



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

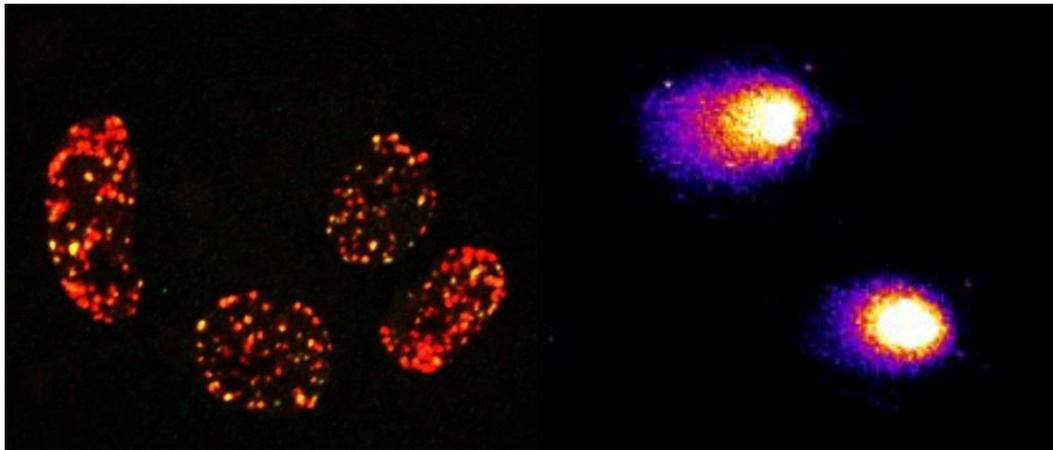


FACULTAD DE
CIENCIAS

Tesina de grado - Licenciatura en Bioquímica

Comparación del nivel de daño genético inducido por bleomicina, en presencia o ausencia de un pool de inhibidores de enzimas de reparación en células VERO

Valentina Perini



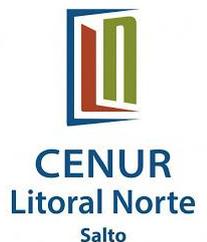
Tutora: Dra. Laura Lafon-Hughes

Co-tutora: Dra. Deborah J. Keszenman

Departamento de genética - IIBCE

Montevideo, Uruguay

2021



DEDICATORIA

Dedico esta tesis a las mujeres de mi árbol genealógico. En especial a mis abuelas. Espero que abuela Chiche pueda estar brindado muy alegremente por esto! También quería dedicar a mis abuelos, de las personas que adquirí un montón de valores... luchadores tanto en la salud como en la enfermedad. Al abuelo Edgardo por enseñarme lo que es la resiliencia, con su frase: **“Un tropezón no es una caída sino que es un paso adelante que uno da”**. A abuelo Carlos, por enseñarme a pelear por lo que me importa, aunque el pronóstico sea tormentoso.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi tutora Laura, por el apoyo brindado, por tenerme paciencia durante toda mi trayectoria, y sobre todas las cosas por la “formación integral”. Laura supo ser muchas veces madre, otras veces amiga y también una maestra, de la cual aprendí un montón de cosas. A mi co-tutora Deborah, por guiarme y por el apoyo recibido. Por su gran energía y motivación a la hora de transmitir conocimientos. “Mis desorientadoras” han aportado un montón a mi formación académica! Gracias por sus valiosos aportes e interesantes discusiones de “daño y reparación del ADN”. Sinceramente, les debo un montón!!

A mis compañeros de laboratorio por todo lo que hemos compartido día a día. En especial, quiero agradecer a Cami, Michelle y Pablo, por su buena onda, por los momentos de risas y por “bufferear” esos momentos ácidos durante esta trayectoria.

A Pablo también quiero agradecer por ayudarme en mis primeros pasos técnicos y también por enseñarme a analizar los famosos foci, muy apreciados por él.

A Majo y Adriana del CENUR, por ser mis compañeras de aprendizaje de ensayo cometa y por compartir aquella semana de experimentos.

A mis compañeros y compañeros... amigos y amigas de facultad por todo este tiempo compartido, por las idas y vueltas de apuntes, por la cantidad de mate y café consumido, por las horas de esfuerzo compartidas, por los consejos y por el aguante. Por su buena energía y compañerismo! En especial quería mencionar a Cami, Euge, Flor Camps, Flo García, Anto, Caro y Cristian. También al grupito de biólogos de la Royal Sociality.

A mis amigos y amigas de siempre, muchos de ellos los conozco desde el jardín, donde aún ni sospechaba de que me gustara la ciencia, hemos compartido un montón de buenos momentos juntos, llantos y risas, gracias por bancarme siempre! Yess, Vivi, Mari, Luciano, Ruella, Roquero, Guigou, Juanma, Nico, Riki, Rodriguez, Roman y Fabián.

A mi madrina y tía Ana, a mi padrino y tío Darwin, a mis primas Vito y Flo. A Tio Nacho, Tía Andrea, a mis primos Lauti y Eze. A mi tía Hilda por ser mi amiga y consejera, en todo el transcurso de la tesis y a tío Diego. A todos ellos gracias!

A mis padres, a Papá por brindarme el sustento económico para poder estudiar en Montevideo, por el apoyo, por mejorar la relación conmigo y abrirte más, por los consejos y por darme la oportunidad de estudiar lo que me gusta. A mi Mamá, por su sensibilidad, por el apoyo emocional y por hacerme reír en los momentos difíciles.

A mis más preciadas personas en el mundo mundial a mis abuelas: Abue Gladys por siempre alegrarse más que yo cuando salvaba un examen, por el apoyo, por preocuparse por mí, por el amor y cariño que me brinda. Abue Chiche, por prender una velita para cada uno de mis exámenes, por su forma de ser y transmitir alegría, por todo lo compartido juntas y siempre estar de mi lado. Ella más que nadie quería presenciar este momento... y yo más que nadie... también quería que formara parte de esta alegría. Espero que estés presente de otra forma.

¡Gracias a todos los que me aportaron mucha energía positiva y enseñanzas en esta etapa tan linda!

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	7
ABREVIATURAS	9
RESUMEN	14
1 INTRODUCCIÓN	16
1.1 Daño genético y la respuesta celular al daño	16
1.1.1 Reparación de las roturas de doble cadena.....	19
1.1.2 Letalidad sintética.....	22
1.2 Bleomicina	23
1.2.1 Mecanismos de generación de daño en el ADN	23
1.2.2 Respuesta celular al daño inducido por BLEO	25
1.3 Poli-ADP-ribosilación	26
1.3.1 PARP-1.....	27
1.3.2 Olaparib y letalidad sintética	29
1.4 Antecedentes específicos	31
2 HIPÓTESIS.....	32
3 OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivo general	33
3.2 Objetivos específicos	33
4 MATERIALES Y MÉTODOS	34
4.1 Cultivo Celular.....	34
4.2 Tratamientos con BLEO e inhibidores de enzimas de reparación del ADN.....	34
4.3 Ensayo de viabilidad celular (MTT)	35
4.4 Ensayo cometa	36
4.4.1 Clasificación visual según morfología del cometa	37
4.4.2 Procesamiento mediante el plug-in <i>OpenComet</i>	37
4.5 Evaluación de focos γ H2AX y 53BP1	40
4.5.1 Inmuncitofluorescencia (ICF)	40
4.5.2 Microscopía confocal	41
4.5.3 Cuantificación del porcentaje de células con marcación γ H2AX pan-nuclear, focos γ H2AX y 53BP1	41
4.5.4 Cuantificación del número de focos γ H2AX y 53BP1	42
4.6 Análisis estadístico.....	42
5 RESULTADOS.....	43

5.1	Puesta a punto del ensayo cometa y evaluación del daño inicial en células VERO.....	43
5.1.1	Ajuste del ensayo cometa con células VERO.....	43
5.1.2	Evaluación del plug-in OpenComet para determinar el nivel de daño genético inducido en células VERO	44
5.2	OLA no afectó la viabilidad celular <i>per se</i> , ni potenció el efecto de BLEO incluso en presencia de un pool de inhibidores de enzimas de reparación de ADN	52
5.3	OLA no disminuyó el índice de daño inicial inducido por BLEO, incluso en presencia de inhibidores de ATM, DNAPK y LigIV	54
5.4	OLA no disminuyó la inducción de la fosforilación de H2AX por BLEO, incluso en presencia de inhibidores de ATM, DNAPK y LigIV	56
5.5	Resultados preliminares sugerirían un aumento de focos 53BP1 al adicionar OLA en presencia de 3i	59
6	DISCUSIÓN	62
7	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes agentes inductores de daño, tipo de daño inducido y principales sistemas reparación implicados en la respuesta a cada tipo de daño.....	17
Figura 2. Esquema genérico de las respuestas celulares frente al daño en el ADN.....	18
Figura 3. Imagen esquemática de la respuesta celular frente a las roturas de doble cadena (DSBs)	19
Figura 2. Vías de reparación de DSB: Recombinación homóloga (HR) y vías de unión de extremos no homólogos (NHEJ): vía canónica (C-NHEJ) y vía alternativa (A-NHEJ)	21
Figura 3. Representación esquemática de letalidad sintética.	22
Figura 4. Formación de bleomicina activada e inducción de daño sobre el ADN..	24
Figura 5. Esquema de la respuesta intracelular al daño inducido por bleomicina activada.....	26
Figura 6. Esquema de algunas de las funciones esenciales que cumple PARP-1 y su estricta regulación.....	29
Figura 7. Representación esquemática del grado de daño.	37
Figura 8. Imagen representativa del reconocimiento de la estructura del cometa.....	39
Figura 9. Comparación entre análisis manual del grado de daño y lo obtenido mediante software <i>OpenComet</i> en imágenes a 20X de células VERO sin tratar (control)	45
Figura 10. Comparación entre análisis manual del grado de daño y lo obtenido mediante software <i>OpenComet</i> en imágenes a 20X de células VERO tratadas con BLEO.	47
Figura 11. Contraejemplos de imágenes obtenidas mediante análisis manual del grado de daño y lo obtenido mediante software <i>OpenComet</i> en imágenes a 20X de células VERO.....	48
Figura 12. Comparación entre análisis manual del grado de daño y lo obtenido mediante software <i>OpenComet</i> en imágenes a 40X de células VERO condiciones: CONTROL y BLEO	50
Figura 13. La longitud del cometa fue el parámetro que mejor se ajustó a lo esperable en comparación al índice de daño (DDI) obtenido mediante la clasificación visual	51
Figura 14. OLA no afectó la viabilidad celular en condiciones basales ni potenció el efecto de BLEO en las células VERO, incluso en presencia de inhibidores de las vías de reparación de DSB.	53
Figura 15. Los inhibidores de enzimas de reparación (OLA y 3i) no impidieron la inducción de daño inicial por BLEO, de acuerdo al ensayo cometa	55

Figura 16. Se evaluó el daño inicial del ADN inducido por BLEO en presencia o ausencia del co-tratamiento OLA, 3i y 3i+OLA mediante la inmunomarcación de γ H2AX y la activación de la vía C-NHEJ mediante la inmunomarcación de 53BP1 56

Figura 17. Los inhibidores de enzimas de reparación (OLA y 3i) no impidieron la inducción de daño inicial por BLEO, de acuerdo a la evaluación de foci γ H2AX 58

Figura 18. Análisis preliminares evidencian una tendencia de que al adicionar OLA aumenta el reclutamiento de 53BP1, enzima característica de C-NHEJ 60

Figura 19. Ante la generación de una rotura de doble cadena se esquematiza las posibles respuestas según PARP-1 y el efecto de Olaparib (OLA) en cada situación 64

Figura 20. Posibles causas de la resistencia al tratamiento con bleomicina (BLEO) e inhibidores de: OLA (A-NHEJ), ATM (HR), DNA-PK y LigIV (C-NHEJ) 65

Figura 21. Frente al daño inducido por BLEO la célula puede optar por reparar por HR (opera en S/G2), por C-NHEJ o A-NHEJ (operan en todo el ciclo celular) 68

ABREVIATURAS

	Inglés	Español
γH2AX	Histone H2AX phosphorylated on Ser 139	Histona H2AX fosforilada en Ser 139
3i	Inhibition of DNA-PK, LigIV and ATM	Inhibidor de DNA-pk, LigIV y ATM
53BP1	p53 Binding Protein 1	Proteína de unión a p53
AIF	Apoptosis-Inducing Factor	Factor inductor de apoptosis
A-NHEJ	Alternative Non-Homologous End Joining	Sistema de reparación por unión de extremos no homólogos, vía Alternativa
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated	-
ATR	Ataxia Telangiectasia Related	-
BER	Base Excision Repair	Sistema de reparación por escisión de bases
BLEO	Bleomycin	Bleomicina
BRCA1/2	Breast Cancer gene 1 or 2	Cáncer de mama 1 o 2
BSA	Bovine Serum Albumin	Seroalbúmina bovina
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A gene	Gen inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 2A
CHK1/2	Checkpoint kinase 1 o 2	Quinasa de punto de control 1 o 2
C-NHEJ	Canonic-Non-Homologous End Joining	Sistema de reparación por unión de extremos no homólogos, vía Canónica
Cy3	Cyanine-3. Fluorescent compound	Cianina 3. Componente fluorescente
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole. Fluorescent DNA marker	4',6-diamidino-2-fenilindol. Sonda fluorescente para ADN
DDI	DNA damage index	Índice de daño

DDR	DNA damage response	Respuesta al daño en el ADN
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Dimetilsulfóxido
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase	Proteína quinasa ADN-dependiente
DSB	DNA double-strand break	Rotura de cadena doble del ADN
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Ácido etilendiaminotetraacético
FBS	Fetal bovine serum	Suero fetal bovino
FITC	Isotiocianato de fluoresceína o fluoresceína-5-isotiocianato	Fluorescein isothiocyanate
H10	Clone mouse monoclonal anti-PAR antibody (Tulip #1020)	Clon del anticuerpo monoclonal anti- PAR
H2AX	Variant histone H2A	Variante histona H2A
HeLa	Henrietta Lacks Human epithelial carcinoma cell line	Línea celular de cáncer cérvico-uterino, derivado de Henrietta Lacks
HR	Homologous recombination	Recombinación homóloga
iATM	Ataxia Telangiectasia Mutated Inhibitor (KU55933)	Inhibidor de Ataxia Telangiectasia Mutated
iATRs	Ataxia Telangiectasia Related inhibitors	Inhibidores de Ataxia Telangiectasia Related
ICF	Inmunocytofluorescence	Inmunocitofluorescencia
iDNA-PK	DNA-dependent protein kinase inhibitor	Inhibidor de proteína quinasa ADN- dependiente
iLigIV	DNA ligase IV inhibitor	Inhibidor de ADN ligasa IV
iPARP	Poly (ADP-ribose) Polymerases inhibitor	Inhibidor de Poli ADP ribosa polimerasa
iPARPs	PARP inhibitors	Inhibidores de PARP
iWEE1	G2 checkpoint kinase inhibitor	Inhibidor de quinasa de punto de control G2

Ku70/80	Heterodimer of two polypeptides, Ku70 (XRCC6) and Ku80 (XRCC5)	Heterodimero compuesto por dos polipeptidos Ku70 (XRCC6) y Ku80 (XRCC5)
Lig III	ADN ligase III	ADN ligasa III
LigIV	ADN ligase IV	ADN ligase IV
MEM	Minimum Essential Medium	Medio mínimo esencial
MMR	Mismatch Repair	-
MMS	Methylmethanosulfonate	Metil Metanosulfonato
MRE11	Complex meiotic recombination 11	Complejo implicado en la recombinación meiotica 11
MRN	Protein complex consisting of Mre11, Rad50 and Nbs1	Complejo proteico integrado por: MRE11, Rad50 y NBS1
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide	Bromuro de 3-(3,4 -dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio
NAD+	Nicotinamide adenine dinucleotide	Nicotinamida adenina dinucleótido
Nam	Nicotinamide	Nicotinamida
NaOH	Sodium hydroxide	Hidróxido de sodio
NBS1	Nijmegen breakage syndrome 1	-
NER	Nucleotide excision repair	Sistema de reparación por escisión de nucleótidos
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NHEJ	Non-homologous end joining	Sistema de reparación por unión de extremos no homólogos
OARilación	-	Oligo-ADP-ribosilación

OLA	Olaparib (PARP-1/-2/-3 inhibitor). Lynparza, AZD-2281	Olaparib (inhibidor de PARP-1/-2/-3)
p53 o TP53	Tumor supressor protein	Proteína supresora de tumores
PAR	Poly-ADP-Ribose	Poli-ADP-Ribosa
PARG	Poly (ADP-Ribose) Glycohydrolase	Poli -ADP-Ribosa-Glicohidrolasa
PARilación	Poly(ADP-ribosylation)	Poli-ADP-Ribosilación
PARP	Poly (ADP-Ribosyl) Polymerase	Poli -ADP-Ribosa Polimerasa
PBS	Phosphate-Buffered Saline	Buffer fosfato salino
PBSf	-	Buffer fosfato salino filtrado
PBSf-T	-	Buffer fosfato salino filtrado-Tween
PFA	Paraformaldehyde	Paraformaldehído
P-gp	P-glycoprotein	Glucoproteína-P
PMC	-	Sensibilidad del fotomultiplicador
PolB	DNA polymerase beta	ADN polimerasa beta
RB1	Retinoblastoma-associated protein	Proteína del retinoblastoma
RER	Ribonucleotide excision repair	-
RI	-	Radiación ionizante
RIF1	Replication Timing Regulatory Factor 1	-
RNS	-	Especies reactivas del nitrógeno
ROS	-	Especies reactivas del oxígeno
SCGE	Single cell gel electrophoresis	Electroforesis en gel de células individuales
SSB	Single-Strand Break	Rotura de simple cadena
TMZ	Temozolomide	Temozolomida
UV	Ultraviolet radiation	Radiación ultravioleta
UV-C	Ultraviolet C radiation	Radiación ultravioleta de tipo C (256

		nm)
VERO	African green monkey kidney	Células epiteliales del riñón de un mono verde africano
VRK1	Vaccinia-related Kinase 1	-
WEE1	G2 Checkpoint Kinase	Quinasa de punto de control G2
XRCC1	X-ray repair cross-complementing protein 1	-
α	-	Grado de daño

RESUMEN

Las roturas de cadena doble del ADN (DSB del inglés *DNA double-strand break*) pueden conducir a muerte celular o inestabilidad genómica y transformación maligna. Las DSBs inducen la fosforilación de la variante de histona H2AX en dominios de cromatina flanqueantes, formando focos γ H2AX que son inmunodetectables. Dicha fosforilación, crítica para el reclutamiento de otras proteínas para reparar la rotura, suele ser catalizada por ATM, DNA-PK o ATR (si ocurre en horquillas de replicación), pero también puede depender de VRK1, una quinasa nucleosomal menos estudiada. Las DSBs se pueden reparar mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ) canónica (C-NHEJ) o alternativa (A-NHEJ) durante todo el ciclo celular, o por recombinación homóloga (HR) en S/G2. En C-NHEJ están implicadas DNA-PK, 53BP1 y Ligasa IV (LigIV). En cambio, A-NHEJ es dependiente de poli-ADP-ribosil polimerasa-1 (PARP-1), que cataliza la síntesis de un polímero de ADP-ribosas denominado poli-ADP-ribosa (PAR).

El inhibidor de PARP Olaparib (OLA) muestra letalidad sintética con proteínas mutadas de HR (BRCA-1/2) y C-NHEJ (LigIV). Sin embargo, los límites de la letalidad sintética no están claros. Algunos pacientes que presentan la mutación de BRCA no responden al tratamiento con OLA, mientras otros sin alteración conocida en HR o C-NHEJ sí responden. Antecedentes previos mostraron que, en células VERO, OLA no potenció la pérdida de viabilidad celular por bleomicina, incluso en concomitancia con un pool de inhibidores (3i) de DNA-PK (KU-0060648), LigIV (SCR7-pirazina) y ATM (KU55933).

En la presente tesina, nos propusimos testar dos de las posibles hipótesis planteadas dados dichos antecedentes: (I) Los inhibidores podrían impedir la generación de daño inicial por interferencia con BLEO. (II) Al inhibir simultáneamente C-NHEJ (iDNA-PK, iLigIV), HR (iATM) y A-NHEJ (OLA, iPARP), la célula repararía las DSBs inducidas por BLEO por una vía independiente de éstas.

Se reprodujeron y verificaron los los resultados previos de viabilidad celular en respuesta a BLEO, OLA y 3i mediante MTT, realizando más experimentos y aplicando ANOVA. Para estudiar el daño de ADN se puso a punto la técnica del ensayo cometa. Dadas las inconsistencias en los resultados obtenidos en la cuantificación mediante el plug-in del ImageJ *OpenComet*, se realizó la cuantificación manual, expresando el daño inicial inducido por BLEO en presencia o ausencia de 3i y OLA como índice de daño (DDI). Asimismo, mediante inmunocitofluorescencia (ICF) y microscopía confocal se evaluó el porcentaje de células con focos γ H2AX o con marcación pan-nuclear y el número de focos γ H2AX. Por último, se comenzó a estudiar (por ICF) si los inhibidores afectan el reclutamiento de 53BP1.

La combinación de OLA con BLEO no afectó significativamente la viabilidad celular, la inducción de daño genético, los focos γ H2AX ni los focos 53BP1, sugiriendo que las células repararon preferentemente de manera PARP independiente, por ejemplo por C-NHEJ. En consonancia con esto, los datos preliminares indicaron un aumento de las células con focos 53BP1 y del número de focos por célula al tratar con BLEO.

Al inhibir DNA-PK y ATM, si bien las tendencias indicaron una disminución de los focos γ H2AX, se observaron focos remanentes sugiriendo la implicación de otras quinasas. Datos preliminares muestran que OLA aumentó el número de focos 53BP1 por célula al combinarlo con BLEO (en ausencia o presencia de DMSO) y también al tener inhibidas simultáneamente ATM, DNA-PK y LigIV. Si esta tendencia se confirmara, sugeriría que al tener inhibidas las tres vías, se acumuló 53BP1 reclutado como ocurriría al inicio de C-NHEJ. Podría interpretarse que las células habrían procurado activar A-NHEJ, pero al inhibir con OLA A-NHEJ, volvieron a intentar utilizar C-NHEJ y por este motivo, los focos se acumularon en los sitios de inducción del daño. Asimismo, nuestros resultados indicaron la presencia de una subpoblación de VERO resistente a BLEO, BLEO + OLA y BLEO + OLA + iATM + iDNA-PK + iLigIV SCR7. Se discuten los mecanismos de resistencia a OLA.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Daño genético y la respuesta celular al daño

El ADN puede sufrir daño por agentes exógenos, donde podemos encontrar a las radiaciones ionizantes (RI), radiación ultravioleta (UV), agentes alquilantes, drogas quimioterapéuticas, agentes radiomiméticos, entre otros y también por procesos y agentes endógenos (Ciccía & Elledge, 2010; Keszenman et al., 2015). Por ejemplo, durante la replicación del ADN puede ocurrir la incorporación incorrecta de ribonucleótidos en vez de desoxirribonucleótidos la cual debe ser corregida (Wallace & Williams, 2014; Williams et al., 2016).

Asimismo, durante procesos celulares normales como la respiración, se generan especies reactivas del oxígeno (ROS). Dichas especies son moléculas generadas a partir del metabolismo celular fisiológico; sin embargo, cuando existe un desbalance entre la producción de radicales libres y los mecanismos antioxidantes se genera estrés oxidativo (Jackson & Bartek, 2009; David et al., 2007). Más recientemente se ha descrito también la importancia en la inducción del daño en el ADN, el rol las especies reactivas del nitrógeno (RNS) (Barcińska et al., 2018). Es interesante que las ROS y también las especies reactivas del nitrógeno son producidos por macrófagos y neutrófilos en un contexto inflamatorio, desencadenando la oxidación y nitración de moléculas del patógeno para ocasionar su destrucción (Manolakou et al., 2021).

Los daños del ADN, pueden ser procesados por distintos mecanismos donde el tipo de daño juega un rol importante. Parte del daño oxidativo puede ser reparado por un sistema de reparación por escisión de bases (*base excision repair* o BER) que reconoce y corta la base dañada para luego reemplazar por el nucleótido correspondiente. En el caso, que los daños distorsionen la doble hélice, por ejemplo los producidos por la radiación UV-C se puede activar el sistema de reparación por escisión de nucleótidos (*nucleotide excision repair* o NER), el cual escinde todo el nucleótido. Durante la replicación pueden ocurrir por error la incorporación de ribonucleótidos

que es reparado por el sistema por escisión de ribonucleótidos (RER). También puede ocurrir incorporación de bases incorrectamente apareadas que son reparadas por el sistema de reparación de bases mal apareadas (*mismatch repair* o MMR). Otros tipos de daños más desafiantes para la integridad celular, son las roturas de cadena, las cuales pueden ser procesadas por mecanismos de reparación recombinacional (HR) o unión de extremos no homólogos (NHEJ); estos se profundizarán más adelante. Cabe resaltar que distintos agentes pueden inducir varios tipos de daño de ADN, los cuales pueden ser reparados por diferentes sistemas de reparación (**Figura 1**) (Hoeijmakers, 2001; Mladenov & Iliakis, 2011).

