

Tesis de Grado de la Licenciatura en Ciencias Biológicas

Facultad de Ciencias – Universidad de la República

**Instituto de Investigaciones Biológicas
Clemente Estable**

“Caracterización de marcas de γ H2AX y su relación con la replicación del ADN en cromosomas mitóticos de CHO9”

Bach. María Magdalena Alvarez Zabaleta

Director de tesis: Dra. María Vittoria Di Tomaso

Codirector: Dra. Ana Laura Reyes Ábalos

Índice

Resumen	3
1. Introducción	4
1.1 Antecedentes	8
1.2 Problema de investigación	9
1.3 Hipótesis	10
1.4 Objetivos	10
2. Metodología	13
2.1 Línea celular CHO9	13
2.2 Tratamiento con Bleo e incorporación de EdU	14
2.3 Recolección de cultivos, citocentrifugación y obtención de extendidos cromosómicos	14
2.4 Inmunomarcación de γ H2AX y detección de EdU	14
2.5 Adquisición y análisis de imágenes	15
2.6 Identificación de las etapas de la fase S	15
2.7 Cuantificación y caracterización de las marcas de γ H2AX	16
2.8 Análisis de colocalización de marcas de γ H2AX y regiones cromosómicas replicantes (EdU+)	17
2.9 Análisis estadístico	19
3. Resultados	20
3.1 Caracterización de marcas de γ H2AX	20
3.2 Colocalización de marcas de γ H2AX y zona replicante (EdU+)	38
4. Discusión	41
5. Conclusiones	46
6. Perspectivas	47
7. Referencias bibliográficas	49

Abreviaturas

ATP - Adenosine TriPhosphate
ATR - Ataxia-Telangiectasia and Rad3 related
Bleo – Bleomicina
DNA - DeoxyriboNucleic Acid
DSB - Double-Strand Break
EdU - 5-Ethynyl-2'- DeoxyUridine
ES - Early S phase
LINE - Long Interspersed Elements
LS - Late S phase
MGV – Mean Gray Value (intensidad)
MS - Middle S phase
PBS - Phosphate Buffered Saline
RPA – Replication Protein A
SINE - Short Interspersed Elements
SSB - Single-Strand Break
ssDNA - Single-Stranded DNA
TADs: Topologically Associated Domains

Resumen

La histona no-canónica H2AX, ante la ocurrencia de daño generado por estrés oxidativo endógeno, radiación ionizante o ciertas drogas, se fosforila en S139, un evento temprano en la respuesta celular al daño en el ADN, que resulta en la formación γ H2AX. Continuando con estudios del Laboratorio de Genética del IIBCE, nuestro objetivo fue averiguar si los foci de γ H2AX se ubicaban preferentemente en las regiones replicantes de los cromosomas mitóticos, dañados en fase S temprana y media, de cultivos de CHO9. Sin embargo, la presencia inesperada de abundantes marcas de γ H2AX en los grupos control nos llevó a proponernos un segundo objetivo que fue la caracterización morfológica de dichas marcas. Así que indujimos el daño con Bleomicina, un radiomimético, y marcamos a γ H2AX con un anticuerpo fluorescente y a las zonas replicantes con EdU, un análogo de la timidina, que se incorpora durante el ciclo celular, evidenciando regiones replicantes mediante fluorescencia. De esta manera, mediante inmunomarcación de γ H2AX, detección química de EdU y contratinción con DAPI detectamos las marcas de γ H2AX, la región replicante y los cromosomas, respectivamente, tomando imágenes de microscopía confocal. Concluimos que, en efecto, las marcas más intensas y las de intensidad media, atribuidas a daño genético, colocalizan con las regiones replicantes, mientras que las marcas débiles, no relacionadas con el daño, no.

Introducción

El genoma de las células eucariotas está organizado en un complejo polimérico dinámico, denominado cromatina (*McGinty et al., 2014*), donde el ADN, asociado a proteínas, se encuentra continuamente accesible en una forma altamente coordinada, permitiendo a la célula realizar sus funciones especializadas y responder al ambiente cambiante. Aún durante la interfase, cuando no es posible discriminar cromosomas con técnicas convencionales, los territorios ocupados por cromosomas individuales persisten (*Gibcus & Dekker, 2013*). Dentro de estos territorios, el plegamiento del genoma en dominios de gran tamaño, topológicamente asociados (TADs: *topologically associated domains*), se logra mediante interacciones proteína-proteína (*Dixon et al., 2012*). En cada dominio, la organización local de la cromatina en subregiones definidas, controla los patrones de actividad transcripcional y replicativa específicos de cada tipo celular, ya que los TADs actúan como dominios de replicación (*Doenecke, 2016; Pope et al., 2014; Dileep et al., 2015*). La organización general multinivel de la cromatina y la suborganización específica, constituyen la base de la identidad de los diferentes tipos celulares. Por tanto, existen mecanismos que garantizan la identidad del tipo celular y su mantenimiento, a través de la memoria de programas durante el ciclo celular (*Doenecke, 2016*).

La estructura basal de la cromatina es la cadena de nucleosomas (*Luger et al., 1997*). El nucleosoma está formado por 147 pares de nucleótidos de ADN, que realizan 1.75 vueltas alrededor de la superficie de un octámero de histonas, consistente en dímeros de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. La base para la formación del octámero es la estructura en tres dominios de estas proteínas. Cada una posee un dominio central globular, que consiste en tres α -hélices, estructuradas de una manera que promueve la interacción de H3 con H4 y de H2A con H2B. De este modo, dos dímeros H3-H4 forman un tetrámero central, al cual se unen dos dímeros de H2A-H2B, completando el octámero (*Luger et al., 1997*). El octámero de histonas presenta simetría bilateral, siendo la interacción de las cuatro hélices H3-H3 en el centro del octámero, el eje de simetría. Dicho eje de simetría forma dos estructuras simétricas (diadas) (*Flaus, 2011*) y se utiliza como referencia para especificar la posición del nucleosoma (*Weintraub et al., 1976*).

Las porciones N-terminales de las histonas centrales son de particular interés porque sobresalen del octámero e interactúan con el ADN y otros componentes de la cromatina. Estas colas N-terminales están enriquecidas en aminoácidos básicos y son el principal blanco de modificaciones postraduccionales, que regulan el estado funcional de la cromatina local. Junto al ADN ligador, la histona H1 completa el nucleosoma como la unidad repetitiva basal de la cromatina. La cadena de nucleosomas puede ser observada con el microscopio electrónico como una fibra de 10 nm de diámetro (*Oudet, 1975; Oudet et al., 2004*).

Las histonas H1 (ligadoras) contribuyen al ensamblaje de nucleosomas en el próximo nivel de compactación: la fibra de 30 nm de diámetro (*Bian & Belmont, 2012*). Las H1 presentan tres

dominios: una región N-terminal extendida, una larga región C- terminal y un dominio globular central, que interactúa con el ADN en dos regiones, a una vuelta helicoidal alejada del eje de simetría y cerca del sitio de salida del ADN ligador (*Doenecke, 2016*).

En la entrada a la etapa mitótica se pierden los TADs. Las fibras de cromatina linealizadas se convierten en arreglos de bucles consecutivos con sus bases en el eje central de las cromátidas. Durante la progresión de la mitosis, el eje adquiere una curvatura helicoidal y entonces los bucles son posicionados en una estructura similar a una escalera en caracol. Hay dos capas de bucles: grandes de ~400kb y pequeños de ~80 kb, que se desarrollan dentro de los bucles grandes, mediados por condensina II y condensina I, respectivamente. Los cromosomas se acortan más a través de un bobinado helicoidal progresivo, que incrementa el número de bucles por vuelta, de 40 (correspondientes a 3Mb) a 150 bucles (12Mb) por vuelta (*Takahashi & Hirota, 2019*).

La topoisomerasa II α se requiere para separar las cromátidas y también está involucrada en la condensación cromosómica (*Kinoshita & Hirano, 2017*). Como las condensinas, la topoisomerasa II α está localizada en el eje mitótico de las cromátidas y los modelos actuales sugieren que actúa para controlar la compactación axial de los cromosomas a través de la regulación de los bucles mediados por condensina (*Nielsen et al., 2020; Shintomi & Hirano, 2021; Paulson et al., 2021*).

Las torsiones generadas durante los procesos de condensación y descondensación del ADN son liberados mediante la acción de topoisomerasas y girasas. Estas enzimas actúan mediante la generación de cortes transitorios en la cadena ADN, ya sea originando rupturas simples (SSB) como lo hacen las Topoisomerasas IA y IB, ATP-independientes, o introduciendo rupturas dobles (DSB), como las Topoisomerasas IIA, IIB y girasas de ADN que requieren ATP para actuar. El mecanismo depende de la formación de un complejo ADN-enzima que permite el corte del ADN y diferentes mecanismos para liberar las tensiones: rotación controlada de una hebra (Topoisomerasas IB y IC), pasaje de una hebra a través de una ruptura simple (Topoisomerasa IA) o, a través de una ruptura doble (Topoisomerasas IIA, IIB y girasas de ADN) y, por último, el sellado de la brecha (*Haase et al., 2019; Wang, 2002; Bush et al., 2014*).

La mayor parte del ensamblaje de la cromatina ocurre durante la replicación del ADN, en coordinación con el replisoma. Este proceso implica la incorporación de histonas en el ADN naciente, que requiere la acción cooperativa de la secuencia de ADN, factores de transcripción sitio específicos, enzimas modificadoras de histonas y un conjunto de complejos remodeladores de la cromatina, lo que asegura la densidad y el espaciamiento de nucleosomas apropiados, después de la replicación. (*Clapier & Cairns, 2014*).

Se distinguen dos estados de la cromatina: eucromatina y heterocromatina (*Heitz, 1928*). La heterocromatina permanece fuertemente empaquetada a lo largo del ciclo celular, mientras la eucromatina modifica su estado de condensación, siendo máximo durante la mitosis. De acuerdo con

Arrighi & Hsu (1971), Drets & Shaw (1971), Gilbert (2002), Craig (2004), Gilbert et al. (2004), Holmquist & Ashley (2006) y Di Tomaso et al. (2013):

- **La eucromatina se** localiza en las bandas G-claras de los cromosomas metafásicos y en los compartimentos internos en el núcleo interfásico. Se replica en la fase S-temprana y contiene secuencias SINE (*short interspersed elements*) moderadamente repetidas y genes constitutivos, que se expresan en estado eucromático en todas las células.

- **La heterocromatina** puede ser **constitutiva** o **facultativa**:

- **La heterocromatina facultativa:** contiene genes tejido-específicos y es rica en secuencias moderadamente repetidas LINE (*long interspersed elements*). Se ubica a nivel de las bandas G-oscuras de los cromosomas metafásicos y en los cromocentros y compartimentos periféricos del núcleo interfásico. Se replica durante la fase S-temprana, cuando sus genes tejido-específicos están activos, o durante la fase S-tardía, en las células de los tejidos en las cuales estos genes no se expresan. Puede presentar bajo o alto grado de compactación dependiendo de la expresión de sus genes.
- **La heterocromatina facultativa, compensatoria de dosis de genes** constituye, en el ser humano, al cromosoma X inactivo (Xi). Se ubica en los compartimentos del núcleo interfásico con cromatina compacta (cromocentros y periferia del núcleo interfásico), replicándose durante la fase S- tardía.
- **La heterocromatina constitutiva** contiene secuencias de ADN en tándem, altamente repetidas. Se localiza en las bandas C de los cromosomas metafásicos y en los compartimentos periféricos y cromocentros del núcleo interfásico. Durante la interfase tiene alto grado de compactación.
- **La heterocromatina constitutiva α** no contiene genes activos y se replica durante la fase S-tardía.
- **La heterocromatina constitutiva β** presenta algunos genes que se expresan en estado heterocromático, replicándose en la fase S-tardía.

La modulación de la estructura de la cromatina involucra principalmente cuatro tipos de actores: variantes y chaperonas de histonas, complejos remodeladores dependientes de ATP y modificaciones covalentes postraduccionales de las colas N-terminales de las histonas, extendidas por fuera del centro del nucleosoma (Doenecke, 2016).

Las modificaciones postraduccionales de las histonas están involucradas en la organización funcional y estructural de la cromatina, modificando las interacciones ADN-proteína o proteína-proteína (Zentner & Henikoff, 2013). La fosforilación de serinas o treoninas, la acetilación de lisinas y la metilación de lisinas o argininas son las modificaciones de histonas más estudiadas. Otras modificaciones son ubiquitinación y ADP-ribosilación de lisinas específicas (Messner & Hottiger, 2011), e isomerización de prolina (Nelson et al., 2006). En cada caso, enzimas específicas (“escritoras”) reconocen las posiciones a ser modificadas. Luego, el tipo y la posición de las modificaciones son reconocidas y traducidas por enzimas “lectoras” en una función específica.

Posteriormente, este efecto es revertido en forma controlada por enzimas “borradoras” que desacetilan, desmetilan, etc. (Doenecke, 2016). Las modificaciones postraduccionales son uno de los mecanismos que permiten a los cromosomas balancear activamente dos aspectos opuestos: la necesidad de condensar y organizar topológicamente cerca de 2 m de ADN, contra la necesidad de acceso al genoma de factores que permiten procesos tales como replicación, transcripción, recombinación y reparación del ADN. Por ejemplo, el sitio de origen de la replicación, que se establece en la transición desde mitosis a la fase G1, no corresponde a una secuencia de ADN particular, sino al contexto de organización de la cromatina local y la topología del ADN, que son “licenciados” mediante el ensamblaje de complejos pre-replicativos en el sitio de origen de la replicación (Doenecke, 2016). También se ha observado que durante la transición G2/M ocurre un rápido incremento de fosforilación de H1, asociado a la condensación de la cromatina (Baatout & Derradji, 2006).

Además, el reemplazo de histonas canónicas por variantes no-alélicas media cambios en la organización de la cromatina local. Existen variantes para tres histonas nucleosómicas: H3, H2A, H2B y para la histona H1 (Franklin & Zweidler, 1977). Su incorporación, introduce variaciones en la composición de la cromatina que la transforman en molde versátil, adaptable y apto para regular los procesos de replicación, transcripción, recombinación y reparación del ADN (Szenker et al., 2014). Estas variantes de histonas también son objeto de modificaciones covalentes y pueden proveer sitios de anclaje para factores de regulación o afectar interacciones ADN-proteínas o proteína-proteína, dentro o entre nucleosomas (Doenecke, 2016).

La histona H2AX es una variante de H2A, cuya región C-terminal es más larga que la de cualquier otro miembro de la familia H2A y contiene un motivo serina/glutamina (SQ), presente desde levaduras hasta mamíferos. El residuo de serina, Ser139, en el motivo SQ es fosforilado rápidamente en respuesta a la radiación ionizante y otros agentes que inducen daño en el ADN, originando la denominada γ H2AX (Redon et al., 2002; Rogakou et al., 1998; Downs et al., 2000). Mediante anticuerpos anti- γ H2AX conjugados a un fluorocromo, la H2AX fosforilada puede ser visualizada como focos o *foci* en los núcleos interfásicos (Durocher & Jackson, 2001). La fosforilación de H2AX es un evento temprano en la respuesta celular al daño en el ADN. *Ataxia-telangiectasia mutated* (ATM), *ATM- and Rad3-related* (ATR) y *DNA-dependent protein kinase* (DNA-PK), son las responsables de la fosforilación de H2A y juegan un rol crucial en la respuesta al daño en el ADN (Durocher & Jackson, 2001; Yang et al., 2003). Existen antecedentes que demuestran que el estrés oxidativo endógeno (originado durante el metabolismo celular), la radiación ionizante o drogas radiomiméticas, como la Bleomicina, (Bleo), inductoras también de estrés oxidativo exógeno, dañan al ADN, vía roturas de hebra simple (*simple strand breaks*, SSB), doble (*double strand breaks*, DSB) y modificaciones apurínicas/apirimidínicas, que producen la fosforilación de H2AX (Liddle et al.,

2014; Reyes-Ábalos et al., 2018; Watson & McGregor, 2010). Asimismo, se han encontrado marcas de γ H2AX vinculadas a SSB generadas por estrés replicativo (Rybak et al., 2016).

La progresión de la horquilla de replicación es un constante desafío y puede estancarse por agentes ambientales y estrés endógeno, resultando en estrés replicativo (Lyu et al., 2019). El estrés replicativo usualmente genera tramos de ADN de simple hebra (ssDNA), que frecuentemente se forman cuando la helicasa replicativa encuentra una base dañada y sobrepasa el sitio por no poder introducir un desoxirribonucleótido (Hedglin, Pandey & Benkovic, 2016) o cuando continúa desenrollando el ADN parental después que la polimerasa se ha estancado. La persistencia de ssDNA, ligada por la proteína de replicación A (RPA) y adyacente al ADN de doble hebra recientemente replicado, genera una señal de activación de la respuesta al estrés replicativo: una unión cebador-hebra molde. Esta estructura sirve como una plataforma de señalización para reclutar proteínas de respuesta al estrés replicativo, incluyendo ATR, que fosforila a H2AX (Zeman & Cimprich, 2013). γ H2AX también puede acumularse en sitios de ssDNA no reparados (Lyu et al., 2019), con la formación de DSB en el siguiente ciclo replicativo (Zeman & Cimprich, 2013).

Lyu et al. (2019) reportaron que los sitios de unión de γ H2AX tienen las siguientes características: no contienen islas CpG, ni sitios de inicio de la transcripción, siendo regiones de cromatina compacta, enriquecidas en SINEs (*Short Interspersed Nuclear Elements*), lo cual indica que podrían ser una barrera para las polimerasas replicativas. Además, en los sitios de unión a γ H2AX hay ausencia de H3K4me3 y H3K9Ac (marcas de eucromatina) y enriquecimiento de H3K27me3 y H3K9me3 (marcas de heterocromatina). Algunos de estos sitios acumulan γ H2AX a bajo nivel, aun en ausencia de estrés replicativo (Lyu et al., 2019).

Por otro lado, Burgess et al. (2014) reportaron que el proceso de compactación de la cromatina durante la mitosis sería suficiente estímulo para disparar la primera etapa de la vía de señalización de respuesta al daño en el ADN (*DNA damage response*, DDR), aún en ausencia de éste, originando marcas de γ H2AX más pequeñas que las generadas por daño.

