



**PROBIOL**  
PROGRAMA DE POSGRADO  
EN BIOLOGÍA



**Tesis de Doctorado**

**PROTEÍNAS DE GOLPE DE CALOR Y  
REPARACIÓN DEL ADN EN LÍNEAS CELULARES  
TUMORALES Y PACIENTES ONCOLÓGICOS  
TRATADOS CON ANÁLOGOS DE PLATINO**

**Tesista: Lic. en Genética Mayra Lis Sottile Fleury**

**Director: Dra. Silvina Nadin. Investigadora adjunta**

**Co-Director: Dra. Laura Vargas Roig. Investigadora independiente**

**Laboratorio de Biología Tumoral**

**IMBECU-CCT CONICET Mendoza**

**AGRADECIMIENTOS:**

- ✓ A mi familia por su apoyo incondicional, esfuerzo y comprensión a lo largo de todos estos años.
- ✓ A la Dra. Silvina Nadin y a la Dra. Laura Vargas por darme el espacio para llevar a cabo esta tesis, por sus aportes y sugerencias que guiaron este aprendizaje.
- ✓ A mis amigos y compañeros del IMBECU, algunos de los cuales se encuentran en otras instituciones, por el apoyo, consejos y por todos los momentos inolvidables que hemos compartido.
- ✓ Agradezco también a Paula y Julieta por su amistad brindada desde la infancia.
- ✓ A la Dra. Mariel Fanelli y al Dr. Cuello Carrión por su asistencia en mi formación académica.
- ✓ A los pacientes y profesionales del COIR que accedieron a participar en este proyecto.
- ✓ Al IMBECU y PROBIOL-UNCuyo.

## **ÍNDICE**

<b>RESUMEN.....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>7</b>
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN</b>	
<b>1.1. Daño y reparación del ADN.....</b>	<b>8</b>
1.1.1. Descripción general.....	8
<b>1.2. Sistema de reparación de bases mal apareadas (<i>Mismatch Repair: MMR</i>).....</b>	<b>9</b>
1.2.1. Características y componentes.....	9
1.2.2. Reconocimiento del daño en el ADN: Unión de los complejos MutS y MutL.....	12
1.2.3. Discriminación entre la cadena hija y parental.....	13
1.2.4. Proteínas accesorias que intervienen en el sistema MMR.....	14
1.2.5. Reacción de reparación del sistema MMR.....	15
1.2.6. Funciones no canónicas del mecanismo MMR.....	17
1.2.7. Relevancia clínica del sistema MMR.....	17
<b>1.3. Marcadores de daño en el ADN.....</b>	<b>18</b>
1.3.1. $\gamma$ H2AX.....	18
1.3.2. 53BP1.....	19
<b>1.4. Proteínas del golpe de calor.....</b>	<b>21</b>
1.4.1. Generalidades.....	21
1.4.2. Expresión génica de las HSPs.....	23
1.4.3. Estructura y función de la proteína Hsp27.....	24
1.4.4. Estructura y función de la proteína Hsp72.....	26
1.4.5. Hsp27 y Hsp72 en cáncer.....	28
1.4.6. HSPs y reparación del ADN.....	29
<b>1.5. Cisplatino.....</b>	<b>31</b>
1.5.1. Descripción general.....	31
1.5.2. Reparación de las lesiones causadas por cPt.....	32
1.5.3. Respuesta celular al daño en el ADN inducido por cisplatino.....	34
1.5.4. Resistencia al cisplatino.....	34

1.5.5. Otras drogas análogas al platino.....35

**1.6. Hipertermia.....36**

**CAPÍTULO 2: OBJETIVOS**

**2.1. Objetivo General.....42**

**2.2. Objetivos Específicos.....42**

**CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS**

**3.1. Sección I: Metodologías empleadas para los estudios en líneas celulares.....44**

3.1.1. Líneas celulares.....44

3.1.2. Tratamientos.....44

3.1.3. Ensayo clonogénico.....45

3.1.4. Extracción de ARN total.....46

3.1.5. Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR).....47

3.1.6. PCR cuantitativa en tiempo real.....47

3.1.7. Inmunodetección de proteínas en membranas de nitrocelulosa.....49

3.1.8. Ensayo cometa alcalino.....52

3.1.9. Viabilidad celular.....54

3.1.10. Detección inmunocitoquímica de la actividad SA-βgalactosidasa.....55

3.1.11. Análisis de ciclo celular por citometría de flujo.....56

3.1.12. Determinación de Anexina V-Ioduro de propidio.....56

3.1.13. Inmunofluorescencia.....57

3.1.14. Inmunoprecipitación.....59

3.1.15. Análisis estadístico.....61

**3.2. Sección II: Metodologías empleadas para los estudios en linfocitos de sangre periférica.....61**

3.2.1. Linfocitos de sangre periférica (LSP) de sujetos sanos y pacientes oncológicos.....61

3.2.2. Tratamientos.....63

3.2.3. Ensayo cometa alcalino.....64

3.2.4. Inmunocitoquímica.....65

3.2.5. Análisis estadístico.....66

**CAPÍTULO 4: RESULTADOS**

<b>4.1. Sección I: Resultados del primer objetivo específico.....</b>	<b>67</b>
4.1.1. Clonogenicidad de las líneas celulares HCT116, HCT116+ch2 y HCT116+ch3 luego de la exposición a cisplatino (cPt) o hipertermia+cisplatino (H+cPt).....	67
4.1.2. Efecto del tratamiento cPt e H+cPt en la expresión de <i>Hsp27 (HSPB1)</i> y <i>Hsp72 (HSPA1A)</i> en células MMR- y MMR+.....	69
4.1.3. Efecto de la hipertermia en la expresión génica de <i>MSH2</i> y <i>MLH1</i> en células MMR- y MMR+ expuestas a cPt.....	70
4.1.4. Efecto del tratamiento cPt e H+cPt en la expresión de las proteínas Hsp27 y Hsp72 en líneas celulares MMR- y MMR+.....	71
4.1.5. Efecto de la hipertermia en la expresión de las proteínas de reparación MSH2, MLH1, y ERCC1 en células tumorales de colon MMR- y MMR+ expuestas a cPt.....	73
4.1.6. Efecto de la hipertermia en el daño en el ADN inducido por cPt en células MMR- y MMR+.....	75
4.1.7. Efecto de la hipertermia en la formación de aductos de cPt en el ADN de células MMR- y MMR+.....	76
4.1.8. Expresión de fosfo-CHK1 y fosfo-CHK2 luego de la exposición a cPt e H+cPt en células tumorales de colon MMR-/.....	78
4.1.9. Efecto del tratamiento cPt e H+cPt en la viabilidad de líneas celulares tumorales de colon humano MMR- y MMR+.....	79
4.1.10. Porcentaje de células senescentes inducido por cPt o H+cPt en células tumorales MMR- y MMR+.....	80
4.1.11. Efecto de la hipertermia en la progresión del ciclo celular en líneas celulares de cáncer de colon MMR- y MMR+ expuestas a cPt.....	82
4.1.12. Efecto citotóxico de la exposición a cPt e H+cPt en células de adenocarcinoma de colon MMR- y MMR+.....	83
<b>4.2. Sección II: Resultados del segundo objetivo específico.....</b>	<b>86</b>
4.2.1. Distribución celular de las proteínas Hsp27, Hsp72 y proteínas del sistema MMR en líneas celulares HCT116+ch2 y HCT116+ch3 expuestas a cPt o H+cPt.....	86
4.2.2. Colocalización de Hsp27 y Hsp72 con proteínas componentes del sistema MMR en líneas celulares HCT116+ch2 y HCT116+ch3 luego de los tratamientos cPt e H+cPt.....	88
4.2.3. Interacción entre las proteínas MLH1 y MSH2 con Hsp27 y Hsp72 en células MMR- y MMR+ expuestas a cPt o H+cPt. ....	91
<b>4.3. Sección III: Resultados del tercer objetivo específico.....</b>	<b>93</b>