Es muy interesante, que se ha descrito una superposición en la especificidad de sustrato de las vías de reparación. Por ejemplo, el daño oxidativo puede ser reparado tanto por BER, NER o MMR dependiendo de la gravedad del daño inducido en la doble hélice y también del contexto en el que ocurre la lesión (Croteau & Bohr, 1997; De Boer & Hoeijmakers, 2000).

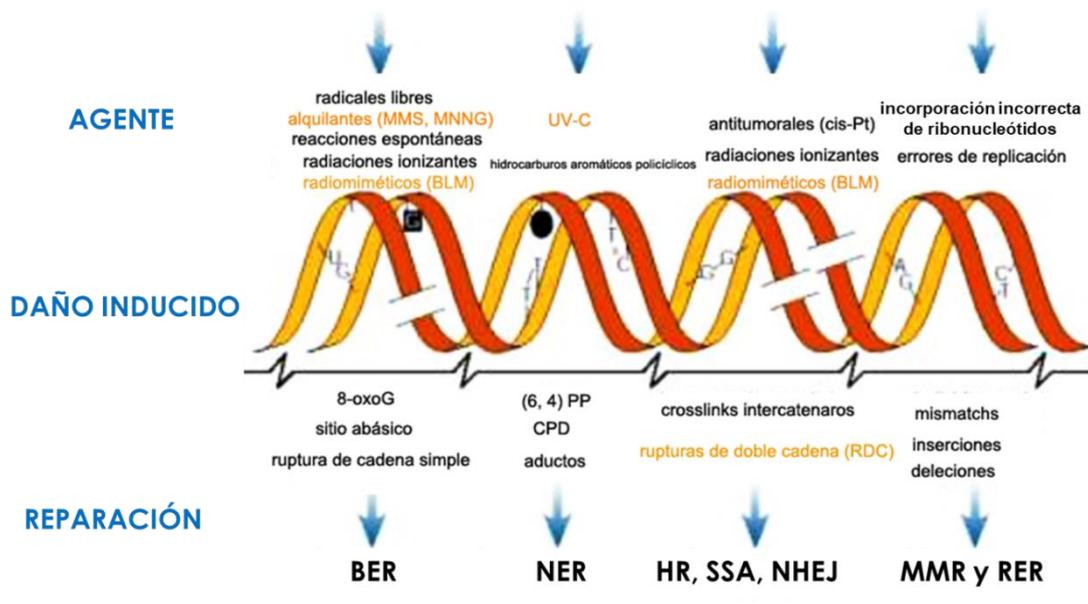


Figura 1. Diferentes agentes inductores de daño, tipo de daño inducido y principales sistemas de reparación implicados en la respuesta a cada tipo de daño. Imagen modificada a partir de la extraída de Hoeijmakers, 2001.

Para combatir la acumulación de mutaciones que podrían originar la muerte de la célula o una proliferación desmedida, se han establecido mecanismos para la supervivencia celular y el

mantenimiento de la integridad y fidelidad del ADN, esos procesos engloban a lo que se conoce como la respuesta al daño en ADN (DDR del inglés *DNA Damage Response*) (Jackson & Bartek, 2009).

Dichos mecanismos involucran la integración de procesos de detección del daño, reparación, control del ciclo celular y muerte celular programada. Las células defectuosas en estos generalmente muestran una mayor sensibilidad a agentes que dañan el ADN y, muchos de estos defectos son causantes de enfermedades. Aunque las respuestas difieren para diferentes clases de lesiones, generalmente ocurren mediante un programa general común (Figura 2) (Jackson & Bartek, 2009b; Manolakou et al., 2021).

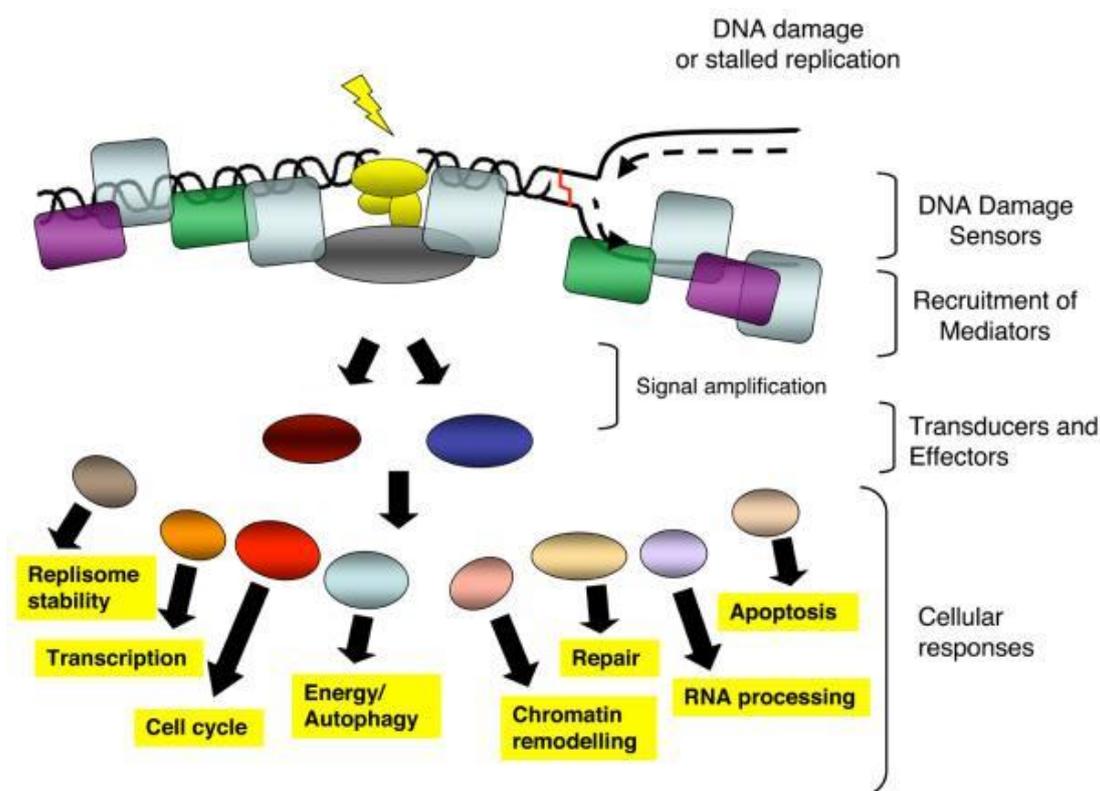


Figura 2. Esquema genérico de las respuestas celulares frente al daño en el ADN. Una serie de proteínas reconocen la presencia de una lesión, que puede provocar un estancamiento de la replicación. Estas proteínas inician vías de señalización que impactan en una amplia variedad de procesos celulares. Imagen extraída de Jackson & Bartek, 2009.

Las roturas de cadena doble del ADN (DSBs) son el tipo de daño que tiene consecuencias más graves para la célula. Luego de generarse las DSBs, la célula puede lograr su completa reparación o no. Si el daño no es reparado, la célula puede sufrir muerte celular inmediata

(necrosis) o diferida (apoptosis) o, en caso contrario, mantener un alto nivel de daño genético lo cual puede originar inestabilidad genómica, aberraciones cromosómicas y transformación maligna (Figura 3). (Deriano & Roth, 2013; Jones et al., 2010).

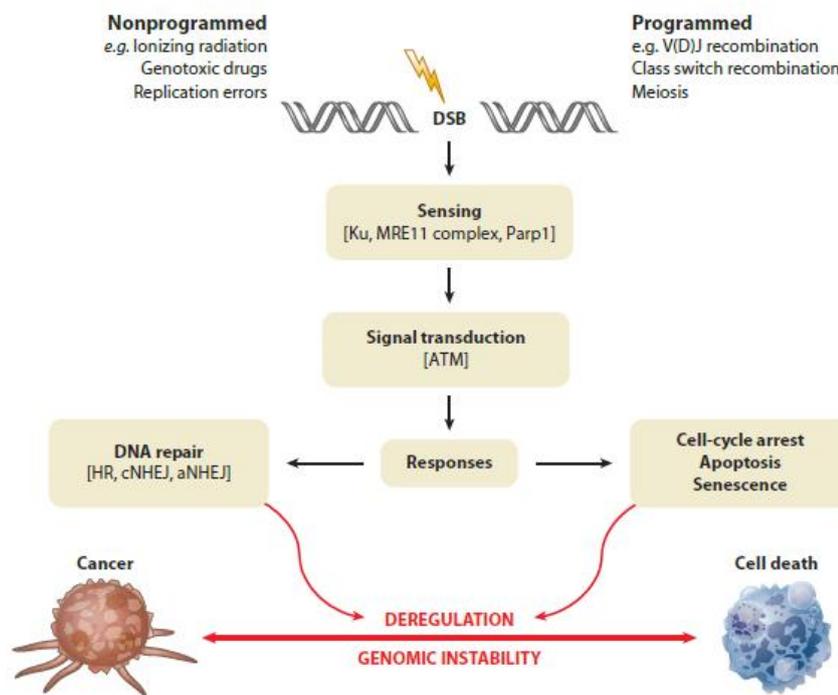


Figura 3. Imagen esquemática de la respuesta celular frente a las roturas de doble cadena (DSBs) extraída de Deriano & Roth, 2013

1.1.1 Reparación de las roturas de doble cadena

Las DSBs se pueden reparar mediante recombinación homóloga (HR) o también por unión de extremos no homólogos (NHEJ). Específicamente la NHEJ puede tener dos vías: la canónica (C-NHEJ) y la alternativa (A-NHEJ) (Figura 2). Cada uno de estos sistemas posee proteínas que son capaces de detectar el daño, señalar y a su vez, son propiamente reparadoras (De Boer & Hoeijmakers, 2000; Mladenov & Iliakis, 2011).

Las lesiones se encuentran flanqueadas por la variante de histona H2AX fosforilada en Ser139 por las quinasas canónicas ATM, ATR o DNA-PK a través de un bucle de señalización de

retroalimentación dando lugar a la formación de focos γ H2AX detectables mediante inmunocitofluorescencia (ICF) (Blackford & Jackson, 2017). Una quinasa unida a la cromatina menos estudiada llamada VRK1 también puede formar focos de γ H2AX, al menos en respuesta al daño del ADN inducido por RI. VRK1 funciona sola o en colaboración con ATM (Salzano et al., 2015).

En la vía canónica (C-NHEJ) están implicadas: Ku70/80, DNA-PK y γ H2AX; 53BP1, PARP-3 y la Ligasa IV. C-NHEJ es promovida por 53BP1 y antagonizada por BRCA1. Por el contrario, la resección del extremo del ADN mediante la actividad de la exonucleasa de MRE11 previene la C-NHEJ y promueve la HR con el reclutamiento de BRCA-1 y BRCA-2 o la vía A-NHEJ (Beck et al., 2014). Beck 2014 En esta última están implicadas PARP-1 y PARP-2 y LigIII pero no Ku 70/80, DNA-PK, 53BP1 ni Ligasa IV. Cabe destacar que las vías son sumamente complejas y algunos actores moleculares no están del todo definidos aun (Beck et al., 2014; Chaudhuri & Nussenzweig, 2017; Deriano & Roth, 2013; Mladenov & Iliakis, 2011; Rulten et al., 2011; Sancar et al., 2004).

Las lesiones se pueden reparar después de la replicación del ADN mediante HR o durante todo el ciclo celular mediante C-NHEJ o A-NHEJ. El daño no reparado puede provocar un estancamiento de la horquilla de replicación y la exposición al ADN monocatenario, lo que activa a ATR (Maréchal & Zou, 2013).

En cuanto a la estabilidad genómica, se acepta que HR es la vía de reparación de DSB de mayor fidelidad, A-NHEJ es la que promueve la mayor inestabilidad genómica y C-NHEJ se presenta una fidelidad media (Beck et al., 2014; Dueva & Iliakis, 2013). Si bien existen numerosos estudios de la cinética de procesamiento de las DSBs, aún se desconoce con precisión el curso temporal de la reparación en distintos tipos celulares y generados por diferentes agentes (Ingram et al., 2019; Kochan et al., 2017; Oizumi et al., 2020; Shen et al., 2021; Tobias et al., 2013). Se ha descrito que C-NHEJ ocurre con un tiempo medio de 10 a 30 min después del daño, mientras que el procesamiento de A-NHEJ tiene un tiempo medio de 30 min a 20 h, considerándose una vía de rescate (Beck et al., 2014; Dueva & Iliakis, 2013).

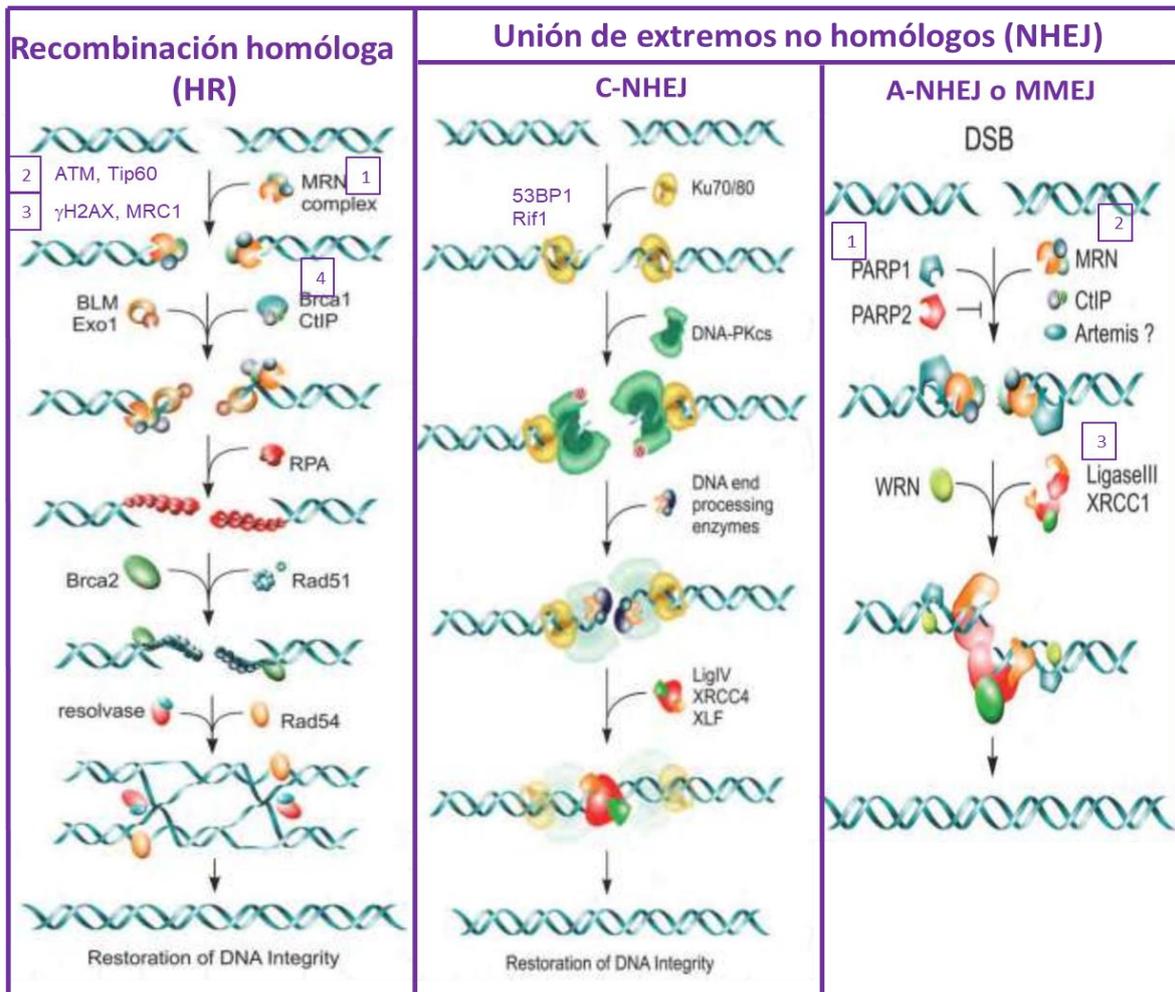


Figura 2. Vías de reparación de DSB: Recombinación homóloga (HR) y vías de unión de extremos no homólogos (NHEJ): vía canónica (C-NHEJ) y vía alternativa (A-NHEJ) Imagen modificada de Mladenov & Iliakis, 2011.

1.1.2 Letalidad sintética

El término "letalidad sintética" fue acuñado originalmente en 1940 para describir el proceso en el que mutaciones conjuntas en dos genes diferentes daban como resultado la muerte celular, pero dichas mutaciones en forma independiente no afectaban la viabilidad. El concepto se aplicó al cáncer algo más tarde para explicar la muerte selectiva de células cancerosas con defectos moleculares particulares mediante el uso de algunas drogas. Se hace evidente que la desregulación de la DDR, contribuye a la inestabilidad genómica, lo cual promueve la aparición de transformaciones malignas. La pérdida de un componente del DDR puede compensarse con otro componente de respaldo en la misma (o diferente) vía, de la cual la célula cancerosa se vuelve dependiente. La inactivación de esta vía compensadora es, por tanto, un medio de destruir selectivamente al tumor (Figura 3) (S. Veuger & Curtin, 2013).

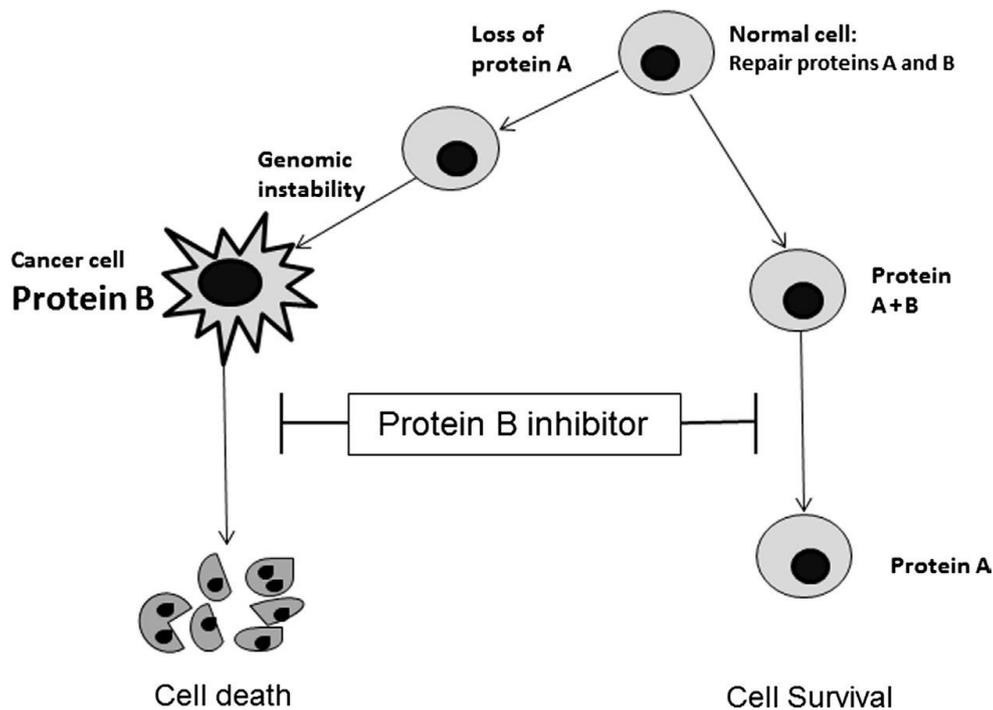


Figura 3. Representación esquemática de letalidad sintética. La célula normal contiene proteínas DDR primarias y de respaldo (A y B) para hacer frente a daño del ADN. La pérdida de una proteína A, la cual ocasiona la pérdida de esta conduce a la dependencia de otra proteína B. Esto promueve inestabilidad genómica, condicionando a la célula a tener un fenotipo maligno. En este caso, al usar un inhibidor de B conduce a la muerte celular de la célula cancerosa, pero no en la célula normal, porque está todavía tiene proteína A para hacer frente al daño del ADN. El esquema fue extraído de Veuger & Curtin, 2013.

1.2 Bleomicina

La bleomicina (BLEO) es un agente radiomimético que tiene una potente actividad antitumoral contra una variedad de linfomas, cánceres de cabeza, cuello y tumores de células germinales. Cabe tener en cuenta que es una molécula hidrófila, que no pueden atravesar las membranas celulares por difusión simple o libre. Estudios indican que la cola cargada positivamente podría ser clave para su transporte (Chen & Stubbe, 2005).

1.2.1 Mecanismos de generación de daño en el ADN

La BLEO tiene una estructura glicopeptídica y contiene un metal de transición que puede ser Fe o Cu. Tiene dos modos principales de acción: su acción directa como agente intercalante que distorsiona la estructura del ADN y su acción indirecta por mecanismos de óxido/reducción (Chen et al., 2008). La BLEO requiere un metal de transición reducido (Fe (II) o Cu (I)), oxígeno y un agente reductor de un electrón para generar una forma activada (**Figura 4**). Dicha forma activada puede autodestruirse, oxidar lípidos, hidrolizar enlaces amida en proteínas e iniciar eventos de clivaje químico específicos de secuencia en el ARN y ADN; en el último caso a través de una vía dependiente de radicales libres.

Las SSB al igual que las DSBs son iniciadas por la BLEO activada la cual, directa o indirectamente, remueve el átomo de hidrogeno 4' del C4 del grupo desoxirribosa de una pirimidina ubicada en dirección 3' respecto a una guanina en el ADN, iniciando el proceso de clivaje de hebra simple. Dependiendo de la disponibilidad de O₂ este intermediario radical 4' puede dividirse en dos vías diferentes: el intermediario es oxidado a un 4' carbocatión generando, por adición de agua, un sitio abásico oxidado en 4' o dicho intermediario, reacciona con O₂ formando un radical 4'-peroxi que luego es reducido a 4'-hidroperóxido. Este grupo sufre una serie de transformaciones químicas complejas generando en última instancia un ADN con un gap con extremos 3' fosfoglicolato/5' fosfato (3'-PG/5'-P) y una pirimidina propenal. La escisión de la doble hélice se efectúa mediante una única molécula de bleomicina y, en consecuencia,

requiere la reactivación de esta proponiéndose que sea el resultado de la reducción del radical peroxi (Figura 4B).

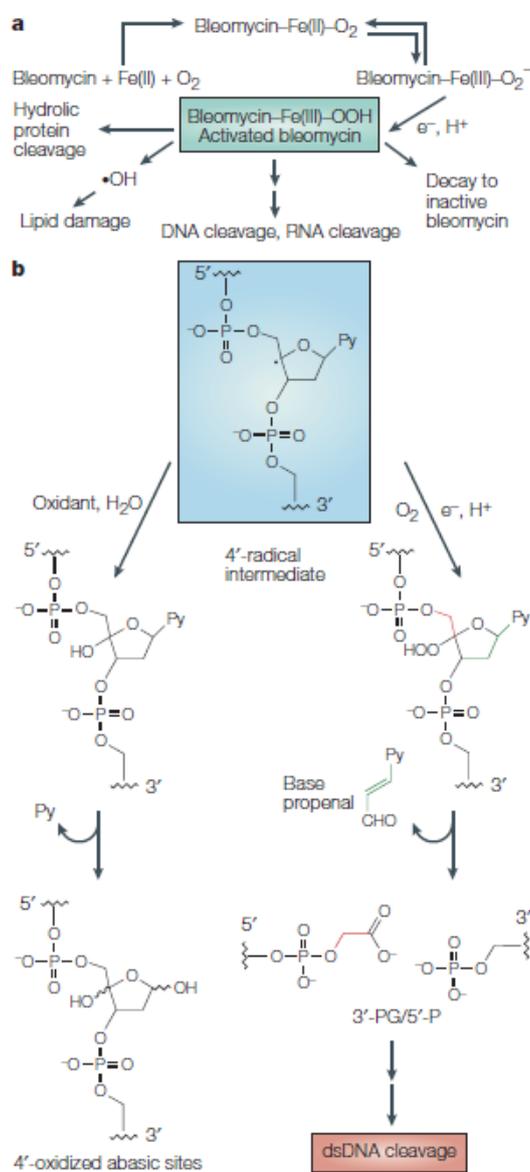


Figura 4. Formación de bleomicina activada e inducción de daño sobre el ADN. A) La bleomicina activada puede formarse mediante unión de bleomicina a Fe (II), seguida de unión de oxígeno y reducción por un reductor. B) Se observan dos posibles destinos del intermediario radical 4' (resaltado en celeste). Imagen esquemática de Chen & Stubbe 2005.