Es posible poner en evidencia dominios de replicación del ADN en la cromatina, incorporando, por ejemplo, el análogo de la timidina EdU (5-ethynyl-2'- deoxyuridine), durante la síntesis activa de ADN. Se ha demostrado que cuando EdU se incorpora durante un ciclo celular, no genera daño en el ADN (Kohlmeier et al., 2013). Por tanto, aplicando esta técnica pueden evidenciarse regiones replicantes en núcleos interfásicos y cromosomas mitóticos.

1.1 – Antecedentes

Liddle et al. (2014) mapearon el daño en el ADN con respecto a las zonas replicantes, analizando la distribución de foci de γ H2AX inducidos por Bleo en núcleos interfásicos de la línea celular CHO9. Mediante la colocalización entre los foci de γ H2AX y los dominios de cromatina EdU+ tanto en núcleos en ES (*Early S*) como en MS/LS (*Middle S/ Late S*) observaron un predominio de

foci de γ H2AX en regiones de cromatina replicante, eucromatina en ES y heterocromatina en MS/LS, indicando que la distribución del daño primario es modulada por la síntesis de ADN.

Di Tomaso et al. (2014) estudiando cromosomas metafásicos de CHO9, fueron los primeros en caracterizar marcas de γ H2AX sobre cromosomas mitóticos. Los autores analizaron metafases provenientes de cultivos tratados con Bleo y de controles, observando marcas de γ H2AX en ambos grupos experimentales, con menor frecuencia en los grupos no tratados. Las marcas de γ H2AX mostraron una disposición dependiente de los sitios de reordenamiento cromosómico durante el establecimiento de la línea celular, independientemente de su posición cromosómica, lo que sugiere su localización en sitios de daño cromosómico.

Por otra parte, *Reyes-Ábalos et al.* (2018) analizaron la relación entre marcas de γ H2AX, inducidas por Bleo, con marcas de regiones replicantes tardías (EdU+). Observaron que, las marcas de γ H2AX provenientes de cultivos de CHO9 tratados durante LS, colocalizaban con bandas cromosómicas de replicación tardía. Este hallazgo, concuerda con lo observado por *Liddle et al.* (2014) en núcleos interfásicos.

Los resultados de *Liddle et al.* (2014) y *Reyes-Ábalos et al.* (2018) sugieren que la replicación sensibiliza el ADN al daño, probablemente debido al mayor acceso de las noxas al ADN, ante el proceso de descondensación local que acompaña la síntesis de ADN.

1.2 - Problema de Investigación

Considerando los resultados obtenidos en nuestro laboratorio sobre:

(a) la preferencia de las regiones con daño genético inducido (γ H2AX+) por compartimentos interfásicos de replicación temprana o tardía, dependiendo del período de la fase S (ES o MS/LS respectivamente),

(b) el predominio de sitios de γ H2AX+ a nivel de regiones replicantes tardías (LS) de cromosomas metafásicos, cuando el daño fue inducido durante dicha fase

(c) la visualización de marcas de γ H2AX en regiones cromosómicas reordenadas de la línea CHO9 y

(d) la presencia de marcas γ H2AX en cromosomas metafásicos no expuestos a la inducción de daño,

nos propusimos analizar en la línea celular CHO9:

1.a) Si las marcas de γ H2AX causadas por el daño genético inducido durante las fases S-temprana (ES) o S-media (MS) del ciclo celular colocalizan con regiones cromosómicas replicantes (EdU+) correspondientes a dichas fases, respectivamente.

1.b) Si las marcas de γ H2AX en cromosomas metafásicos provenientes de cultivos sin inducción de daño también colocalizaban con regiones cromosómicas replicadas durante ES o MS.

2) Asimismo, nos propusimos caracterizar la morfología de las marcas cromosómicas de γ H2AX, tanto en cultivos tratados como controles.

1.3 - Hipótesis

1- El daño genético primario (marcas de γ H2AX) inducido en el ADN por Bleo, durante las fases ES o MS predomina en regiones replicantes (EdU+) ES o MS respectivamente, de cromosomas metafásicos de CHO9.

2- Existen diferencias en las características morfológicas y de intensidad de las marcas de γ H2AX entre condiciones de inducción y controles.

Si la primera hipótesis se probase, considerando los antecedentes ya mencionados de nuestro laboratorio, podríamos concluir que el ADN de CHO9 es más sensible al daño genético inducido durante su replicación y que las regiones dañadas permanecen marcadas hasta la metafase en las áreas cromosómicas replicantes.

1.4 – Objetivos

1) Detectar la presencia y frecuencia de marcas de γ H2AX inducidas por Bleo durante las fases ES o MS, analizando cromosomas metafásicos de CHO9.

2) Determinar la presencia y frecuencia de marcas de γ H2AX en controles.

3) Describir área, intensidad y forma de las marcas de γ H2AX tanto en grupos tratados como control.

4) Analizar la colocalización de marcas de γ H2AX con regiones cromosómicas replicantes (EdU+) en metafases provenientes de cultivos de CHO9 expuestos a Bleo durante ES o MS.

2. Metodología

2.1 - Línea celular CHO9

Trabajamos con la línea celular CHO9, un subclón de células CHO (ovario de hámster chino) (Puck *et al.*, 1958), dado que contábamos con resultados previos en esta línea celular.

CHO9 presenta 21 cromosomas: nueve originales (1, 2, 5, 7, 9, 10, dos 8 y un X) y doce reordenados (Z1-Z10, Z12 y Z13), originados mediante reordenamientos ocurridos durante el establecimiento de la línea celular (Deaven & Petersen, 1973). El único cromosoma X es metacéntrico, con un brazo largo (Xq) casi enteramente heterocromático, que se replica durante la fase S-tardía, con excepción de una constricción secundaria medial, y un brazo corto (Xp), cuya replicación ocurre durante la fase S-temprana (ES) (Schmid & Leppert, 1969; Ray, 1976; Di Tomaso *et al.*, 2006; Di Tomaso *et al.*, 2010).

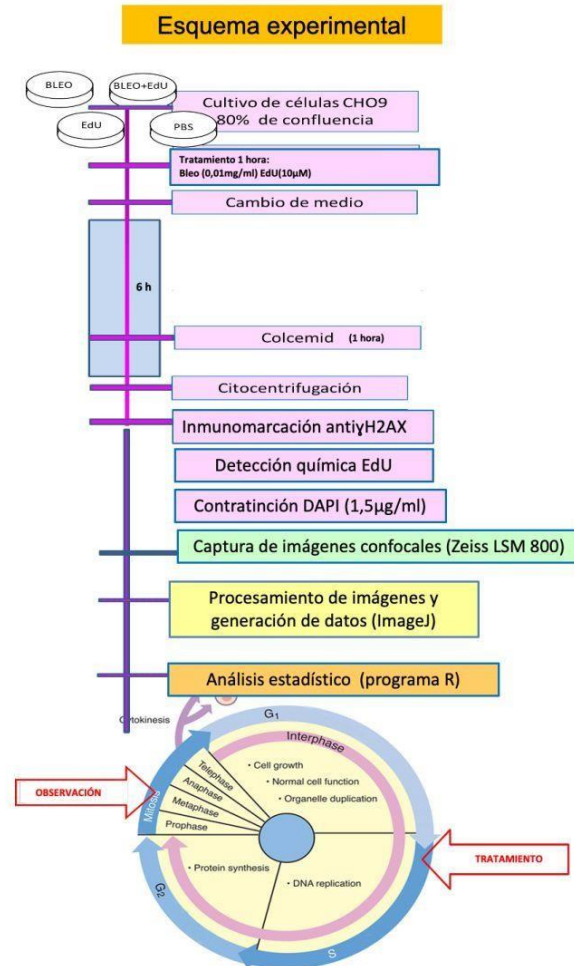


Figura 1 - Esquema de la metodología experimental

2.2 - Tratamiento con Bleo e incorporación de EdU

Las células de la línea CHO9 (de Natarajan AT, Universidad de Leiden) fueron cultivadas a 37°C y 5% de CO₂ en medio de cultivo Ham-F12 (PAA E15/890) suplementado con 10% de suero fetal bovino (PAA A15-151) y antibióticos (100 U/mL de penicilina y 125 mg/mL de dihidroestreptomicina sulfato, Sigma). En la Tabla 1 se presentan los diferentes tratamientos según grupos experimentales, los tiempos de tratamiento y recuperación, las concentraciones finales de Bleo y EdU incorporados a los cultivos y el volumen de PBS agregado al grupo control. El tiempo de recuperación de 6 horas fue ajustado a fin de observar metafases, en nuestros cultivos sincrónicos de células dañadas en ES o MS (Di Tomaso et al., 2006). Posteriormente, el medio fue removido, la monocapa lavada con PBS y cultivada (6 horas, 37°C, 5% CO₂) en medio completo. Ver Figura 1 para una visión global de la metodología.

Tabla 1 - Grupos experimentales, concentraciones finales de los compuestos utilizados y tiempos de exposición y recuperación.

Grupo experimental	Concentración final	Exposición (h)	Recuperación (h)
Bleomicina (Bleo)	10 µg/mL	1	6
EdU	10 µM	1	6
EdU y Bleo (E+B)	10 µM + 10 µg/mL	1	6
PBS	10 µL	1	6

2.3 - Recolección de cultivos, citocentrifugación y obtención de extendidos cromosómicos

Durante la última hora de incubación, se agregó a los cultivos Colcemid (Ciba) a una concentración final de 0.16 µg/mL. Después de la exposición a Colcemid, las células mitóticas fueron recuperadas mediante pipeteo suave de la monocapa celular, centrifugadas y resuspendidas en KCl 0.075 mM a 37°C durante 5 min (shock hipotónico). A continuación, las suspensiones celulares (50.000 células/500µL) fueron citocentrifugadas a 2000 rpm, durante 10 minutos usando un *Cellspin / Cytocentrifuge* (Tharmac GmbH) para obtener cromosomas metafásicos dispersos sobre portaobjetos.

2.4 - Inmunomarcación de γH2AX y detección de EdU

Las preparaciones cromosómicas fueron fijadas (2% paraformaldehído, 5 min), permeabilizadas (0.5% Triton X-100, 5 min) y bloqueadas con 2% BSA (15 min). Luego, fueron incubadas (37°C, 30 min) con anti-γH2AX de ratón (Abcam, 1:500), lavadas con 2% BSA (3 veces, 3 minutos) e incubadas (37°C,

30 min) con anticuerpos conjugados de conejo anti-ratón *Alexa Fluor 546* (*Molecular Probes*, 1:250). La incorporación de EdU fue revelada mediante reacción química con una azida conjugada a *Alexa Fluor 488* (30 min) (*Click-iT EdU Imaging Kit*, *Invitrogen*). Finalmente, los cromosomas fueron contrateñidos (10 min) con 1.5 µg/mL de DAPI (*Sigma-Aldrich*) y montados en *Vectashield* (*Vector Laboratories*).

2.5 Adquisición y análisis de imágenes

Las imágenes de metafases provenientes de control (PBS) y cultivos tratados (E+B, Bleo y EdU) fueron capturadas usando el microscopio láser confocal *Zeiss LSM 800* con láser de estado sólido y detector *Ga ASP* del IIBCE. La configuración del microscopio se ajustó empleando el control sin anticuerpos primarios. Se escaneó en forma secuencial en función de la longitud de onda de los fluoróforos, a fin de evitar el sangrado entre señales. Las imágenes de 1024 x 1024 píxeles fueron adquiridas usando un lente objetivo de inmersión en aceite *Plan Apochromatic* (63x, 1.4 NA). Las imágenes se guardaron en archivos digitales con formato no comprimido de extensión TIFF (.tif). Se utilizó el software *ImageJ* para recortar cada metafase de las imágenes originales y se realizaron máscaras binarias de cada canal: 405 nm (DAPI), 488 nm (EdU), 546 nm (γH2AX), maximizando la concordancia con las imágenes originales, sobre las cuales se procedió a realizar los diferentes análisis.

2.6 Identificación de las etapas de la fase S analizadas

Se reconocieron las fases mediante la identificación de sus patrones de replicación:

- Fase S-temprana (ES): marcas eucromáticas EdU+ en la constricción secundaria del brazo largo (Xp) y en regiones autosómicas correspondientes a bandas G-claras, identificadas comparando con idiogramas de los cromosomas (*Martínez-López et al., 2001; Di Tomaso et al., 2006*) (Figura 2: a y b).

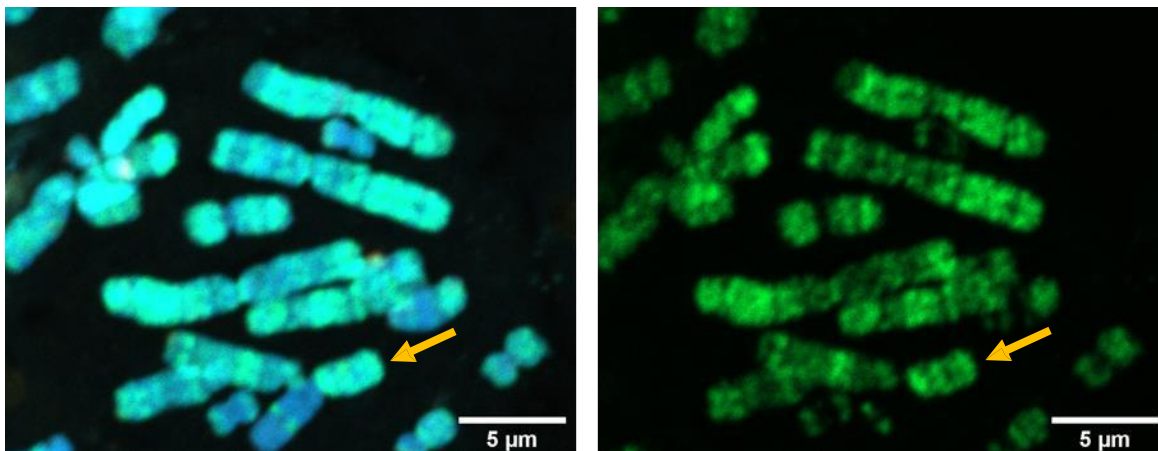


Figura 2.A. Imágenes confocales de metafases de CHO9 expuestas a Bleo durante ES. En cada panel (a) y (b), se observa una metafase típica de ES, con superposición de marcas de EdU y DAPI en (a) y con las marcas características de EdU en (b). Se observa la apariencia característica del cromosoma X durante ES (flechas amarillas): brazo corto eucromático marcado con EdU y brazo largo heterocromático con dos pequeñas regiones simétricas marcadas con EdU, concordantes con su constricción secundaria eucromática. También se observan las marcas de EdU autosómicas correspondientes a regiones eucromáticas, (bandas G-claras), replicadas durante ES.

- Fase S-media (MS): marcas EdU+ en ambos brazos del cromosoma X y en regiones autosómicas correspondientes a las bandas G-oscuras comparadas con el idiograma de los cromosomas (Martínez- López *et al.*, 2001; Di Tomaso *et al.*, 2006) y dos marcas simétricas EdU+ en cada brazo del cromosoma Z-3, equidistantes al centrómero (Figura 2: c y d).

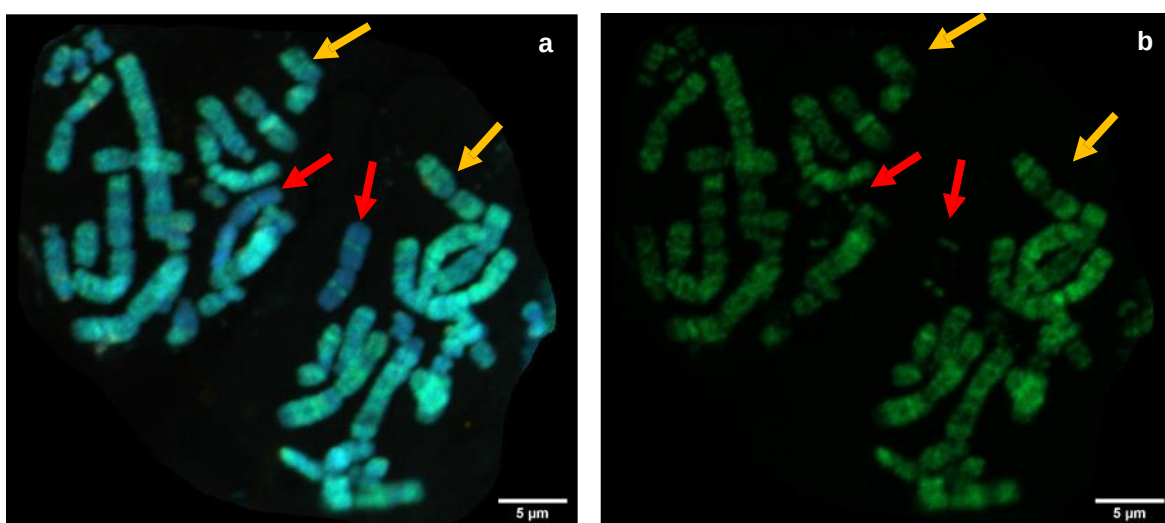


Figura 2.B. Imágenes confocales de dos metafases de CHO9 expuestas a Bleo durante MS. En (a) y (b), se observan dos metafases contiguas típicas de MS, con superposición de marcas de EdU y DAPI en (a) y con las marcas características de EdU en (b). En cada una se encuentra el cromosoma Z-3, con su apariencia característica durante MS (flechas rojas): dos marcas específicas y simétricas de EdU en cada brazo. También se observan los cromosomas X (flechas amarillas) marcados con EdU en ambos brazos y marcas de EdU autosómicas correspondientes a regiones de heterocromatina facultativa (bandas G-oscuras) replicadas durante MS.

De acuerdo con los objetivos, se seleccionaron las metafases que fueron dañadas durante las fases ES o MS para realizar los análisis que se describen a continuación.

2.7 - Cuantificación y caracterización de las marcas de γ H2AX

Se siguió el siguiente proceso:

- (1) Se calculó la frecuencia de células con marcas de γ H2AX y la frecuencia de señales por metafase.

(2) Se midió el área e intensidad media (intensidad/área) de fluorescencia de las marcas de γ H2AX, utilizando el programa *Image J*. Posteriormente, en base a las diferencias en las intensidades de fluorescencia y áreas de las marcas, se clasificaron en débiles ($0 < d < 70$), medias ($70 \leq m < 119$) y fuertes ($119 \leq i \leq 255$).