4.3.1. Daño en el ADN y muerte celular en LSP de pacientes oncológicos.....	93
4.3.2. Efecto de la hipertermia en la migración del ADN inducida por cPt en LSP.....	93
4.3.3. Media de migración del ADN. Evaluación de la respuesta clínica en pacientes oncológicos.....	96
<b>4.4. Sección IV: Resultados del cuarto objetivo específico.....</b>	<b>98</b>
4.4.1. Respuesta al daño en el ADN inducido por cPt e H+cPt en LSP.....	98
4.4.2. Respuesta celular al daño en el ADN inducido por cisplatino. Evaluación de la respuesta clínica.....	102
<b>CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN.....</b>	<b>105</b>
<b>CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES.....</b>	<b>122</b>
<b>CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>124</b>
<b>CAPÍTULO 8: ANEXO.....</b>	<b>141</b>

## RESUMEN

El cisplatino (cPt) es un agente genotóxico ampliamente utilizado en oncología, cuya resistencia ha sido asociada a deficiencia del sistema de reparación del ADN Mismatch Repair (MMR). La hipertermia (H) ha sido utilizada en combinación con radioterapia y quimioterapia para potenciar su toxicidad. La H induce la síntesis de las proteínas de golpe de calor (Heat Shock Proteins, HSPs), chaperonas moleculares que cumplen funciones de mantenimiento en la célula. También se ha descrito que las HSPs pueden promover la actividad de diferentes sistemas de reparación del ADN.

El objetivo de esta tesis es investigar el efecto de la H y de Hsp27 y Hsp72 en la sensibilidad al cPt en condiciones proficientes y deficientes para el sistema MMR y evaluar la utilidad predictiva del daño en el ADN en linfocitos de sangre periférica (LSP) de pacientes oncológicos. Las líneas celulares HCT116+ch2 y HCT116+ch3 (deficiente y proficiente en el sistema MMR, respectivamente) y LSP de pacientes oncológicos fueron expuestos in vitro a cPt e H+cPt. La H previa al cPt incrementó la formación de aductos de platino, fosforilación de H2AX, CHK1 y CHK2, y disminuyó la expresión de las proteínas MMR. Se verificó una disminución de la viabilidad en células MMR+ tratadas con H+cPt. Las HSPs colocalizaron con MLH1 y MSH2 en condiciones basales, incrementando esta asociación luego del cPt. Estos resultados sugieren que la H potencia el efecto genotóxico del cPt independientemente del sistema MMR, pero su efecto en la sensibilidad sería mayor en células MMR+. Se concluye que MLH1 y MSH2 son proteínas clientes de Hsp27 y Hsp72. En LSP de pacientes con respuesta clínica completa, se encontró menor daño basal, mayor formación de aductos cPt-ADN (por ensayo cometa alcalino), y mayor número de focos  $\gamma$ H2AX en relación a los pacientes resistentes a la quimioterapia. Es necesario incrementar el número de pacientes para verificar la tendencia observada y la utilidad predictiva de estos marcadores.

## ABSTRACT

Cisplatin is an antineoplastic agent widely used in oncology. The loss of DNA Mismatch Repair System (MMR) has been related to cisplatin resistance. Hyperthermia (H) has been administered to cancer patients in combination with radiotherapy and chemotherapy in order to potentiate their toxicity. H induces the synthesis of Heat Shock Proteins (HSPs) in cells. The HSPs are molecular chaperones which play housekeeping functions in the cell. It has also been described HSPs can promote different DNA repair mechanisms.

The aim of this work is to investigate the effects of H and HSPs (Hsp27 and Hsp72) on cPt sensitivity under MMR-deficient and -proficient conditions, and to evaluate the predictive value of DNA damage in peripheral blood lymphocytes (PBL) from cancer patients. HCT116+ch2 and HCT116+ch3 (MMR-deficient/proficient, respectively) colon cancer cell lines and PBL from cancer patients were *in vitro* exposed to cPt and H+cPt. H increased cisplatin adducts formation, phosphorylation of H2AX, CHK1 and CHK2, and decreased MMR proteins expression. MMR+ cells decreased viability after H+cPt treatment. Colocalization analysis revealed that HSPs and MMR proteins are associated at basal conditions, and these associations increase after cPt exposure. These results suggest that H may potentiate genotoxic effect of cPt in a MMR-independent manner, although H effect on sensitivity may be higher for MMR+ cells. In addition, MLH1 and MSH2 are client proteins of Hsp27 and Hsp72. Lower intrinsic DNA damage, higher DNA-cPt adduct formation (evaluated by alkaline comet assay) and higher levels of  $\gamma$ H2AX foci were observed in PBL from patients with complete clinical response than in chemotherapy-resistant patients. It is necessary to increase the number of patients in order to verify the observed trend and the predictive value of these DNA damage markers.



## CAPÍTULO 1

### INTRODUCCIÓN

#### 1.1. Daño y reparación del ADN

##### 1.1.1. Descripción general

Nuestro genoma se encuentra expuesto continuamente a diversos tipos de agentes, tanto exógenos como endógenos, que causan alteraciones de variada magnitud en el ADN. Entre los agentes exógenos físicos se incluyen las radiaciones ionizantes y UV; mientras que en el grupo de agentes químicos se encuentran por ejemplo el benzopireno, los asbestos, el humo del cigarrillo y la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG). Agentes endógenos originados a partir del metabolismo aerobio normal de la célula, como las especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (NOS), originan daño oxidativo en el ADN. Por otra parte, durante el metabolismo del ADN (replicación, recombinación, etc.) también pueden ocurrir alteraciones [1]. Por ejemplo, las ADN polimerasas replicativas presentan una alta fidelidad pero pueden incorporar hasta  $10^{-7}$  nucleótidos incorrectos en cada ciclo de división celular; mientras que otras ADN polimerasas conocidas como ADN polimerasas de translesión poseen una fidelidad de replicación menor, ya que carecen de lectura correctora de prueba y por ende son capaces de originar mayor cantidad de errores [2]. Si los daños inducidos en el ADN no son reparados correctamente puede ocurrir la detención del ciclo celular, muerte celular, o bien en el peor de los escenarios, mutaciones y riesgo de transformaciones malignas [3].