En particular, la formación de DSB surge de la formación de dos roturas de hebra de ADN cercanas, iniciadas por la remoción del hidrógeno en el C4. Asimismo, dicha reacción también causa otras lesiones ADN agrupadas. Estas lesiones implican la presencia de dos o más lesiones

cercanas en hebras opuestas y separadas por hasta 10 pares de bases (Keszenman & Sutherland, 2010; Regulus et al., 2007).

A través de los mecanismos detallados anteriormente, la BLEO cataliza la formación de roturas de simple y doble cadena en el ADN así como oxidación de bases y sitios apurínicos/apirimidínicos. La citotoxicidad de BLEO está íntimamente relacionada con la generación de DSBs, dado el potencial citotóxico intrínseco de este tipo de daño (Tounekti et al., 2001).

1.2.2 Respuesta celular al daño inducido por BLEO

En la **Figura 5**, se detalla la respuesta intracelular al daño por BLEO activada. Las proteínas involucradas en esta red a menudo se describen como sensores de daño, transductores de señal o efectores, aunque estos aún no están del todo identificados. Las proteínas sensoras activan ATM, un transductor de señal central. ATM fosforila varios blancos intracelulares que activan cascadas de transducción de señales. Por ejemplo, ATM fosforila y activa NBS1 en el complejo de nucleasa MRN (MRE11-RAD50-NBS1), necesario para la generación de extremos monocatenarios sobresalientes, un paso esencial en la vía de reparación por HR (Mladenov & Iliakis, 2011).

Asimismo, ATM activa CHK2, un regulador del ciclo celular. También activa p53, un supresor de tumores y componente esencial en la regulación de la detención del ciclo celular o apoptosis (Chen & Stubbe, 2005; Zhou et al., 2017). Si no se detiene el ciclo celular antes o durante la mitosis en respuesta al daño, se producirá la muerte de las células mitóticas con características de fragmentación nuclear y múltiples micronúcleos. Además, los heterodímeros KU70-KU80 pueden reclutarse para roturas de ADN bicatenario para iniciar la vía NHEJ (Chen & Stubbe, 2005).

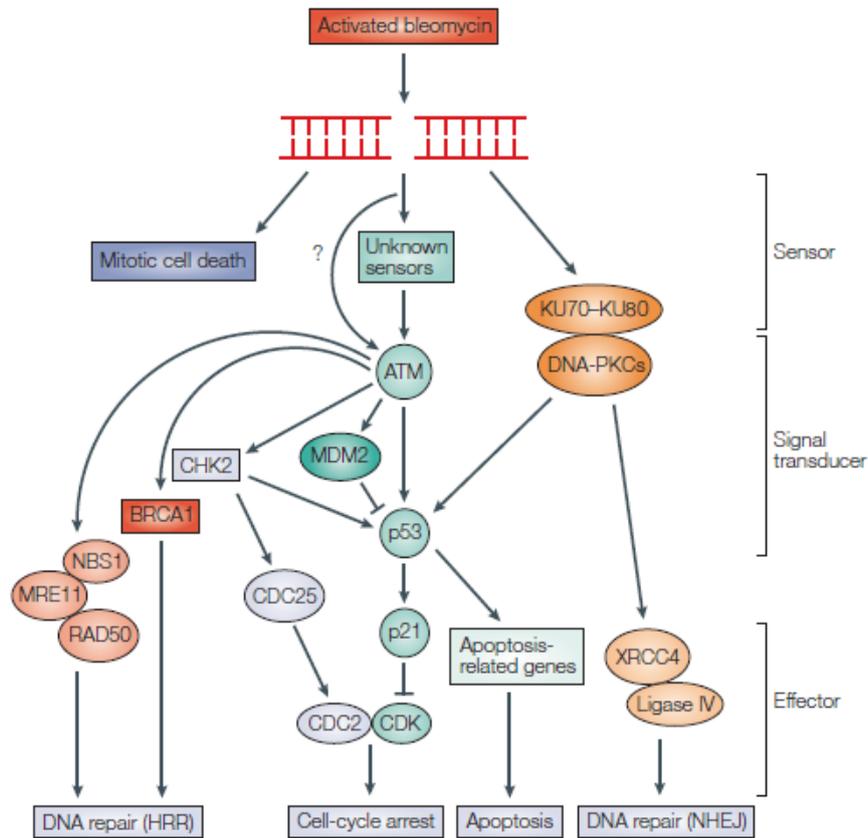


Figura 5. Esquema de la respuesta intracelular al daño inducido por bleomicina activada. Extraído de Chen Stubbe 2005.

1.3 Poli-ADP-ribosilación

La poli(ADP-ribosilación) o PARilación es una modificación postraduccional que es catalizada por poli(ADP-ribosil) polimerasas (PARPs). Las PARPs utilizan como coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) al sintetizar poli-ADP-ribosa (PAR), que es un polímero constituido por unidades de estructura pentosa-bifosfato-pentosa-adenina enlazadas por enlaces glicosídicos. Dicho polímero está fuertemente cargado negativamente ya que alberga dos grupos fosfato por residuo. A su vez, en esta reacción se libera nicotinamida (Nam), que funciona como inhibidor endógeno (retroalimentación negativa). A su vez, PAR es degradada por la poli-ADP-ribosa glicohidrolasa (PARG) (Virág & Szabó, 2002). La PAR es reconocida por dominios de proteínas de unión a PAR y facilita el ensamblaje de complejos multiproteicos a través de interacciones no covalentes (Teloni & Altmeyer, 2016). Asimismo, se ha reportado que la

acumulación de PAR es una señal citotóxica, ya que se ha demostrado que la alteración dirigida de PARG es embrionariamente letal en ratones y está asociada con la muerte celular apoptótica en blastocistos (Ko & Ren, 2012).

Existen 18 isoformas de PARP, de las cuales PARP-1 y PARP-2 producen dicho polímero, el cual es largo y ramificado. Las tankirasas 1 y 2 catalizan la oligo-ADP-ribosilación (OARilación). En cambio, PARP-3 es un ejemplo de mono-ADP-ribosilasa. Asimismo, algunas isoformas no presentan actividad enzimática conocida (Hottiger, 2015).

1.3.1 PARP-1

En particular, PARP-1 se encuentra localizada exclusivamente en el núcleo y ha sido la más estudiada hasta el momento. Participa de varias funciones esenciales incluyendo remodelación de la cromatina, regulación de la transcripción e imprinting, reconocimiento de los sitios dañados del ADN y su reparación. En particular en la reparación del ADN: participa en BER (Ronson et al., 2018) y en A-NHEJ (Dueva & Iliakis, 2013; Mladenov & Iliakis, 2011). Incluso, se ha interpretado que PARP-1 antagoniza Ku70/80 y como Ku70/80 es imprescindible para C-NHEJ, la activación de PARP-1 favorecería A-NHEJ frente a C-NHEJ (Beck et al., 2014). En algunas revisiones se argumenta que PARP-1 participa de las tres vías de reparación de DSB, incluso en la etapa inicial común (Chaudhuri & Nussenzweig, 2017).

PARP-1 participa también en procesos inflamatorios y su sobreactivación puede conducir a la muerte celular (Ko & Ren, 2012; Lafon-Hughes et al., 2008; Oliva et al., 2006). En caso de que PARP-1 se sobreactive, por una parte, se consume NAD generando una situación de depleción energética que podría conducir a la muerte celular apoptótica o necrótica (Bouchard et al., 2003; David et al., 2009) y por otra parte, se genera un exceso de PAR, que es una fuente de citotoxicidad. El polímero induce la translocación de AIF desde la mitocondria al núcleo, en un tipo particular de muerte programada independiente de caspasas denominada parthanatos (David et al., 2009; Kam et al., 2018; Koehler et al., 2021). Se ha destacado que la toxicidad de PAR depende de la longitud y complejidad del polímero. Mediante el suministro directo de polímero

PAR en neuronas y células HeLa, se encontró que los polímeros PAR de tamaño superior a 60 unidades ADP-ribosa son más tóxicos que los polímeros menos complejos (David et al., 2009).

PARP-1 es un coactivador de factores de transcripción como ser NF- κ B, contribuyendo a la transcripción de diferentes subconjuntos de genes diana sobre inmunidad innata. Por lo que la inhibición de PARP-1 atenúa notablemente la respuesta inflamatoria. Se ha observado que OLA y otros iPARPs desarrollados para su uso en oncología, han tenido efectos protectores en neuronas humanas. Su efecto protector no solo disminuye la respuesta proinflamatoria de la microglía mediada por NF- κ B, sino que también detiene la muerte celular programada inducida por la sobreactivación de PARP-1 (Koehler et al., 2021). También hay evidencias experimentales de la relación de la actividad de PARP-1 con la longevidad y regulación metabólica (Bai & Cantó, 2012; Osorio et al., 2016).

Dada las funciones tan relevantes en la que esta enzima participa, esta se encuentra sumamente regulada por ciertos ligandos, reguladores, proteínas y modificaciones post-traduccionales (**Figura 6**) (Ko & Ren, 2012).

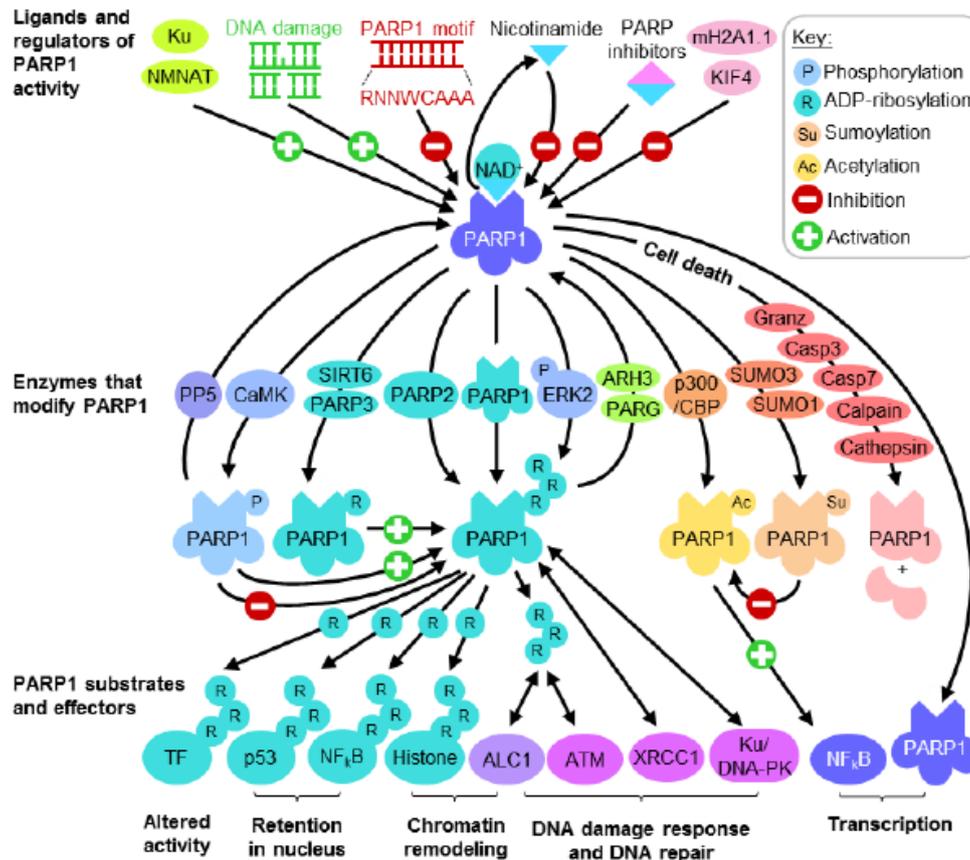


Figura 6. Esquema de algunas de las funciones esenciales que cumple PARP-1 y su estricta regulación. Obtenido de Ko & Ren, 2012.

1.3.2 Olaparib y letalidad sintética

Olaparib (OLA, *Lynparza*, AZD-2281) es un inhibidor de PARPs (iPARPs), específicamente PARP-1, PARP-2 y PARP-3. Fue aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration, EEUU*) para tratar los cánceres con mutación en los genes de BRCA-1 o BRCA-2 (U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (FDA), 2014). Estos últimos codifican para proteínas implicadas en la vía de reparación HR. Debido a que las proteínas BRCA1 y BRCA2 son componentes críticos de la vía HR, las mutaciones hereditarias de BRCA1 y BRCA2 hacen que las células sean más sensibles al daño al combinarse con un un inhibidor de PARP (iPARP) (Curtin, Nicola J.; Sharma, 2015; Ping Lin et al., 2018).

Existe evidencia acumulada que los iPARPs pueden mostrar una variedad de efectos desde la muerte celular hasta efectos protectores dependiendo del contexto celular (Brock et al., 2004; Cleaver et al., 1983; Drew et al., 2011; Horton et al., 2005; Kelland et al., 1987; Russo A.L., Kwon H.-C., Burgan W.E., Carter D., Beam K., Weizheng X., Zhang J., Slusher B.S., Chakravarti A., 2009; S. J. Veuger et al., 2003). En los últimos años se ha destacado la utilidad de iPARPs para matar células deficientes en BRCA1 o BRCA2. Este hallazgo ha servido como un claro ejemplo de letalidad sintética en contexto de la terapia contra el cáncer. Se ha demostrado que ciertos iPARPs no afectan apreciablemente a células normales, pero potencian efectos del daño en el ADN en células que tienen ciertas vías de reparación bloqueadas por mutación o inhibición enzimática de un actor crucial de la vía (Curtin & Sharma, 2015; Jackson & Bartek, 2009).

En la literatura, se ha notado que OLA promueve la muerte celular de manera diferencial en las células que han obstaculizado la reparación de DSB, como células que tienen mutada una proteína mutada de la vía HR, como BRCA-1/-2 (Curtin, Nicola J.; Sharma, 2015; Ping Lin et al., 2018; Sunada et al., 2018; Topatana et al., 2020; S. Veuger & Curtin, 2013). Es relevante resaltar que BRCA-1 es un actor crítico no solo en HR sino que también en BER (Saha et al., 2010). Se ha notado que OLA muestra letalidad sintética con proteínas de HR mutadas como BRCA-1/2, proteínas relacionadas al BER (XRCC1, Polβ) o de C-NHEJ (LigIV) (Czyz et al., 2016; Horton et al., 2015).

A pesar de las respuestas positivas observadas en algunas pacientes con cánceres de ovario o de mama con deficiencia en BRCA, otras pacientes no mostraron beneficio al utilizar iPARPs. La resistencia de las células neoplásicas sigue siendo un obstáculo en la implementación de este hallazgo preclínico el cual se encuentra en etapa inicial y hasta el momento no está descrito que mecanismo explica esta resistencia (Curtin & Sharma, 2015).

1.4 Antecedentes específicos

Resultados previos de viabilidad celular (obtenidos en el marco del proyecto PAIE-CSIC) y utilizando ensayo clonogénico, donde se estudió el efecto de OLA en células VERO tratadas con BLEO, evidenciaron que OLA no potenció el efecto de BLEO. Aún más, no se encontró una dosis suficientemente alta de BLEO como para inducir un alto porcentaje de células con γ H2AX pan-nuclear. De hecho, se observó que la marcación de γ H2AX predominante fue en forma de focos individuales (no pan-nuclear) y se acompañó de la presencia de focos 53BP1. Esta combinación fue altamente sugerente de la activación de la vía C-NHEJ. Resultó interesante observar que las células pan-nucleares para γ H2AX no presentaban focos 53BP1. Estos resultados indicarían que las células VERO reparan fundamentalmente por C-NHEJ y dado que PARP-1 está en la A-NHEJ, serían concordantes con la ausencia de potenciación con OLA.

Al inhibir las otras vías (HR y C-NHEJ) utilizando 3i, podría ocurrir que las células activaran la vía alternativa (A-NHEJ) que es PARP-1 dependiente. En esa situación se podría observar potenciación por OLA, pero de hecho, no se evidenció potenciación por dicho inhibidor. Estos resultados habilitan diferentes explicaciones: **a)** los inhibidores no tuvieron efecto debido a interacciones químicas entre ellos o **b)** la existencia de una interacción directa entre BLEO y DMSO. Alternativamente, **c)** los inhibidores podrían impedir la generación de daño inicial por interferencia con BLEO. También **d)** se podría plantear la posible existencia de una cuarta vía de reparación de DSB no descrita, o bien que, **e)** las vías estén estuviesen interconectadas. Esto último, significa que al inhibir una enzima de una vía, la célula pase a operar por otra. En este trabajo nos propusimos testar dos de éstas posibles explicaciones.

2 HIPÓTESIS

I. Los inhibidores de enzimas de reparación de DSB impiden que se genere daño inicial por interferencia con BLEO

II. Al inhibir simultáneamente C-NHEJ (iDNA-PK, iLigIV), HR (iATM) y A-NHEJ (OLA, iPARP), la célula pasa a reparar las DSB inducidas por BLEO por una vía independiente de éstas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

A los efectos de verificar si la presencia de los inhibidores interfiere con la inducción de daño genético por BLEO y/o con la respuesta inicial de la célula al daño se propone comparar el nivel de daño genético inducido por BLEO en presencia o ausencia de OLA y un pool de inhibidores de enzimas de reparación de ADN en células VERO y el reclutamiento de 53BP1 en las mismas condiciones.

3.2 Objetivos específicos

- Poner a punto el ensayo cometa y evaluar el software *OpenComet* para determinar el nivel de daño genético inducido en células VERO.

- Profundizar en la evaluación de la viabilidad celular en respuesta a BLEO, OLA y 3i mediante ensayo de viabilidad MTT.

- Evaluar el daño inicial inducido por BLEO en presencia o ausencia de 3i y OLA expresado como (i) índice de daño del ensayo cometa (ii) porcentaje de células con focos γ H2AX o con marcación pan-nuclear por inmunocitofluorescencia (ICF) (iii) cuantificación de focos γ H2AX mediante ICF.

- Estudiar si los inhibidores afectan la activación inicial de C-NHEJ mediante el estudio de los focos 53BP1 por ICF.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Cultivo Celular

La línea celular VERO de epitelio de riñón de *Cercopithecus aethiops* (mono verde) (ATCC® CCL-81™) se cultivó en MEM-STA (Capricorn, Capricorn Scientific GmbH, 35085 Ebsdorfergrund, Alemania) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS; Capricorn #FBS-11A, recogido en América del Sur), en presencia de los antibióticos: penicilina/estreptomicina (Capricorn PS-B, concentración 1:100) y L-glutamina 2 mM en estufa de cultivo con 5% de CO₂ a 37°C. La línea se mantuvo realizando pasajes y cambios de medio de acuerdo a lo sugerido por el proveedor, en placas de 100 mm y/o frascos de 25 cm². A partir de un cultivo de un 80% de confluencia se sembraron 3000 células/pocillo (para evaluar 96 h post siembra) en placas de cultivo celular de 96 pocillos para el ensayo MTT, por otra parte se sembraron 100.000 células en cubreobjetos redondos en placas de 24 pocillos para ICF y 500.000 células en placas de Petri de 35 mm para el ensayo cometa.

4.2 Tratamientos con BLEO e inhibidores de enzimas de reparación del ADN

Se indujo daño genético utilizando el agente radiomimético bleomicina en presencia o ausencia del inhibidor de PARP-1/2/3 Olaparib (U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (FDA), 2014) y/o de inhibidores de las quinasas ATM y DNA-PK o Ligasa IV (LigIV).

Previamente en el proyecto PAIE-CSIC, se realizaron curvas de dosis-respuesta a BLEO (0, 4, 10, 20, 40, 80, 160, 200 y 500 µg/mL) y a OLA (0, 50, 100, 150 y 200 nM). A partir de dichas curvas se seleccionaron las concentraciones: BLEO 40 µg/mL y OLA 50 nM. A continuación se detallan las respectivas concentraciones: 10 µM KU55933 (SIGMA SML-1109, St. Louis, Missouri, EE. UU.), 0,1 µM KU-0060648 (SIGMA SML- 1257, St. Louis, MO, EE. UU.) y 0,1 µM de pirazina SCR7 (SIGMA SML-1546, St. Louis, MO, EE. UU.).

El tratamiento con sulfato de bleomicina (BLEO de NOLVER (Montevideo, Uruguay), NIPPON, KAYAKU (Japón) o LKM (Perú)) consistió en un pulso de 45 min en ausencia de suero fetal bovino (FBS). Los controles, realizados en paralelo, se sometieron a la misma depleción de FBS durante 45 min. El tratamiento con Olaparib (OLA) de Tocris (Minneapolis, MN, EE. UU.) y con inhibidores de ATM, DNA-PK y LigIV (3i) fue continuo. Se realizaron co-tratamientos con los correspondientes inhibidores + BLEO durante 45 min; luego, para el ensayo MTT, se agregó medio de cultivo fresco con FBS e inhibidores (sin BLEO) durante 72 h. Para el ensayo cometa o ICF, el experimento se detuvo y las células se lisaron o fijaron inmediatamente después del tratamiento de 45 min. En las **figuras de resultados** se ha integrado siempre un esquema temporal de tratamiento.

4.3 Ensayo de viabilidad celular (MTT)

La viabilidad celular se determinó mediante un ensayo colorimétrico de MTT (bromuro de 3-(3,4-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), donde las células metabólicamente activas reducen la molécula de MTT a formazán (púrpura) por acción de la succinato deshidrogenasa mitocondrial (Mosmann, 1983).

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de acuerdo con la duración del experimento, en este caso, 3000 células por pocillo. Al finalizar el experimento, las células se incubaron durante 1 h 37°C en estufa de CO₂ con MTT (concentración final de 0,5 mg/ml con glucosa 10 mM en buffer fosfato (PBS)). Los cristales de formazán se disolvieron con DMSO puro. La absorbancia se midió utilizando una longitud de onda de referencia de 630 nm y una longitud de onda de prueba de 570 nm en el lector de microplacas Flash Varioskan (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Cada experimento contó con un blanco con medio de cultivo celular. Se configuró el software del lector de microplacas para que reste la absorbancia del blanco a cada condición experimental.

4.4 Ensayo cometa

El ensayo de electroforesis de células individuales (SCGE), también denominado ensayo cometa, se llevó a cabo en su versión alcalina para detectar roturas del ADN que pueden corresponder originalmente a SSB, DSB y sitios álcali-lábiles (Møller et al., 2020; Olive & Banáth, 2006). Como resultado se obtienen núcleos con apariencia de un cometa con una cabeza (región nuclear) y cola (formada por fragmentos nucleares que han migrado en dirección al ánodo) (Rodríguez-Rey et al., 2016).

La superficie del portaobjetos se recubrió con agarosa de punto de fusión normal al 1% (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) en PBS y se dejó secar. Posteriormente al tratamiento de 45 min, las células se lavaron con PBS filtrado (PBSf), se incubaron con tripsina-EDTA durante 5 min a 37°C, se centrifugaron y se re suspendieron en PBS; luego, se mezcló 20 µl de suspensión celular con 80 µl de agarosa de bajo punto de fusión al 0,75% (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) en PBS a 37°C.

Inmediatamente, se colocó un volumen de 80 µL de la suspensión de células en agarosa en un portaobjetos apoyado en una platina a 37 °C, se realizó un extendido mediante cobertura con parafilm y se mantuvo el preparado a 4°C durante 10 min. Se retiró el parafilm y se sumergió el portaobjetos en buffer de lisis frío (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris-HCl 10 mM y 8 g de NaOH/890 mL de agua, ajustado a pH 10, al que se le añadió 1% Triton-X-100 y 10% DMSO una hora previa a su uso) y se mantuvo a 4°C de 1 a 15 días.

Los portaobjetos se incubaron en buffer de electroforesis frío (NaOH 300 mM y EDTA 1 mM a pH 13) durante 20 min a 4°C, de modo de desenrollar las hebras de ADN y exponer los sitios lábiles a los álcalis. La corrida electroforética se realizó a 25 V durante 20 min en una cuba con 35 cm de separación entre los electrodos. El volumen del buffer se ajustó para lograr una intensidad de corriente en el rango de 250 a 300 mA.

Finalizada la corrida, los portaobjetos se lavaron con buffer de neutralización (Tris-HCl 0,4 M, pH 7,5) tres veces durante 5 min, posteriormente se lavaron con agua destilada. Se

sumergieron en etanol 70 % durante 5 min. Luego se dejaron secar a 40 °C durante 10 a 15 min. Los portaobjetos se tiñeron con 80 µL de DAPI (6 µg/mL) durante un tiempo de incubación de 10 min, se lavaron con agua destilada y se cubrieron con cubreobjetos.