(3) Para caracterizar las marcas discretas se usaron los descriptores de forma de *Image J*:

- **circularidad**: definida por $4\pi \text{ área} / \text{perímetro}^2$, cuyos valores van de 0 a 1 (círculo perfecto), y puede modificarse por dos motivos: cambios en el área o cambios en el perímetro. Si el perímetro aumenta y el área no cambia, la circularidad decrece, indicando que hay un contorno irregular. Si solo el área decrece y no el perímetro, la circularidad también decrece, porque cambia la forma. En este caso también aumenta AR (*Takashimizu & Iiyoshi, 2016*).

- **AR** (*Aspect Ratio*) es la relación entre longitud eje mayor/ longitud eje menor. El eje mayor se define como la mayor recta que se puede trazar entre los límites del objeto y el eje menor es la menor recta perpendicular al eje mayor que se puede trazar entre los límites del objeto. Los valores de AR aumentan a medida que la imagen se deforma. El valor 1 define un cuadrado o un círculo (para discriminarlos se utiliza el siguiente parámetro: redondez 0: cuadrado, redondez 1: círculo), correspondiendo el valor 10, por ejemplo, a una elipse cuyo valor de eje mayor es 10 y de eje menor 1.

- **redondez**, cuya ecuación es $4 \text{ área} / \pi (\text{eje mayor})^2$, puede tener valores desde 0 a 1, (1 = círculo). Tanto una forma elíptica como un contorno irregular disminuirán los valores de redondez. Si hay picos o el área es angulosa, va a haber valores bajos de redondez. Si la redondez y la circularidad son bajas, tenemos un objeto con forma de estrella, siempre y cuando el AR sea cercano a 1.

- **solidez** es la relación entre área / área convexa del objeto. El área convexa es el círculo cuyo diámetro coincide con el eje mayor del objeto. La solidez (0 a 1) mide la densidad del objeto. Un valor 1 define a un objeto sólido. Si el contorno es irregular o si hay agujeros o la densidad del objeto es heterogénea los valores tienden a 0.

2.8 - Análisis de colocación de marcas de γ H2AX y regiones cromosómicas replicantes (EdU+) durante los tratamientos

El análisis de colocación se utiliza para determinar si las marcas de dos fluoróforos se encuentran en el mismo lugar (co-ocurrencia) (*Dunn et al., 2011*). Para realizar este análisis se utilizó el *plugin* Coloc2 del programa *ImageJ*. Este programa estima la colocación analizando la co-ocurrencia de dos marcas (por ejemplo, rojo y verde) calculando los coeficientes de Manders (M1 y M2), que cuantifican el número de píxeles solapantes entre ambas marcas, siendo:

$$M1 = \frac{\text{rojo} \cap \text{verde}}{\text{verde}} \quad M2 = \frac{\text{verde} \cap \text{rojo}}{\text{rojo}} \quad (\text{Manders et al., 1993})$$

En este trabajo para determinar la colocación entre las marcas de γ H2AX y las regiones replicantes se determinó si las zonas replicantes (EdU+) estaban contenidas en la cromatina (DAPI+) para lo cual se calculó el coeficiente M2 de esta relación.

- M1: Fracción de cromatina replicada que ocupa el área de cromatina total (DAPI), obtenida por intersección de píxeles EdU+ y DAPI+ (área de DAPI $\cap$ área de EdU) sobre el área replicada (EdU+):

$$\frac{\gamma H2AX \cap EdU}{EdU}$$

Para saber si la marca de γ H2AX colocaliza con la cromatina replicante (EdU+) se calculó el coeficiente M1 de esta relación.

- M2: Fracción de área cromosómica dañada (γ H2AX+) contenida en la cromatina replicada EdU+, obtenida por intersección de píxeles EdU+ y γ H2AX+ (área de EdU $\cap$ área de γ H2AX) sobre el área dañada (γ H2AX+):

$$\frac{EdU \cap \gamma H2AX}{\gamma H2AX}$$

Un valor 1 en los coeficientes de Manders equivale a **co-ocurrencia**, mientras que un valor 0 indica **no co-ocurrencia**.

Para analizar las marcas débiles, medias y fuertes de γ H2AX, se recortaron metafases individuales de las imágenes panorámicas de 8 bits, guardándose como archivo .tif. Se separaron los canales de fluorescencia, creándose máscaras binarias de cada uno. Sobre el canal de γ H2AX se seleccionaron las marcas mediante ROIs (*Region Of Interest*). Se sincronizaron los ROI de γ H2AX sobre los canales de DAPI y EdU. Se seleccionaron los ROIs correspondientes a cada categoría de marca de γ H2AX, eliminando, en cada caso, las otras categorías de marcas en los tres canales. Se colocó individualmente cada ROI de γ H2AX con su correspondiente área en los canales de EdU y DAPI, para cada una de las tres categorías de marcas, calculando los coeficientes de Manders. Se verificó que la fracción EdU+ que está en DAPI (M2), diera valores mayores a 0.9, indicando que todas las marcas de EdU estaban ubicadas en la cromatina (DAPI+). De esta forma, M1 (la fracción de γ H2AX que está en EdU) representa la fracción de colocación de las marcas de γ H2AX con la zona cromosómica replicante (EdU+). Teniendo en cuenta que el valor 1 del coeficiente de Mander indica colocación total y 0 no colocación y que se observaron valores intermedios, se hizo un análisis de los coeficientes de Manders separándolos en rangos de 0.2 de amplitud, considerando al rango 0-0.2 como **no**

colocalización. Los demás rangos muestran diferentes grados de colocalización, tomándose el rango de 0.8-1 como colocalización total.

2.9 - Análisis estadístico

Finalmente, se realizó el análisis estadístico con el programa R.

Se aplicó el test de *Shapiro* para evaluar la normalidad de la distribución de las variables área, intensidad media de fluorescencia y descriptores de forma de las marcas de γ H2AX y test de *Levene* para evaluar la homocedasticidad de sus varianzas. Los datos que no presentaron distribución normal, ni homocedasticidad de varianza, se analizaron aplicando estadística no-paramétrica: rango intercuartílico, mediana, intervalo de confianza 95%, como medidas de resumen y test de *Kruskall-Wallis* y test de *Wilcoxon*, para comparar entre grupos. Los datos con distribución normal se analizaron aplicando estadística paramétrica: media aritmética y desvío estándar, como medidas de resumen y *pairwise t-test* y *t-test* para comparar entre grupos.

Para descartar que la colocalización no fuera aleatoria se realizó *Wilcoxon test* contra un valor $\mu = 0.5$ con 95% de confianza. Considerando el total de ROIs de γ H2AX como 100%, este valor de μ divide la población en dos grupos iguales con o sin colocalización, por lo cual esta fue considerada aleatoria.

3. Resultados

3.1 Caracterización de las marcas de γ H2AX

Como primer paso para el análisis de los datos obtenidos, se realizó el conteo de las metafases de CHO9 marcadas y no marcadas. Luego, se midieron áreas e intensidades de fluorescencia, se aplicaron descriptores de forma y se analizó la colocación de marcas de γ H2AX fuertes, medias y débiles con regiones EdU+. Los resultados se presentan a continuación.

El panel de imágenes de la Figura 3 muestra ejemplos de metafases de CHO9 de los diferentes grupos experimentales, marcadas con anti- γ H2AX, reveladas para visualizar los patrones de replicación (EdU+) y contrateñidas con DAPI. Se observan marcas de γ H2AX en todos los grupos experimentales. También se aprecia que la cantidad, tamaño e intensidad de las señales es mayor en los grupos tratados con E+B y Bleo que en los expuestos a EdU y el control (PBS).

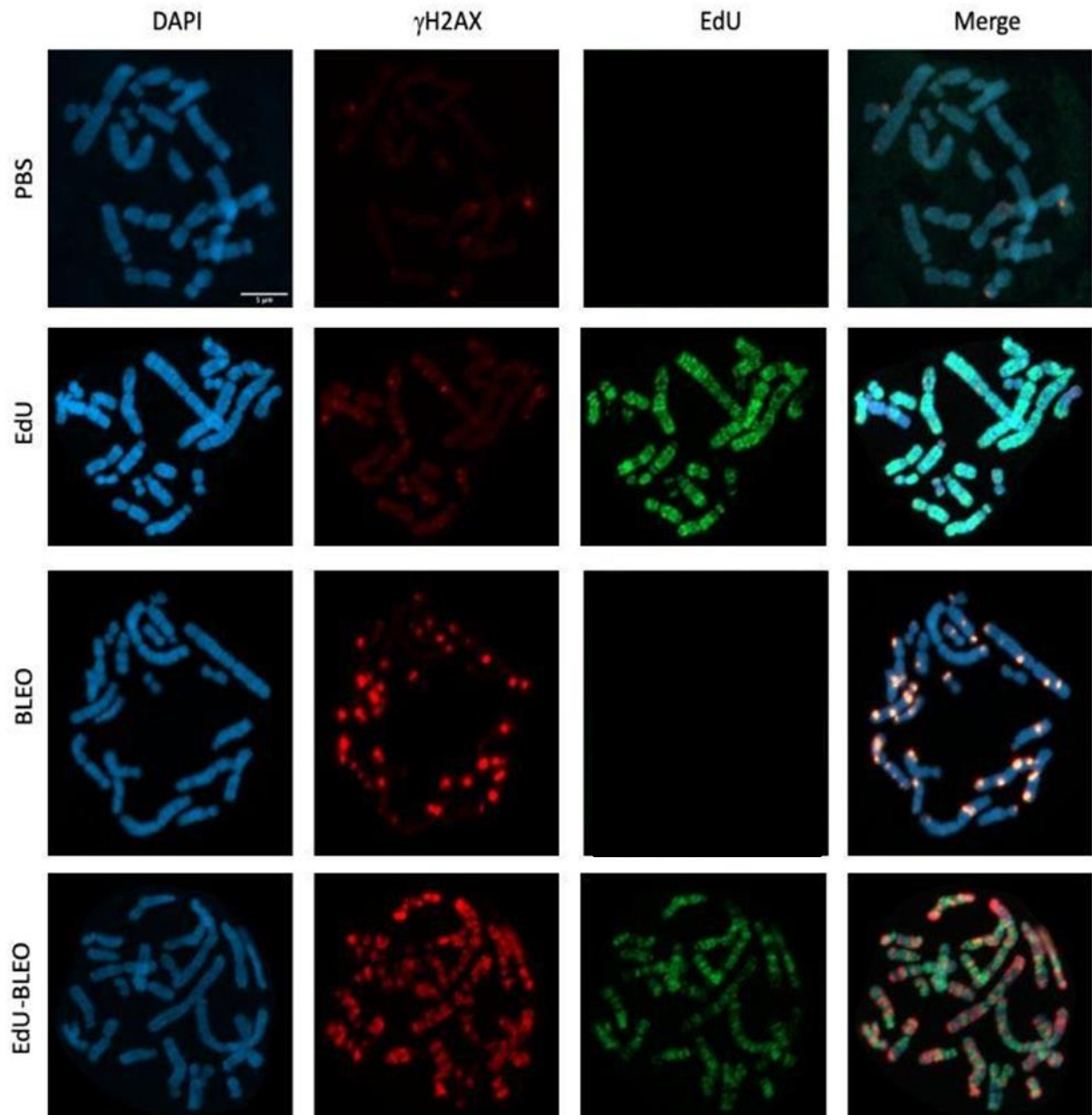


Figura 3. Imágenes confocales de metafases provenientes de cultivos de CHO9 de los grupos experimentales: E+B, Bleo, EdU y PBS. Se observan de izquierda a derecha, los cromosomas teñidos con DAPI, las marcas de γ H2AX, las regiones cromosómicas replicantes incorporadas con EdU y las mismas imágenes con superposición de los canales de las tres marcas (Merge).

En la Figura 4, se observa que, al considerar todas las marcas, los grupos tratados con BLEO (Bleo y E+B) presentan marcas más intensas y grandes que los grupos EdU y control (PBS) ($p < 0.0001$, en todos los casos).

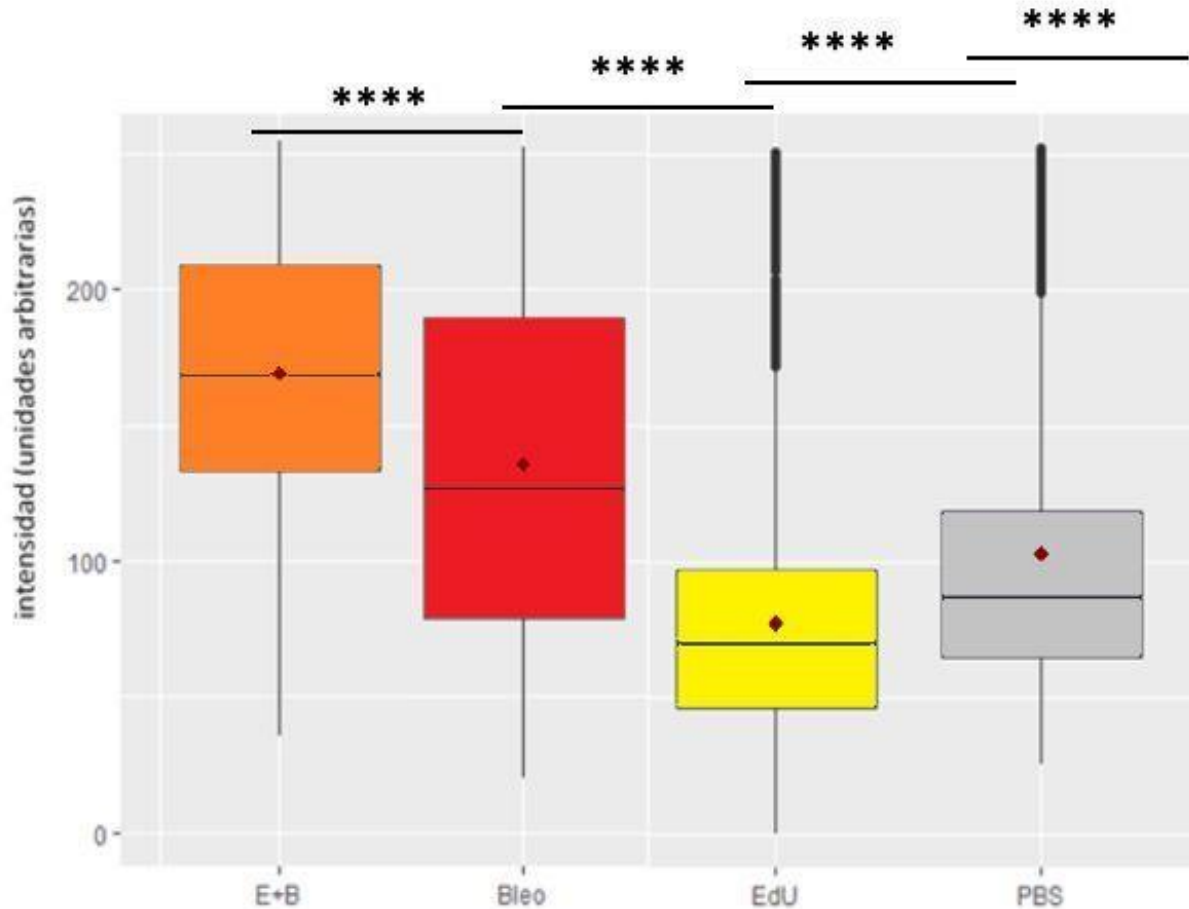


Figura 4 – Distribución de las intensidades de las marcas de γ H2AX por grupo experimental: Cada diagrama de caja contiene el 50% de la población (entre percentiles 25 y 75) y se representa con una línea transversal interior la mediana (percentil 50). E+B: incorporación de EdU y tratamiento simultáneo con Bleomicina. Bleo: tratamiento con Bleomicina. EdU: incorporación de EdU. PBS: control. La intensidad fue valorada con unidades arbitrarias (ua) del programa ImageJ. (Wilcoxon test: **** $p < 0.0001$)

En los histogramas de los controles (Figura 5), se pudo establecer un límite (70 ua) que separaba dos poblaciones de marcas. Se observa que en los grupos tratados con Bleo predominan las marcas con intensidades mayores a 70 ua y en los grupos EdU y control, las menores a 70 ua. Por lo tanto, inicialmente, se adoptó el criterio de separarlas en menores y mayores de 70 ua, procediéndose luego a analizar cada grupo por separado.

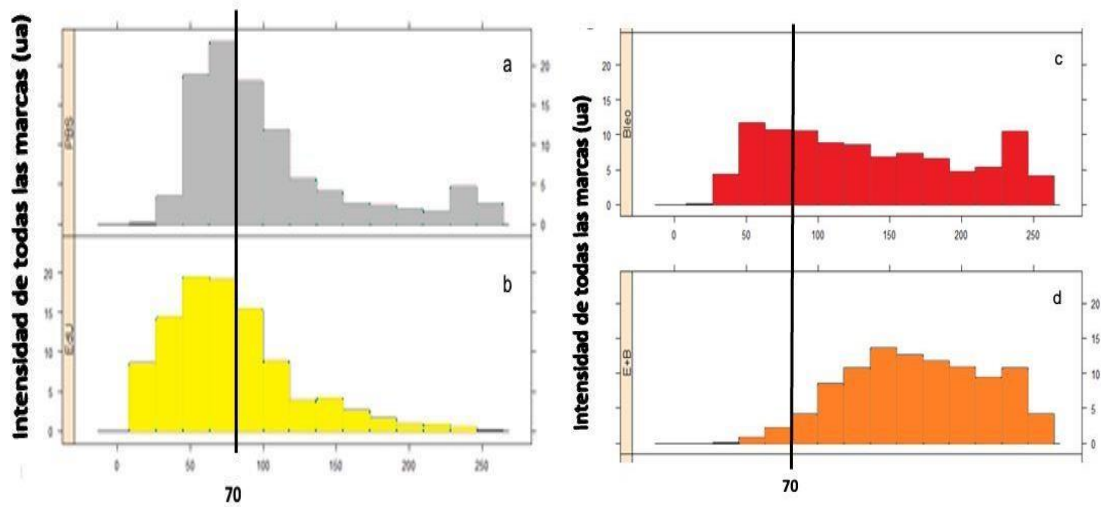


Figura 5. Histograma de frecuencias de metafases según intensidad de las marcas de γ H2AX en los distintos grupos experimentales PBS (a), EdU (b), Bleo (c), E+B (d). La línea negra vertical, marca el punto de corte (70 ua) que separa las dos poblaciones.