Afortunadamente, las células cuentan con maquinarias enzimáticas especializadas en la reparación de los múltiples tipos de daños que puede sufrir el genoma. El correcto funcionamiento de los sistemas de reparación del ADN es crucial para remover las mutaciones en el ADN y mantener la integridad genómica en las células. En los organismos superiores, existen cinco grandes mecanismos de reparación del ADN: a) Reparación por escisión de bases (*Base Excision Repair: BER*); b) Reparación de bases mal apareadas en el ADN (*Mismatch Repair: MMR*); c) Reparación por escisión de nucleótidos (*Nucleotide Excision Repair: NER*); d) Reparación por recombinación homóloga (*Homologous Recombination: HR*); y e) Reparación por recombinación no homóloga (*Non Homologous End Joining: NHEJ*) [4]. Cada uno de estos mecanismos es capaz de intervenir en la detección y corrección de lesiones específicas en determinadas fases del ciclo celular (Tabla 1.1) [5].

**Tabla 1.1- Principales mecanismos de reparación del ADN en el ser humano.**

Mecanismo de reparación	Tipo de lesión	Fase del ciclo celular
BER (Base Excision Repair)	Bases desaminadas, modificadas y oxidadas. Sitios abásicos. Rupturas de simple cadena.	G1; S
NER (Nucleotide Excision Repair)	Distorsiones de la doble hélice: fotoproductos y productos de adición (hidrocarburos aromáticos policíclicos, aductos de cisplatino, etc.)	G1; S; G2-M
MMR (Mismatch Repair)	Nucleótidos mal apareados por errores en la replicación, bases modificadas, inserciones o deleciones.	S
HR (Homologous Recombination)	Rupturas de doble cadena (generalmente, cromátides hermanas), uniones cruzadas.	S; G2-M
NHEJ (Non Homologous End Joining)	Rupturas de doble cadena.	G1

Este trabajo se ha enfocado en el estudio de componentes del sistema de reparación de bases mal apareadas o MMR, por lo que a continuación solo será descrito en detalle este mecanismo.

## 1.2. Sistema de reparación de bases mal apareadas (*Mismatch Repair: MMR*)

### 1.2.1. Características y componentes

El sistema de reparación de bases mal apareadas (MMR) es un mecanismo postreplicativo, que actúa durante la fase S del ciclo celular, y corrige los errores generados durante la síntesis del ADN que escapan de la lectura correctora de pruebas de las enzimas ADN polimerasas [5]. Este sistema incrementa la fidelidad replicativa en las células, disminuyendo la tasa de mutaciones a un orden entre  $10^{-9}$ - $10^{-11}$  [2].

El sistema MMR se encuentra altamente conservado a lo largo de la cadena evolutiva, guardando similitudes con el modelo procariota de *Escherichia coli*. En el ser humano se han identificado diversos componentes en base a su homología con *E.coli* que incluyen: MSH (*MutS Homologue*), MLH (*MutL Homologue*), EXO1 (*Exonuclease 1*), RPA (*Replication Protein A*), PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), ADN polimerasa  $\delta$  y ADN ligasa I (Tabla 1.2.1.1) [1].

**Tabla 1.2.1.1. Componentes del sistema MMR y sus funciones.** Adaptado de Li GM, *Cell Research*, 2008; 18: 85-98 [1].

<i>E. coli</i>	Human	Función
(MutS) <sup>2</sup>	MutSa <sup>a</sup> MutS $\beta$	Reconocimiento de la lesión

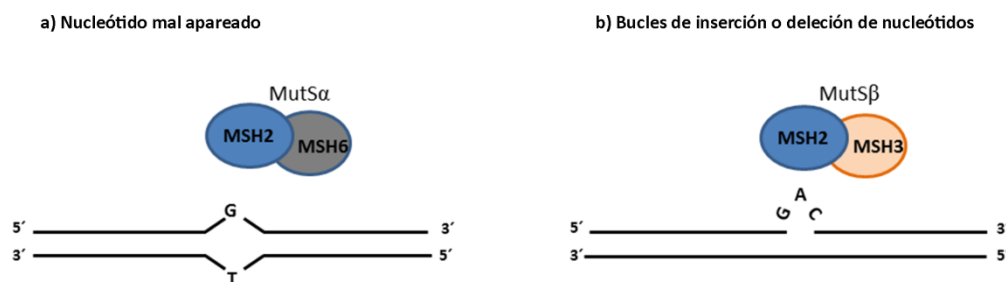
(MutL) <sup>2</sup>	MutL <sup>a</sup>	Promotor molecular; actividad endonucleasa, finalización del paso de escisión
	MutL $\beta$ MutLy	
MutH	*	Discriminación de cadena; actividad endonucleasa
UvrD (Mut U)	*	ADN helicasa
ExoI, ExoVII		Exonucleasa 3'-5'; escisión de la base mal apareada
ExoX, RecJ	EXO1	Exonucleasa 5'-3'; escisión de la base mal apareada
Holoenzima Pol III	Pol	Síntesis de reparación del ADN
	PCNA	Promotor molecular; activación de endonucleasa MutL $\alpha$ en MMR dirigido por el corte 3'; factor de procesividad en la resíntesis del ADN
SSB	RPA	Unión a ADN de cadena simple; estimulación de la escisión; finalización de la escisión del ADN; factor promotor de la resíntesis del ADN.
	HMG1	Proteína accesoria con capacidad de unirse y curvar al ADN; estimulación de la escisión del ADN
Complejo $\gamma$	RFC	Carga de PCNA; reparación dirigida por el corte en 3'; activación de la endonucleasa MutL $\alpha$
ADN Ligasa	ADN ligasa I	Sellado de la unión química.