Los cometas se contaron a ciegas bajo epifluorescencia o utilizando el microscopio confocal en condiciones no confocales (apertura confocal 5) bajo objetivos de 40x y 20x. Se tomaron fotografías representativas.

4.4.1 Clasificación visual según morfología del cometa

Los cometas se clasificaron según el grado de daño (α) en cinco categorías: 1 a 5. Los siguientes fueron los criterios para evaluar el grado de daño (**Figura 7**):



Figura 7. Representación esquemática del grado de daño. En rojo se muestra la cabeza y en blanco la cola del cometa. Los valores correspondientes pueden ser: **1:** sin daño e intacto o con un halo alrededor del núcleo; **2:** un pequeño daño (el ADN se distribuyó en forma de óvalo); **3:** el eje anteroposterior mide el doble del diámetro; **4:** el ADN compacto se redujo y apareció una gran nube de ADN (cola larga del cometa); y **5:** la cola se separó del resto de ADN compacto.

Se realizó un recuento doble ciego. Se calculó un índice de daño (DDI) según la siguiente ecuación: $DDI = \sum(n\alpha)$ Donde para 100 células, n es el número de células con grado de daño α . Cabe tener en cuenta que como se menciona dicha ecuación se aplica para una cantidad total de 100 células por condición experimental, por lo que si la cantidad es mayor o menor a 100 hay que normalizar por el número de células para que las condiciones experimentales sean proporcionales y comparativas entre sí.

4.4.2 Procesamiento mediante el plug-in *OpenComet*

Para el procesamiento automático se utilizó el un plug-in del software Image J, *OpenComet v1.3* (Gyori et al., 2014). Primeramente, se indicó la carpeta de imágenes de microscopía (aumentos 20x y 40x) de entrada. *OpenComet* generó imágenes (**Figura 8**) y una hoja

de datos de salida que contiene las mediciones de cometas (Tabla 1) y las estadísticas de todas las imágenes analizadas.

Tabla 1. Parámetros que se obtienen mediante el software OpenComet y su respectiva descripción. Tabla extraída de *OpenComet v1.3 Documentation*, n.d.

Parámetro	Descripción
Área del cometa	Número de píxeles en el cometa
Longitud del cometa	Longitud de la región del cometa en píxeles
Contenido de ADN del cometa	Suma de intensidades de píxeles dentro del cometa
Intensidad media del cometa	Contenido de ADN del cometa dividido por el tamaño del cometa
Área de la cabeza	Número de píxeles dentro de la cabeza
Diámetro de la cabeza	Longitud de la cabeza en píxeles
Contenido de ADN de la cabeza	Suma de intensidades de píxeles dentro de la cabeza
Intensidad media de la cabeza	Contenido de ADN de la cabeza dividido por el tamaño de la cabeza
% De ADN de la cabeza	Contenido de ADN de la cabeza como porcentaje del contenido de ADN del cometa
Área de la cola	Número de píxeles en la cola
Longitud de la cola	Longitud de la cola en píxeles
Contenido de ADN de la cola	Suma de intensidades de píxeles dentro de la cola
Promedio de cola	Contenido de ADN de la cola dividido por el tamaño de la cola
% De ADN de la cola	Contenido de ADN de la cola como porcentaje del contenido de ADN del cometa
Momento de cola	Tiempos de longitud de la cola % de ADN de la cola
Momento olive	% De ADN y la distancia entre los centroides ponderados por intensidad de la cabeza y la cola

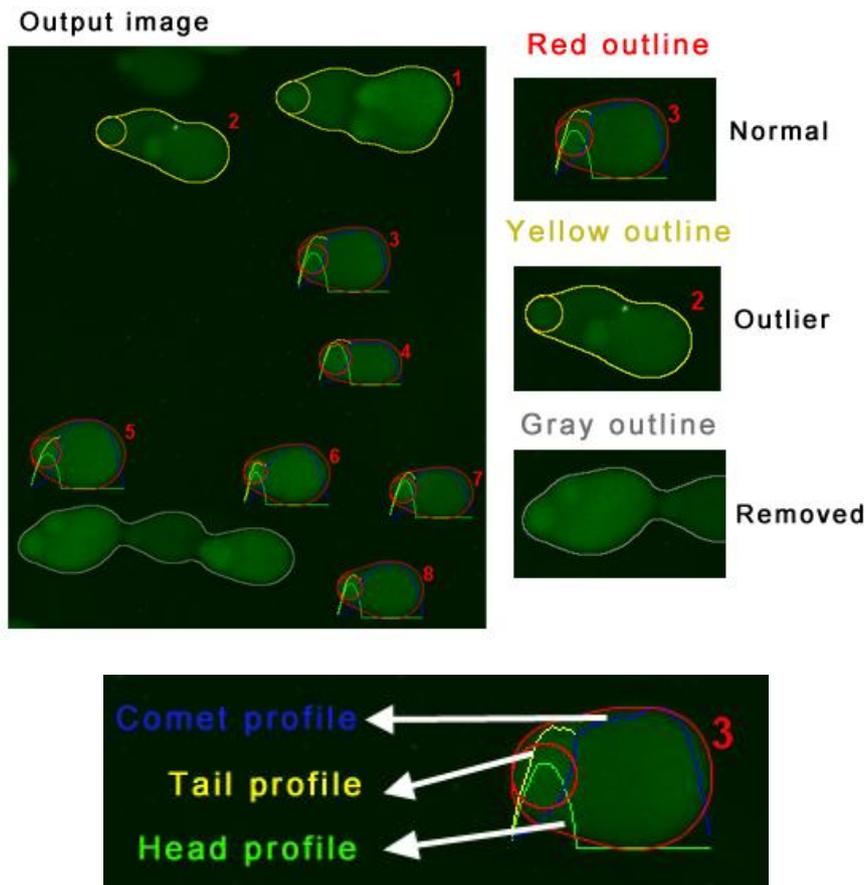


Figura 8. Imagen representativa del reconocimiento de la estructura del cometa. A la izquierda se muestra la imagen de salida (output image) y a la derecha la representación según el tipo de cometa. Contorno rojo: cometa normal, donde se puede ver Perfil verde: cabeza de cometa (head profile), Perfil amarillo: cola de cometa (tail profile) y Perfil azul: Cometa (comet profile), este último representa la suma de los perfiles cabeza y cola. Contorno amarillo: cometa atípico (outlier). Contorno gris: forma eliminada (removed). La numeración asignada representa la asignación del cometa que luego se puede ver la correspondencia con la hoja de salida que contiene los resultados del procesamiento. Imágenes extraídas de *OpenComet v1.3 Documentation*, n.d.

Se evaluó el software OpenComet analizando su coherencia interna (si a colas más largas corresponden parámetros adecuados, mayor longitud de cola, etc.) y además se comparó resultados con los obtenidos por evaluación manual de las mismas imágenes.

4.5 Evaluación de focos γ H2AX y 53BP1

4.5.1 Inmunocitofluorescencia (ICF)

La técnica de inmunocitofluorescencia se emplea para determinar la presencia y localización subcelular de moléculas de interés. Se utilizan anticuerpos unidos a una molécula fluorescente para demostrar la ausencia o presencia de la molécula de interés. Hay dos tipos de ICF: directa e indirecta. La primera implica el uso de un anticuerpo primario unido a un fluoróforo que reconoce un antígeno específico. La segunda implica el uso de un anticuerpo primario que reconoce un antígeno específico, y luego un anticuerpo secundario marcado con un fluoróforo que reconoce el anticuerpo primario.

Se realizó una ICF indirecta. Luego del tratamiento, las células se lavaron con PBSf y se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4% en PBSf durante 15 min en frío. Posteriormente, se lavaron en PBSf (3 x 5 min) y se permeabilizaron en Triton-100X al 0,1% en PBSf durante 10 min. Se bloqueó en seroalbúmina bovina (BSA, solución de bloqueo) al 1% en PBSf-Tween (PBSf-T) al 0.2% durante 30 min. Se incubó con los anticuerpos primarios específicos durante 2 h a 37 °C: Anti- γ H2AX monoclonal de ratón 1:400 (Abcam) y anti-53BP1 policlonal 1:300 (Abcam 36828) diluidos en solución de bloqueo. Se lavó con PBSf-T (3 x 5 min). Posteriormente, se incubaron con la mezcla de anti-anticuerpos secundarios durante 1 h a temperatura ambiente: anti-ratón-Cy3 1:250 (Jackson Immuno Research) y anti-conejo 488 1:1000 (#A-11034, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) diluidos en solución de bloqueo. Se lavó con PBSf-T (2 x 5 min).

Se realizó una contratinción con DAPI (1,5 μ g/ml en PBSf) y un lavado final rápido en PBSf, los cubreobjetos se montaron en Prolong Gold (Molecular ProbesP36930, Eugene, OR, EE. UU.) y finalmente se sellaron con esmalte de uñas. Se realizó controles sin anticuerpos primarios para comprobar la especificidad de la señal.

4.5.2 Microscopía confocal

Para adquirir las correspondientes imágenes se utilizó el microscopio confocal Olympus BX61, módulo confocal FV300. La excitación de los fluorocromos se realizó con los láseres: diodo de 405 nm (DAPI), argón multilínea de 488 nm (Alexa Fluor 488) y helio-neón de 561 nm (Cy3), y se registró la emisión utilizando respectivamente los filtros de corte o de banda: DAPI (filtro de banda, 430-460 nm), FITC (dos filtros de corte mayor a 510 y menor a 530 nm) y rojo (filtro de banda de 560 a 600 nm).

Se ajustó la configuración del microscopio: intensidad del láser, sensibilidad del fotomultiplicador (PMC) y ganancia, de manera tal que no registre ninguna señal inespecífica en los controles sin anticuerpos primarios. El barrido de las secciones ópticas se realizó de forma secuencial para los diferentes fluorocromos. Todas las imágenes de cada serie experimental se tomaron con el mismo setting en la misma sesión confocal.

4.5.3 Cuantificación del porcentaje de células con marcación γ H2AX pan-nuclear, focos γ H2AX y 53BP1

El anticuerpo anti- γ H2AX sólo reconoce H2AX fosforilada en Ser 139. La fosforilación es catalizada por ciertas quinasas incluyendo DNA-PK, ATM, ATR o VRK1, dando lugar a la formación de focos u observándose marcación pan-nuclear. En cambio, el anticuerpo anti-53BP1 reconoce proteína total que puede distribuirse de manera difusa en el núcleo, dando lugar a una marcación homogénea (“lisa”) o relocalizarse en torno a las dando lugar a focos 53BP1. Por ese motivo, en el canal rojo los núcleos se clasificaron en 3 categorías: con focos γ H2AX (para lo cual debían presentar al menos 4 focos bien definidos), con marcación pan-nuclear, o negativos. En el canal verde los núcleos se clasificaron en dos categorías: con focos (requiriendo al menos 2 focos 53BP1 conspicuos) o con distribución homogénea de 53BP1, denominada marcación “lisa”. Cabe destacar, que los núcleos con un único focus 53BP1 se incluyeron en la categoría de marcación “lisa”. Los resultados fueron normalizados mediante su expresión como % células con focos

γ H2AX, % células pan-nucleares y % células con focos 53BP1 con respecto al total de células. Los núcleos fueron contados por un operador utilizando el complemento “*Cell Counter*” del ImageJ.

4.5.4 Cuantificación del número de focos γ H2AX y 53BP1

La cuantificación del número de focos por célula se realizó mediante el software de procesamiento de imágenes de microscopía ImageJ. Primero se separaron los canales: DAPI (azul), γ H2AX (rojo) y 53BP1 (verde). Luego con los canales de nuestro interés, correspondientes a γ H2AX y 53BP1, se segmentaron las imágenes para obtener una máscara utilizando un umbral fijo para todas las imágenes del experimento en cada canal. Los umbrales de los diferentes canales no necesariamente deben ser los mismos. El complemento Analizar partículas permitió contar objetos con ciertas propiedades. Los focos se definieron como objetos de forma ovoide a circular (circularidad > 0.5) y de 5 a 200 pixels de tamaño. Se utilizó un script que permitió realizar el análisis en batch (Perini et al., 2020). En cada caso, el programa mostró las máscaras, mostró los resultados y resumió los datos. De esta manera, obtuvimos el número de focos γ H2AX y focos 53BP1. Para el cálculo de focos/célula, en el canal de γ H2AX se excluyeron del denominador las células pan-nucleares.

4.6 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como Media \pm SEM o Media \pm SD. Se probó la significación Se determinó las diferencias significativas entre los grupos experimentales utilizando una prueba t de Student de dos colas desiguales en Microsoft Excel 2010 o un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de pruebas de comparaciones múltiples post-hoc: Tukey en ASTATSA y Tamhane el cual no asume varianzas iguales en el software SPSS, versión 21.0.

5 RESULTADOS

5.1 Puesta a punto del ensayo cometa y evaluación del daño inicial en células

VERO

5.1.1 Ajuste del ensayo cometa con células VERO

Uno de los objetivos de esta tesina fue optimizar el ensayo cometa para células VERO. Desde un principio, se sembraron 500.000 células en cajas de 35 mm. Se implementaron las siguientes modificaciones del protocolo de partida:

a) Con el fin de disminuir el ruido de fondo observado en los primeros experimentos, se implementó un lavado de los portaobjetos y cubreobjetos. Se roció etanol 70% y luego se secó con papel, repitiendo este paso si persistían marcas visibles en los vidrios. Luego los vidrios se sumergieron en metanol puro en un coppling. Se dejaron secar en estufa a 37°C hasta que el metanol se evaporó.

b) Inicialmente, el tiempo de la corrida fue de 25 minutos, pero se observó que las longitudes de los cometas eran considerables, por lo que se disminuyó a 20 min.

c) Posteriormente del lavado de los portaobjetos en buffer de neutralización, se adicionó un paso de fijación con etanol 70 % durante 5 min, y los preparados se dejaron secar a 40°C durante 10 a 15 min de modo de disminuir el espesor del gel.

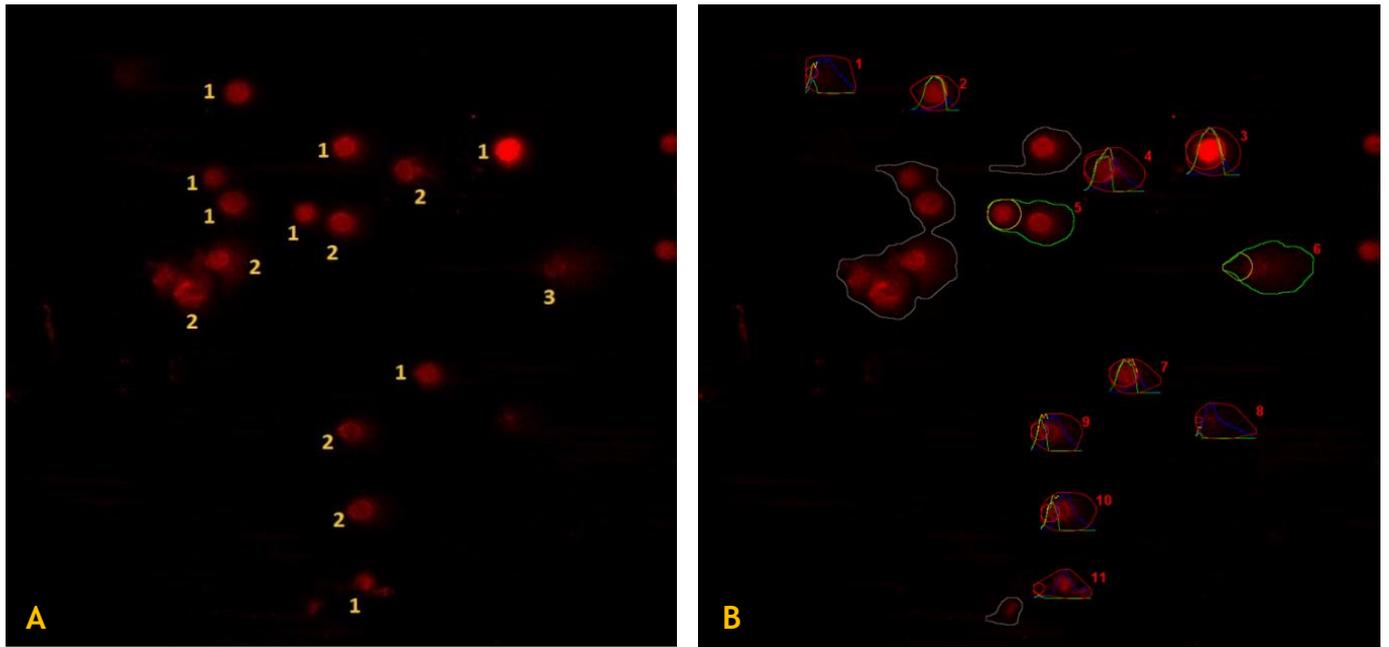
d) Se ajustó la tinción con DAPI para marcar ADN. En primera instancia, se probó con una concentración de 1,5 mg/mL pero al denotar que la marcación fue tenue, se consideró utilizar una concentración de 6 mg/mL. Asimismo, luego de incubar los preparados con dicha tinción durante 10 min, se procedió a realizar un lavado con agua destilada.

5.1.2 Evaluación del plug-in OpenComet para determinar el nivel de daño genético inducido en células VERO

Para evaluar el software *OpenComet* se utilizaron dos aproximaciones: la comparación con la evaluación visual por un observador que clasificó los cometas según su grado de daño creciente (de 1 a 5) y el chequeo de coherencia interna del sistema (los cometas más largos no pueden por ejemplo tener medidas de colas más cortas).

En la **Figura 9**, se observa un campo del control. A la izquierda (**Figura 9A**) se indican los grados de daño según la clasificación manual. A la derecha (**Figura 9B**) se observa la imagen que brinda el software. El software eliminó (zonas contorneadas en gris) cometas que podrían haber sido reconocidos. Se puede ver que hay casos, donde reconoció cometas que se encontraban en otro plano de forma incorrecta, como los cometas señalizados como 1 o 8.

Luego, se puede denotar que el programa no distinguió correctamente entre cabeza y cola. Como por ejemplo, el cometa 11 se puede ver que reconoció por fuera de donde se situaba la cabeza y sobreestimó la longitud de la cola del cometa. Se puede denotar que el programa se adaptó mejor a la estructura de los cometas 2 y 3, con grado de daño 1 y parámetros (longitud del cometa, cabeza y cola, así como el momento olive) muy similares.

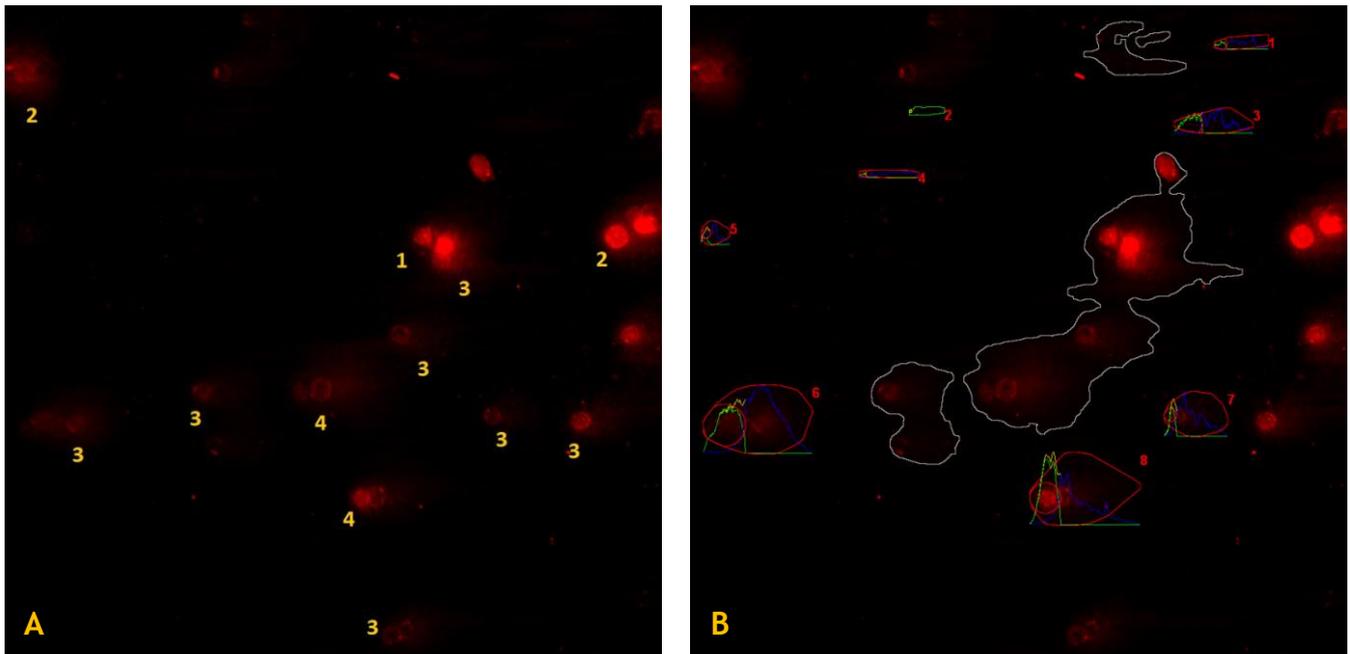


	Número	Selección	Longitud cometa	Longitud cabeza	Longitud cola	Momento Olive	Grado de daño
CONTROL	1	normal	75	18	57	2.11E+16	-
CONTROL	5	outlier	130	50	80	3.51E+16	-
CONTROL	6	outlier	136	44	92	3.39E+15	-
CONTROL	8	normal	91	10	81	2.34E+16	-
CONTROL	2	normal	73	54	19	2.82E+16	1
CONTROL	3	normal	81	58	23	2.95E+15	1
CONTROL	7	normal	77	42	35	5.60E+15	1
CONTROL	11	normal	87	16	71	4.00E+14	1
CONTROL	4	normal	91	44	47	1.07E+16	2
CONTROL	9	normal	77	26	51	1.66E+16	2
CONTROL	10	normal	83	28	55	1.66E+16	2

Figura 9. Comparación entre análisis manual del grado de daño y lo obtenido mediante software *OpenComet* en imágenes a 20X de células VERO sin tratar (control). **(A)** Clasificación manual en base al grado de daño ($\alpha=1-5$) el cual se denota en amarillo **(B)** Reconocimiento de la estructura del cometa mediante *OpenComet*. Contorno rojo: cometas normal donde se puede ver Perfil VERDE: cabeza de cometa, Perfil AMARILLO: cola de cometa y Perfil AZUL: Cometa (igual a cabeza más cola). Contorno amarillo: cometa outlier. Contorno GRIS: Forma eliminada. El número en rojo corresponde la asignación del cometa que luego se puede ver la correspondencia en la *Tabla inferior*: Parámetros que se obtienen mediante *OpenComet* (Longitud cometa, longitud cabeza, longitud cola y momento olive), la última columna corresponde a la clasificación manual (grado de daño). En dicha columna se señala con - cuando el programa no logró reconocer el cometa o reconoció alguna estructura que no era un cometa. *outlier*: corresponde a un reconocimiento de un cometa atípico. *normal*: cometa normal

En la **Figura 10** se muestra la clasificación manual (**Figura 10A**) y realizada por el *OpenComet*, de cometas de células tratadas con BLEO. Tal como se observó en la figura anterior, hay cometas que no fueron reconocidos como tales. Asimismo, el software reconoció estructuras que no corresponden a cometas, como las enumeradas como 1, 3 y 5.