Como se aprecia en la Figura 6, si bien tanto en los grupos tratados con Bleo (E+B y Bleo) como en los grupos EdU y PBS, hay marcas mayores a 70 ua, las marcas de los grupos tratados presentan mayor intensidad que las de los grupos EdU y PBS. Por lo que, basados en las diferencias en la intensidad de fluorescencia de las marcas de γ H2AX mayores a 70 ua, dichas marcas se subdividieron en dos subpoblaciones. Resultando ahora tres categorías de intensidad: fuertes ($119 \leq i \leq 255$), medias ($70 \leq m < 119$) y débiles ($0 < d < 70$).

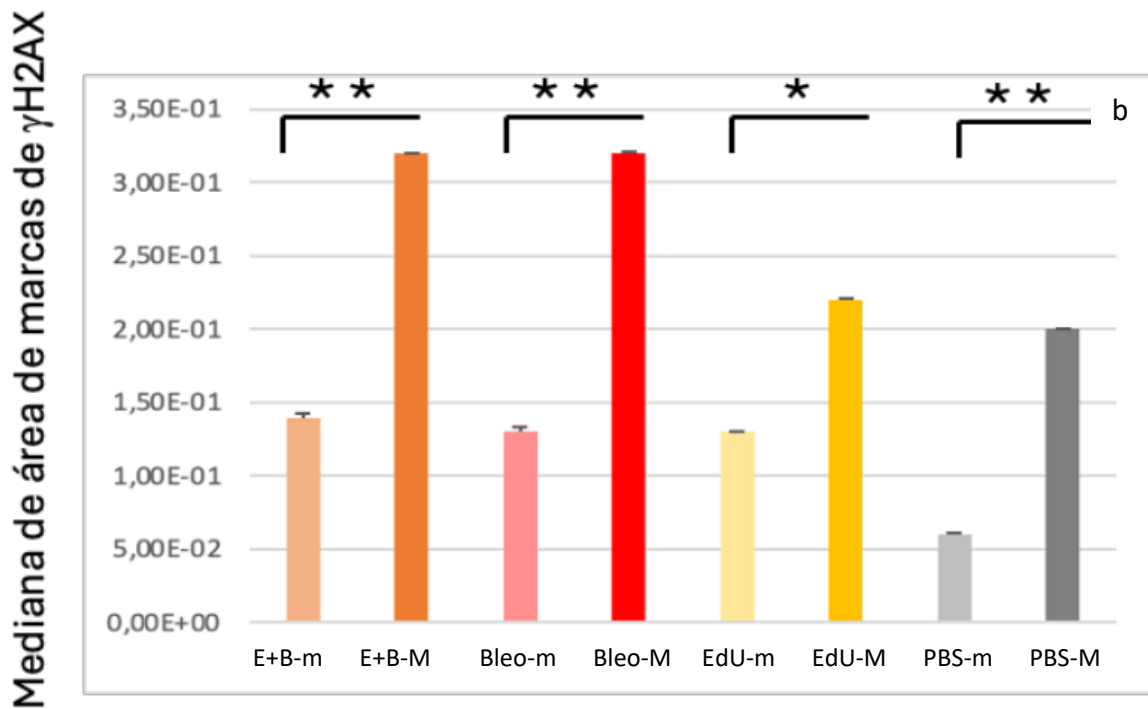
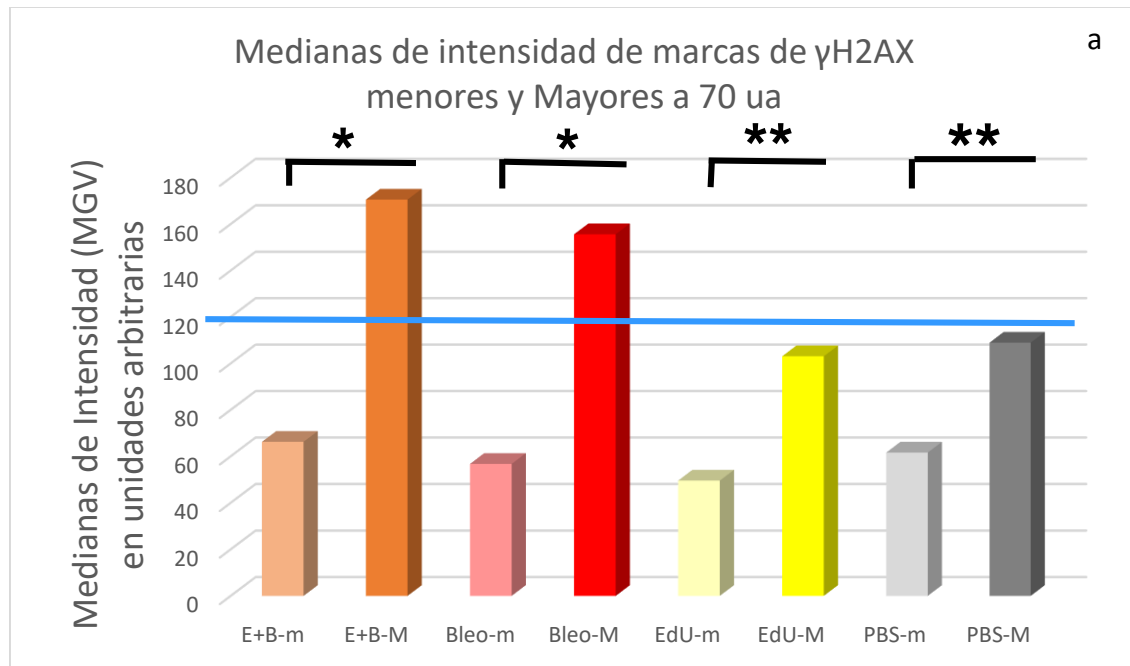


Figura 6. Intensidad (a) y área (b) de marcas de γ H2AX en metafases de CHO9. Las barras representan las medianas de cada variable. Se presentan la intensidad (a) y el área (b) de marcas ≤ 70 ua (m) y marcas >70 ua (M) de γ H2AX en metafases provenientes de todos los grupos experimentales (E+B, Bleo, EdU y PBS. Kruskal-Wallis ** $p \leq 0.0001$ * $p \leq 0.05$

Como todas las metafases provenientes de los grupos experimentales presentaban una sola categoría o distintas combinaciones de categorías de marcas, se procedió a contabilizarlas según su categoría en cada grupo experimental. En los casos en que había más de una categoría de marcas, se halló el porcentaje relativo de cada categoría. En la Figura 7, se observa una marcada prevalencia de metafases que presentan sólo marcas fuertes en el grupo E+B. En el grupo experimental Bleo predominan las metafases con las tres categorías de marca, pero con un 49% del total de marcas de dicho grupo correspondiente a marcas fuertes. En el grupo EdU predominan las metafases con marcas débiles solamente, mientras que en el grupo control predominan ampliamente las metafases con las tres categorías de marcas, prevaleciendo las marcas débiles (46%).

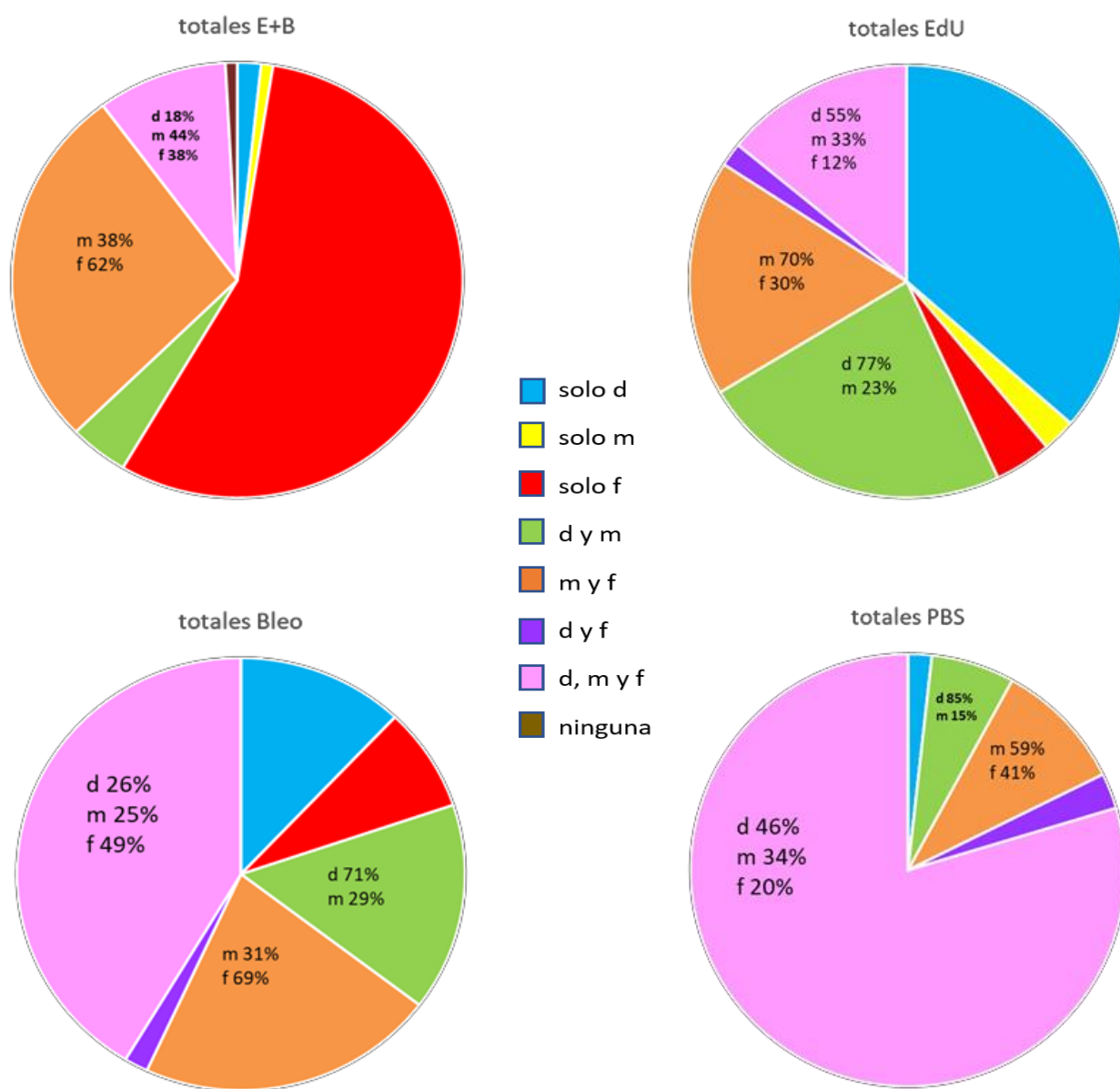


Figura 7. Frecuencia relativa (%) de metafases con marcas de γ H2AX débiles (d: $0 < d < 70\text{ua}$), medias (m: $70\text{ua} \leq m < 119\text{ua}$) y fuertes (f: $119\text{ua} \leq f \leq 255\text{ua}$). Los valores dentro de las fracciones de los diagramas circulares indican los porcentajes relativos de cada categoría en ese segmento, tomando todas las marcas del mismo como 100%.

Características de las marcas

Considerando que se identificaron marcas de γ H2AX con diferentes categorías de intensidad y que, además, podían estar presentes todos sus tipos o solo uno en los grupos experimentales, se procedió a analizar, por categoría y grupo experimental, sus características en cuanto a área y morfología.

Características de las marcas fuertes

La intensidad de las marcas fuertes (Figura 8) es mayor en el grupo Bleo respecto a E+B ($p=0.001$) y a PBS ($p=0.0056$), entre estos dos últimos no hay diferencias significativas y ambos son mayores que EdU ($p=2.0 \times 10^{-16}$). La distribución de los datos es amplia en todos los grupos experimentales, lo que implica que hay variedad de intensidad en las marcas de γ H2AX de cada grupo experimental.

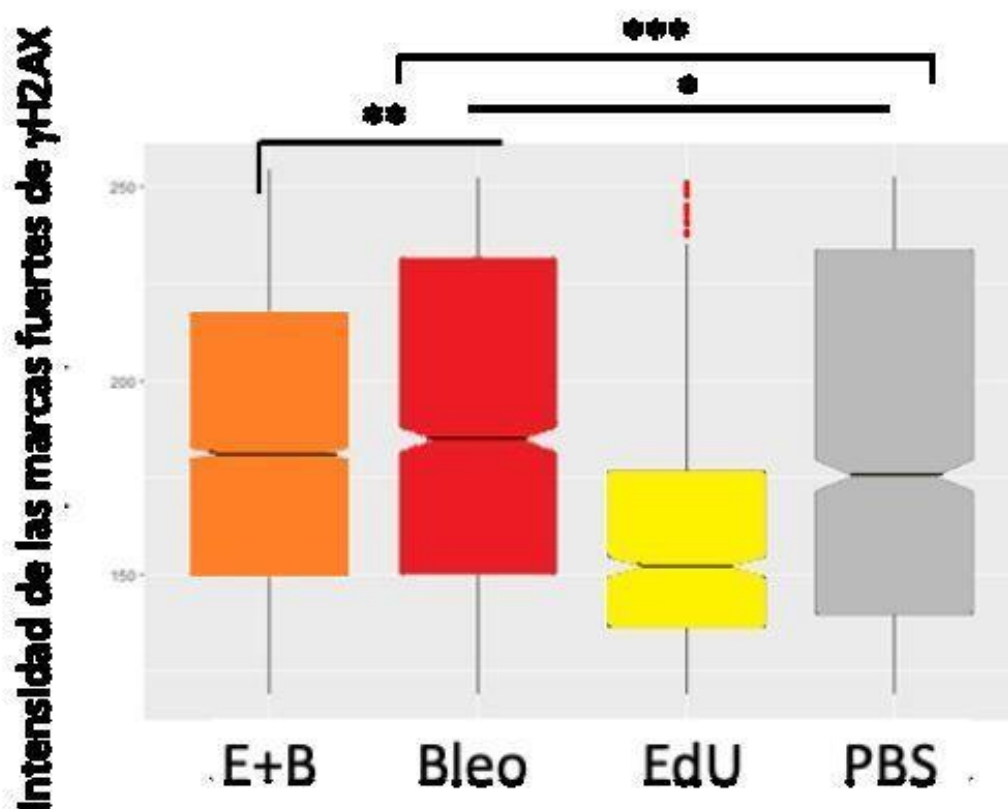


Figura 8. Distribución de la intensidad de las marcas fuertes de γ H2AX en diagramas de cajas. *Wilcoxon rank sum test with continuity correction*. **** $p \leq 0.0001$; *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$. En los gráficos sólo se muestran comparaciones estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

El área de las marcas fuertes (Figura 9) es mayor en el grupo tratado con Bleo que en el expuesto a E+B ($p=0.022$), la cual es, a su vez, mayor que en el grupo EdU ($p=0.0012$), y ésta mayor que el control PBS ($p=0.022$). El rango de distribución de los datos va de 0 a 2 μm^2 , predominando los valores más pequeños en todos los grupos experimentales, más cercanos a 0 en los grupos EdU y PBS.

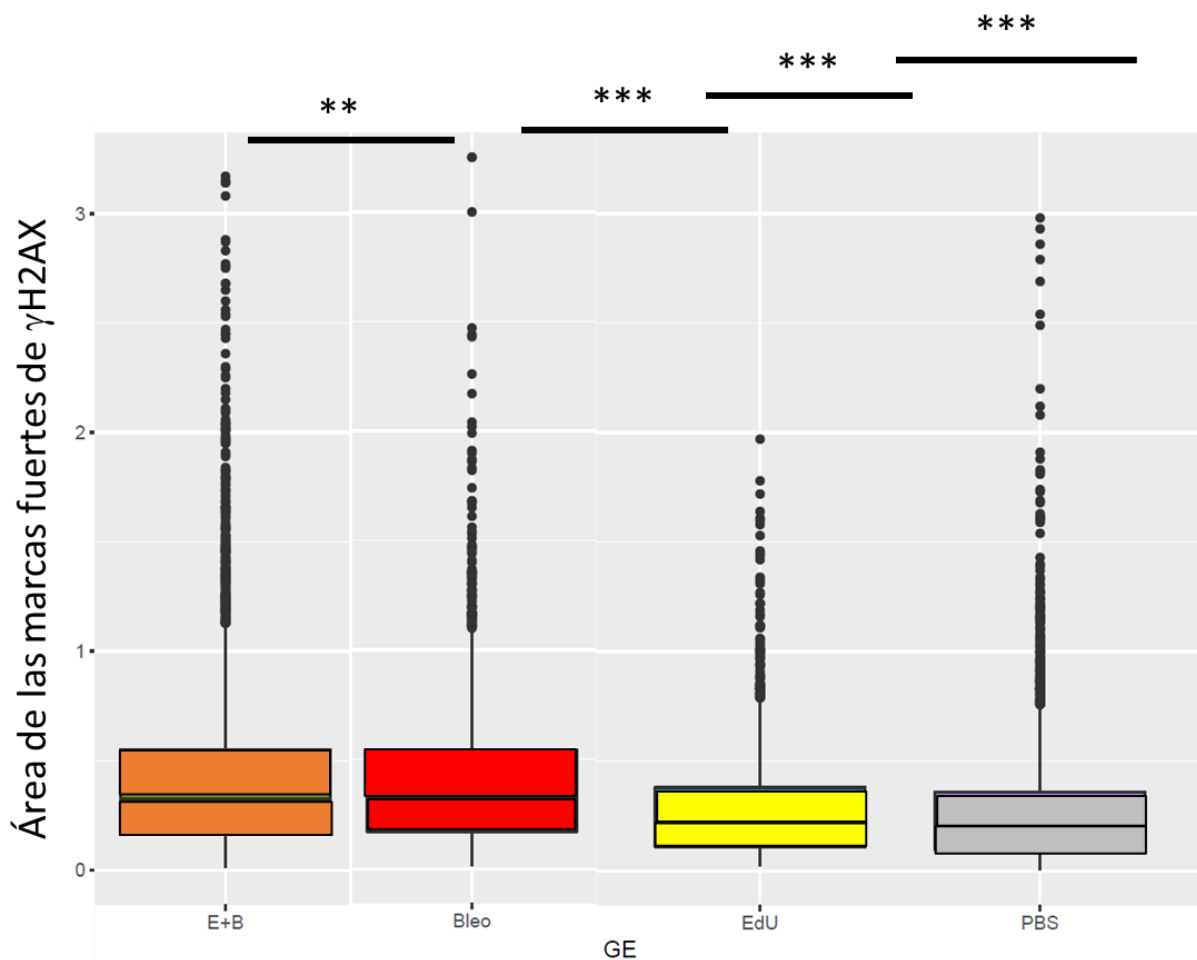


Figura 9. Distribución del área de las marcas fuertes de γH2AX en diagramas de cajas. *Wilcoxon rank sum test with continuity correction*. **** $p \leq 0.0001$; *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$

En la Tabla 2, se puede ver que la circularidad de las marcas fuertes de γH2AX va decreciendo en el siguiente orden: PBS > Bleo > E+B > EdU, siendo los valores de $p < 2.0 \times 10^{-16}$ en todos los casos y su redondez es significativamente decreciente en el siguiente orden: Bleo > EdU > PBS > E+B, siendo los valores p : 3.2×10^{-5} , 5.3×10^{-4} , 0.036, respectivamente. El AR de las marcas fuertes es decreciente en el siguiente orden: E+B > PBS > EdU > Bleo

(valores p: 0.038; 5.7×10^{-4} y 3.1×10^{-5} , respectivamente) mientras que la solidez es decreciente en el siguiente orden: PBS > Bleo > E+B $\approx$ EdU, presentando estos dos últimos grupos diferencias **no significativas** ($\approx$; valores p: 1.5×10^{-11} , $< 2.0 \times 10^{-16}$, respectivamente).