<sup>a</sup> Principales componentes en células

\*Aún no identificados

<sup>2</sup> Complejos homodiméricos

Hasta el momento se han descrito en el ser humano cinco proteínas homólogas a MutS (MSH2, MSH3, MSH4, MSH5, MSH6) y cuatro a MutL (MLH1, MLH3, PMS1 y PMS2). Mientras que en las bacterias MutS y MutL funcionan como proteínas homodiméricas, los homólogos eucariotas claves del sistema MMR han evolucionado como heterodímeros conformando tres subunidades: MutS $\alpha$  (MSH2+MSH6), MutS $\beta$  (MSH2+MSH3) y MutL $\alpha$  (MLH1+PMS2) [6]. Como se ha mencionado, el sistema MMR es un sistema post-replicativo, que reconoce específicamente malos apareamientos (pares de bases distintos a los de Watson y Crick) y pequeños bucles de nucleótidos extra helicoidales (*"insertion/deletion loops"*, IDLs) (Figura 1.2.1) [7].



**Figura 1.2.1. Esquema de los tipos de daño en el ADN que son reconocidas por el sistema MMR.**

**a)** El complejo MutS $\alpha$  (heterodímero MSH2+MSH6) reconoce y se une a bases mal apareadas. **b)** El complejo MutS $\beta$  (heterodímero MSH2+MSH3) reconoce bucles de nucleótidos extrahelicoidales.

El complejo MutS $\alpha$  detecta bases simples mal apareadas o IDLs de uno o dos nucleótidos, aunque es capaz de reconocer IDLs de mayor extensión con baja afinidad. El complejo MutS $\beta$  reconoce IDLs de 2 a 10 nucleótidos, detecta débilmente IDLs de un nucleótido y es prácticamente inerte para bases mal apareadas [8]. Los IDLs se forman en las regiones repetitivas del genoma conocidas como microsatélites, debido a un alineamiento incorrecto de la ADN polimerasa durante los ciclos de disociación y asociación enzima-ADN que ocurren durante la replicación. Los IDLs representan un caso particular, ya que escapan a la lectura correctora de prueba de las ADN polimerasas, y por lo tanto, su reparación depende predominantemente del sistema MMR [9]. Una de las características de las células deficientes en el sistema MMR es la presencia de cambios frecuentes en el número de repeticiones del ADN microsatélite, este fenómeno es conocido como inestabilidad de microsatélites (*Microsatellite Instability, MSI*) y es característico en el Síndrome de Lynch o cáncer de colon no poliposo hereditario (*Hereditary NonPolyposis Colorectal Ccancer, HNPCC*) [10].

En el ser humano, los complejos MutL están formados por la combinación de la proteína MLH1 con PMS2 (human *Post-Meiotic Segregation protein 2*), o con PMS1 (human *Post-Meiotic Segregation protein 1*) o con MLH3, formando respectivamente los heterodímeros MutL $\alpha$ , MutL $\beta$  o MutL $\gamma$ . El complejo MutL $\alpha$  constituye una de las subunidades centrales del sistema MMR, siendo considerado el “promotor molecular”, ya que facilita el ensamblaje de un complejo funcional que coordina el reconocimiento inicial del daño con la maquinaria de reparación [11]. Además este complejo posee actividad endonucleasa presente en PMS2, esencial para la reparación de ciertos heterodúplex [12]. El complejo MutL $\gamma$  interviene en la meiosis, actuando en el procesamiento de intermediarios de recombinación meiótica en conjunto con el complejo MSH4-MSH5 [13, 14]. Además, se cree que este heterodímero podría tener un rol menor en el sistema MMR, precisamente en la reparación de IDLs dependiente de MutS $\beta$ . Sin embargo, se desconoce aún la función biológica del complejo MutL $\beta$ . Recientemente se ha propuesto que MutL $\beta$  podría funcionar como un factor accesorio que facilitaría la actividad del sistema MMR dependiente de MutL $\alpha$  [15]. La Tabla 1.2.1.2 resume las funciones de los componentes del sistema MMR en el ser humano.

**Tabla 1.2.1.2 Proteínas involucradas en el sistema MMR del ser humano.** Extraído de *Jiricny J y colaboradores, Nat Rev Mol Cell Biol. 2006; 7:335-346* [11].

Complejo	Componentes	Función
<b>MutS<math>\alpha</math></b>	MSH2, MSH6	Reconocimiento de bases mal apareadas y pequeños IDLs
<b>MutS<math>\beta</math></b>	MSH2, MSH3	Reconocimiento de IDLs

<b>MutL<math>\alpha</math></b>	MLH1, PMS2	Forma un compuesto ternario con el ADN y MutS $\alpha$ , incrementa la discriminación entre homodúplex y heterodúplex, también participa en la recombinación meiótica
<b>MutL<math>\beta</math></b>	MLH1, PMS1	Desconocida
<b>MutL<math>\gamma</math></b>	MLH1, MLH3	Función primaria en la recombinación meiótica; respaldo de MutL $\alpha$

Funcionalmente el sistema MMR comprende tres pasos esenciales: a) reconocimiento del sitio mal apareado, b) escisión de la cadena de ADN que contiene el error, y c) la síntesis de reparación libre de error. La primera etapa del proceso involucra los complejos MutS y MutL, los cuales reclutan otros polipéptidos, exonucleasas, polimerasas, y factores de reparación necesarios para las siguientes fases del proceso. Ciertas características otorgan al sistema MMR una elevada eficiencia. La primera de ellas es que las bases mal apareadas deben corregirse antes del siguiente ciclo de replicación. Si no fuera así, la mitad de las células hijas serían portadoras de la mutación. La segunda característica es que los factores de reconocimiento del sistema MMR son capaces de detectar diferentes tipos de distorsiones en la doble hélice de ADN. Esto se debe a que los malos apareamientos originados por los distintos pares de bases y los IDLs tienen diferentes estructuras. La tercera característica es que el sistema de reparación puede distinguir entre la cadena parental y la cadena hija de ADN y dirigir la reparación a la cadena recién sintetizada [9].

### 1.2.2. Reconocimiento del daño en el ADN: Unión de los complejos MutS y MutL

El proceso se inicia con la incorporación del complejo MutS al mal apareamiento en el ADN (*mismatch*), a través de un residuo Phe en el motivo Phe-X-Glu, localizado en el extremo N-terminal de su cadena polipeptídica [16]. En los eucariotas, este motivo se encuentra en la proteína MSH6 pero no en MSH2 ni MSH3, lo cual indica que sólo MSH6 está involucrada en el reconocimiento inicial de la base mal apareada. Cuando el residuo de Phe se encuentra mutado (Phe cambia por Ala), el heterodímero MutS $\alpha$  (MSH2-MSH6) pierde su capacidad de unión al ADN [17]. La proteína MSH3 posee varios aminoácidos polares y básicos que interactúan con el esqueleto azúcar-fosfato de los IDLs, otorgándole al complejo MutS $\beta$  (MSH2-MSH3) la habilidad para unirse a IDLs de distinto tamaño. Llamativamente, la proteína MSH2 que no participa en la unión a bases mal apareadas en el complejo MutS $\alpha$ , establece contacto con los IDLs de mayor tamaño en MutS $\beta$  [18]. De este modo, el extremo N-terminal de las proteínas MSHs tiene funciones claves en el reconocimiento de la lesión, mientras que el dominio C-terminal, donde reside la actividad ATPasa, es esencial para los pasos posteriores

