucleotide excision repair involves the incorporation of ubiquitinated H2A at damaged genomic sites. *DNA repair*, 8(2), 262-273.

Zwelling, L. A., Michaels, S., Erickson, L. C., Ungerleider, R. S., Nichols, M., & Kohn, K. W. (1981). Protein-associated deoxyribonucleic acid strand breaks in L1210 cells treated with the deoxyribonucleic acid intercalating agents 4'-(9-acridinylamino) methanesulfon-m-anisidide and adriamycin. *Biochemistry*, 20(23), 6553-6563.