De manera general, las marcas fuertes tienen mayor área ($p < 2.0 \times 10^{-16}$) que las marcas medias y débiles respectivamente, y presentan forma ovoide, contorno regular y densidad homogénea.

Tabla 2. Medianas de los valores de los descriptores de forma (circularidad, redondez, AR y solidez) para las marcas fuertes (**mf**) de γ H2AX y su comparación entre grupos experimentales (GE), aplicando el Wilcoxon test. El **n** de las marcas fuertes (**n m f**) en cada grupo experimental y los valores p de cada comparación se presentan en la tabla. Los casilleros con fondo verde indican valores p significativos, mientras los amarillos indican no-significancia.

Circularidad de las marcas fuertes de γ H2AX					
n m f GE1	GE 1	Mediana de GE1	GE 2	Comparación	Valor p
4782	E+B	0.55	Bleo	E+B < Bleo	$< 2.0 \times 10^{-16}$
	E+B		EdU	E+B > EdU	0.044
	E+B		PBS	E+B < PBS	$< 2.0 \times 10^{-16}$
1383	Bleo	0.73	EdU	Bleo > EdU	1.4×10^{-14}
587	EdU	0.47	PBS	EdU < PBS	$< 2.0 \times 10^{-16}$
1277	PBS	0.82	Bleo	PBS > Bleo	$< 2.0 \times 10^{-16}$
Redondez de las marcas fuertes de γ H2AX					
n m f GE1	GE 1	Mediana de GE1	GE 2	Comparación	Valor p
4782	E+B	0.72	Bleo	E+B < Bleo	$< 2.0 \times 10^{-16}$
	E+B		EdU	E+B < EdU	3.2×10^{-08}
	E+B		PBS	E+B < PBS	0.03605
1383	Bleo	0.80	EdU	Bleo > EdU	3.2×10^{-05}
587	EdU	0.76	PBS	EdU > PBS	0.00053
1277	PBS	0.74	Bleo	PBS < Bleo	$< 2.0 \times 10^{-16}$
AR de las marcas fuertes de γ H2AX					
n m f GE1	GE 1	Mediana de GE1	GE 2	Comparación	Valor p
4782	E+B	1.38	Bleo	E+B > Bleo	$< 2.0 \times 10^{-16}$
	E+B		EdU	E+B > EdU	3.8×10^{-08}
	E+B		PBS	E+B > PBS	0.03801
1383	Bleo	1.26	EdU	Bleo < EdU	3.1×10^{-05}
587	EdU	1.31	PBS	EdU < PBS	0.00057
1277	PBS	1.35	Bleo	PBS > Bleo	$< 2.0 \times 10^{-16}$

Solidez de las marcas fuertes de γ H2AX					
n m i GE1	GE 1	Mediana de GE1	GE 2	Comparación	Valor p
4782	E+B	0.90	Bleo	E+B < Bleo	$< 2.0 \times 10^{-16}$
	E+B		EdU	E+B ~ EdU	0.52
	E+B		PBS	E+B < PBS	2.0×10^{-16}
1383	Bleo	0.92	EdU	Bleo > EdU	2.7×10^{-10}
587	EdU	0.88	PBS	EdU < PBS	$< 2.0 \times 10^{-16}$
1277	PBS	0.94	Bleo	PBS > Bleo	1.5×10^{-11}

Características de las marcas medias

En la Figura 10, se observa que la intensidad de las marcas medias es significativamente mayor en el grupo E+B, siguiéndole en intensidad el grupo tratado con Bleo y luego, el expuesto a EdU. Éste último mostró diferencia no significativa con el control (PBS).

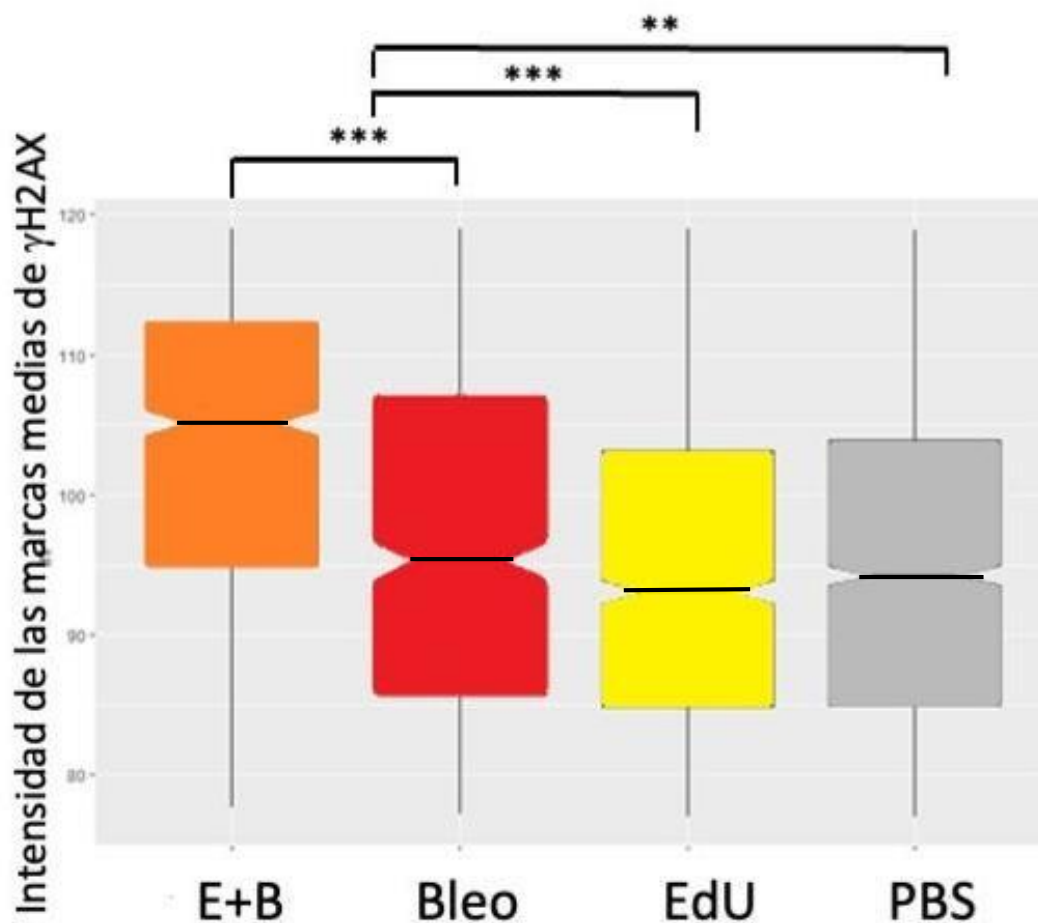


Figura 10. Distribución de la intensidad de las marcas medias de γ H2AX representada en diagramas de caja en cada grupo experimental. *Wilcoxon rank sum test with continuity correction*. **** $p \leq 0.0001$; *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$

El área de las marcas medias (Figura 11) presenta diferencias no significativas entre E+B y Bleo, siendo ambas mayores que EdU ($p=1.8 \times 10^{-6}$ y 1.8×10^{-4} , respectivamente) cuya área es, a su vez, mayor que el grupo control ($p=9.7 \times 10^{-5}$). La distribución de los datos presenta un rango que va de 0 a $1 \mu\text{m}^2$, pero en los grupos E+B, Bleo y EdU predominan las marcas con área $0.25 \mu\text{m}^2$, mientras que en el grupo control son preponderantes las áreas cercanas a cero.

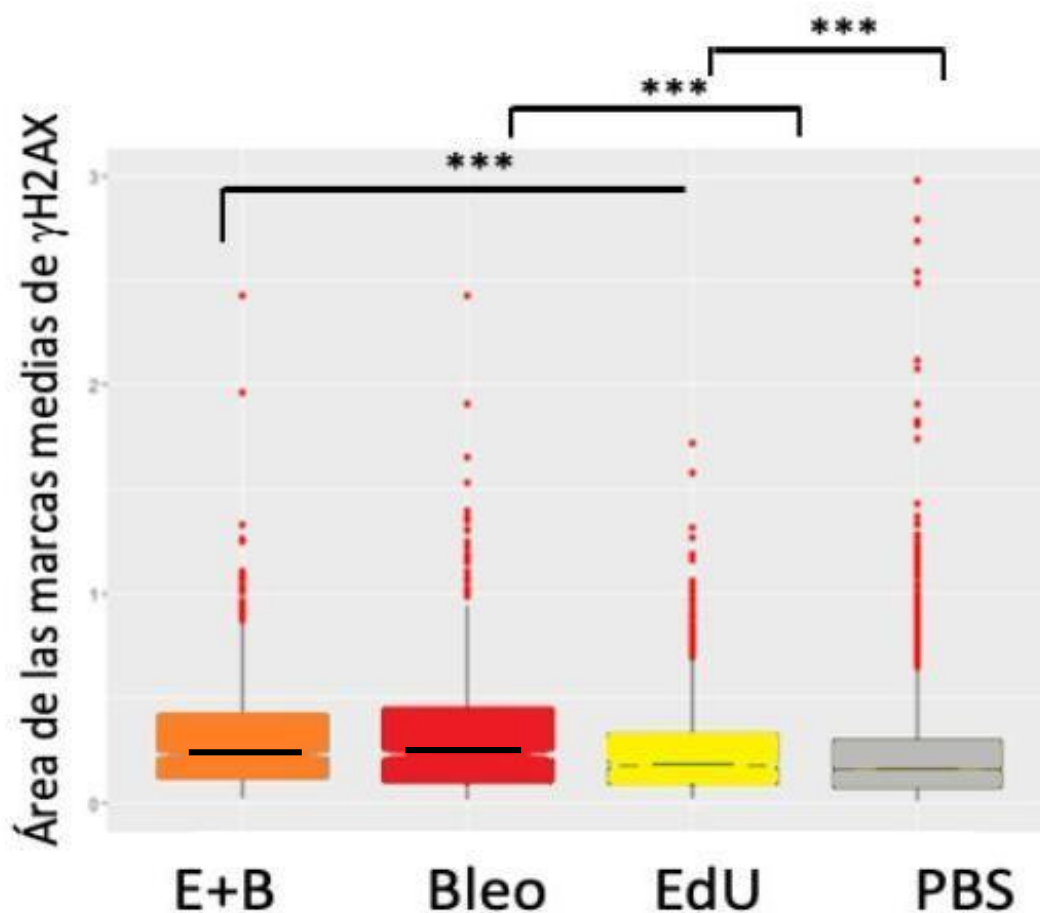


Figura 11.- Distribución del área de las marcas medias de γH2AX de los distintos grupos experimentales graficadas en diagramas de caja. Wilcoxon rank sum test with continuity correction. **** $p \leq 0.0001$; *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$

Como se puede ver en la Tabla 3, no hay diferencias significativas en la circularidad de las marcas medias en ninguno de los grupos. La redondez es mayor en el grupo tratado con Bleo, siendo ésta menor en los grupos EdU y E+B ($p=2.9 \times 10^{-5}$ y 5.1×10^{-6} , respectivamente), los

cuales presentan diferencias no significativas entre ellos. Las marcas medias del control (PBS) son las que presentan la menor redondez ($p=1.3 \times 10^{-9}$). AR de las marcas medias de γ H2AX es decreciente en el siguiente orden: PBS > E+B ($p=1.0 \times 10^{-9}$); E+B $\approx$ EdU > Bleo ($p=3.2 \times 10^{-5}$), habiendo **diferencias no significativas ($\approx$)** entre los grupos E+B y EdU. La solidez de los grupos tratados presenta diferencias no significativas, pero la mediana del grupo control es menor respecto a todos los demás ($p=2.1 \times 10^{-3}$).

Tabla 3. Comparación de las medianas de descriptores de forma (circularidad, redondez, AR y solidez) para las marcas medias de γ H2AX. Wilcoxon test. Los casilleros con fondo verde indican valores p significativos, mientras los amarillos indican no-significancia.

circularidad de las marcas medias de γ H2AX					
n m m GE1	GE 1	Mediana de G1	GE 2	Comparación	Valor p
776	E+B	0.26	Bleo	E+B ~ Bleo	0.25
	E+B		EdU	E+B ~ EdU	0.68
	E+B		PBS	E+B ~ PBS	0.86
587	Bleo	0.27	EdU	Bleo ~ EdU	0.68
1181	EdU	0.26	PBS	EdU ~ PBS	0.30
1813	PBS	0.25	Bleo	PBS ~ Bleo	0.06

Redondez de las marcas medias de γ H2AX					
n m m GE1	GE 1	Mediana de G1	GE 2	Comparación	Valor p
776	E+B	0.74	Bleo	E+B < Bleo	5.1×10^{-06}
	E+B		EdU	E+B ~ EdU	0.35
	E+B		PBS	E+B > PBS	1.3×10^{-09}
587	Bleo	0.78	EdU	Bleo > EdU	2.9×10^{-05}
1181	EdU	0.74	PBS	EdU > PBS	2.0×10^{-15}
1813	PBS	0.69	Bleo	PBS < Bleo	$< 2.0 \times 10^{-16}$

AR de las marcas medias de γ H2AX					
n m m GE1	GE 1	Mediana de G1	GE 2	Comparación	Valor p
776	E+B	1.35	Bleo	E+B > Bleo	7.1×10^{-06}
	E+B		EdU	E+B ~ EdU	0.38
	E+B		PBS	E+B < PBS	1.0×10^{-09}
587	Bleo	1.29	EdU	Bleo < EdU	3.2×10^{-05}
1181	EdU	1.34	PBS	EdU < PBS	2.3×10^{-15}

1813	PBS	1.44	Bleo	PBS > Bleo	$< 2.0 \times 10^{-16}$
solidez de las marcas medias de γ H2AX					
n m m GE1	GE 1	Mediana de G1	GE 2	Comparación	Valor p
776	E+B	0.78	Bleo	E+B ~ Bleo	0.32016
	E+B		EdU	E+B ~ EdU	0.46929
	E+B		PBS	E+B > PBS	0.00067
587	Bleo	0.80	EdU	Bleo ~ EdU	0.12398
1181	EdU	0.78	PBS	EdU > PBS	0.00208
1813	PBS	0.77	Bleo	PBS < Bleo	2.2×10^{-05}

En general, las marcas medias presentan intensidad y área intermedia entre las marcas intensas y débiles (p en la tabla 4), y tienen un contorno más irregular, son más circulares y su densidad es menor que las marcas fuertes (p en la tabla 4).

Tabla 4. Tabla comparativa por categorías del área y los descriptores de forma en los grupos experimentales

ÁREA					
n marcas	GE 1	Mediana de G1	GE 2	comparación	Valor p
155	E+B-d	0.14	E+B-m	E+B-d < E+B-m	7.5×10^{-06}
776	E+B-m	0.23	E+B-i	E+B-m < E+B-i	$< 2.0 \times 10^{-16}$
4782	E+B-i	0.34	E+B-d	E+B-i > E+B-d	$< 2.0 \times 10^{-16}$
621	Bleo-d	0.13	Bleo-m	Bleo-d < Bleo-m	5.5×10^{-15}
587	Bleo-m	0.23	Bleo-i	Bleo-m < Bleo-i	$< 2.0 \times 10^{-16}$
1383	Bleo-i	0.35	Bleo-d	Bleo-i > Bleo-d	$< 2.0 \times 10^{-16}$
2374	EdU-d	0.13	EdU-m	EdU-d < EdU-m	$< 2.0 \times 10^{-16}$
1181	EdU-m	0.18	EdU-i	EdU-m < EdU-i	$< 2.0 \times 10^{-16}$
587	EdU-i	0.29	EdU-d	EdU-i > EdU-d	$< 2.0 \times 10^{-16}$
2032	PBS-d	0.06	PBS-m	PBS-d < PBS-m	$< 2.0 \times 10^{-16}$
1813	PBS-m	0.16	PBS-i	PBS-m < PBS-i	$< 2.0 \times 10^{-16}$
1277	PBS-i	0.26	PBS-d	PBS-i > PBS-d	$< 2.0 \times 10^{-16}$
CIRCULARIDAD					
n marcas	GE 1	Mediana de G1	GE 2	comparación	Valor p
155	E+B-d	0.20	E+B-m	E+B-d < E+B-m	9.4×10^{-07}
776	E+B-m	0.26	E+B-i	E+B-m < E+B-i	$< 2.0 \times 10^{-16}$
4782	E+B-i	0.55	E+B-d	E+B-i > E+B-d	$< 2.0 \times 10^{-16}$
621	Bleo-d	0.19	Bleo-m	Bleo-d < Bleo-m	7.6×10^{-09}
587	Bleo-m	0.27	Bleo-i	Bleo-m < Bleo-i	$< 2.0 \times 10^{-16}$
1383	Bleo-i	0.73	Bleo-d	Bleo-i > Bleo-d	$< 2.0 \times 10^{-16}$
2374	EdU-d	0.15	EdU-m	EdU-d < EdU-m	$< 2.0 \times 10^{-16}$
1181	EdU-m	0.26	EdU-i	EdU-m < EdU-i	$< 2.0 \times 10^{-16}$
587	EdU-i	0.47	EdU-d	EdU-i > EdU-d	$< 2.0 \times 10^{-16}$
2032	PBS-d	0.23	PBS-m	PBS-d ~ PBS-m	0.059
1813	PBS-m	0.25	PBS-i	PBS-m < PBS-i	$< 2.0 \times 10^{-16}$
1277	PBS-i	0.82	PBS-d	PBS-i > PBS-d	$< 2.0 \times 10^{-16}$
REDONDEZ					
n marcas	GE 1	Mediana de G1	GE 2	comparación	Valor p