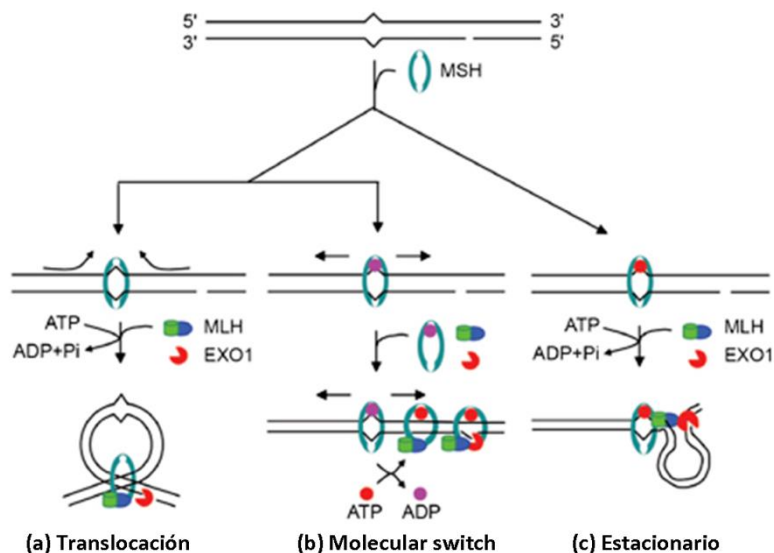
del proceso de reparación. El reconocimiento y unión de MutS $\alpha$  a la base mal apareada, reacción facilitada por PCNA, desencadena la interacción entre MutS $\alpha$  y MutL $\alpha$  y la formación de un compuesto ternario con el ADN en presencia de ATP [19].

Los homólogos eucariotas de MutL también poseen actividad ATPasa, la cual se encuentra en su dominio conservado N-terminal. El dominio C-terminal de MutL $\alpha$  no está tan conservado y es donde se encuentra la actividad endonucleasa [6]. Del mismo modo que MutS, MutL $\alpha$  también atraviesa un cambio conformacional cuando se une a ATP. Aún no está claro si este complejo ternario con MutS $\alpha$  y el ADN se forma mientras MutS $\alpha$  está unido a la base mal apareada ó si MutS $\alpha$ /MutL $\alpha$  interactúan en el ADN homodúplex una vez que se ha formado el anillo MutS $\alpha$ -ATP y abandonado el sitio mal apareado. Sin embargo, se sabe que el heterodímero MutL $\alpha$  no es necesario para que MutS $\alpha$  atraviese el cambio conformacional dirigido por la unión a ATP, esto se explica en detalle más adelante [9].

### **1.2.3. Discriminación entre la cadena hija y parental**

Dado que la reparación del ADN está dirigida a la cadena recién sintetizada, en los eucariotas la señal de discriminación entre la hebra hija y la parental está dada por los cortes (*nick*) 3' y 5' presentes entre los fragmentos de Okazaki de la cadena retardada; y además por los extremos 3' libres de la cadena conductora que permanecen transitoriamente sin sellar durante el proceso de replicación [8]. Se han propuesto tres modelos a través de los cuales las proteínas del sistema MMR facilitarían la comunicación entre la base mal apareada y la señal de discriminación de cadena, dos sitios físicamente separados en el ADN (Figura 1.2.3). El "*modelo de translocación*" propone que la hidrólisis del ATP es la fuerza que dirige la translocación de MutS a lo largo del ADN formando bucles de ADN que aproximan el sitio mal apareado y la señal de discriminación de cadena [20]. En el "*modelo molecular switch o sliding clamp*" (interruptor molecular o pinza deslizante), MutS $\alpha$ -ADP o MutS $\beta$ -ADP, reconocen y se unen al ADN en el sitio de la lesión, intercambiándose ADP por ATP. La unión del complejo MutS $\alpha$  a la base mal apareada inhibe la hidrólisis de ATP, y luego un cambio conformacional libera al complejo del sitio de la lesión, en forma de un anillo que se desliza a través del ADN [21, 22]. De acuerdo con este modelo, el complejo MutS se aleja del sitio mal apareado para encontrar la señal de discriminación de cadena, y para reclutar factores de reparación o activar factores que pueden estar unidos a él. El "*modelo estacionario*" propone que las interacciones entre las proteínas del sistema MMR inducen una vuelta en el ADN que acerca estos dos sitios distantes, mientras que MutS permanece unido al ADN [23]. Actualmente los dos primeros modelos son los más aceptados, apoyados por los resultados de Pluciennik y colaboradores

[24]. Sus experimentos demostraron que una DBSs o una proteína “roadblock” entre la base mal apareada y el *nick* (dos sitios alejados en el ADN), inhibe la reparación *in vitro* del sistema MMR, esto significa que la existencia de un impedimento físico entre estos dos sitios bloquearía la reacción de reparación.



**Figura 1.2.3. Esquema de los modelos propuestos para la conexión del sitio mal apareado y la señal de discriminación de cadena.** Los modelos móviles (a) y (b) postulan que las proteínas MSH se unen a la base mal apareada y luego se alejan del sitio en busca de la señal de discriminación de cadena (mella). El “modelo de translocación” (a) sostiene que la hidrólisis de ATP dirige el movimiento unidireccional del heterodímero MSH, resultando en la formación de un bucle tipo  $\alpha$ . En el modelo “molecular switch” (b) la unión del heterodímero MutS (unido a ADP) a la base mal apareada desencadena el intercambio de ADP por ATP promoviendo un deslizamiento del complejo que puede ocurrir en dirección 5’ o 3’ alejándose del mismatch. En la figura sólo está representado el deslizamiento en dirección hacia el *nick*. En el “modelo estacionario” (c) el complejo MutS (heterodímero MSH) permanece unido a la base mal apareada. La interacción entre proteínas induce un bucle en el ADN que atrae a los dos sitios distantes. EXO1 interactúa con MSH2 y MLH1 en el sitio del *nick*, permitiendo su reclutamiento y carga en el ADN. Diagrama traducido de Li GM, *Cell Research*, 2008; 18: 85-98 [1]