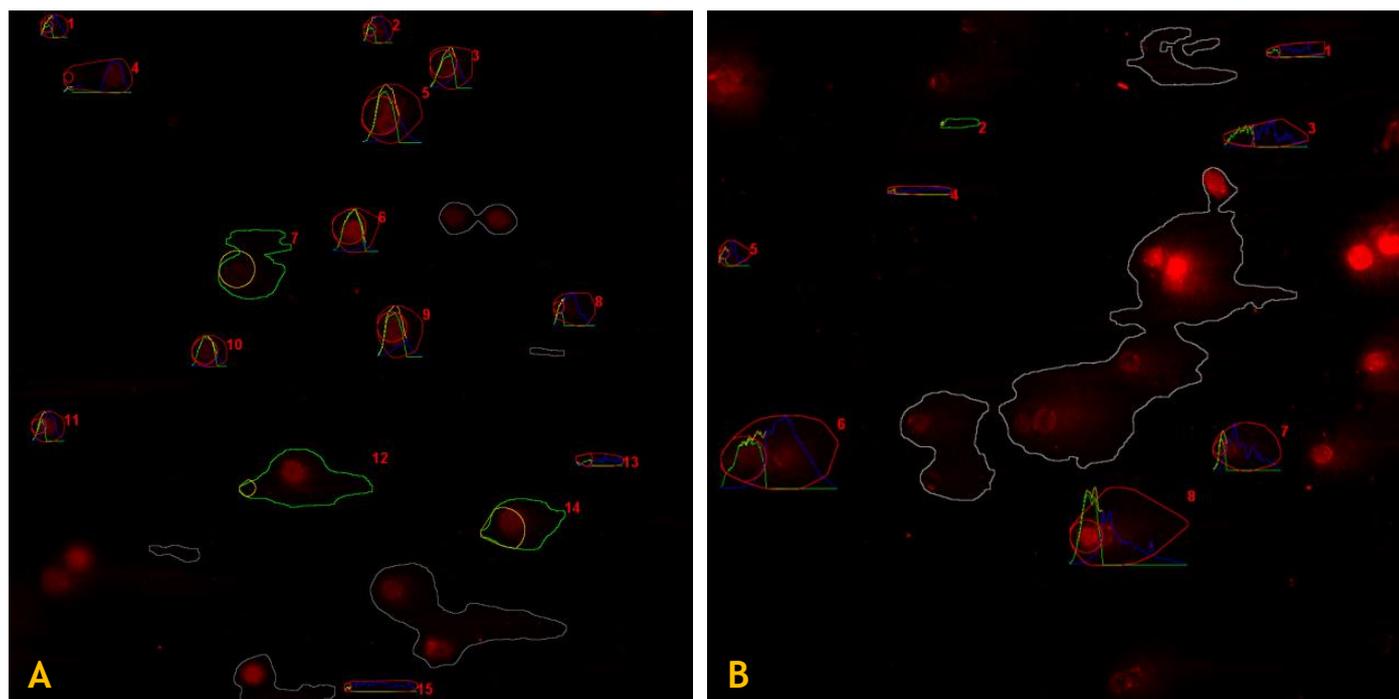
También se puede denotar que por ejemplo, para dos de los cometas con grado de daño 3 como lo son los cometas 6 y 7, los parámetros obtenidos fueron muy dispares. A su vez, el cometa reconocido como 6 presenta más similitud en cuanto a los parámetros con el cometa 8, al cual le corresponde un grado 4 en el análisis visual y no un 3. Por lo tanto, tenemos falta de coherencia interna y con respecto a la clasificación manual.



	Número	Selección	Longitud cometa	Longitud cabeza	Longitud cola	Momento Olive	Grado de daño
BLEO	1	normal	85	20	65	2.81E+16	-
BLEO	2	outlier	55	4	51	2.64E+16	-
BLEO	3	normal	123	44	79	2.54E+16	-
BLEO	4	normal	93	12	81	4.85E+16	-
BLEO	5	normal	45	14	31	1.11E+16	-
BLEO	6	normal	170	66	104	3.80E+15	3
BLEO	7	normal	99	20	79	2.19E+16	3
BLEO	8	normal	172	48	124	2.23E+15	4

Figura 10. Comparación entre análisis manual del grado de daño y lo obtenido mediante software *OpenComet* en imágenes a 20X de células VERO tratadas con BLEO. (A) Clasificación manual en base al grado de daño ($\alpha=1-5$) el cual se denota en amarillo (B) Reconocimiento de la estructura del cometa mediante *OpenComet*. Contorno rojo: cometas normal donde se puede ver Perfil VERDE: cabeza de cometa, Perfil AMARILLO: cola de cometa y Perfil AZUL: Cometa (igual a cabeza más cola). Contorno amarillo: cometa outlier. Contorno GRIS: Forma eliminada. El número en rojo corresponde la asignación del cometa que luego se puede ver la correspondencia en la *Tabla inferior*: Parámetros obtenidos mediante *OpenComet*: Longitud cometa, longitud cabeza, longitud cola y momento olive, la última columna corresponde a la clasificación manual (grado de daño). En dicha columna se señala con - cuando el programa no logró reconocer el cometa o reconoció alguna estructura que no era un cometa. *outlier*: corresponde a un reconocimiento de un cometa atípico. *normal*: cometa normal

En la **Figura 11** se comparan los outputs del *OpenComet* para una imagen de control (**Figura 11A**) y una de BLEO (**Figura 11B**). En la tabla inferior se comparan los resultados, núcleo a núcleo, con el grado de daño manual (columna derecha), resaltando contraejemplos de las imágenes obtenidas mediante el análisis manual del grado de daño y lo obtenido mediante *OpenComet*.

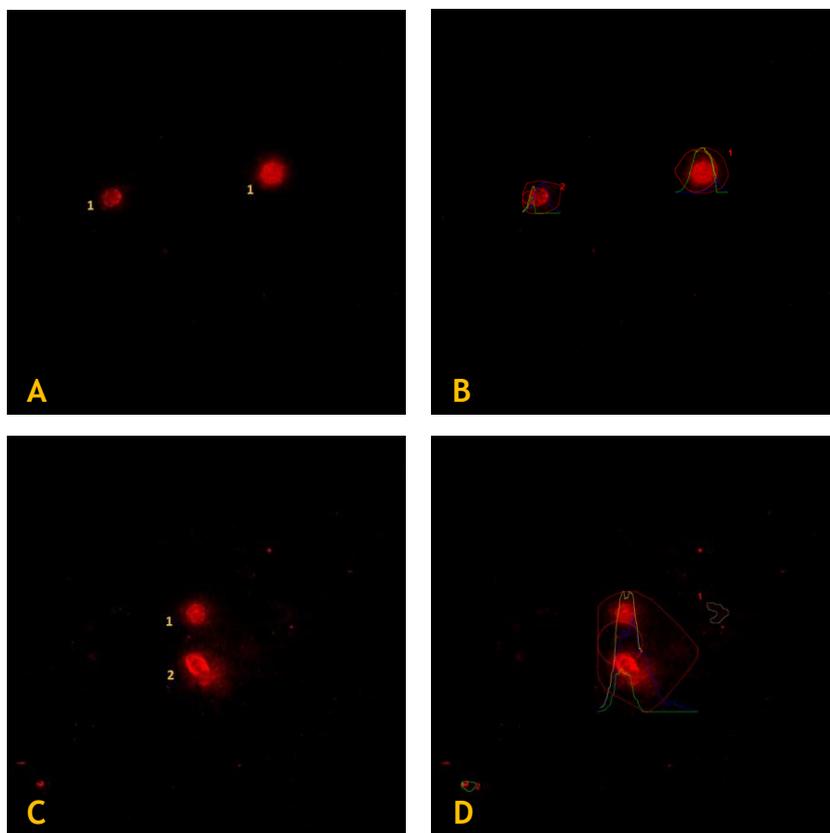


	Número	Selección	Longitud cometa	Longitud cabeza	Longitud cola	Momento Olive	Grado de daño
CONTROL	4	normal	102.00	14.00	88.00	6.40E+15	1
CONTROL	12	outlier	199.00	24.00	175.00	6.94E+15	2
CONTROL	14	outlier	126.00	66.00	60.00	7.82E+15	2
BLEO	6	normal	170	66	104	3.80E+15	3
BLEO	7	normal	99	20	79	2.19E+16	3
BLEO	8	normal	172	48	124	2.23E+15	4

Figura 11. Contraejemplos de imágenes obtenidas mediante análisis manual del grado de daño y lo obtenido mediante software *OpenComet* en imágenes a 20X de células VERO. **(A)** Imagen obtenida mediante *OpenComet* de la condición control **(B)** Imagen obtenida mediante *OpenComet* de células VERO tratadas con BLEO. Contorno rojo: cometas normal, donde se puede ver *Perfil verde*: cabeza de cometa, *Perfil amarillo*: cola de cometa y *Perfil azul*: Cometa (igual a cabeza más cola). Contorno amarillo: cometa outlier. Contorno gris: forma eliminada. El número en rojo corresponde la asignación del cometa que luego se puede ver la correspondencia en la *Tabla inferior*: Tabla con datos representativos de contraejemplos donde los parámetros que se obtienen mediante *OpenComet* se contraponen con el grado de daño. Parámetros obtenidos mediante *OpenComet*: Longitud cometa, longitud cabeza, longitud cola y momento olive, la última columna corresponde a la clasificación manual en base al grado de daño ($\alpha=1-5$). *outlier*: corresponde a un reconocimiento de un cometa atípico. *normal*: cometa normal.

Se puede visualizar que hay cometas que les corresponde un grado de daño con valor 1 (cometa número 4), presentan parámetros similares a un cometa que le corresponde un grado de daño con valor 3 (cometa número 7). Asimismo, se puede notar que por ejemplo, un cometa con grado de daño 2 (cometa número 12), presenta parámetros similares e incluso un poco mayores que un cometa clasificado con un grado de daño 4 (cometa número 8).

Además de registrar las imágenes a 20X (**Figuras 9, 10 y 11**), también se registró a 40X (**Figura 12**). Se comparan para condiciones control (**Figura 12A y B**) y BLEO (**Figura 12C y D**), las clasificaciones manuales (**Figura 12A y C**) vs las obtenidas con el *OpenComet* (**Figura 12B y D**). Se incluye además una tabla de igual manera que a 20X, se observó que el programa no logró discernir correctamente entre cabeza y cola. Por ejemplo, en el caso del cometa CONTROL 2 (**Tabla y Figura 12B**), la longitud de la cabeza fue subestimada y la longitud del cola sobreestimada. Asimismo, si comparamos el momento olive para los dos cometas del control, de grado 1, difieren considerablemente ($3,8 \times 10^{15}$ vs $2,3 \times 10^{16}$). Por otro lado, en la **Figura 12D** se observa que el programa se le dificultó reconocer de manera independiente dos cometas cercanos.



	Número	Selección	Longitud cometa	Longitud cabeza	Longitud cola	Momento Olive	Grado de daño
CONTROL	1	normal	133	104	29	3,8E+15	1
CONTROL	2	normal	95	32	63	2,3E+16	1
BLEO	1	normal	251	113	138	1,9E+15	-
BLEO	2	outlier	36	6	30	8,6E+15	-

Figura 12. Comparación entre análisis manual del grado de daño y lo obtenido mediante software *OpenComet* en imágenes a 40X de células VERO condiciones: CONTROL (A-B) y BLEO (C-D). (A y C): Clasificación manual en base al grado de daño ($\alpha=1-5$) el cual se denota en amarillo. (B y D): Reconocimiento de la estructura del cometa mediante *OpenComet*. Contorno rojo: cometas normal donde se puede ver Perfil VERDE: cabeza de cometa, Perfil AMARILLO: cola de cometa y Perfil AZUL: Cometa (igual a cabeza más cola). Contorno amarillo: cometa outlier. Contorno GRIS: Forma eliminada. El número en rojo corresponde la asignación del cometa que luego se puede ver la correspondencia en la *Tabla inferior*: Parámetros obtenidos mediante *OpenComet*: Longitud cometa, longitud cabeza, longitud cola y momento olive, la última columna corresponde a la clasificación manual (grado de daño). En dicha columna se señala con - cuando el programa no logró reconocer el cometa o reconoció alguna estructura que no era un cometa. *outlier*: corresponde a un reconocimiento de un cometa atípico. *normal*: cometa normal.

A partir de todas las imágenes observadas a 40X y comparando los parámetros obtenidos, se denotó que el parámetro que mejor se ajustó fue la longitud del cometa (al menos mostró una tendencia al aumento en presencia de bleomicina y no al revés).

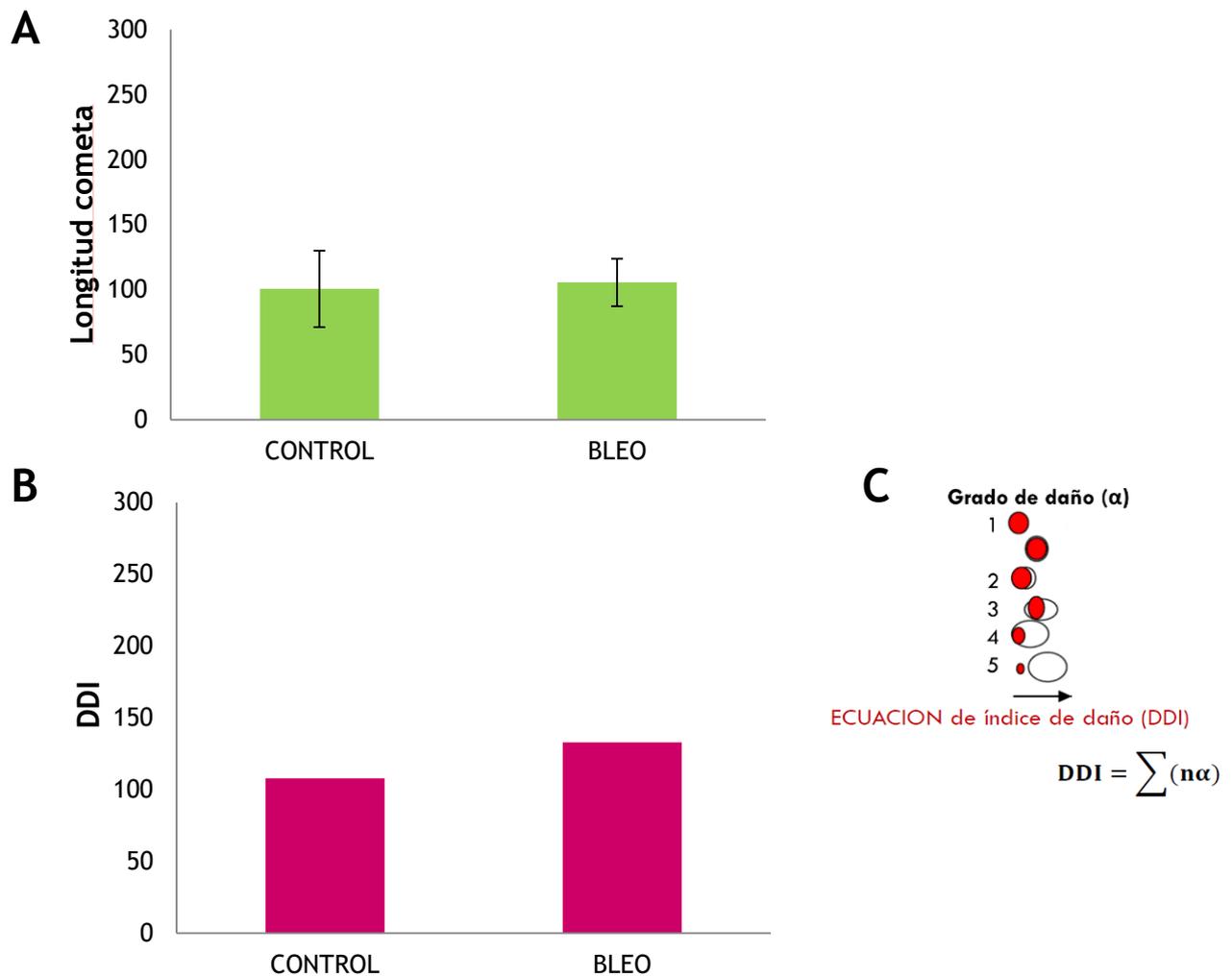


Figura 13. La longitud del cometa fue el parámetro que mejor se ajustó a lo esperable en comparación al índice de daño (DDI) obtenido mediante la clasificación visual. Esta comparación proviene de un único experimento para las condiciones CONTROL y BLEO utilizando imágenes a 40X, con $n \geq 10$ núcleos para cada condición. **(A)** Gráfico correspondiente a la longitud del cometa (longitud de la región del cometa en píxeles) obtenido mediante el software *OpenComet*. Media \pm SD. **(B-C)** Se evaluó utilizando el DDI para cada condición. Para calcular el DDI, a cada cometa se le asignó un grado de 1 a 5, donde 1: compacto o con halo simétrico; 2: halo asimétrico; 3: longitud de la cola=longitud de la cabeza; 4: longitud de la cola > longitud de la cabeza; 5: cabeza separada de la cola. Luego se aplicó la ecuación mostrada donde n es el número de células y α el grado de daño para 100 células por condición experimental.

En la **Figura 13**, se muestra la comparación de dicho parámetro con el DDI obtenido mediante la clasificación visual para una muestra pequeña. El DDI fue más sensible que la longitud del cometa para mostrar el efecto de BLEO.

Dadas las inconsistencias observadas utilizando el software *OpenComet*, se decidió hacer capturas a 20X y analizar las imágenes mediante la clasificación de grado de daño.

5.2 OLA no afectó la viabilidad celular *per se*, ni potenció el efecto de BLEO incluso en presencia de un pool de inhibidores de enzimas de reparación de ADN

Según algunos autores (Dueva & Iliakis, 2013; Mladenov & Iliakis, 2011), la activación de PARP-1 participa en A-NHEJ pero no en HR o C-NHEJ. Si este fuera el caso, entonces el bloqueo simultáneo de HR y C-NHEJ debería dejar las células dependientes de A-NHEJ, por ende dependientes de PARP-1. Planteamos que la inhibición simultánea de DNA-PK, LigIV y ATM induciría la muerte de las células remanentes o las obligaría a cambiar a A-NHEJ, volviéndose así dependientes de PARP y sensibles a OLA (inhibidor de PARP-1, PARP-2 y PARP-3). Para testar esa hipótesis, se realizaron estudios de viabilidad celular con la técnica de MTT.

En condiciones basales (en ausencia de BLEO), un tratamiento continuo con OLA (45min + 72 h) por sí mismo no afectó la viabilidad celular (**Figura 14A**). En cambio, un tratamiento continuo con 3i (45 min + 72h), consistente en una combinación de inhibidores de DNA-PK (KU-0060648), LigIV (SCR7 pirazina) y ATM (KU55933), disminuyó significativamente la viabilidad celular. Esto indica que los 3i actuaron, afectando así la reparación de DSBs originadas endógenamente. Hay que destacar que habrían sido afectados por estos inhibidores HR (al inhibir ATM) y C-NHEJ (al inhibir DNA-PK y LigIV).

Luego de un tratamiento con BLEO de 45 min y un tiempo de recuperación de 72 hs (**Figura 14B**), tampoco se observó diferencia significativa en presencia de OLA y nuevamente se observó caída de la viabilidad celular en presencia de 3i (comparando con BLEO sola o en presencia del vehículo de esos inhibidores, DMSO). Finalmente, se constató que en presencia de 3i, tampoco ocurrió sensibilización por OLA.

En suma, OLA no afectó la viabilidad celular en condiciones basales, ni en presencia de BLEO o el pool de inhibidores.

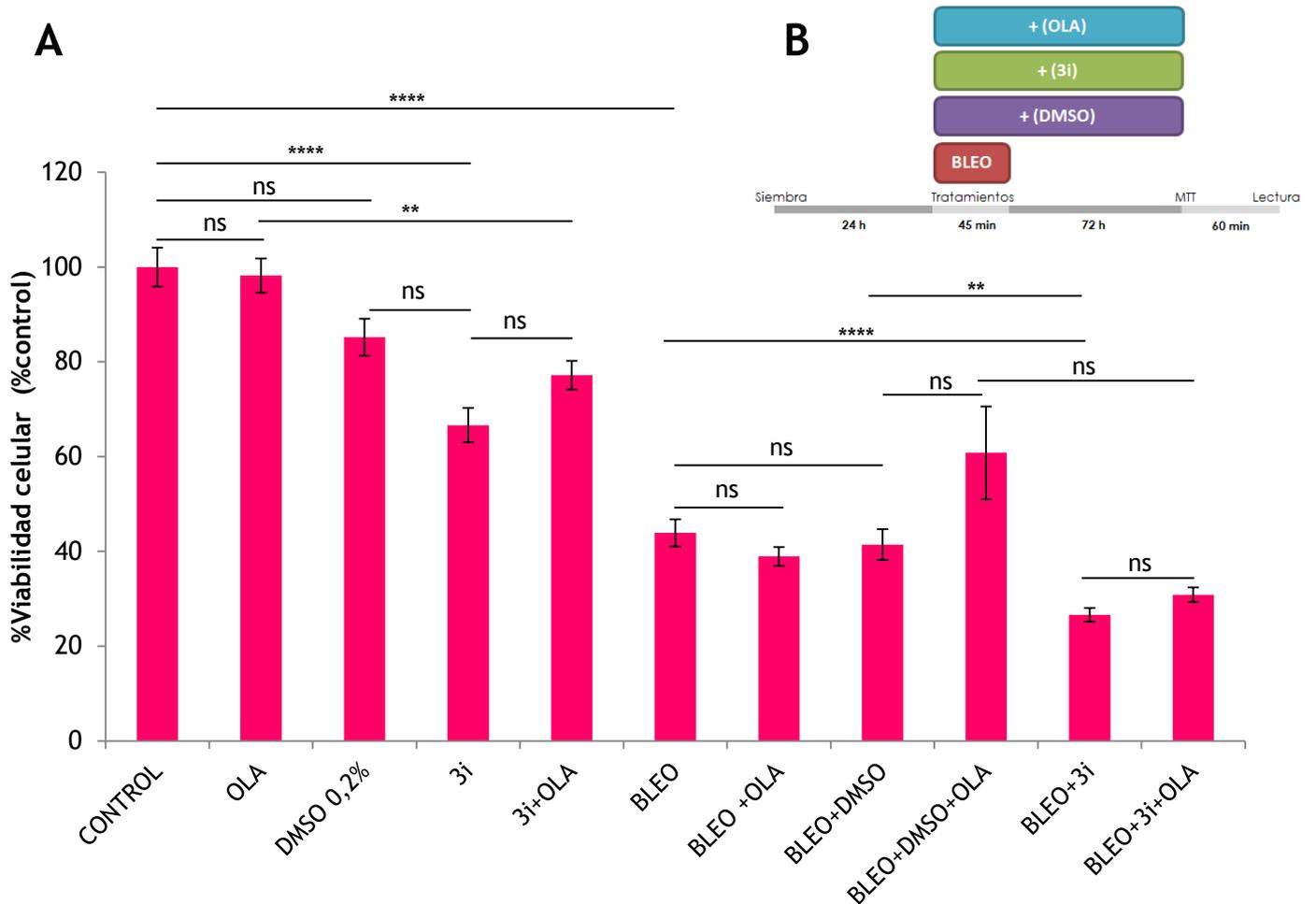


Figura 14. OLA no afectó la viabilidad celular en condiciones basales ni potenció el efecto de BLEO en las células VERO, incluso en presencia de inhibidores de las vías de reparación de DSB. **(A)** La viabilidad celular en relación con el control (MTT 72 h) de las células tratadas con BLEO en ausencia o presencia de OLA y 3i. DMSO 0,2% corresponde al control de vehículo del pool de inhibidores 3i. La mayoría de los datos fueron de cinco experimentos independientes, con $n = 21, 44, 21, 44, 36, 26, 52, 26, 8, 44$ y 44 . La condición BLEO+DMSO+OLA proviene de 2 experimentos. Media \pm SEM. Se realizó ANOVA de un factor y prueba post-hoc Tamhane que no asume varianzas iguales. ns: no significancia estadística, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$ **(B)** Esquema temporal. 3i: es un pool de inhibidores de enzimas de reparación de las vías de rotura de doble cadena (inhibidor de DNA-PK $0,1 \mu\text{M}$ KU-0060648 + inhibidor de LigIV $0,1 \mu\text{M}$ SCR7 pirazina + $10 \mu\text{M}$ ATM inhibidor KU55933). OLA (Olaparib, inhibidor de PARP-1/-2/-3 50 nM).

5.3 OLA no disminuyó el índice de daño inicial inducido por BLEO, incluso en presencia de inhibidores de ATM, DNAPK y LigIV

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos mediante los ensayos de MTT, y de modo de testar si el daño inicial por BLEO no había sido afectado por alguna posible interferencia de los tratamientos realizados, se realizó el ensayo cometa.

El índice de daño (DDI) se calculó como se indica en la **Figura 15A**, como una sumatoria de términos en los cuales se multiplica el grado de daño α que va de 1 a 5 por la cantidad n de células con ese grado de daño (si las células no son justo 100, se normalizan como si fueran porcentajes los conteos por categorías antes de calcular el índice, de modo que n total sea 100).

En la **Figura 15B** se muestran ejemplos de campos obtenidos en diversas condiciones experimentales. Como se aprecia en **Figura 15C**, BLEO indujo un aumento significativo del DDI luego de un tratamiento de 45 min (como se indica en **Figura 15D**). A su vez, se puede ver que el daño inicial inducido por BLEO no disminuyó al utilizar cualquiera de los inhibidores, tanto cuando solo se adicionó OLA como 3i o la combinación de ambos tratamientos.