155	E+B-d	0.75	E+B-m	E+B-d ~ E+B-m	0.898
776	E+B-m	0.74	E+B-i	E+B-m ~ E+B-i	0.075
4782	E+B-i	0.72	E+B-d	E+B-i ~ E+B-d	0.732
621	Bleo-d	0.73	Bleo-m	Bleo-d < Bleo-m	2.2×10^{-06}
587	Bleo-m	0.78	Bleo-i	Bleo-m < Bleo-i	0.0049
1383	Bleo-i	0.80	Bleo-d	Bleo-i > Bleo-d	$< 2.0 \times 10^{-16}$
2374	EdU-d	0.72	EdU-m	EdU-d < EdU-m	5.8×10^{-06}
1181	EdU-m	0.74	EdU-i	EdU-m < EdU-i	0.0093
587	EdU-i	0.76	EdU-d	EdU-i > EdU-d	1.2×10^{-09}
2032	PBS-d	0.67	PBS-m	PBS-d < PBS-m	2.9×10^{-06}
1813	PBS-m	0.69	PBS-i	PBS-m < PBS-i	5.1×10^{-11}
1277	PBS-i	0.74	PBS-d	PBS-i > PBS-d	$< 2.0 \times 10^{-16}$
AR					
n marcas	GE 1	Mediana de G1	GE 2	comparación	Valor p
155	E+B-d	1.33	E+B-m	E+B-d ~ E+B-m	0.898
776	E+B-m	1.35	E+B-i	E+B-m ~ E+B-i	0.066
4782	E+B-i	1.38	E+B-d	E+B-i ~ E+B-d	0.728
621	Bleo-d	1.37	Bleo-m	Bleo-d > Bleo-m	2.5×10^{-06}
587	Bleo-m	1.29	Bleo-i	Bleo-m > Bleo-i	0.0045
1383	Bleo-i	1.26	Bleo-d	Bleo-i < Bleo-d	$< 2.0 \times 10^{-16}$
2374	EdU-d	1.39	EdU-m	EdU-d > EdU-m	5.7×10^{-06}
1181	EdU-m	1.34	EdU-i	EdU-m > EdU-i	0.0096
587	EdU-i	1.31	EdU-d	EdU-i < EdU-d	1.4×10^{-09}
2032	PBS-d	1.49	PBS-m	PBS-d > PBS-m	3.1×10^{-06}
1813	PBS-m	1.44	PBS-i	PBS-m > PBS-i	5.7×10^{-11}
1277	PBS-i	1.35	PBS-d	PBS-i < PBS-d	$< 2.0 \times 10^{-16}$
SOLIDEZ					
n marcas	GE 1	Mediana de G1	GE 2	comparación	Valor p
155	E+B-d	0.70	E+B-m	E+B-d < E+B-m	6.4×10^{-09}
776	E+B-m	0.78	E+B-i	E+B-m < E+B-i	$< 2.0 \times 10^{-16}$
4782	E+B-i	0.90	E+B-d	E+B-i > E+B-d	$< 2.0 \times 10^{-16}$
621	Bleo-d	0.73	Bleo-m	Bleo-d < Bleo-m	8.3×10^{-14}
587	Bleo-m	0.80	Bleo-i	Bleo-m < Bleo-i	$< 2.0 \times 10^{-16}$
1383	Bleo-i	0.82	Bleo-d	Bleo-i > Bleo-d	$< 2.0 \times 10^{-16}$
2374	EdU-d	0.65	EdU-m	EdU-d < EdU-m	$< 2.0 \times 10^{-16}$
1181	EdU-m	0.78	EdU-i	EdU-m < EdU-i	$< 2.0 \times 10^{-16}$
587	EdU-i	0.88	EdU-d	EdU-i > EdU-d	$< 2.0 \times 10^{-16}$
2032	PBS-d	0.71	PBS-m	PBS-d < PBS-m	1.5×10^{-14}
1813	PBS-m	0.77	PBS-i	PBS-m < PBS-i	$< 2.0 \times 10^{-16}$
1277	PBS-i	0.94	PBS-d	PBS-i > PBS-d	$< 2.0 \times 10^{-16}$

Características de las marcas débiles

La intensidad de las marcas débiles de γ H2AX (Figura 12) presenta valores decrecientes: E+B > PBS > Bleo > EdU ($p = 5.9 \times 10^{-5}$; 1.8×10^{-14} ; $< 2.0 \times 10^{-16}$; respectivamente).

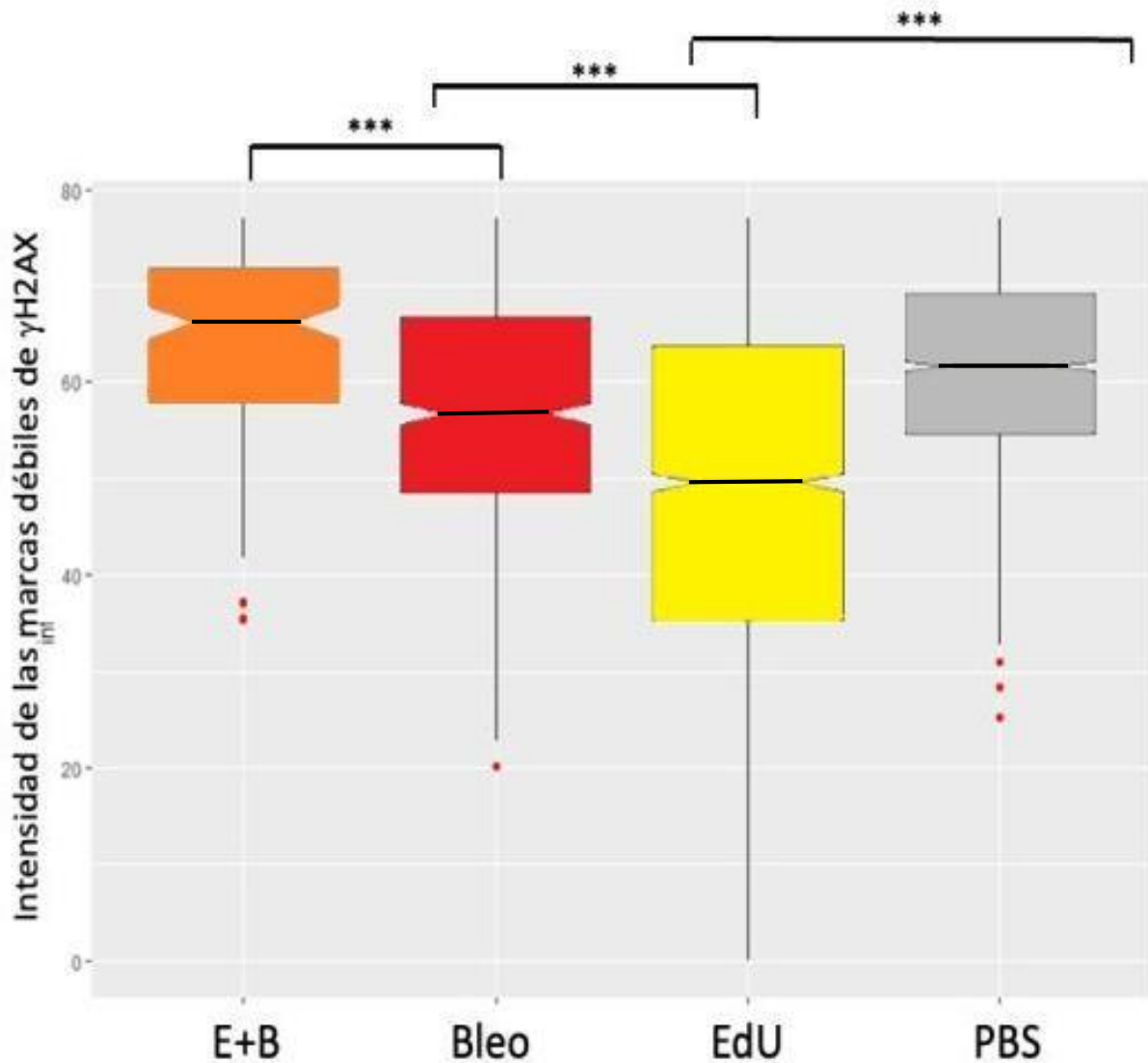


Figura 12. Distribución de la intensidad de las marcas débiles de γ H2AX representada en diagramas de caja por grupo experimental. *Wilcoxon rank sum test with continuity correction*. **** $p \leq 0.0001$; *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$.

El área de las marcas débiles (Figura 13) es mayor en los grupos E+B, EdU y Bleo (con diferencias no significativas entre ellos), que la del control PBS ($p = 4.2 \times 10^{-12}$, $< 2.0 \times 10^{-16}$ y 6.2×10^{-16} , respectivamente). Si bien la distribución de los datos va de 0 a $0.5 \mu\text{m}^2$, predominan los valores cercanos a 0, en todos los casos, especialmente en PBS.

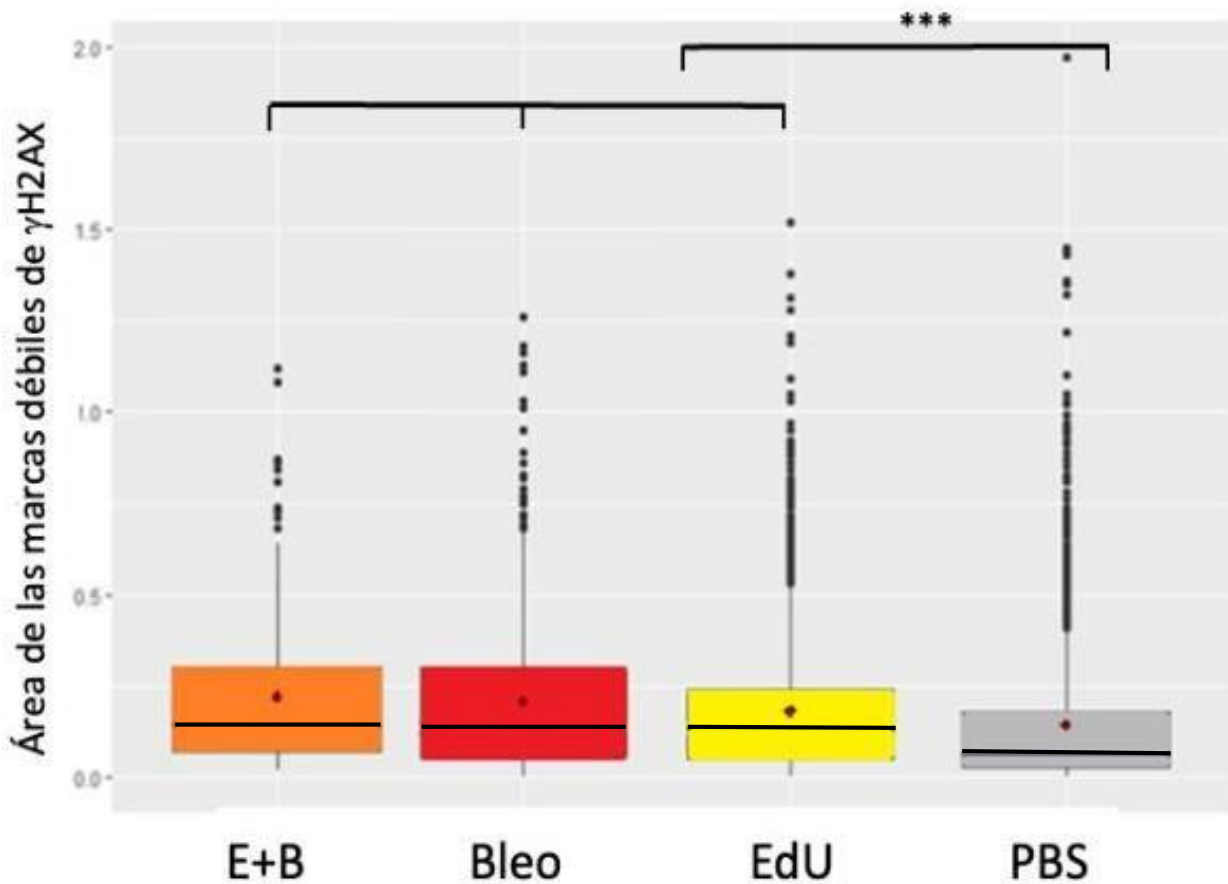


Figura 13. Distribución del área de marcas débiles de γ H2AX según grupo experimental representada en diagramas de caja. *Wilcoxon rank sum test with continuity correction*. *** $p \leq 0.0001$; ** $p \leq 0.001$; * $p \leq 0.01$; $p \leq 0.05$.

En la Tabla 5, se puede ver que la circularidad, la redondez y el AR de las marcas débiles del grupo control PBS son significativamente menores respecto a los demás grupos experimentales (valores p en la tabla), entre los cuales no hay diferencias significativas. La solidez es significativamente menor en el grupo EdU que en los demás grupos, entre los cuales no hay diferencias significativas.

Tabla 5. Medianas de los valores de los descriptores de forma (circularidad, redondez, AR y solidez) de las marcas débiles (d) de γ H2AX y su comparación entre grupos experimentales (GE), empleando el Wilcoxon test. Los valores p y los n de las marcas débiles (n md) de cada grupo experimental se exponen en la Tabla. Los casilleros con fondo verde indican valores p significativos, mientras los amarillos indican no-significancia.

circularidad de marcas débiles de γ H2AX					
n m d GE1	GE 1	Mediana de GE1	GE 2	Comparación	Valor p
155	E+B	0.20	Bleo	E+B ~ Bleo	0.545
	E+B		EdU	E+B > EdU	1.1×10^{-05}
	E+B		PBS	E+B ~ PBS	0.085
621	Bleo	0.19	EdU	Bleo > EdU	6.7×10^{-16}
2374	EdU	0.15	PBS	EdU < PBS	$< 2.0 \times 10^{-16}$
2032	PBS	0.23	Bleo	PBS ~ Bleo	0.545
redondez de las marcas débiles de γ H2AX					
n m d GE1	GE 1	Mediana de G1	GE 2	Comparación	Valor p
155	E+B	0.75	Bleo	E+B ~ Bleo	0.81
	E+B		EdU	E+B ~ EdU	0.35
	E+B		PBS	E+B > PBS	3.2×10^{-06}
621	Bleo	0.73	EdU	Bleo ~ EdU	0.13
2374	EdU	0.72	PBS	EdU > PBS	$< 2.0 \times 10^{-16}$
2032	PBS	0.67	Bleo	PBS < Bleo	4.6×10^{-16}
AR de las marcas débiles de γ H2AX					
n m d GE1	GE 1	Mediana de GE1	GE 2	Comparación	Valor p
155	E+B	1.33	Bleo	E+B ~ Bleo	0.82
	E+B		EdU	E+B ~ EdU	0.35
	E+B		PBS	E+B < PBS	3.2×10^{-06}
621	Bleo	1.37	EdU	Bleo ~ EdU	0.13
2374	EdU	1.39	PBS	EdU < PBS	$< 2.0 \times 10^{-16}$
2032	PBS	1.49	Bleo	PBS > Bleo	4.5×10^{-16}
solidez de las marcas débiles de γ H2AX					
n m d GE1	GE 1	Mediana de G1	GE 2	Comparación	Valor p
155	E+B	0.70	Bleo	E+B ~ Bleo	0.24128
	E+B		EdU	E+B > EdU	0.00032
	E+B		PBS	E+B ~ PBS	0.80220
621	Bleo	0.73	EdU	Bleo > EdU	$< 2.0 \times 10^{-16}$
2374	EdU	0.65	PBS	EdU < PBS	$< 2.0 \times 10^{-16}$
2032	PBS	0.71	Bleo	PBS ~ Bleo	0.0997

En general, las marcas débiles presentan un área menor que las marcas fuertes y medias y su densidad es heterogénea (Tabla 6). Además, tienen un contorno muy irregular (circularidad), comparado con las marcas fuertes y medias (Tabla 6), excepto en el caso del grupo control, PBS, donde las marcas medias y las débiles no tienen diferencia significativa.

Tabla 6. Comparación del área y la circularidad por categorías en cada grupo experimental.

ÁREA		CIRCULARIDAD	
Comparación	valor p	Comparación	valor p
E+B-f > E+B-d	$< 2.0 \times 10^{-16}$	E+B-f > E+B-d	$< 2.0 \times 10^{-16}$
E+B-m > E+B-d	7.5×10^{-06}	E+B-m > E+B-d	9.4×10^{-07}
Bleo-f > Bleo-d	$< 2.0 \times 10^{-16}$	Bleo-f > Bleo-d	$< 2.0 \times 10^{-16}$
Bleo-m > Bleo-d	5.5×10^{-15}	Bleo-m > Bleo-d	7.6×10^{-09}
EdU-f > EdU-d	$< 2.0 \times 10^{-16}$	EdU-f > EdU-d	$< 2.0 \times 10^{-16}$
EdU-m > EdU-d	$< 2.0 \times 10^{-16}$	EdU-m > EdU-d	$< 2.0 \times 10^{-16}$
PBS-f > PBS-d	$< 2.0 \times 10^{-16}$	PBS-f > PBS-d	$< 2.0 \times 10^{-16}$
PBS-m > PBS-d	$< 2.0 \times 10^{-16}$	PBS-m $\approx$ PBS-d	0.059

3.2 Colocalización de marcas de γ H2AX y zona replicante (EdU+)

Mediante gráficos de barras comparativos (Figura 14) se representa la frecuencia de los coeficientes de Manders en rangos, que indican la fracción de la marca de γ H2AX que ocupa la región cromosómica replicante EdU+ (colocalización entre ambas marcas). Se observaron diferentes grados de colocalización entre ambas marcas según la fase de replicación (ES y MS) y grupo experimental.