#### 1.2.4. Proteínas accesorias que intervienen en el sistema MMR

Los complejos MutS $\alpha$ , MutS $\beta$  y MutL $\alpha$  poseen motivos PIP (*PCNA Interacting Peptide*) a través de los cuales interactúan con PCNA [25,26]. PCNA transfiere los complejos MutS al ADN heterodúplex [27], se une al ADN en el extremo libre 3’ a través del factor de replicación RFC y junto con éste, forman un anillo alrededor del ADN que permite el anclaje de proteínas, como es el caso de las proteínas MMR. PCNA no sólo es requerido en la etapa de resíntesis del ADN, sino también para activar la función endonucleasa de MutL $\alpha$  necesaria para la reparación de las bases mal apareadas con sitio de corte en el extremo 3’ (heterodúplex 3’) [12, 28]. EXO1 (exonucleasa 5’ $\rightarrow$ 3’) realiza la remoción de la cadena hija de ADN en presencia de un sitio de

corte en el extremo 5' del *mismatch* (heterodúplex 5'), con la participación de MutS $\alpha$  o MutS $\beta$  y RPA. En el caso de la escisión del heterodúplex 3', la actividad endonucleasa de MutL $\alpha$  (activada por MutS $\alpha$ , PCNA y RFC) daría origen a incisiones distales al sitio de la lesión en el ADN, que constituirían puntos de inicio para la remoción del ADN por la actividad 5'→3' de EXO1 [12]. Esta hipótesis proviene de estudios con sistemas purificados donde MutS $\alpha$ , MutL $\alpha$ , EXO1, PCNA y RFC fueron capaces de llevar a cabo la remoción de la base mal apareada tanto en heterodúplex 3' como en 5', sin necesidad de la acción de otra exonucleasa [29, 30].

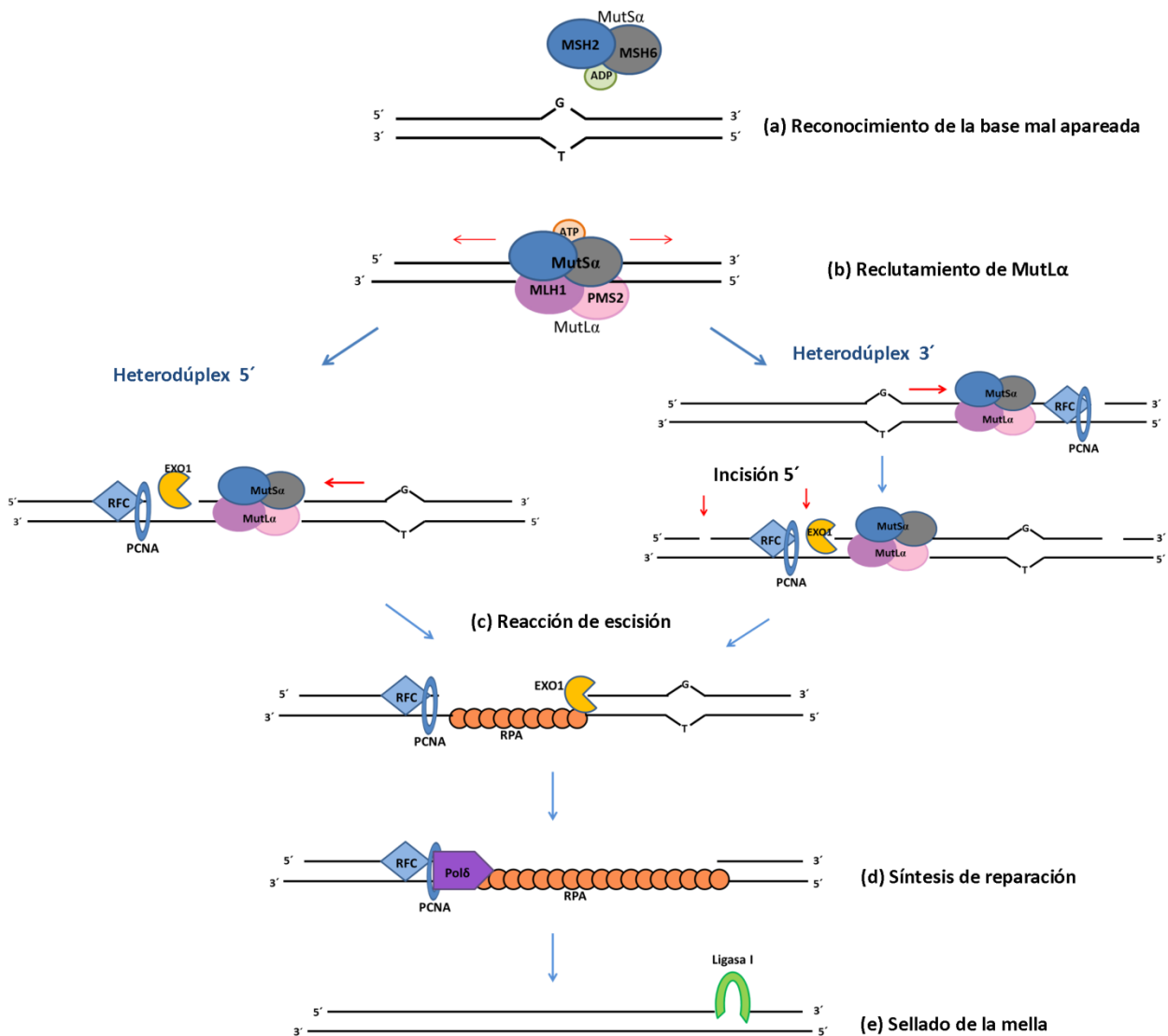
Entre los factores accesorios que participan en el sistema MMR humano también se encuentran RPA, HMGB1 (*High Mobility Group Binding 1*) y ADN Polimerasa  $\delta$  [7]. RPA se une y protege al ADN de cadena simple generado durante el paso de escisión, estimula la finalización de la escisión por EXO1 y facilita la resíntesis del ADN [31]. Cuando RPA no está fosforilado, presenta una alta afinidad por el ADN, lo cual es necesario para proteger al ADN de cadena simple y para desplazar al complejo MutS $\alpha$ /MutL $\alpha$  que se encuentra ligado al ADN. Luego del reclutamiento de la ADN Pol  $\delta$  a la región de ADN simple cadena (*gap*), la fosforilación de RPA reduce la afinidad del complejo RPA-ADN, facilitando la resíntesis del ADN por la polimerasa  $\delta$  [32]. No se conoce con certeza la función de HMGB1 en el sistema MMR. Se sabe que esta proteína es capaz de unirse al ADN y curvarlo, acercando sitios distantes y facilitando la interacción de proteínas necesarias para el procesamiento de la lesión en el ADN. En el caso de MMR, se ha propuesto que HMGB1 tendría lugar en el paso de escisión del *mismatch*, específicamente atenuando la escisión del ADN por parte de EXO1. Sin embargo, se ha demostrado en ensayos *in vitro* que su participación no es esencial para la reparación por MMR [31, 33].