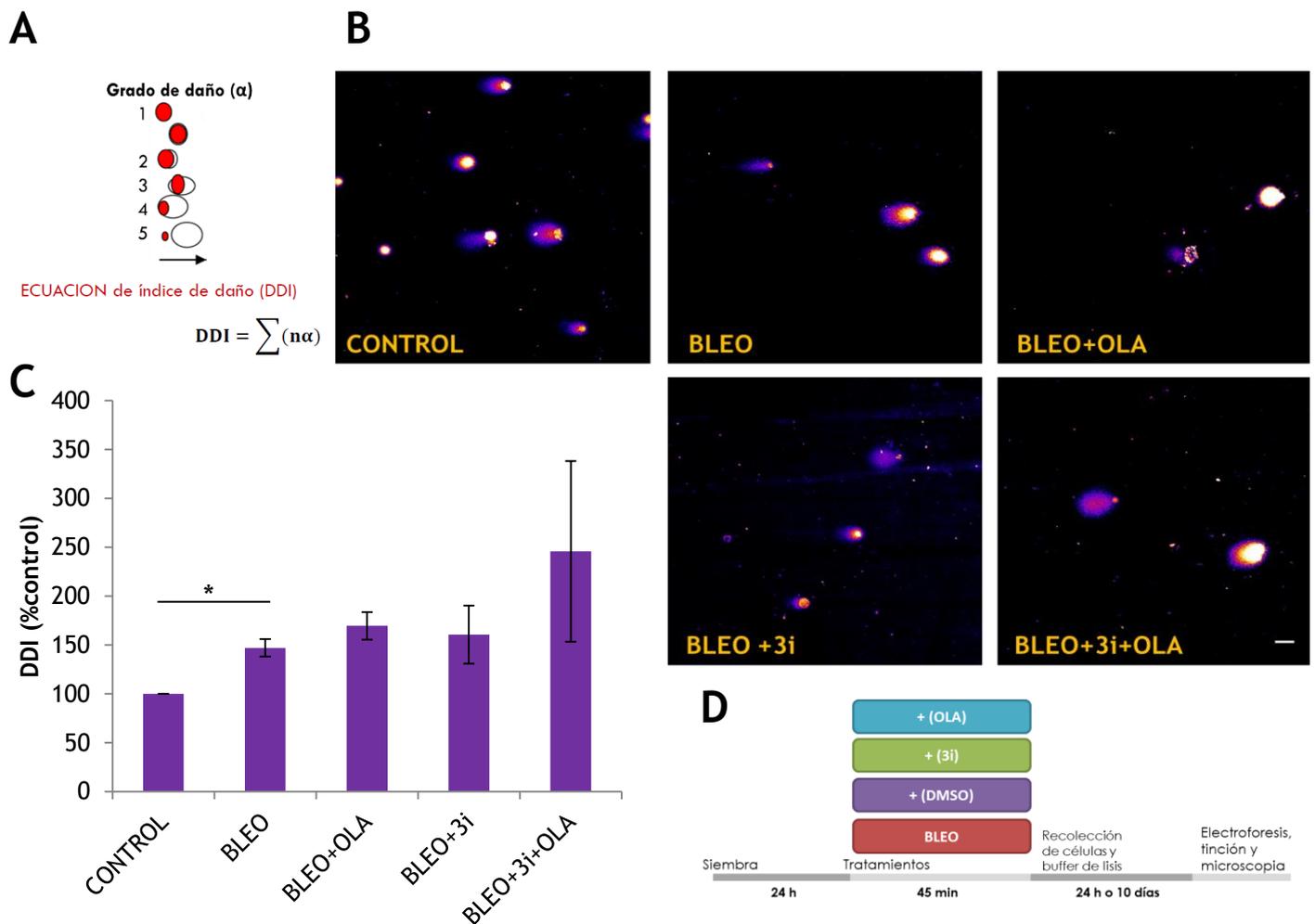


Figura 15. Los inhibidores de enzimas de reparación (OLA y 3i) no impidieron la inducción de daño inicial por BLEO, de acuerdo al ensayo cometa. Se evaluó el daño inicial del ADN inducido por BLEO en presencia o ausencia del co-tratamiento OLA, 3i y 3i+OLA. **(A)** El ensayo del cometa se evaluó utilizando el índice de daño del ADN (DDI). Para calcular el DDI, a cada cometa se le asignó un grado de 1 a 5, donde 1: compacto o con halo simétrico; 2: halo asimétrico; 3: longitud de la cola=longitud de la cabeza; 4: longitud de la cola> longitud de la cabeza; 5: cabeza separada de la cola. Luego se aplicó la ecuación mostrada donde n es el número de células y α el grado de daño para 100 células por condición experimental. **(B)** Imágenes representativas de electroforesis unicelular o ensayo cometa. Para evidenciar mejor cabeza y cola del cometa se cambió la forma de visualización LUT (Look Up Table). Barra: 30 μ m. **(C)** Los resultados se normalizaron con respecto al control. Media \pm SEM. Se utilizó test de t para muestras con varianzas desiguales: CONTROL vs BLEO $p=0,03369$, BLEO vs BLEO+OLA $p=0,260$ y BLEO+3i vs BLEO+3i+OLA $p=0,702$. Los datos provienen de al menos dos experimentos independientes de imágenes a 20X, con $n \geq 210$ células/condición. *: $p < 0.05$. **(D)** Esquema temporal del ensayo. 3i: es un pool de inhibidores de enzimas de reparación de las vías de rotura de doble cadena (inhibidor de DNA-PK 0,1 μ M KU-0060648 + inhibidor de LigIV 0,1 μ M SCR7 pirazina + 10 μ M ATM inhibidor KU55933). OLA (Olaparib, inhibidor de PARP-1/-2/-3 50 nM)

5.4 OLA no disminuyó la inducción de la fosforilación de H2AX por BLEO, incluso en presencia de inhibidores de ATM, DNAPK y LigIV

La inducción de daño en el ADN en células VERO se evaluó mediante ICF con anticuerpos anti- γ H2AX (rojo, Figura 16B) y anti-53BP1 (verde, Figura 16B) y contratinción con DAPI (azul, Figura 16B).

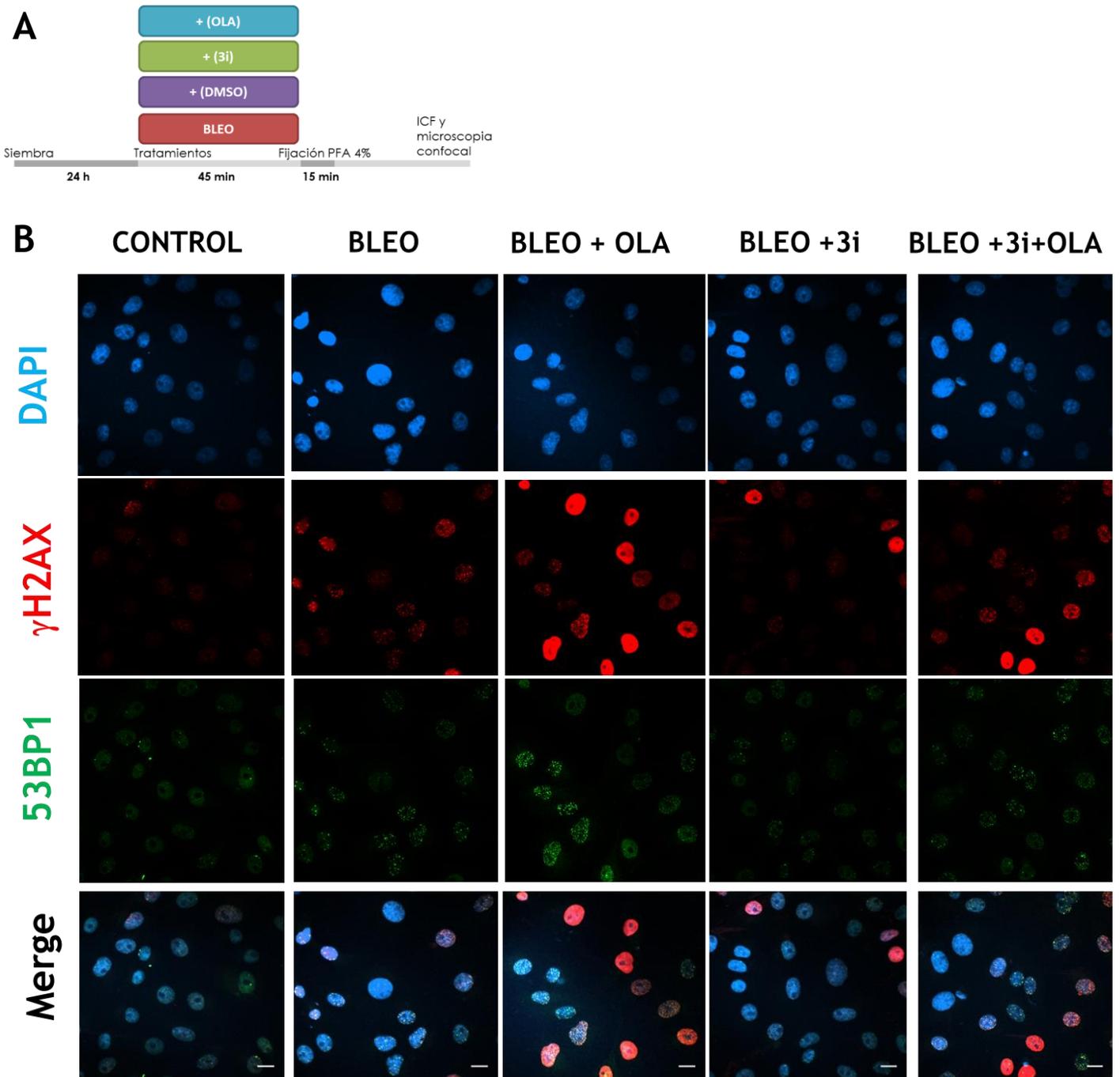


Figura 16. Se evaluó el daño inicial del ADN inducido por BLEO en presencia o ausencia del co-tratamiento OLA, 3i y 3i+OLA mediante la inmunomarcación de γ H2AX y la activación de la vía C-NHEJ mediante la inmunomarcación de 53BP1. (A) Esquema temporal. (B) Imágenes representativas de inmunocitoquímica. DAPI en azul; γ H2AX en rojo; 53BP1 en verde y merge. 3i: es un pool de inhibidores de enzimas de reparación de las vías de rotura de doble cadena (inhibidor de DNA-PK 0,1 μ M KU-0060648 + inhibidor de LigIV 0,1 μ M SCR7 pirazina + 10 μ M ATM inhibidor KU55933). OLA (Olaparib, inhibidor de PARP-1/-2/-3 50 nM). Barra: 20 μ m.

Se evaluó la marcación γ H2AX en células control o tratadas durante 45 min (**Figura 17A**) expuestas a BLEO sola o con OLA. Asimismo, utilizando DMSO como vehículo, se comparó el daño inducido por BLEO sola (BLEO + DMSO), con OLA (BLEO + DMSO + OLA), con 3i (BLEO + 3i) o con todos (BLEO+ 3i + OLA).

Se detectaron pocas células con marcación pan-nuclear (**Figura 17B**), y con mucha variación entre los campos. Con la dosis utilizada (40 μ g/mL), BLEO mostró apenas una tendencia al aumento de pan-nucleares con respecto al control ($p=0.130$) pero no con respecto a los co-tratamientos con OLA y 3i. Por ejemplo, $p=0.817$ para BLEO + DMSO vs BLEO + 3i.

El porcentaje de células con focos γ H2AX (**Figura 17C**) indicó que las células VERO estaban más dañadas al emplear BLEO (sola o con el solvente DMSO) en comparación al CONTROL (CONTROL vs BLEO $p=0.005$, CONTROL vs BLEO + DMSO $p= 0,04$).

Al combinar BLEO con OLA (en ausencia o presencia del vehículo), no se observó aumento ni disminución del porcentaje de células con focos γ H2AX en comparación con BLEO ($p=0.619$). Al combinar BLEO con 3i si bien el error estándar es grande, se detectó una tendencia a la disminución del porcentaje de células con focos respecto al tratamiento con BLEO ($p=0.112$); no así con respecto al control ($p=0.71$). Este resultado sugirió que hay una fosforilación basal, anterior al tratamiento, que no fue afectada; que los inhibidores tuvieron efecto al menos en parte de la población celular; que podría haber alguna otra quinasa involucrada.

No se observó diferencia entre BLEO+3i y BLEO+3i+OLA. Por lo que la combinación de OLA con 3i indudablemente no interfirió con BLEO para evitar la inducción inicial del daño del ADN.

Con respecto al número de focos por célula (excluyendo las pan-nucleares, **Figura 17D**), los datos obtenidos, provenientes de la evaluación de 3 experimentos (uno de ellos incluyendo BLEO y BLEO+OLA sin DMSO; los otros, con DMSO), mostraron las mismas tendencias que el porcentaje de células con focos γ H2AX, sin llegar a niveles de significación estadística.

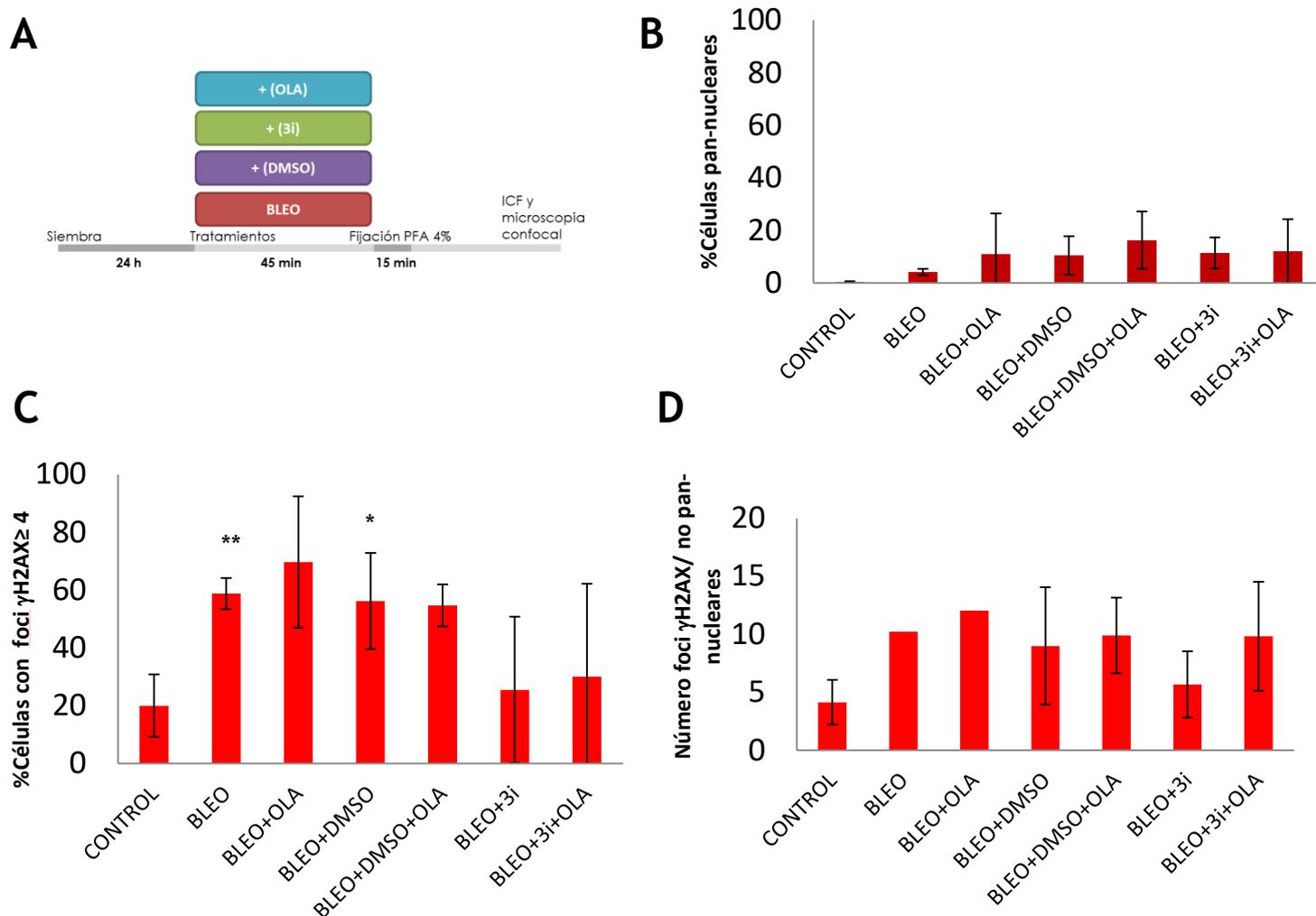


Figura 17. Los inhibidores de enzimas de reparación (OLA y 3i) no impidieron la inducción de daño inicial por BLEO, de acuerdo a la evaluación de foci γ H2AX. Se evaluó el daño inicial del ADN inducido por BLEO en presencia o ausencia del co-tratamiento OLA, 3i y 3i+OLA. (A) Esquema temporal del ensayo (B) %Células pan-nucleares para las distintas condiciones experimentales. (C) %Células con foci γ H2AX ≥ 4 . (D) Número de foci γ H2AX/célula no pan-nuclear. El conjunto de datos proviene de 5 experimentos ($n \geq 192$ células/condición), con la salvedad que en 3 experimentos se trató con BLEO y BLEO+OLA sin DMSO y en 2 experimentos, en presencia del vehículo de los 3i. Los foci γ H2AX se contaron en 3 de los experimentos. Nota: los puntos que provienen de un único experimento se identifican por la ausencia de barras de error. Todos los resultados se expresan como Media \pm SD. Se utilizó test de t para muestras con varianzas desiguales. *: $p < 0,05$, **: $p < 0.01$ 3i: es un pool de inhibidores de enzimas de reparación de las vías de rotura de doble cadena (inhibidor de DNA-PK 0,1 μ M KU-0060648 + inhibidor de LigIV 0,1 μ M SCR7 pirazina + 10 μ M ATM inhibidor KU55933). OLA (Olaparib, inhibidor de PARP-1/-2/-3 50 nM)

En suma, 3i utilizados en concentraciones descritas en la literatura (Liddle et al., 2020; Perini et al., 2020) mostraron una tendencia a disminuir la fosforilación de H2AX en células VERO. OLA no afectó significativamente la inducción de daño por BLEO sólo ni tampoco en presencia de 3i. Esto iría contra la hipótesis de la existencia de una interferencia entre OLA y 3i que impidiera la inducción de daño por BLEO.

5.5 Resultados preliminares sugerirían un aumento de focos 53BP1 al adicionar OLA en presencia de 3i

Es conocido que 53BP1 actúa en la vía C-NHEJ (Gupta et al., 2014; Jiang et al., 2021; Swift et al., 2021), por este motivo la formación de focos 53BP1 en ICF se utiliza como marcador molecular de la activación de esta vía. Para estudiar cómo la inhibición de ciertas enzimas repercute en la activación de la vía canónica, evaluamos la formación de focos 53BP1 mediante ICF (**Figura 18**).

En un intento por bloquear HR y C-NHEJ para forzar a la célula a utilizar A-NHEJ o morir, se utilizaron: un inhibidor de ATM (para bloquear HR) y dos inhibidores de enzimas de C-NHEJ que se encuentran en distintos niveles de la vía, concretamente DNA-PK y LigIV. Si la viabilidad se mantenía significaba que las células habían optado por A-NHEJ (esto fue evidenciado en los ensayos de MTT).

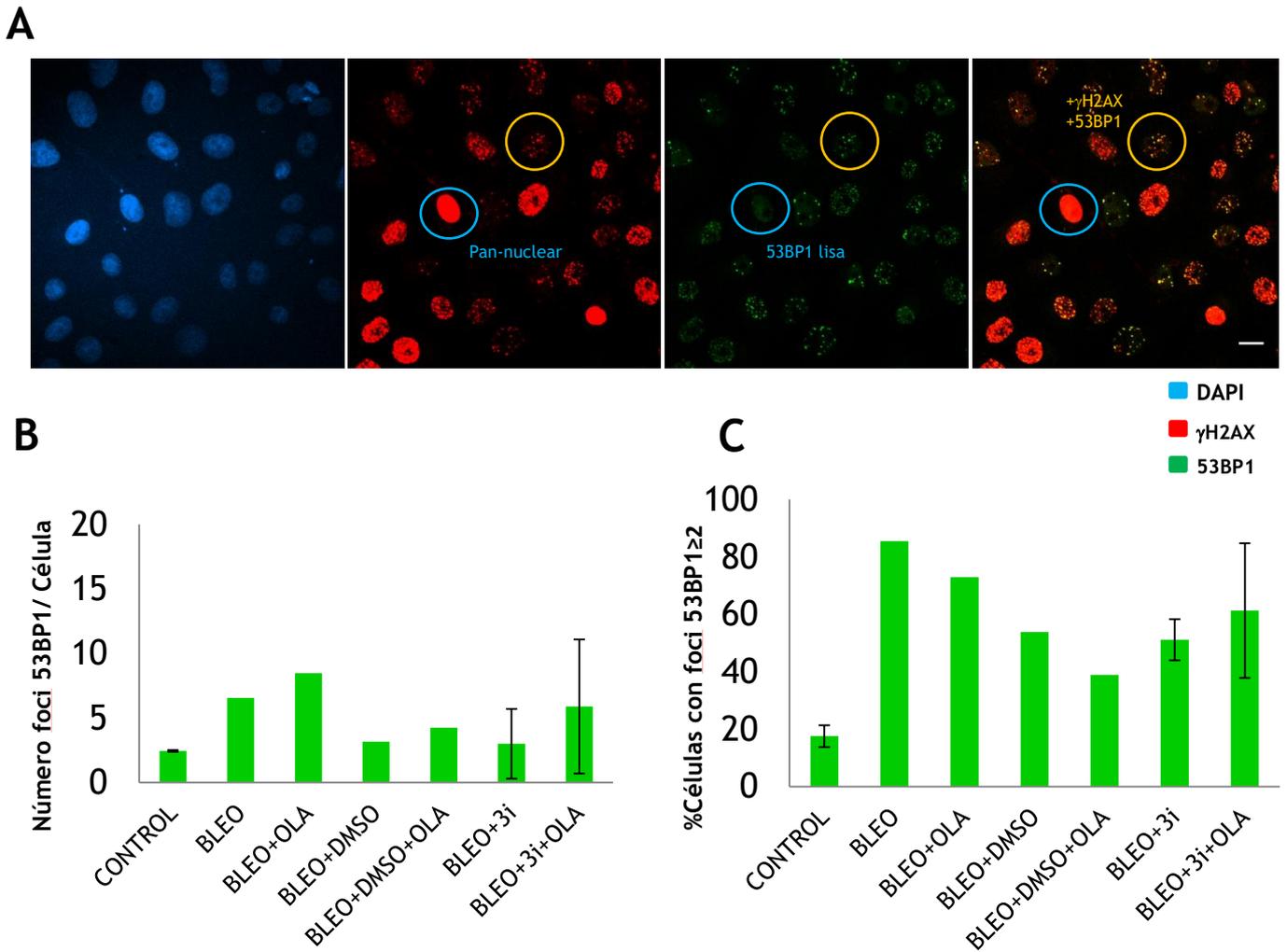


Figura 18. Análisis preliminares evidencian una tendencia de que al adicionar OLA aumenta el reclutamiento de 53BP1, enzima característica de C-NHEJ. Se evaluó la respuesta inicial al daño en el ADN inducido por BLEO en presencia o ausencia del co-tratamiento OLA, 3i y 3i+OLA. **(A)** Imágenes representativas de inmunocitoquímica. Ordenados de izquierda-derecha se muestra: DAPI en azul; γ H2AX en rojo; 53BP1 en verde y canales superpuestos. En celeste se señala un ejemplo de célula pan-nuclear que es 53BP1 lisa, luego en amarillo se señala una célula con foci γ H2AX y 53BP1. Barra: 20 μ m. **(B)** Número de foci 53BP1/célula. **(C)** %Células con foci 53BP1 \geq 2. El conjunto de datos proviene de 2 experimentos ($n \geq 192$ células/condición). Nota: los puntos que provienen de un único experimento se identifican por la ausencia de barras de error. Todos los resultados se expresan como Media \pm SD 3i: es un pool de inhibidores de enzimas de reparación de las vías de rotura de doble cadena (inhibidor de DNA-PK 0,1 μ M KU-0060648 + inhibidor de LigIV 0,1 μ M SCR7 pirazina + 10 μ M ATM inhibidor KU55933). OLA (Olaparib, inhibidor de PARP-1/-2/-3 50 nM)

Dos de los experimentos realizados según el esquema en la **Figura 17A** y evaluados para γ H2AX, fueron también evaluados en cuanto al reclutamiento de 53BP1 a los sitios dañados. Generalmente, se observaron que los focos γ H2AX se encuentran acompañados de focos 53BP1. En contraste, las células 53BP1 lisas no tenían focos γ H2AX o eran pan-nucleares (**Figura 18A**).