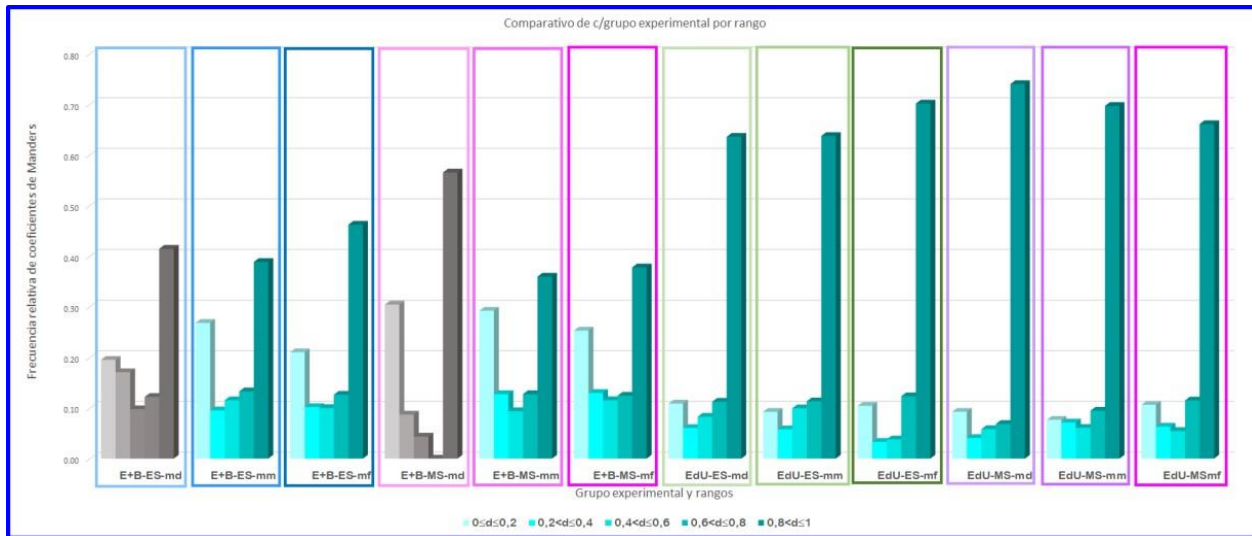


Figura 14. Gráfico de barras que muestra las frecuencias expresadas en frecuencia relativa de los coeficientes de colocación de Manders entre las marcas fuertes, medias o débiles de γ H2AX y la región cromosómica replicante según grupo experimental. Los coeficientes de Manders se clasificaron en los siguientes rangos: $0 \leq m < 0.2$; $0.2 \leq m < 0.4$; $0.4 \leq m < 0.6$; $0.6 \leq m < 0.8$ y $0.8 \leq m \leq 1.0$. **md**: marca débil; **mm**: marca media y **mf**: marca fuerte). **ES**: fase S temprana, **MS** fase S media, **E+B-ES**: metafases provenientes del grupo E+B tratado durante la fase S temprana. La misma lógica sigue el resto de las denominaciones.

Colocalización de marcas de γ H2AX fuertes según fases ES o MS

La Figura 14 muestra que en el grupo E+B-ES, el 79% de las marcas de γ H2AX presentaron diferentes grados de colocación con la zona cromosómica replicante EdU+, mientras en el grupo E+B-MS, el 75% de las señales de γ H2AX, presentaron distintos grados de colocación. En el grupo EdU-ES, 90% de las marcas tienen coeficientes de colocación en el rango 0.2-1. El grupo EdU-MS presentó 89% de los coeficientes entre 0.2-1.

Estos resultados indican que, si bien hay diferentes grados de colocación, un gran porcentaje de las marcas fuertes de γ H2AX colocalizaron con las regiones cromosómicas replicantes (EdU+).

Colocalización de marcas medias de γ H2AX según fases ES o MS

En la Figura 14 se observa que el 73% de las marcas **medias** de γ H2AX del grupo E+B-ES colocalizan con regiones EdU+ en distintos grados (0.2-1), mientras que, en E+B-MS, lo hacen en el 71% de los casos. En el grupo EdU, colocalizan en distintos grados tanto las marcas en ES (91%) como las marcas en MS (92%).

Colocalización de marcas de γ H2AX débiles según fases ES o MS

En la Figura 16 se distingue que en los grupos E+B-ES y E+B-MS las marcas débiles presentan **colocalización aleatoria**, según el Wilcoxon test contra un valor $\mu = 0.5$ con 95% de confianza. Mientras que en los grupos EdU-ES y EdU-MS, 91 y 92% de las marcas presentaron distintos grados de colocación respectivamente.

Resumiendo, con la excepción de la distribución aleatoria de las marcas débiles, observada en los grupos E+B, tanto en ES como en MS, todos los demás grupos presentaron diferentes grados de colocación entre las marcas de γ H2AX y las regiones cromosómicas replicantes.

4. Discusión

Originariamente las marcas de γ H2AX fueron atribuidas a daño en el ADN, ya sea, a DSB (Rogakou *et al.*, 1998) o SSB (*Single Strand Breaks*) generadas por horquillas replicantes trancadas (Petermann *et al.*, 2010). Varias aproximaciones experimentales demostraron el papel temprano de γ H2AX en la señalización y el desencadenamiento de la cascada de eventos de respuesta al daño (*DNA damage response*: DDR). (Redon *et al.*, 2002; Rogakou *et al.*, 1998; Downs *et al.*, 2000). La DDR se acompaña de modificaciones en la conformación de la cromatina, relacionados a la necesidad de acceso al ADN de las proteínas involucradas en la respuesta celular y probablemente, al mantenimiento de un entorno más seguro para el ADN que está siendo procesado. Mediante el seguimiento de la dinámica cromatínica de una región dañada por irradiación local con láser, Kruhlak *et al.*, (2006) reportaron que, luego de dañada, la cromatina correspondiente a dicha zona se expande rápidamente, reclutando MRE11, alcanzando su máximo a los 4.5 min. Posteriormente, sufre una fase de re-compactación lineal extendida, volviendo al nivel de compactación anterior al daño en 15 min, seguida por último de una hiper-compactación que continúa hasta los 20– 30 min post-daño. Esta modificación epigenética de la conformación de la cromatina se relaciona al procesamiento de las lesiones. La intervención de los mecanismos de control del ciclo celular, otorgan el tiempo necesario para que los mecanismos de reparación restituyan las lesiones. Si el daño es importante o no es reparado, se activa la apoptosis (Baran *et al.*, 2014). Otra alternativa es que las células entren en el estado de senescencia celular (Herranz *et al.*, 2018).

Más recientemente, se reportaron evidencias que sugieren que la fosforilación de γ H2AX podría depender de otros factores no relacionados al daño (Rybak *et al.*, 2016; Liddle *et al.*, 2014; Reyes-Ábalos *et al.*, 2018). Se ha señalado que la γ H2AX podría marcar regiones heterocromáticas transcripcionalmente inactivas, que facilitan el estancamiento de la horquilla de replicación (Lyu *et al.*, 2019; Petermann *et al.*, 2010; Barlow *et al.*, 2013). Algunas de estas regiones corresponden a sitios cromosómicos pobres en genes y de replicación tardía, denominados sitios frágiles. Estas regiones, que se visualizan a nivel citológico mayoritariamente como gaps, forman estructuras en horquillas que favorecen el bloqueo de la replicación, siendo propensos a romperse generando rupturas de cromátidas e inestabilidad genómica (Zeman & Cimprich, 2013; Durkin & Glover, 2015). Según Ichijima *et al.* (2010) las lesiones asociadas al estrés replicativo son criptogénicas, serían capaces de sobrepasar los puntos de control del ciclo celular (*checkpoint*) debido a su limitada e inefectiva activación de los factores de control. Asimismo, de acuerdo a Burgess *et al.* (2014), la γ H2AX podría señalar regiones en proceso de compactación mitótica, originando marcas de γ H2AX más pequeñas que las inducidas por el daño en el ADN.

En las metafases de CHO9 analizadas, pertenecientes a los distintos grupos experimentales, observamos marcas de γ H2AX de diferente densidad y características morfológicas que agrupamos en tres categorías diferentes según su intensidad: fuertes ($119 \leq f \leq 255$), medias ($70 \leq m < 119$) y débiles ($0 < d < 70$). Basándonos en la bibliografía, en nuestro análisis morfológico y en los resultados de colocalización obtenidos, pensamos que los distintos tipos de marcas de γ H2AX podrían señalar diferentes lesiones y/o procesos en el ADN.

Marcas de intensidad fuerte de γ H2AX

Considerando el recuento total de marcas fuertes en las metafases de todos los grupos experimentales, detectamos un predominio de estas marcas en las metafases de los cultivos tratados con Bleo (Bleo y E+B) respecto a los controles (53% en Bleo, 41% en E+B-ES; 48% en E+B-MS; 4% en EdU-ES, 7% en EdU-MS), así como su colocalización con las regiones cromosómicas replicantes (EdU+) de ES y MS (Figura 14).

El predominio de marcas fuertes en los grupos tratados, sugiere un rol de dichas marcas en la respuesta al daño, que genera en el ADN el radiomimético Bleo. A su vez, el pequeño porcentaje de marcas fuertes detectado en los controles no expuestos a Bleo, podría corresponder a daño genético espontáneo o inducido por radicales libres originados durante el metabolismo celular (*Liddle et al., 2014; Reyes-Ábalos et al., 2018; Watson & McGregor, 2010*).

Además de los mayores porcentajes de ocurrencia de las marcas fuertes en los grupos tratados, los más altos índices de colocalización con la zona replicante (Edu+) tanto de ES como MS (Figura 14) indican que el daño generado por Bleo está relacionado a la síntesis de ADN (EdU+) como reportaron *Liddle et al. (2014)* en interfase y *Reyes-Ábalos et al. (2018)* en metafases de células CHO9.

Asimismo, los contornos definidos y la densidad homogénea de estas marcas fuertes de γ H2AX podrían estar relacionados a la sustitución de H2A por H2AX en todos los nucleosomas próximos al daño. Según explican *Atsumi et al. (2015)*, la histona H2AX es producida continuamente, sin embargo, normalmente es poli-ubiquitinizada por HUWE1 y, en consecuencia, degradada por la vía proteosómica. Inmediatamente después de la formación de DSB, se activa ATM, mediante fosforilación, bloqueando a HUWE1. De este modo, la H2AX no ubiquitinizada es incorporada en la cromatina bajo la regulación de las desacetilasas y mono ADP-ribosil transferasas SIRT6 y SNF2H, la subunidad catalítica de los complejos remodeladores de cromatina ISWI (familia de proteínas SWI/SNF, ATP-dependientes), que descondensan localmente la cromatina, permitiendo la fosforilación de H2AX en la serina-139 con la formación de γ H2AX, que señala los DSB y recluta a la cascada de proteínas de la DDR para su consiguiente reparación (*Atsumi et al., 2015*).

Cuando la horquilla de replicación encuentra una región de ADN dañada, se produce el bloqueo de la replicación (*Petermann et al., 2010; Liddle et al., 2014*). Sin embargo, como reportaron *Rhind & Russell* (2000), los mecanismos de control reducen la velocidad del ciclo celular sin detener completamente la síntesis de ADN. De modo que el control parece estar más involucrado en acomodar la tolerancia al daño que en repararlo, permitiendo varias respuestas: (1) que las polimerasas sean sustituidas por polimerasas translesión (*Rhind & Russell, 2000*), lo que produciría nuevas SSB o DSB en el ADN o (2) dar oportunidad a que la lesión sea reparada después de la replicación (*Rhind & Russell, 2000*). Ambas posibilidades, que favorecen la persistencia del daño, podrían haber ocurrido durante el tratamiento con Bleo en las fases ES o MS. Bleo es capaz de dañar el ADN durante todo el ciclo celular, lo cual explicaría el daño de las células que se encontraban en etapas no replicativas de la interfase (G1 o G2) durante el tratamiento. Sin embargo, el daño en estas células fue menor que el ocurrido durante ES o MS, probablemente porque son fases del ciclo celular menos sensibles al daño y, además, no se sumaron lesiones por bloqueo de la horquilla de replicación. De todos modos, no sería posible descartar el bloqueo de las horquillas de transcripción al encontrar un sitio de ADN dañado espontáneamente o con estructuras de ADN inusuales, como discutimos en el apartado siguiente relativo a las marcas de intensidad media (*Lyu et al., 2019; Zeman & Cimprich, 2013*).

Marcas de intensidad media de γ H2AX

Las marcas medias de las metafases de CHO9, presentaron valores intermedios de intensidad, área y descriptores de forma, respecto a los mismos parámetros de las marcas fuertes y débiles (Tabla 4). Estas marcas predominaron en las metafases de los grupos no tratados con Bleo (EdU y PBS) (Figura 7) y colocalizaron con las regiones replicantes (EdU+), ya sean en ES o MS (Figura 14). El predominio de estas marcas en grupos no tratados con Bleo, sugiere que podrían haberse originado por daño espontáneo del ADN, producido por radicales libres producto del metabolismo basal o por contaminantes ambientales (*Watson & McGregor, 2010*). Además, su colocalización con regiones de síntesis de ADN, aún en ausencia de daño, sugiere que el estancamiento de las horquillas de replicación con formación de SSB podría ser un mecanismo subyacente (*Petermann et al., 2010; Liddle et al., 2014*). Se ha descrito que cuando el ADN se encuentra con estructuras que dificultan la progresión de la replicación tales como bases dañadas espontáneamente o estructuras en horquilla, como las que se forman nivel de los sitios frágiles (*Lyu et al., 2019; Zeman & Cimprich, 2013*), se induce la fosforilación de γ H2AX. *Lyu et al.* (2019) demostraron que γ H2AX se une a estas regiones que se expresan en los cromosomas como sitios frágiles, compuestas por genes grandes y regiones que codifican transcritos largos para señalar donde la maquinaria de transcripción o replicación podría trancarse y dónde esta última es más propensa a colisionar con las ARN polimerasas que los están transcribiendo. Cuando la horquilla de replicación o transcripción se estanca, la marca de γ H2AX aumenta en intensidad y tamaño

respecto a las que señalan sitios frágiles sin presencia de estrés replicativo o transcripcional (*Lyu et al., 2019; Zeman & Cimprich, 2013*).

Marcas de intensidad débil de γ H2AX

Las marcas débiles, pequeñas, de densidad heterogénea y de contornos irregulares predominaron en las metafases de los grupos EdU y PBS y se distribuyeron al azar en los brazos cromosómicos, no mostrando relación con las regiones replicantes en los controles PBS, pero sí, diferentes grados de colocalización en los grupos EdU.

Burgess et al. (2014) reportaron que el proceso de compactación de la cromatina durante la mitosis sería suficiente estímulo para disparar la primera etapa de la vía de señalización de DDR, aún en ausencia de inducción de daño, originando marcas pequeñas y débiles, ya que esta primera etapa es anterior a la amplificación de la señal.

Como los cromosomas metafásicos son un caso extremo de compactación natural y los cambios estructurales en la cromatina contribuyen a la señalización de la DDR es de esperar que el proceso de compactación de la cromatina en los cromosomas mitóticos dispare la fosforilación de H2AX (*Kruhlak et al., 2006*). Dado que las marcas débiles, no colocalizaron con las regiones replicantes y que predominaron en las metafases de los grupos no tratados con Bleo, estas marcas, pequeñas y heterogéneas podrían estar vinculadas al proceso de compactación mitótica de la cromatina. Como se producen en un contexto de compactación y en ausencia de daño inducido, solo se fosforilarían las H2AX constitutivas, presentes en 1/10 de los nucleosomas de CHO (*Rogakou et al., 1998*), por la vía DNA-PKcs/CHK2 (*Tu et al., 2013*). Según explican *Atsumi et al. (2015)*, la histona H2AX es producida continuamente. Sin embargo, es poli-ubiquitinizada por HUWE1 y en consecuencia, degradada por la vía proteosómica. Por lo que, en ausencia de daño, no habría reemplazo de H2A por H2AX (*Atsumi et al., 2015*) y, por tanto, existirían menos moléculas de H2AX en el ADN a ser fosforiladas en caso de necesidad. Estos hechos podrían explicar, que, a diferencia de las marcas de daño, las marcas de compactación sean pequeñas e heterogéneas. No podríamos descartar que estas marcas se hubieran generado también a nivel de sitios frágiles y que, como mencionáramos, podrían bloquear las horquillas de transcripción y/o replicación (*Lyu et al., 2019; Zeman & Cimprich, 2013*).

Asimismo, los mayores coeficientes de colocalización de las marcas débiles con regiones replicantes de las metafases provenientes de grupos incorporados con EdU respecto a los controles PBS, podrían atribuirse a la marcación de la cromatina recientemente sintetizada, que, a medida que se compacta (*Burgess et al. 2014*), iría fosforilando las H2AX constitutivas (10% de las H2A en CHO9).

Las marcas débiles también están presentes en los grupos tratados con Bleo (E+B y Bleo), pero se presentaron con menor frecuencia que en los controles. Probablemente, estas marcas pequeñas y poco intensas podrían ser menos visibles eclipsadas por las marcas de daño próximas, que son más intensas y grandes. Otra alternativa, aunque no posible de observar en nuestras preparaciones citológicas, es que la remodelación de la cromatina que acompaña al daño, pudiera afectar también la compactación mitótica de la cromatina (*Kruhlak et al., 2006*).

Asimismo, es posible que, por acción de la Bleo, los sitios frágiles sensibles al daño se conviertan en sitios de lesiones (*Mortusewicz et al., 2013*), lo cual incrementaría las marcas fuertes y disminuirían las marcas débiles, que es lo que hemos observado en las metafases de CHO9 pertenecientes a los grupos tratados. Otro aspecto que mencionar es que, si bien las marcas débiles no colocalizaron con las regiones replicantes, observamos más marcas débiles en EdU-MS que en EdU-ES, lo cual podría relacionarse a que, durante MS, se replica la heterocromatina. La heterocromatina, más compacta que la eucromatina, involucraría un proceso de condensación mayor después de la replicación del ADN, promoviendo la aparición de las marcas débiles de γ H2AX.

Es interesante destacar, que a diferencia de las marcas débiles de γ H2AX, que se formarían durante la metafase por la condensación mitótica, las marcas fuertes y las medias, se producen durante la interfase (G1, ES o MS), pero las hemos observado en las metafases de CHO9. Según *Ichijima et al. (2010)* las lesiones asociadas al estrés replicativo son criptogénicas y pasan a través de los puntos de control del ciclo celular debido a su limitada e inefectiva activación de los factores de control. Además, se ha reportado que cuando las marcas son debidas al daño, tenderían a permanecer más tiempo, y su permanencia hasta la metafase podría propiciar la reparación del daño en el siguiente ciclo celular de las células hijas (*Martin et al., 2014*).

5. Conclusiones

El daño genético primario (marcas de γ H2AX) inducido en el ADN por Bleo, durante las fases ES o MS **predomina** en regiones replicantes (EdU+) ES o MS respectivamente, de cromosomas metafásicos de CHO9, lo que, considerando los antecedentes ya mencionados de nuestro laboratorio, nos lleva a concluir que el ADN de CHO9 es más sensible al daño genético inducido durante su replicación y que las regiones dañadas permanecen marcadas hasta la metafase en las áreas cromosómicas replicantes.