### 1.2.5. Reacción de reparación del sistema MMR

A modo de síntesis, existen dos tipos de reacciones MMR dependiendo de si el corte se encuentra en sentido 5' ó 3' respecto a la lesión en el ADN (Figura 1.2.5). En el caso del heterodúplex 5', la combinación de MutS $\alpha$  o MutS $\beta$ , RPA y EXO1, promoverían la degradación de la cadena hija desde el corte 5' en dirección a la base mal apareada; luego la síntesis de reparación estaría a cargo de Pol  $\delta$ , PCNA, RFC y RPA. En el caso del heterodúplex 3', la difusión de un complejo MutS activado resultaría en el encuentro de una molécula PCNA en el extremo 3' adyacente a la ruptura de cadena [11]. En este caso, se formaría un complejo entre MutS $\alpha$ , MutL $\alpha$ , EXO1, PCNA y RFC en el extremo 3' del corte, que activaría la función endonucleasa de MutL $\alpha$  para que introduzca cortes en dirección 5' a la base mal apareada, generando un sitio de inicio para que EXO1 lleve a cabo la degradación del ADN en dirección al



*mismatch*. RPA se uniría al ADN de cadena simple resultante y la ADN Pol $\delta$  realizaría la síntesis de reparación. Por último, la ADN ligasa I sellaría el corte remanente, completando así el proceso de reparación [8].



**Figura 1.2.5. Etapas propuestas para la reparación de bases mal apareadas en el ADN por el sistema *Mismatch Repair* (MMR).** El diagrama describe los pasos secuenciales de la reacción MMR. **(a)** El complejo MutS $\alpha$  o MutS $\beta$  reconoce la mutación y se une al ADN en el sitio del *mismatch*, esto desencadena un cambio de conformación del complejo, el intercambio de ADP por ATP y el reclutamiento de MutL $\alpha$  **(b)**. De acuerdo con el modelo “*molecular switch*”, este complejo ternario se desplazaría alejándose de la base mal apareada en búsqueda de la señal de discriminación de cadena. En el caso de un heterodúplex 5' (con una ruptura de cadena aguas arriba del sitio mal apareado), estos complejos reclutarían a EXO1 para que lleve a cabo la escisión de la cadena hija en dirección 5'  $\rightarrow$  3' **(c)**. En el caso de un heterodúplex 3', los complejos se encontrarían con una molécula de PCNA adyacente al sitio de corte 3'. Esto activaría la función endonucleasa de MutL $\alpha$ , la cual produciría varios cortes 5' del *mismatch* para generar un sitio de entrada para EXO1. El ADN de simple cadena, que resulta de la actividad de EXO1, sería resguardado por diversas moléculas de RPA; mientras que ADN Pol $\delta$  llevaría a cabo la síntesis del ADN junto con los cofactores PCNA y RFC **(d)**. En la última etapa del proceso de reparación, la enzima ADN ligasa I sellaría la mella remanente **(e)**.

### 1.2.6. Funciones no canónicas del mecanismo MMR

Además de mantener la estabilidad genómica a través de la corrección de los errores originados durante la replicación del ADN, el sistema MMR también realiza esta función suprimiendo eventos de la recombinación homeóloga [34]. A su vez, se ha reportado que las proteínas del sistema MMR intervienen en la señalización de ciertos tipos de daño y en la detención del ciclo celular [35, 36]. Sin embargo, algunas de sus funciones tienen un rol mutagénico [37]. Este es el caso de los complejos MutS $\beta$  que promueven la expansión de las repeticiones de trinucleótidos [38], regiones responsables de varios desórdenes neurodegenerativos como el síndrome de X frágil, la enfermedad de Huntington, distrofia miotónica, etc. Las funciones no canónicas del sistema MMR también tienen protagonismo en los procesos de hipermutación somática y en el cambio de clase de la cadena pesada de los linfocitos B [39, 40]. En este caso los eventos de reparación son mutagénicos debido a la ausencia de una señal de discriminación de cadena, ya que el proceso no está acoplado a la replicación del ADN.

### 1.2.7. Relevancia clínica del sistema MMR

La inactivación del sistema MMR en el ser humano produce inestabilidad genómica y causa una fuerte predisposición al desarrollo tumoral. Los defectos en esta vía se han detectado en el 10-15% de ciertos tipos de cáncer esporádico (colorectal, de endometrio y de ovario), y en más de la mitad de los casos de cáncer de colon no poliposo hereditario (HNPCC), también conocido como Síndrome de Lynch [41]. El HNPCC es un síndrome autosómico dominante causado por la mutación germinal de uno o varios genes del sistema MMR. Se han identificado mutaciones en los genes *MLH1*, *MSH2*, *PMS1*, *PMS2*, *MSH6* y *MLH3* [42-44]. Las mutaciones en los genes *MLH1* y *MSH2*, ocurren en el 50-60% de los casos, mientras que las mutaciones en *MSH6* y *PMS2* son raras y de menor penetrancia. Del total de mutaciones identificadas en los genes *MLH1* y *MSH2*, el 29% y 16% respectivamente, son mutaciones de cambio de sentido (*missense mutations*) que producen la sustitución de un aminoácido [43].

Por otra parte, la mutación en los genes del sistema MMR causa alteraciones en la longitud de secuencias repetitivas del genoma, es decir MSI. Si bien la MSI fue relacionada por primera vez con defectos del sistema MMR en pacientes con HNPCC, ha sido identificada en otros tumores (tumores de colon, endometrio, ovario, estómago, cervical, mama, pulmonar, próstata y vejiga, también glioma, leucemias y linfomas) [45]. La MSI en tumores esporádicos no colónicos se asocia a menudo con la hipermetilación del promotor del gen *MLH1*; aunque

llamativamente, se han identificado pocas mutaciones en los genes del sistema MMR en estas células [46, 47].

Los defectos en el sistema MMR, además de relacionarse con la predisposición a la oncogénesis, han sido vinculados con la resistencia a ciertos agentes antineoplásicos como cisplatino, 6-tioguanina y MNNG (N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina). Dicha resistencia puede ocurrir directamente por la pérdida de la capacidad de la célula para detectar el daño al ADN y activar la apoptosis, o indirectamente por el incremento de la tasa de mutación del genoma [48].