Se cuantificó el porcentaje de células con focos 53BP1 y el número de focos 53BP1 por célula (**Figura 18**). Si bien los datos son preliminares, las tendencias indican que BLEO indujo formación de focos 53BP1 en hasta 80% de las células, sugiriendo que la reparación habría ocurrido predominantemente utilizando la vía C-NHEJ, que es 53BP1-dependiente.

Habiendo 2 experimentos independientes para la comparación de BLEO + 3i con el tratamiento BLEO + 3i + OLA. En esta situación, tanto el porcentaje de células con focos 53BP1 como el número de focos por célula tienden a aumentar (**Figura 18B y C**). Si esta tendencia se confirmara, sugeriría que al tener inhibidas HR y C-NHEJ, las células habrían procurado activar la vía alternativa, A-NHEJ, pero al inhibir con OLA A-NHEJ, volvieron a intentar utilizar C-NHEJ y por esto, los focos se acumularon en los sitios de inducción del daño. Esto implicaría que DNA-PK y LigIV se encuentran *downstream* al reclutamiento de 53BP1.

6 DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha estudiado el impacto sobre la viabilidad celular, la inducción de daño genético, la fosforilación de H2AX en Ser 139 y el reclutamiento de 53BP1, del inhibidor de PARP-1/2-3 Olaparib sólo o en combinación con inhibidores de DNA-PK, LigIV y ATM, como posibles moduladores de los efectos de BLEO en células de la línea epitelial VERO.

Al extender los estudios de viabilidad realizados previamente, se confirmó que OLA no disminuye la viabilidad celular en presencia de BLEO (ya reportado en el informe PAIE), y además se comprobó utilizando ANOVA que OLA tampoco tiene un efecto citoprotector. De hecho, no se detectó efecto significativo alguno del OLA combinado con BLEO a la dosis utilizada (50 nM) sobre la viabilidad celular, la inducción de daño genético, los focos γ H2AX ni los focos 53BP1. Sin embargo, tenemos evidencia de la disminución de PAR en presencia de OLA (Perini et al., 2020). Por ende, OLA está logrando actuar sobre PARP.

Cabe preguntarse en primer lugar si las células VERO expresan PARP y sintetizan PAR. Sabemos que sí (Lafon-Hughes et al., 2014). También sabemos que se trata de una PARP mutada. Las células VERO albergan mutaciones de PARP de significado biológico desconocido. Esto merece un estudio más a fondo. Se ha descrito resistencia a iPARPs en una paciente con cáncer de ovario portadora de una mutación puntual en PARP-1 (Pettitt et al., 2018). A pesar de las mutaciones, existe PARilación en los núcleos de VERO. En condiciones basales hay PAR detectable con ciertos anticuerpos pero no con el anti-PAR H10 (que es el típico utilizado para detectar polímero de cadena larga ramificada, según Kawamitsu et al., 1984). En condiciones de estrés genotóxico en células VERO se puede detectar leve aumento de PAR. No se observó un aumento importante de PAR en respuesta al daño genotóxico inducido por diversos agentes incluyendo BLEO, MMS o UV-C (Lafon-hughes, 2014; Perini et al., 2020).

A priori, la presencia de DSBs podría a) activar PARP favoreciendo A-NHEJ frente a C-NHEJ (Beck et al., 2014) en cuyo caso adicionar OLA en la situación dificultaría la reparación por A-

NHEJ o desencadenarían la muerte celular, **b)** sobreactivar PARP-1 en cuyo caso inhibir con OLA protegería a la célula o **c)** por algún motivo no activar PARP, en cuyo caso podría no repararse las DSBs u ocurrir reparación de DSBs independiente de PARP, como C-NHEJ (Her & Bunting, 2018) (Her & Bunting, 2018) (**Figura 19**). En células VERO no se observó protección por OLA, descartando la sobreactivación de PARP. Tampoco se observó potenciación, sugiriendo que las células reparan preferentemente de manera independientes de PARP, por ejemplo por C-NHEJ. En consonancia con esto, los datos preliminares indicaron un aumento de los focos 53BP1 al tratar con BLEO, esto indica que la gran parte de la población celular repara el daño inducido por BLEO mediante C-NHEJ. Luego, se podría interpretar que un remanente de la población podría estar operando por HR (células que se encuentren en S/G2).

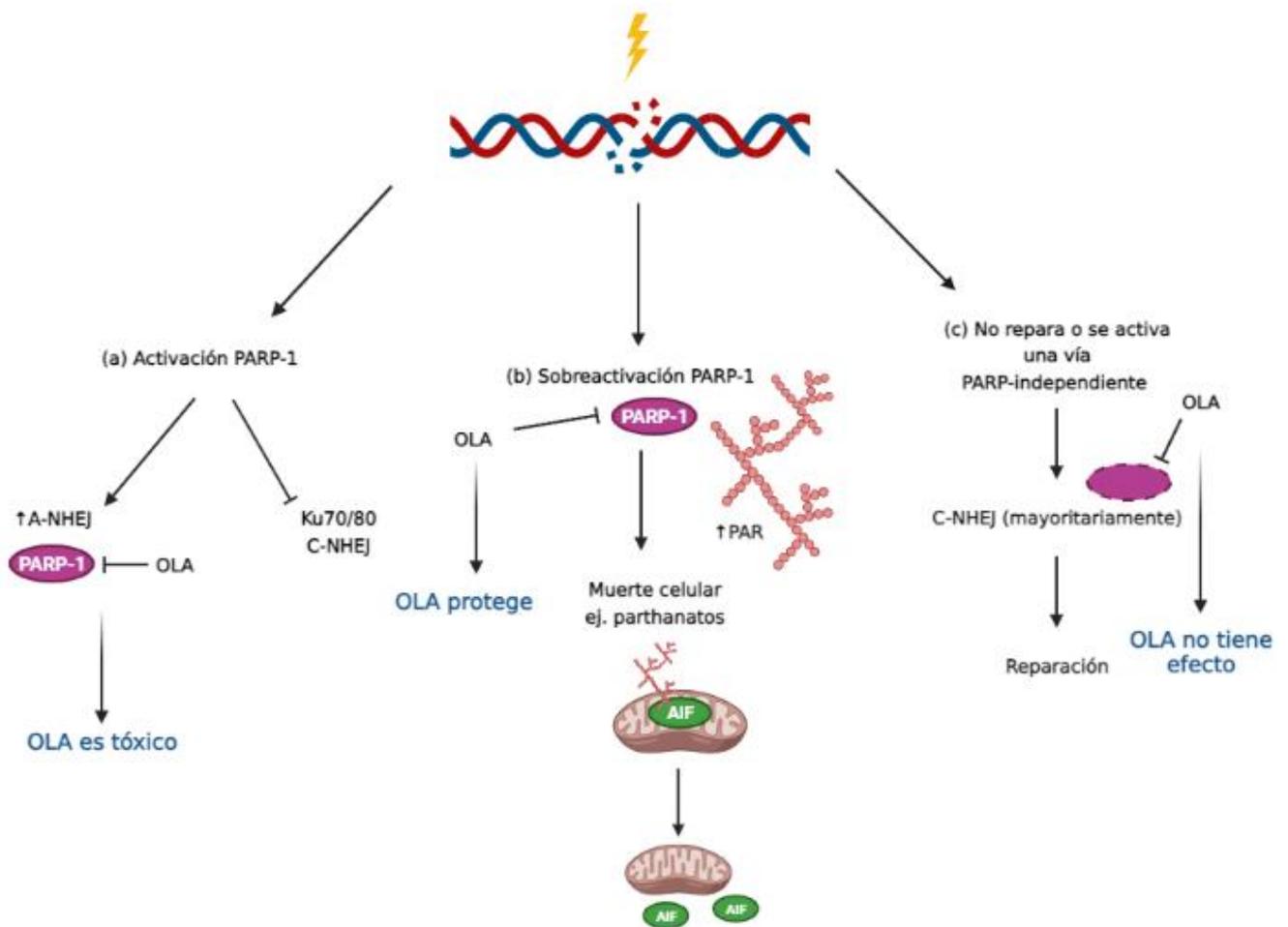


Figura 19. Ante la generación de una rotura de doble cadena se esquematiza las posibles respuestas según PARP-1 y el efecto de Olaparib (OLA) en cada situación: a) activar PARP favoreciendo A-NHEJ frente a C-NHEJ en cuyo caso adicionar OLA en la situación dificultaría la reparación por A-NHEJ o desencadenarían la muerte celular b) sobreactivación de PARP-1, donde se genera mayor síntesis de PAR y muerte celular, por ejemplo mediante parthanatos, en cuyo caso inhibir con OLA protegería a la célula c) por algún motivo no activar PARP, en cuyo caso podría no repararse las DSB u ocurrir reparación de DSBs independiente de PARP, como C-NHEJ, de ser así OLA no tendría efecto. Imagen generada en <https://biorender.com/>

De acuerdo al paradigma de efecto de iPARPs en contextos de letalidad sintética, dado que las células VERO no albergan mutaciones conocidas en los genes de reparación del ADN, era esperable que al inhibir con OLA las células no murieran. Entonces, se trataron las células no sólo con OLA (que inhibiría al menos A-NHEJ), sino también con iATM (para inhibir HR), iDNA-PK y LigIV (para inhibir C-NHEJ). Se esperaba observar letalidad sintética en estas condiciones. Bloquear estas vías obligaría a las células a volverse dependientes de PARP o morir. Las células se expusieron a BLEO y un tratamiento conjunto y posterior con 3i o 3i + OLA.

El punto más importante fue que inhibimos ATM, DNA-PK y LigIV, y bajo esa condición, una subpoblación de células sobrevivió, incluso en presencia del inhibidor de PARP OLA, no se produjo sinergismo. De hecho, nuestros resultados indicaron la presencia de una subpoblación de VERO que era resistente a BLEO, BLEO + OLA y BLEO + OLA + iATM + iDNA-PK + iLigIV SCR7.

Las causas conocidas de la resistencia a OLA incluyen alteraciones del metabolismo de la PARilación, alteraciones en los transportadores de fármacos, regulación de HR y la estabilización de las horquillas de replicación estancadas (Figura 20) (D'Andrea, 2018; Mweempwa & Wilson, 2019; Pettitt et al., 2018).

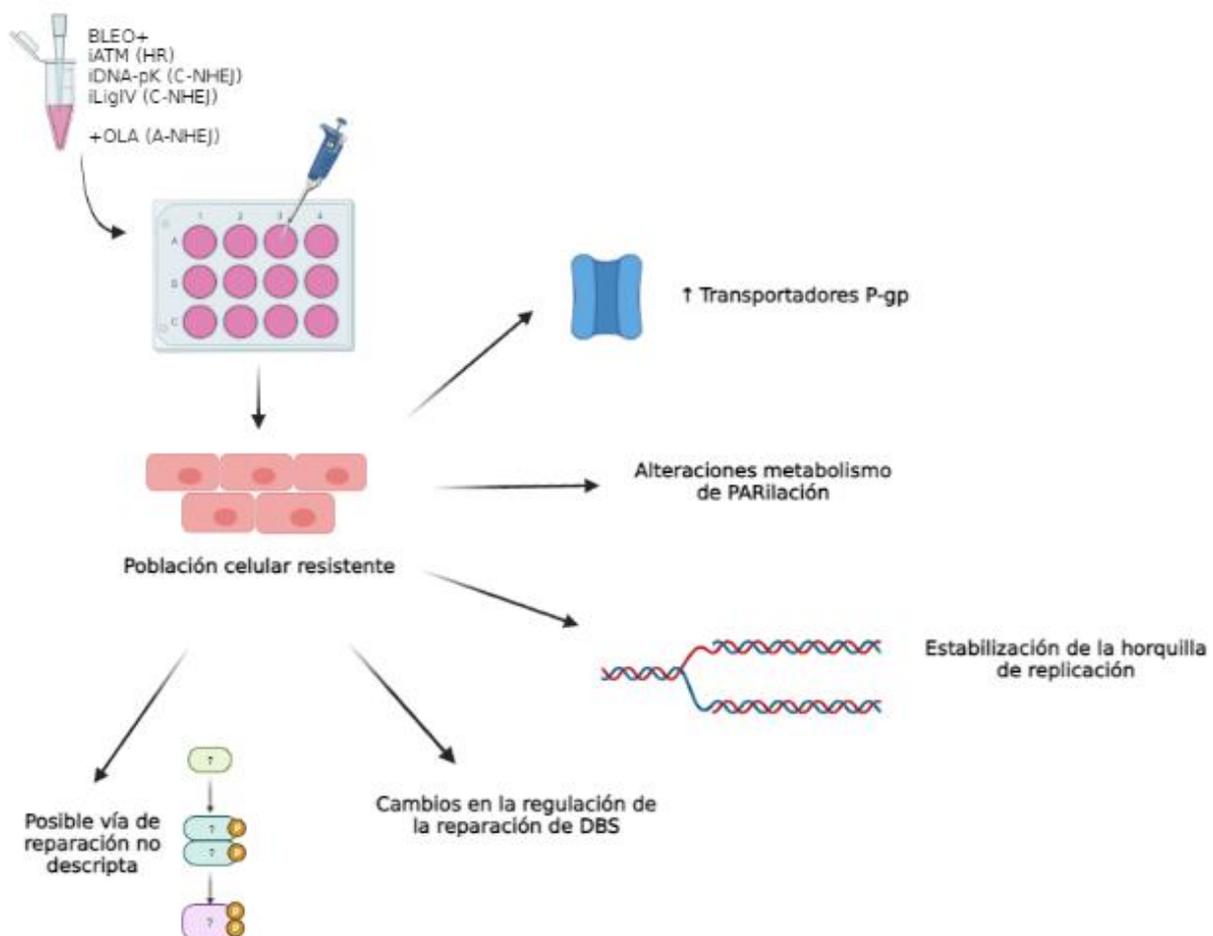


Figura 20. Posibles causas de la resistencia al tratamiento con bleomicina (BLEO) e inhibidores de: OLA (A-NHEJ), ATM (HR), DNA-PK y LigIV (C-NHEJ): sobreexpresión de transportadores P-gp, alteraciones en el metabolismo de PARilación, estabilización de la horquilla de replicación, cambios en la regulación de reparación de DSB y una posible vía no descrita. Imagen generada en <https://biorender.com/>

Con respecto a los transportadores, se sabe que los transportadores de glicoproteína P (P-gp) exportan OLA al exterior celular y la sobreexpresión de los mismos puede ser una posible causa de resistencia (O'Connor et al., 2016). No hemos evaluado si las células VERO sobreexpresan transportadores de P-gp, pero OLA logra disminuir PAR, lo que hace que la sobreexpresión de P-gp sea una explicación poco probable de la resistencia a OLA en células VERO.

Para excluir la posibilidad de que OLA en combinación con 3i hubiera interferido con la inducción del daño del ADN por BLEO, se midió el daño inicial del ADN (células positivas para γ H2AX y 53BP1, número de focos γ H2AX y 53BP1, y células pan-nucleares e índices de daño del ADN). Sin embargo, no se denotó una disminución del daño por ensayo cometa, ni disminución de focos γ H2AX, al combinar BLEO con OLA. Por lo que observamos concordancias con los resultados de las tres técnicas. Cabe destacar, que la combinación de BLEO con OLA, tampoco afectó el daño inducido por BLEO en presencia de 3i según lo evaluado por el ensayo cometa.

La fosforilación de la histona H2AX (γ H2AX), está asociada a la respuesta temprana al daño e independiente del mecanismo de reparación de DSBs que se active (Collins et al., 2020; Mah et al., 2010). En las células VERO en presencia de BLEO, se inhibió DNA-PK y ATM que son quinasas que fosforilan a dicha histona, si bien las tendencias indicaron una disminución de los focos γ H2AX, quedarón focos remanentes. Esto sugiere que la fosforilación de H2AX es llevado por distintas quinasas, como pueden ser ATR y/o VRK1 (Rossetto et al., 2010; Salzano et al., 2015). Últimamente, la literatura ha resaltado el rol de VRK1 en la fosforilación de H2AX, se observó que la pérdida de VRK1 impide totalmente la formación de los focos γ H2AX inducidos por la combinación de Temozolomida (TMZ) y OLA en líneas celulares de glioblastoma (Navarro-Carrasco & Lazo, 2021). Esto evidencia que esta enzima es esencial para la formación de focos en dichas células cancerosas y en nuestro modelo DNA-PK y ATM no son esenciales, dado que no observamos desaparición total de los focos γ H2AX.

Un punto interesante es que, según nuestros datos preliminares, OLA aumentó los focos 53BP1 al tener inhibidas HR (iATM) y C-NHEJ (iDNA-PK y iLigIV). Si esta tendencia se confirmara, sugeriría que al tener inhibidas HR y C-NHEJ, las células habrían procurado activar A-NHEJ, pero al inhibir con OLA A-NHEJ, volvieron a intentar utilizar C-NHEJ y por este motivo, los focos se acumularon en los sitios de inducción del daño (**Figura 21**). Esto implicaría que DNA-PK y LigIV se encuentran *downstream* al reclutamiento de 53BP1. Esto concuerda con los resultados donde se observa que en células deficientes en DNA-pk tanto en condiciones endógenas como exógenas (exposición a IR) se observa acumulación de 53BP1, por lo que DNA-pk no se requiere para formar focos 53BP1 (Schultz et al., 2000). Estos datos también concuerdan con los datos de las líneas celulares HeLa y PtK2 publicados por Saquilabon Cruz et al., 2015, quienes determinaron que los iPARPs inducen el aumento del reclutamiento de 53BP1 en los sitios de daño del ADN y por tanto, activación de C-NHEJ. Asimismo varios autores concuerdan en que 53BP1 actúa al inicio de la reparación de DSB mediante C-NHEJ, formando un complejo con RIF1 junto al heterodímero Ku70/Ku80 protegiendo los extremos de la resección (Bunting et al., 2010; Gelot et al., 2015; Zimmermann, et al., 2013).

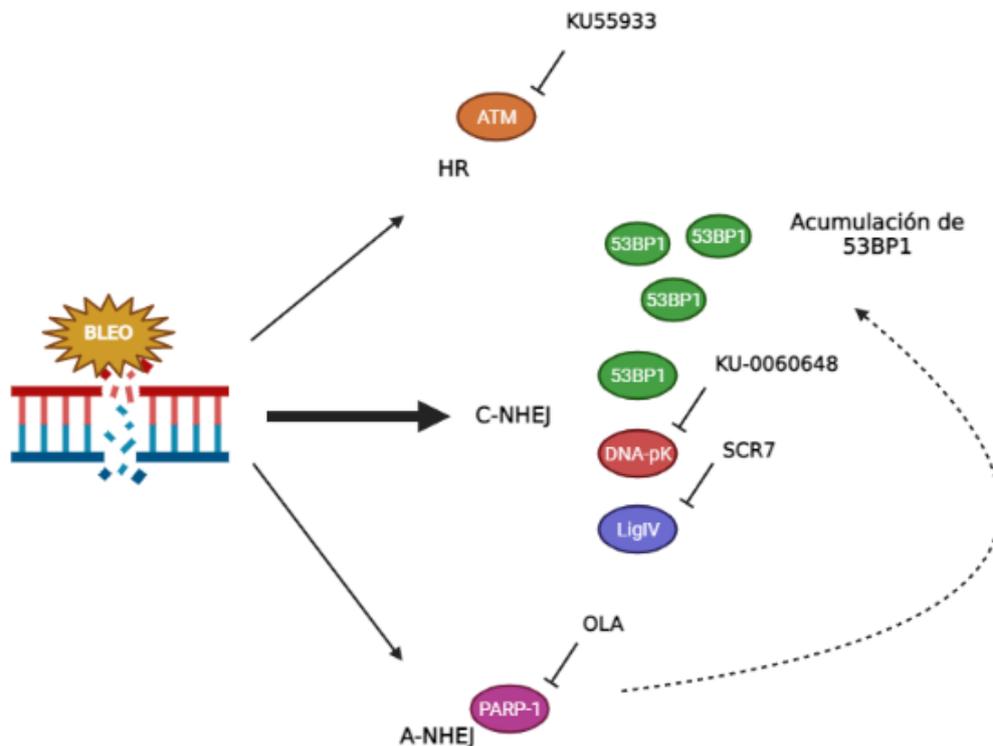


Figura 21. Frente al daño inducido por BLEO la célula puede optar por reparar por HR (opera en S/G2), por C-NHEJ o A-NHEJ (operan en todo el ciclo celular). En VERO, se activó mayoritariamente C-NHEJ. Pero al tener inhibidas HR (inhibición de ATM) y C-NHEJ (en distintos niveles: DNA-PK y LigIV), las células habrían procurado activar A-NHEJ, pero al inhibir con OLA A-NHEJ, volvieron a intentar utilizar C-NHEJ y por este motivo, los focos 53BP1 se acumularon en los sitios de inducción del daño. Imagen generada en <https://biorender.com/>

Suponiendo que todos los inhibidores utilizados funcionaran como en otros modelos, una explicación con respecto a la resistencia a BLEO + OLA + 3i sería que las células repararan el daño del ADN a través de una vía no descrita por la literatura en lugar de A-NHEJ (porque PARP-1 se inhibió) o HR (porque se inhibió ATM) o C-NHEJ (ya que se inhibieron DNA-PK y LigIV).

Incluso bajo el defecto de HR (debido a proteínas mutadas o inhibidas), la estabilización de la horquilla de replicación estancada se ha propuesto como un mecanismo alternativo de resistencia a iPARPs (D'Andrea, 2018; Mweempwa & Wilson, 2019). Las quinasas de punto de control ATR, CHK1 y WEE1 desempeñan papeles diferentes en la estabilización de la horquilla de replicación estancada, proporcionando mecanismos alternativos que se deben considerar en el desarrollo de terapias de combinación para evitar la resistencia a los fármacos (Haynes et al., 2018). Por ejemplo, iATRs (VE-821, VE-822 o AZ20) supera la resistencia a iPARPs adquirida y

preexistente en múltiples líneas celulares de cáncer deficientes en BRCA1 (Yazinski et al., 2017). ATRi (AZD6738) y WEE1i (AZD1775) muestran una actividad diferencial en una subpoblación de líneas celulares de linfomas difusos de células B grandes que no son del centro germinal, las cuales se caracterizan por una alta expresión del oncogén MYC y una deleción en inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 2A (CDNK2A/B) (Young et al., 2019). A su vez, CDNK2A/B codifica para tres proteínas que pertenecen a las vías RB1 y TP53, que actúan como supresores de tumores regulando el punto de control G1/S del ciclo celular (Carrasco Salas et al., 2016). A su vez, el inhibidor de CHK1 Prexasertib es eficaz contra líneas celulares de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello humanos con pérdidas genéticas CDKN2A (Gadhikar et al., 2018). En algunas familias, CDKN2A las mutaciones genéticas facilitan el desarrollo de un solo tipo de cáncer, mientras que en otras familias, pueden conducir a un síndrome de predisposición al cáncer, lo que aumenta el riesgo de desarrollar múltiples tipos de cáncer. Además, se han encontrado mutaciones somáticas del gen CDKN2A en algunas personas con tumores cerebrales y en niños con leucemia linfoblástica aguda (*CDKN2A Gene: MedlinePlus Genetics*, n.d.).

Las células VERO tienen una deleción homocigótica de ≈9 Mb en el cromosoma 12, lo que provoca la pérdida de los genes CDKN2A/B, además del grupo de genes del interferón tipo I (lo que probablemente explica por qué son tan propensas a infecciones). Aunque estas mutaciones por sí mismas no son suficientes para transformar células normales en células tumorigénicas, la pérdida de CDKN2A/B puede jugar un papel crucial en la adquisición de la inmortalidad en el linaje celular VERO (Naoki et al., 2014).