Existen diferencias en las características morfológicas y de intensidad de las marcas de γ H2AX entre condiciones de inducción y controles, lo que implica que los diferentes tipos de marca responden a diferentes fenómenos biológicos, a saber, las marcas fuertes corresponderían a DSB, las marcas medias a SSB y las marcas débiles a sitios frágiles y al proceso de compactación de la cromatina.

6. Perspectivas

Los resultados obtenidos demuestran la presencia de marcas de γ H2AX en los cromosomas metafásicos de CHO9, que clasificamos en tres categorías en función de la intensidad: fuertes, medias y débiles. Los tres tipos de marcas, si bien están presentes en metafases de todos los grupos experimentales, predominan en algunos de ellos, dependiendo de su tipo. Estas diferentes marcas de γ H2AX estarían vinculadas a distintos procesos interactuantes con la cromatina. Basándonos en nuestros datos y en la literatura científica y teniendo presente que es necesario aplicar nuevas aproximaciones que demuestren de manera empírica algunas de nuestras interpretaciones, sugerimos a modo de hipótesis que: (1) las marcas fuertes de γ H2AX, de densidad homogénea, que predominan en los cultivos tratados con BLEO, corresponderían principalmente a la señalización de las DSB inducidas durante las fases S-temprana o S-media por Bleo, las cuales persisten hasta la metafase, (2) las marcas de γ H2AX de intensidad media, que predominan en los grupos EdU y PBS, estarían asociadas sobre todo a SSB originadas por estancamiento de las horquillas de replicación y/o transcripción, como consecuencia de estructuras de ADN inusuales, como las presentes a nivel de sitios frágiles o las debidas a daño oxidativo espontáneo y (3) las marcas débiles de γ H2AX, de densidad inhomogénea, que también predominan en los grupos EdU y PBS, se generarían durante el proceso de compactación de la cromatina y/o la señalización de sitios frágiles, en ausencia de estrés transcripcional o replicativo.

Como los procesos epigenéticos de compactación y descompactación de la cromatina, acompañan a las diferentes etapas del ciclo celular y la producción de DSB y SSB puede tener lugar de manera espontánea o inducida por Bleo, las marcas metafásicas de γ H2AX podrían depender, en diferente proporción, de una combinación de dichos fenómenos. Sin embargo, la localización predominante de las marcas fuertes de γ H2AX con las regiones replicantes (S-temprana y S-media), conocidas por ser más sensibles al daño, aporta fuerza a la sugerencia de su vínculo con el daño genético inducido. En cambio, las marcas débiles que presentan una distribución cromosómica aleatoria sugieren un origen predominantemente no vinculado al daño genético. Estas hipótesis deberán ser demostradas con futuras aproximaciones experimentales.

Para aportar datos empíricos a las hipótesis plantadas anteriormente nos propusimos como perspectivas:

- 1) Detectar posibles señales de otras proteínas de la cascada de respuesta al daño que junto a las marcas de γ H2AX persisten hasta la metafase.

2) Analizar la colocación de las señales de γ H2AX con regiones de estructuras cromatínicas inusuales tales como sitios frágiles. Asimismo, detectar posibles señales de ARN polimerasa o ADN polimerasa que indiquen bloqueo de horquillas de transcripción o replicación, respectivamente.

3) Analizar la relación de las marcas de γ H2AX con la compactación de la cromatina, aplicando la técnica de PCC. A su vez, el empleo de inhibidores de la condensación metafásica de la cromatina, permitiría observar modificaciones en la frecuencia y/o morfología de las marcas de γ H2AX.

7. Referencias bibliográficas

- Arrighi, F. E., & Hsu, T. C.** (1971). Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 10(2), 81-86.
- Atsumi, Y., Minakawa, Y., Ono, M., Dobashi, S., Shinohe, K., Shinohara, A., ... & Yoshioka, K. I.** (2015). ATM and SIRT6/SNF2H mediate transient H2AX stabilization when DSBs form by blocking HUWE1 to allow efficient γ H2AX foci formation. *Cell reports*, 13(12), 2728-2740.
- Baatout, S. & Derradji, H.** (2006). About histone H1 phosphorylation during mitosis. *Cell Biochemistry and Function*, 24(2), 93-94. <https://doi.org/10.1002/cbf.1293>
- Barlow, J. H., Faryabi, R. B., Callén, E., Wong, N., Malhowski, A., Chen, H. T., ... & Nussenzweig, A.** (2013). Identification of early replicating fragile sites that contribute to genome instability. *Cell*, 152(3), 620-632.
- Bian, Q., & Belmont, A. S.** (2012). Revisiting higher-order and large-scale chromatin organization. *Current Opinion in Cell Biology*, 24(3), 359-366. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.03.003>
- Burgess, R. C., Burman, B., Kruhlak, M. J., & Misteli, T.** (2014). Activation of DNA damage response signaling by condensed chromatin. *Cell reports*, 9(5), 1703-1717.
- Clapier, C. R. & Cairns, B. R.** (2014). Chromatin remodeling complexes. *Fundamentals of chromatin*, 69-146.
- Craig, J. M.** (2005). Heterochromatin - Many flavours, common themes. *BioEssays*, 27(1), 17-28. <https://doi.org/10.1002/bies.20145>
- Deaven, L. L., & Petersen, D. F.** (1973). The chromosomes of CHO, an aneuploid Chinese hamster cell line: G- band, C-band, and autoradiographic analyses. *Chromosoma*, 41(2), 129-144. <https://doi.org/10.1007/BF00319690>
- Dileep, V., Rivera-Mulia, J. C., Sima, J., & Gilbert, D. M.** (2015, January). Large-scale chromatin structure-function relationships during the cell cycle and development: insights from replication timing. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 80, pp. 53-63). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Di Tomaso, M. V., Liddle, P., Lafon-Hughes, L., Reyes-Ábalos, A. L., & Folle, G.** (2013). Chromatin Damage Patterns Shift According to Eu/ Heterochromatin Replication. *The Mechanisms of DNA Replication*. <https://doi.org/10.5772/51847>
- Di Tomaso, M. V., Martínez-López, W., & Palitti, F.** (2010). Asynchronously replicating eu/heterochromatic regions shape chromosome damage. *Cytogenetic and Genome Research*, 128(1-3), 111-117. <https://doi.org/10.1159/000298820>
- Di Tomaso, M. V., Martínez-López, W., Folle, G. A., & Palitti, F.** (2006). Modulation of chromosome damage localization by DNA replication timing. *International Journal of Radiation Biology*, 82(12), 877-886. <https://doi.org/10.1080/09553000600973335>
- Di Tomaso, M., Basso, S., Lafon-Hughes, L., Saona, G., López-Carro, B., Reyes-Ábalos, A.L., & Liddle, P.** (2014) Spontaneous and Bleomycin-Induced γ H2AX Signals in CHO9 Metaphase Chromosomes *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 5(June), 603-616. <https://doi.org/10.4236/abb.2014.57071>
- Dixon, J. R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., ... Ren, B.** (2012). Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature*, 485(7398), 376-380. <https://doi.org/10.1038/nature11082>
- Doenecke, D.** (2016). Chromatin Dynamics During the Cell Cycle. In *Chromatin Regulation and Dynamics* (Vol. 127). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803395-1.00005-8>
- Downs, J. A., Lowndes, N. F., & Jackson, S. P.** (2000). A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature*, 408(6815), 1001-1004. <https://doi.org/10.1038/35050000>

- Drets, M. E., & Shaw, M. W.** (1971). Specific banding patterns of human chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(9), 2073–2077. <https://doi.org/10.1073/pnas.68.9.2073>
- Dunn K. W., Kamocka M.M., & McDonald, J. H.** (2011) A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy *Am J Physiol Cell Physiol* 300: C723–C742
- Durkin, S. G., & Glover, T. W.** (2007). *Chromosome fragile sites*. *Annu. Rev. Genet.*, 41(1), 169-192.
- Durocher, D., & Jackson, S. P.** (2001). DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: Variations on a theme? *Current Opinion in Cell Biology*, 13(2), 225–231. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00201-5](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00201-5)
- Flaus, A.** (2011). Principles and practice of nucleosome positioning in vitro. *Frontiers in Life Science*, 5(1–2), 5–27. <https://doi.org/10.1080/21553769.2012.702667>
- Franklin, S. G., & Zweidler, A.** (1977). Non-allelic variants of histones 2a, 2b and 3 in mammals [25]. *Nature*, 266(5599), 273–275. <https://doi.org/10.1038/266273a0>
- Gibcus, J. H., & Dekker, J.** (2013). The Hierarchy of the 3D Genome. *Molecular Cell*, 49(5), 773–782. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.02.011>
- Gilbert, D. M.** (2002). Replication timing and transcriptional control: beyond cause and effect. *Current opinion in cell biology*, 14(3), 377-383.
- Gilbert, N., Boyle, S., Fiegler, H., Woodfine, K., Carter, N. P., & Bickmore, W. A.** (2004). Chromatin architecture of the human genome: Gene-rich domains are enriched in open chromatin fibers. *Cell*, 118(5), 555–566. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.08.011>
- Haase J., Chen, R., Parker W. M., Bonner M.K., Jenkins L. M., Kelly A. E.** (2022) The TFIIF complex is required to establish and maintain mitotic chromosome structure *eLife* 11:e75475. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.75475>
- Heitz, E.** (1928). Der bilaterale Bau der Geschlechtschromosomen und Autosomen bei *Pellia fabbronia*, *P. epiphylla* und einigen anderen Jungermanniaceen. *Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie. Abteilung E: Planta*, 725-768.
- Holmquist, G. P., & Ashley, T.** (2006). Chromosome organization and chromatin modification: Influence on genome function and evolution. *Cytogenetic and Genome Research*, 114(2), 96–125. <https://doi.org/10.1159/000093326>
- Ichijima, Y., Yoshioka, K. I., Yoshioka, Y., Shinohe, K., Fujimori, H., Unno, J., ... & Teraoka, H.** (2010). DNA lesions induced by replication stress trigger mitotic aberration and tetraploidy development. *PloS one*, 5(1), e8821.
- Kinoshita K, Hirano T.** (2017) Dynamic organization of mitotic chromosomes. *Current Opinion in Cell Biology* 46:46–53. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.01.006>
- Kohlmeier, F., Maya-Mendoza, A., & Jackson, D. A.** (2013). EdU induces DNA damage response and cell death in mESC in culture. *Chromosome Research*, 21, 87-100.
- Kruhlak, M. J., Celeste, A., Deliaire, G., Fernandez-Capetillo, O., Müller, W. G., McNally, J. G., ... & Nussenzweig, A.** (2006). Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *The Journal of cell biology*, 172(6), 823-834.
- Liddle, P., Lafon-Hughes, L., Di Tomaso, M. V., Reyes-Ábalos, A. L., Jara, J., Cerda, M., ... & Folle, G. A.** (2014). Bleomycin-induced γH2AX foci map preferentially to replicating domains in CHO9 interphase nuclei. *Chromosome research*, 22, 463-481.
- Luger, K., Dechassa, M. L., & Tremethick, D. J.** (2012). New insights into nucleosome and chromatin structure: An ordered state or a disordered affair? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(7), 436–447. <https://doi.org/10.1038/nrm3382>
- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., & Richmond, T. J.** (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648), 251–260. <https://doi.org/10.1038/38444>
- Lyu, X., Chastain, M., & Chai, W.** (2019). Genome-wide mapping and profiling of γH2AX binding hotspots in response to different replication stress inducers. *BMC genomics*, 20(1), 1-13.
- Manders, E.M.M., Verbeek, F.J. & Aten, J.A.** (1993) Measurement of co-localization of objects in dual-color confocal images. *Journal of Microscopy*, Vol. 169, pp. 375-382. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1993.tb03313>.

- Martín, M., Terradas, M., Hernández, L., & Genesca, A.** (2014). γ H2AX foci on apparently intact mitotic chromosomes: not signatures of misrejoining events but signals of unresolved DNA damage. *Cell cycle*, 13(19), 3026-3036.
- Martínez-López, W., Folle, G. A., Obe, G., & Jeppesen, P.** (2001). Chromosome regions enriched in hyperacetylated histone H4 are preferred sites for endonuclease-and radiation-induced breakpoints. *Chromosome Research*, 9, 69-75.
- McGinty, R. K., Tan, S., Steunou, A. L., Rossetto, D., & Côté, J.** (2014). Fundamentals of Chromatin. In *Fundamentals of Chromatin* (Vol. 9781461486). <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8624-4>
- McManus, K. J., & Hendzel, M. J.** (2005). ATM-dependent DNA damage-independent mitotic phosphorylation of H2AX in normally growing mammalian cells. *Molecular biology of the cell*, 16(10), 5013-5025.
- Messner, S., & Hottiger, M. O.** (2011). Histone ADP-ribosylation in DNA repair, replication and transcription. *Trends in Cell Biology*, 21(9), 534–542. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.06.001>
- Mortusewicz, O., Herr, P. and Helleday, T.** (2013) Early replication fragile sites: where replication–transcription collisions cause genetic instability. *EMBO J.*, 32, 493–495.
- Nelson, C. J., Santos-Rosa, H., & Kouzarides, T.** (2006). Proline Isomerization of Histone H3 Regulates Lysine Methylation and Gene Expression. *Cell*, 126(5), 905–916. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.026>
- Nielsen CF, Zhang T, Barisic M, Kalitsis P, Hudson DF.** (2020) Topoisomerase II α is essential for maintenance of mitotic chromosome structure. *PNAS* 117:12131–12142. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.2001760117>
- Oudet, P.** (1975). *and Biochemical that Chromatin Structure Is a Repeating Unit*. 4(April), 281–300. **Oudet, P., Chambon, P., & Urbaine, C.** (2004). *Seeing Is Believing Commentary*. (1), 1974–1976. **Paulson, J.R., Hudson, D.F., Cisneros-Soberanis, F., Earnshaw, W. C.** (2021) Mitotic chromosomes. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 117:7–29. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.03.014>, PMID: 33836947
- Petermann, E., Orta, M. L., Issaeva, N., Schultz, N., & Helleday, T.** (2010). Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51-mediated pathways for restart and repair. *Molecular cell*, 37(4), 492-502.
- Pope, B. D., Ryba, T., Dileep, V., Yue, F., Wu, W., Denas, O., ... & Gilbert, D. M.** (2014). Topologically associating domains are stable units of replication-timing regulation. *Nature*, 515(7527), 402-405.
- Puck, T. T., Cieciura, S. J., & Robinson, A.** (1958). Genetics of somatic mammalian cells: III. Long- term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *The Journal of experimental medicine*, 108(6), 945.
- Ray, M.** (1976). Proposed banding nomenclature for the Chinese hamster chromosomes (*Cricetulus griseus*). *Cytogenet. Cell Genet.*, 16, 83-91.
- Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K., & Bonner, W.** (2002). Histone H2a variants H2AX and H2AZ. *Current opinion in genetics & development*, 12(2), 162-169.
- Reyes-Ábalos, A. L., Liddle, P., Folle, G. A., & Di Tomaso, M. V.** (2018). γ H2AX prefers late replicating metaphase chromosome regions. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 836(June), 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.06.001>
- Rhind, N., & Russell, P.** (2000). Checkpoints: it takes more than time to heal some wounds. *Current biology: CB*, 10(24), R908–R911. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00849-6](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00849-6)
- Roca, J., Wang, J. C.** (1994) DNA transport by a type II DNA topoisomerase: Evidence in favor of a two-gate mechanism. *Cell* 77, 609–616.
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., & Bonner, W. M.** (1998). DNA double- stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *Journal of Biological Chemistry*, 273(10), 5858–5868. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.10.5858>

- Rybak, P., Hoang, A., Bujnowicz, L., Bernas, T., Berniak, K., Zarebski, M., ... Dobrucki, J.** (2016). Low level phosphorylation of histone H2AX on serine 139 (γ H2AX) is not associated with DNA double-strand breaks. *Oncotarget*, 7(31), 49574–49587. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10411>
- Schmid, W., & Leppert, M. F.** (1969). Rates of DNA synthesis in heterochromatic and euchromatic segments of the chromosome complements of two rodents. *Cytogenetic and Genome Research*, 8(2), 125-135.
- Shintomi, K., Hirano, T.** (2021) *Guiding functions of the C-terminal domain of topoisomerase II α advance mitotic chromosome assembly*. *Nature Communications* 12:2917. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23205-w>
- Szenker, E., Boyarchuk, E., & Almouzni, G.** (2013). Properties and functions of histone variants. In *Fundamentals of chromatin* (pp. 375-426). New York, NY: Springer New York.
- Takahashi, M. & Hirota, T.** (2019) Folding the genome into mitotic chromosomes. *Current Opinion in Cell Biology*, 60:19–26 <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.03.005>
- Takashimizu, Y. & Iiyoshi, M.** (2016) New parameter of roundness R: circularity corrected by aspect ratio. *Progress in Earth and Planetary Science* 3:2 DOI 10.1186/s40645-015-0078-x
- Tu, W. Z., Li, B., Huang, B., Wang, Y., Liu, X. D., Guan, H., ... & Zhou, P. K.** (2013). γ H2AX foci formation in the absence of DNA damage: Mitotic H2AX phosphorylation is mediated by the DNA- PKcs/CHK2 pathway. *FEBS letters*, 587(21), 3437-3443.
- Watson NB & McGregor WG.** (2010) Cellular Responses to DNA Damage. In: Charlene A. McQueen, editor. *Comprehensive Toxicology*. Second Edition. Oxford: Elsevier; p. 377-402.
- Weintraub, H., Worcel, A., & Alberts, B.** (1976). A model for chromatin based upon two symmetrically paired half-nucleosomes. *Cell*, 9(3), 409–417. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(76\)90085-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(76)90085-4)
- Yang, J., Yu, Y., Hamrick, H. E., & Duerksen-Hughes, P. J.** (2003). ATM, ATR and DNA-PK: Initiators of the cellular genotoxic stress responses. *Carcinogenesis*, 24(10), 1571–1580. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgg137>
- Zeman, M. K., & Cimprich, K. A.** (2014). Causes and consequences of replication stress. *Nature cell biology*, 16(1), 2-9.
- Zentner, G. E., & Henikoff, S.** (2013). Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nature Structural and Molecular Biology*, 20(3), 259–266. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2470>

Chinese hamster genome database. <http://www.chogenome.org>