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bai, P., & Cantó, C. (2012). The role of PARP-1 and PARP-2 enzymes in metabolic regulation and disease. *Cell Metabolism*, 16(3), 290-295. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.06.016>
- Barcińska, E., Wierzbicka, J., Zauszkiewicz-Pawlak, A., Jacewicz, D., Dabrowska, A., & Inkielewicz-Stepniak, I. (2018). Role of Oxidative and Nitro-Oxidative Damage in Silver Nanoparticles Cytotoxic Effect against Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8251961>
- Beck, C., Robert, I., Reina-San-Martin, B., Schreiber, V., & Dantzer, F. (2014). Poly(ADP-ribose) polymerases in double-strand break repair: Focus on PARP1, PARP2 and PARP3. *Experimental Cell Research*, 329(1), 18-25. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.07.003>
- Blackford, A. N., & Jackson, S. P. (2017). ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Molecular Cell*, 66(6), 801-817. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.015>
- Bouchard, V. J., Rouleau, M., & Poirier, G. G. (2003). PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Experimental Hematology*, 31(6), 446-454. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(03\)00083-3](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(03)00083-3)
- Brock, W. A., Milas, L., Bergh, S., Lo, R., Szabó, C., & Mason, K. A. (2004). Radiosensitization of human and rodent cell lines by INO-1001, a novel inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase. *Cancer Letters*, 205(2), 155-160. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2003.10.029>
- Bunting, S. F., Callén, E., Wong, N., Chen, H., Polato, F., Gunn, A., Bothmer, A., Feldhahn, N., Fernandez-capetillo, O., Cao, L., Xu, X., Deng, C., Finkel, T., Nussenzweig, M., & Stark, J. M. (2010). *53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks*. 141(2), 243-254. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.012>
- Carrasco Salas, P., Fernández, L., Vela, M., Bueno, D., González, B., Valentín, J., Lapunzina, P.,

& Pérez-Martínez, A. (2016). The role of CDKN2A/B deletions in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Hematology and Oncology*, 33(7-8), 415-422.
<https://doi.org/10.1080/08880018.2016.1251518>

CDKN2A gene: MedlinePlus Genetics. (n.d.). Retrieved September 23, 2021, from
<https://medlineplus.gov/genetics/gene/cdkn2a/>

Chaudhuri, A., & Nussenzweig, A. (2017). The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18(10), 610-621.
<https://doi.org/10.1038/nrm.2017.53>.The

Chen, J., Ghorai, M. K., Kenney, G., & Stubbe, J. A. (2008). Mechanistic studies on bleomycin-mediated DNA damage: Multiple binding modes can result in double-stranded DNA cleavage. *Nucleic Acids Research*, 36(11), 3781-3790. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn302>

Chen, J., & Stubbe, J. A. (2005). Bleomycins: Towards better therapeutics. *Nature Reviews Cancer*, 5(2), 102-112. <https://doi.org/10.1038/nrc1547>

Ciccia, A., & Elledge, S. J. (2010). The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Molecular Cell*, 40(2), 179-204. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.019>

Cleaver, J. E., Bodell, W. J., Morgan, W. F., & Zelle, B. (1983). Differences in the regulation by poly(ADP-ribose) of repair of DNA damage from alkylating agents and ultraviolet light according to cell type. *Journal of Biological Chemistry*, 258(15), 9059-9068.
[https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)44631-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)44631-x)

Collins, P. L., Purman, C., Porter, S. I., Nganga, V., Saini, A., Hayer, K. E., Gurewitz, G. L., Sleckman, B. P., Bednarski, J. J., Bassing, C. H., & Oltz, E. M. (2020). DNA double-strand breaks induce H2Ax phosphorylation domains in a contact-dependent manner. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16926-x>

Croteau, D. L., & Bohr, V. A. (1997). Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial

DNA in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, 272(41), 25409-25412.

<https://doi.org/10.1074/jbc.272.41.25409>

Curtin, Nicola J.; Sharma, R. A. (2015). *PARP Inhibitors for Cancer Therapy*. Humana Press, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-14151-0>

Czyz, M., Toma, M., Gajos-Michniewicz, A., Majchrzak, K., Hoser, G., Szemraj, J., Nieborowska-Skorska, M., Cheng, P., Gritsyuk, D., Levesque, M., Dummer, R., Sliwinski, T., & Skorski, T. (2016). PARP1 inhibitor olaparib (Lynparza) exerts synthetic lethal effect against ligase 4-deficient melanomas. *Oncotarget*, 7(46), 75551-75560.

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.12270>

D'Andrea, A. D. (2018). Mechanisms of PARP inhibitor sensitivity and resistance. *DNA Repair*, 71(xxxx), 172-176. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.08.021>

David, K. K., Andrabi, S. A., Dawson, T. M., & Dawson, V. L. (2009). Parthanatos, A messenger of death. *Frontiers in Bioscience*, 14(3), 1116-1128. <https://doi.org/10.2741/3297>

De Boer, J., & Hoeijmakers, J. H. J. (2000). Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*, 21(3), 453-460. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.453>

Deriano, L., & Roth, D. B. (2013). Modernizing the nonhomologous end-joining repertoire: Alternative and classical NHEJ share the stage. *Annual Review of Genetics*, 47(September), 433-455. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155540>

Drew, Y., Mulligan, E. A., Vong, W. T., Thomas, H. D., Kahn, S., Kyle, S., Mukhopadhyay, A., Los, G., Hostomsky, Z., Plummer, E. R., Edmondson, R. J., & Curtin, N. J. (2011). Therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor AG014699 in human cancers with mutated or methylated BRCA1 or BRCA2. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(4), 334-346. <https://doi.org/10.1093/jnci/djq509>

Dueva, R., & Iliakis, G. (2013). Alternative pathways of non-homologous end joining (NHEJ) in

genomic instability and cancer. *Translational Cancer Research*, 2(3), 163-177.

<https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-676X.2013.05.02>

Gadhikar M.A., Zhang J., Shen L., Rao X., Wang J., Zhao M., Kalu N.N., Johnson F.M., Byers L.A., Heymach J., et al. (2018). CDKN2A/p16 deletion in head and neck cancer cells is associated with Cdk2 activation, replication stress, and vulnerability to Chk1 inhibition. *Cancer Res.*, 78(3), 781-797. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-2802.CDKN2A/p16>

Gelot, C., Magdalou, I., & Lopez, B. S. (2015). Replication stress in mammalian cells and its consequences for mitosis. *Genes*, 6(2), 267-298. <https://doi.org/10.3390/genes6020267>

Gupta, A., Hunt, C. R., Chakraborty, S., Pandita, R. K., Yordy, J., Ramnarain, D. B., Horikoshi, N., & Pandita, T. K. (2014). Role of 53BP1 in the Regulation. *Radiat Res.*, 181(1), 1-8. <https://doi.org/10.1667/RR13572.1.Role>

Gyori, B. M., Venkatachalam, G., Thiagarajan, P. S., Hsu, D., & Clement, M. V. (2014). OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biology*, 2(1), 457-465. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.020>

Haynes, B., Murai, J., Lee, J., Branch, M., & Branch, T. (2018). Restored replication fork stabilization, a mechanism of PARP inhibitor resistance, can be overcome by cell cycle checkpoint inhibition. *Cancer Treat Rev.*, 71, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.09.003.Restored>

Her, J., & Bunting, S. F. (2018). How cells ensure correct repair of DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry*, 293(27), 10502-10511. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.000371>

Hoeijmakers, J. H. J. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411(6835), 366-374. <https://doi.org/10.1038/35077232>

Horton, J. K., Stefanick, D. F., Naron, J. M., Kedar, P. S., & Wilson, S. H. (2005). Poly(ADP-

ribose) polymerase activity prevents signaling pathways for cell cycle arrest after DNA methylating agent exposure. *Journal of Biological Chemistry*, 280(16), 15773-15785.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M413841200>

Horton, J. K., Stefanick, D. F., Prasad, R., Gassman, N. R., Padmini, S., & Wilson, S. H. (2015). *Base excision repair defects invoke hypersensitivity to PARP inhibition*. 12(8), 1128-1139.
<https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0502.Base>

Hottiger, M. O. (2015). SnapShot: ADP-Ribosylation Signaling. *Molecular Cell*, 58(6), 1134.e1-1134.e1. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.06.001>

Ingram, S. P., Warmenhoven, J. W., Henthorn, N. T., Smith, E. A. K., Chadwick, A. L., Burnet, N. G., Mackay, R. I., Kirkby, N. F., Kirkby, K. J., & Merchant, M. J. (2019). Mechanistic modelling supports entwined rather than exclusively competitive DNA double-strand break repair pathway. *Scientific Reports*, 9(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42901-8>

Jackson, S. P., & Bartek, J. (2009a). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461(7267), 1071-1078. <https://doi.org/10.1038/nature08467>

Jackson, S. P., & Bartek, J. (2009b). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461(7267), 1071-1078. <https://doi.org/10.1038/nature08467>

Jiang, Y., Dong, Y., Luo, Y., Jiang, S., Meng, F. L., Tan, M., Li, J., & Zang, Y. (2021). AMPK-mediated phosphorylation on 53BP1 promotes c-NHEJ. *Cell Reports*, 34(7), 108713.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108713>

Jones, J. A., Casey, R. C., & Karouia, F. (2010). Ionizing Radiation as a Carcinogen. *Comprehensive Toxicology, Second Edition*, 14, 181-228. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01411-1>

Kam, T. I., Mao, X., Park, H., Chou, S. C., Karuppagounder, S. S., Umanah, G. E., Yun, S. P., Brahmachari, S., Panicker, N., Chen, R., Andrabi, S. A., Qi, C., Poirier, G. G., Pletnikova,

O., Troncoso, J. C., Bekris, L. M., Leverenz, J. B., Pantelyat, A., Ko, H. S., ... Dawson, V. L. (2018). Poly(ADP-ribose) drives pathologic a-synuclein neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science*, 362(6414). <https://doi.org/10.1126/science.aat8407>

Kawamitsu, H., Hoshino, H. o., Okada, H., Miwa, M., Sugimura, T., & Momoi, H. (1984). Monoclonal Antibodies to Poly(adenosine diphosphate ribose) Recognize Different Structures. *Biochemistry*, 23(16), 3771-3777. <https://doi.org/10.1021/bi00311a032>

Kelland, L. R., Burgess, L., & Steel, G. G. (1987). Radiation damage repair capacity of a human germ-cell tumour cell line: Inhibition by 3-aminobenzamide. *International Journal of Radiation Biology*, 51(2), 227-241. <https://doi.org/10.1080/09553008714550731>

Keszenman, Deborah J.; Kolodiuk, Lucia; Baulch, J. E. (2015). DNA damage in cells exhibiting radiation-induced genomic instability. *Mutagenesis*, 30(3), 451-458. <https://doi.org/doi.org/10.1093/mutage/gev006>

Keszenman, D. J., & Sutherland, B. M. (2010). Yields of clustered DNA damage induced by charged-particle radiations of similar kinetic energy per nucleon: Let dependence in different dna microenvironments. *Radiation Research*, 174(2), 238-250. <https://doi.org/10.1667/RR2093.1>

Ko, H. L., & Ren, E. C. (2012). Functional aspects of PARP1 in DNA repair and transcription. *Biomolecules*, 2(4), 524-548. <https://doi.org/10.3390/biom2040524>

Kochan, J. A., Desclos, E. C. B., Bosch, R., Meister, L., Vriend, L. E. M., Van Attikum, H., & Krawczyk, P. M. (2017). Meta-analysis of DNA double-strand break response kinetics. *Nucleic Acids Research*, 45(22), 12625-12637. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1128>

Koehler, R. C., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2021). Targeting Parthanatos in Ischemic Stroke. *Frontiers in Neurology*, 12(May), 1-15. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.662034>

Lafon-hughes, L. (2014). *Localización preferencial del daño genético en regiones eucromáticas y*

replicantes de los cromosomas y los núcleos de mamíferos. Roles de la poli-ADP-ribosa en presencia y ausencia de daño genético inducido en células VERO. IIBCE-INGEBI.

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. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.01.008>

Lafon-Hughes, L., Vilchez Larrea, S. C., Kun, A., & Fernández Villamil, S. H. (2014). VERO cells harbor a poly-ADP-ribose belt partnering their epithelial adhesion belt. *PeerJ*, 2014(1). <https://doi.org/10.7717/peerj.617>

Liddle, P., Jara-Wilde, J., Lafon-Hughes, L., Castro, I., Härtel, S., & Folle, G. (2020). dSTORM microscopy evidences in HeLa cells clustered and scattered γ H2AX nanofoci sensitive to ATM, DNA-PK, and ATR kinase inhibitors. *Molecular and Cellular Biochemistry*. <https://doi.org/10.1007/s11010-020-03809-4>

Mah, L. J., El-Osta, A., & Karagiannis, T. C. (2010). γ H2AX: A sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia*, 24(4), 679-686. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.6>

Manolakou, T., Verginis, P., & Boumpas, D. T. (2021). Dna damage response in the adaptive arm of the immune system: Implications for autoimmunity. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11). <https://doi.org/10.3390/ijms22115842>

Maréchal, A., & Zou, L. (2013). DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(9), 1-17. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012716>

Martin-oliva, D., Martin-oliva, D., Muñoz-gámez, J. A., Aguilar-quesada, R., & Oliver, F. J. (2006). Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa-1: una proteína nuclear implicada en procesos inflamatorios, muerte celular y cáncer. *Revista Médicas Uis*, 19(2).

Mladenov, E., & Iliakis, G. (2011). The Pathways of Double-Strand Break Repair. *DNA Repair - On the Pathways to Fixing DNA Damage and Errors*. <https://doi.org/10.5772/24572>

Møller, P., Azqueta, A., Boutet-Robinet, E., Koppen, G., Bonassi, S., Milić, M., Gajski, G., Costa, S., Teixeira, J. P., Costa Pereira, C., Dusinska, M., Godschalk, R., Brunborg, G., Gutzkow, K. B., Giovannelli, L., Cooke, M. S., Richling, E., Laffon, B., Valdiglesias, V., ... Langie, S. A. S. (2020). *Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): recommendations for describing comet assay procedures and results*. *15*(12), 3817-3826.
<https://doi.org/10.1038/s41596-020-0398-1>

Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, *65*, 55-63.
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

Mweempwa, A., & Wilson, M. K. (2019). Mechanisms of resistance to PARP inhibitors - an evolving challenge in oncology. *Cancer Drug Resistance*, *2*(3), 608-617.
<https://doi.org/10.20517/cdr.2019.50>

Naoki, O., Arihiro, K., Toshiyuki, Y., Noriko, H., Fumio, K., Suyoshi, S., Makoto, K., Kentaro, H., & Hattori, M. (2014). The genome landscape of the African Green Monkey kidney-derived vero cell line. *DNA Research*, *21*(6), 673-683. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsu029>

Navarro-Carrasco, E., & Lazo, P. A. (2021). Vrk1 Depletion Facilitates the Synthetic Lethality of Temozolomide and Olaparib in Glioblastoma Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*(June), 1-15. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.683038>

O'Connor, L. O., Rulten, S. L., Cranston, A. N., Odedra, R., Brown, H., Jaspers, J. E., Jones, L., Knights, C., Evers, B., Ting, A., Bradbury, R. H., Pajic, M., Rottenberg, S., Jonkers, J., Rudge, D., Martin, N. M. B., Caldecott, K. W., Lau, A., & O'Connor, M. J. (2016). The PARP inhibitor AZD2461 provides insights into the role of PARP3 inhibition for both synthetic lethality and tolerability with chemotherapy in preclinical models. *Cancer Research*, *76*(20), 6084-6094. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-3240>

Oizumi, T., Ohno, R., Yamabe, S., Funayama, T., & Nakamura, A. J. (2020). Repair kinetics of

dna double strand breaks induced by simulated space radiation. *Life*, 10(12), 1-13.

<https://doi.org/10.3390/life10120341>

Olive, P. L., & Banáth, J. P. (2006). *The comet assay: A method to measure DNA damage in individual cells*. 1(1), 23-29. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.5>

OpenComet v1.3 documentation. (n.d.). Retrieved June 18, 2021, from <https://cometbio.org/documentation.html>

Osorio, F. G., Soria-Valles, C., Santiago-Fernández, O., Freije, J. M. P., & López-Otín, C. (2016). NF- κ B signaling as a driver of ageing. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 326). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2016.04.003>

Perini, V., Schacke, M., Liddle, P., Vilchez-Larrea, S., Keszenman, D. J., & Lafon-Hughes, L. (2020). Parp inhibitor olaparib causes no potentiation of the bleomycin effect in vero cells, even in the presence of pooled atm, dna-pk, and ligiv inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms21218288>

Pettitt, S. J., Krastev, D. B., Brandsma, I., Dréan, A., Song, F., Aleksandrov, R., Harrell, M. I., Menon, M., Brough, R., Campbell, J., Frankum, J., Raney, M., Pemberton, H. N., Rafiq, R., Fenwick, K., Swain, A., Guettler, S., Lee, J. M., Swisher, E. M., ... Lord, C. J. (2018). Genome-wide and high-density CRISPR-Cas9 screens identify point mutations in PARP1 causing PARP inhibitor resistance. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03917-2>

Ping Lin, Z., Zhu, Y. L., Lo, Y. C., Moscarelli, J., Xiong, A., Korayem, Y., Huang, P. H., Giri, S., LoRusso, P., & Ratner, E. S. (2018). Combination of triapine, olaparib, and cediranib suppresses progression of BRCA-wild type and PARP inhibitor-resistant epithelial ovarian cancer. *PLoS ONE*, 13(11), 1-24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207399>

Regulus, P., Duroux, B., Bayle, P. A., Favier, A., Cadet, J., & Ravanat, J. L. (2007). Oxidation of the sugar moiety of DNA by ionizing radiation or bleomycin could induce the formation of a

cluster DNA lesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(35), 14032-14037. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706044104>

Rodríguez-Rey, A., Noris-García, E., & Fundora Torres, M. T. (2016). Principios y relevancia del ensayo cometa. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas*, 35(2), 184-194.

Ronson, G. E., Piberger, A. L., Higgs, M. R., Olsen, A. L., Stewart, G. S., McHugh, P. J., Petermann, E., & Lakin, N. D. (2018). PARP1 and PARP2 stabilise replication forks at base excision repair intermediates through Fbh1-dependent Rad51 regulation. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03159-2>

Rossetto, Dorine, Truman, Andrew W., Kron, Stepehn J., Coté, J. (2010). Epigenetic Modifications in Double Strand Break DNA Damage Signaling and Repair. *Clin Cancer Res.*, 16(18), 4543-4552. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0513>.Epigenetic

Rulten, S. L., Fisher, A. E. O., Robert, I., Zuma, M. C., Rouleau, M., Ju, L., Poirier, G., Reina-San-Martin, B., & Caldecott, K. W. (2011). PARP-3 and APLF function together to accelerate nonhomologous end-joining. *Molecular Cell*, 41(1), 33-45. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.12.006>

Russo A.L., Kwon H.-C., Burgan W.E., Carter D., Beam K., Weizheng X., Zhang J., Slusher B.S., Chakravarti A., T. P. J. (2009). In vitro and In vivo Radiosensitization of Glioblastoma Cells by the Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibitor E7016. *Clin Cancer Res.*, 15(2), 607-612. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-2079>

Saha, T., Smulson, M., & Rosen, E. M. (2010). BRCA1 regulation of base excision repair pathway. *Cell Cycle*, 9(13), 2471-2472. <https://doi.org/10.4161/cc.9.13.12084>

Salzano, M., Sanz-García, M., Monsalve, D. M., Moura, D. S., & Lazo, P. A. (2015). VRK1 chromatin kinase phosphorylates H2AX and is required for foci formation induced by DNA damage. *Epigenetics*, 10(5), 373-383. <https://doi.org/10.1080/15592294.2015.1028708>

- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Ünsal-Kaçmaz, K., & Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry*, 73, 39-85. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723>
- Saquilabon Cruz, G. M., Kong, X., Silva, B. A., Khatibzadeh, N., Thai, R., Berns, M. W., & Yokomori, K. (2015). Femtosecond near-infrared laser microirradiation reveals a crucial role for PARP signaling on factor assemblies at DNA damage sites. *Nucleic Acids Research*, 44(3), e27-e27. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv976>
- Schultz, L. B., Chehab, N. H., Malikzay, A., & Halazonetis, T. D. (2000). p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *Journal of Cell Biology*, 151(7), 1381-1390. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.7.1381>
- Sheila S. David, V. L. O. and S. K. (2007). Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature*, 447(7147), 941-950. <https://doi.org/10.1038/nature05978>
- Shen, W., Ma, Y., Qi, H., Wang, W., He, J., Xiao, F., Zhu, H., & He, S. (2021). Kinetics model of DNA double-strand break repair in eukaryotes. *DNA Repair*, 100(January). <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.103035>
- Sunada, S., Nakanishi, A., & Miki, Y. (2018). Crosstalk of DNA double-strand break repair pathways in poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor treatment of breast cancer susceptibility gene 1/2-mutated cancer. *Cancer Science*, 109(4), 893-899. <https://doi.org/10.1111/cas.13530>
- Swift, M. L., Beishline, K., Flashner, S., & Azizkhan-Clifford, J. (2021). DSB repair pathway choice is regulated by recruitment of 53BP1 through cell cycle-dependent regulation of Sp1. *Cell Reports*, 34(11), 108840. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108840>
- Teloni, F., & Altmeyer, M. (2016). Survey and summary readers of poly(ADP-ribose): Designed to be fit for purpose. *Nucleic Acids Research*, 44(3), 993-1006. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1383>

- Tobias, F., Löb, D., Lengert, N., Durante, M., Drossel, B., Taucher-Scholz, G., & Jakob, B. (2013). Spatiotemporal Dynamics of Early DNA Damage Response Proteins on Complex DNA Lesions. *PLoS ONE*, 8(2), 17-21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057953>
- Topatana, W., Juengpanich, S., Li, S., Cao, J., Hu, J., Lee, J., Suliyanto, K., Ma, D., Zhang, B., Chen, M., & Cai, X. (2020). Advances in synthetic lethality for cancer therapy: Cellular mechanism and clinical translation. *Journal of Hematology and Oncology*, 13(1), 1-22. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00956-5>
- Tounekti, O., Kenani, A., Foray, N., Orlowski, S., & Mir, L. M. (2001). The ratio of single-to double-strand DNA breaks and their absolute values determine cell death pathway. *British Journal of Cancer*, 84(9), 1272-1279. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2001.1786>
- U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (FDA). (2014). *LYNPARZA safely and effectively. HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION*. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/208558s000lbl.pdf
- Veuger, S., & Curtin, N. J. (2013). Inhibition of DNA Repair as a Therapeutic Target. In *Cancer Drug Design and Discovery: Second Edition* (Second Edi). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396521-9.00008-5>
- Veuger, S. J., Curtin, N. J., Richardson, C. J., Smith, G. C. M., & Durkacz, B. W. (2003). Radiosensitization and DNA repair inhibition by the combined use of novel inhibitors of DNA-dependent protein kinase and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Cancer Research*, 63(18), 6008-6015.
- VIRAG, L., & SZABO, C. (2002). The Therapeutic Potential of Poly (ADP-Ribose). *Pharmacological Reviews*, 54(3), 375-429.
- Wallace, B. D., & Williams, R. S. (2014). Ribonucleotide triggered DNA damage and RNA-DNA damage responses. *RNA Biology*, 11(11), 1340-1346. <https://doi.org/10.4161/15476286.2014.992283>

- Williams, J. S., Lujan, S. A., & Kunkel, T. A. (2016). Processing ribonucleotides incorporated during eukaryotic DNA replication. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(6), 350-363. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.37>
- Yazinski, S. A., Comaills, V., Buisson, R., Genois, M. M., Nguyen, H. D., Ho, C. K., Kwan, T. T., Morris, R., Lauffer, S., Nussenzweig, A., Ramaswamy, S., Benes, C. H., Haber, D. A., Maheswaran, S., Birrer, M. J., & Zou, L. (2017). ATR inhibition disrupts rewired homologous recombination and fork protection pathways in PARP inhibitor-resistant BRCA-deficient cancer cells. *Genes and Development*, 31(3), 318-332. <https://doi.org/10.1101/gad.290957.116>
- Young, L. A., O'Connor, L. O., de Renty, C., Veldman-Jones, M. H., Dorval, T., Wilson, Z., Jones, D. R., Lawson, D., Odedra, R., Maya-Mendoza, A., Reimer, C., Bartek, J., Lau, A., & O'Connor, M. J. (2019). Differential activity of ATR and Wee1 inhibitors in a highly sensitive subpopulation of DLBCL linked to replication stress. *Cancer Research*, 79(14), 3762-3775. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-2480>
- Zhou, H., Kawamura, K., Yanagihara, H., Kobayashi, J., & Zhang-Akiyama, Q. M. (2017). NBS1 is regulated by two kind of mechanisms: ATM-dependent complex formation with MRE11 and RAD50, and cell cycle-dependent degradation of protein. *Journal of Radiation Research*, 58(4), 487-494. <https://doi.org/10.1093/jrr/rrx014>
- Zimmermann, Michal, Lottersberger, Francisca, Buonomo, Sara B., Sfeir, Agnel, de Lange, T. (2013). 53BP1 regulates DSB repair using Rif1 to control 5' end resection. *Science*, 339(6120), 700-704. <https://doi.org/10.1126/science.1231573>