### **1.3. Marcadores de daño en el ADN**

#### **1.3.1. $\gamma$ H2AX**

La proteína H2AX es una variante de la histona H2A, proteína estructural de los nucleosomas, que en mamíferos representa el 2 a 25% de la histona H2A, según el organismo y tipo celular. H2AX está formada por un dominio central globular, flanqueado por los dominios amino y carboxilo terminal, el cual posee sitios para diversas modificaciones post-traduccionales [49]. H2AX es similar en estructura a otras variantes de la histona H2A, pero se distingue por la presencia de un motivo SQ en el extremo C-terminal con un residuo de serina denominado omega-4. Tanto el motivo SQ como el residuo omega-4 se encuentran altamente conservados en la cadena evolutiva [50]. En el ser humano, el residuo omega-4 corresponde a la ser 139 que se fosforila rápidamente en presencia de rupturas de doble cadena (Double Strand Breaks, DSBs). La forma fosforilada de H2AX (Ser139) se denominó  $\gamma$ H2AX debido a que se observó por primera vez en células expuestas a radiación  $\gamma$  [50, 51]. La fosforilación de H2AX es mediada por proteínas sensoras de la familia PI3-quinasas: ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), ATR (*AT and Rad3-Related protein*) y DNA-PK (*DNA-dependent Protein Kinase*) (Figura 1.3). Cuando se produce el daño en el ADN, la fosforilación de H2AX ocurre en primer término en la cromatina que rodea al sitio de la ruptura de cadena. Posteriormente, cientos a miles de moléculas de  $\gamma$ H2AX rodean un único sitio de DSBs dando origen a un foco, cuya función consiste en la apertura de la cromatina y en la constitución de una plataforma para el reclutamiento de diversos factores de reparación involucrados en la respuesta al daño en el ADN [52]. Entre los factores reclutados al sitio del daño se encuentran las cohesinas, proteínas necesarias para el mantenimiento de la cohesión de las cromátides permitiendo así una correcta reparación del ADN [53].

La exposición a distintas fuentes de radiación, como rayos X, radiación  $\gamma$ , iones pesados, induce en forma directa las DSBs en el ADN. Además, el tratamiento de las células con agentes citotóxicos como inhibidores de la síntesis del ADN, agentes alquilantes, inhibidores de topoisomeras I y II, y peróxido de hidrógeno conduce indirectamente a la formación de DSBs y por lo tanto, a la expresión de  $\gamma$ H2AX [49]. Esto ocurre como consecuencia de la reparación o intento de reparación de rupturas de simple cadena o de aductos que origina DSBs al interferir con el progreso de los complejos de replicación y transcripción de la lesión original. Es importante mencionar que se han descrito focos de  $\gamma$ H2AX que pueden ser desencadenados por factores intrínsecos como el estrés replicativo, daño oxidativo, envejecimiento o el metabolismo del ADN, los que pueden ser independientes de DSBs [54].

En relación al sistema MMR, se ha reportado en células HeLa que la proteína MSH6 colocalizó con  $\gamma$ H2AX luego de la exposición a radiación ionizante, mientras que las células HeLa *knokdown* para MSH6 exhibieron focos  $\gamma$ H2AX persistentes través del tiempo los cuales se asociaron a DSBs (detectadas también por ensayo cometa). Sin embargo, se desconoce si la deficiencia del sistema MMR puede causar focos  $\gamma$ H2AX espontáneos [55].

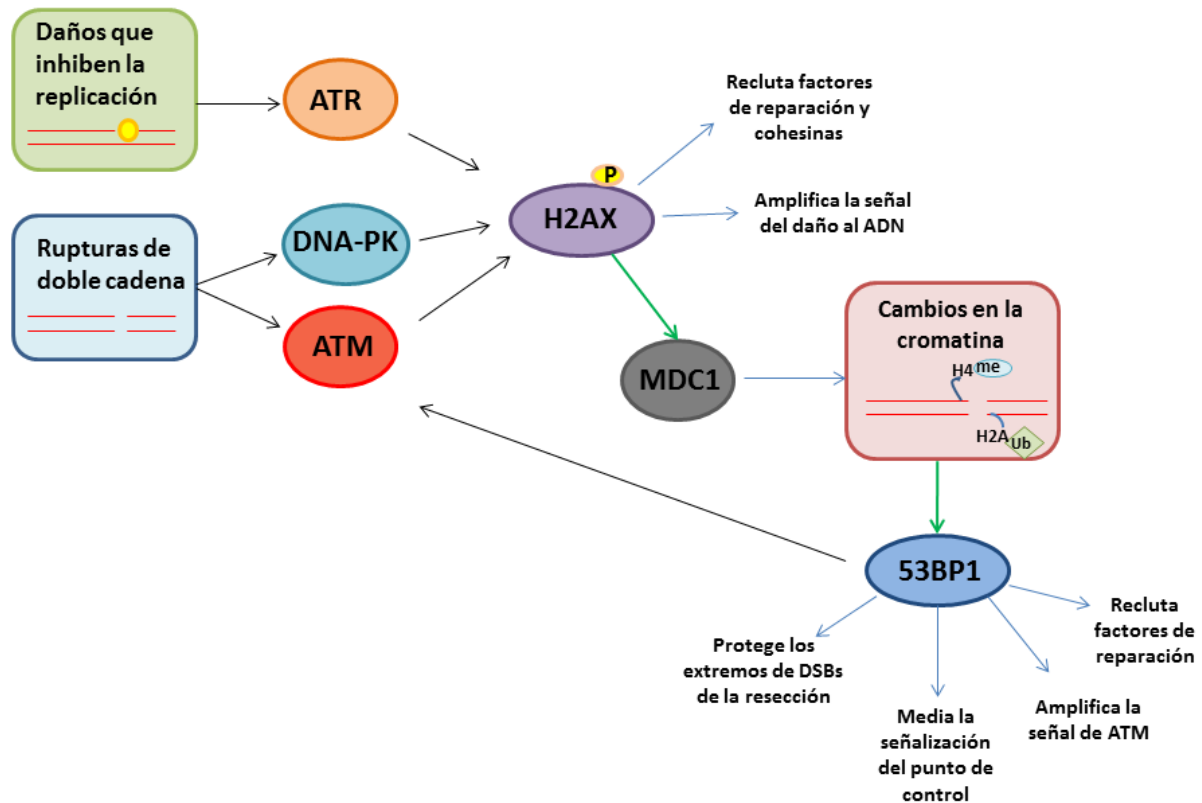
La inducción de  $\gamma$ H2AX luego de la exposición a diversos agentes puede ser detectada y cuantificada por inmunoblot, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, ELISA y citometría de flujo [51]. La eficiencia en la detección de  $\gamma$ H2AX convierte a esta proteína en un biomarcador de DSBs del ADN. Si bien en un principio la determinación de  $\gamma$ H2AX se utilizó para estudiar el daño del ADN en investigación básica, en la actualidad, también se está aplicando en áreas traslacionales. Estas áreas incluyen biodosimetría, desarrollo de drogas, estudios de contaminantes ambientales, monitoreo de pacientes en ensayos clínicos y tumorigénesis [56-58].

### **1.3.2. 53BP1**

La proteína 53BP1 (*p53-binding protein 1*) tiene como función principal en la célula regular la señalización de las DSBs [59]. En el año 1994 se describió por primera vez que interactuaba con el supresor tumoral p53, sin embargo la significancia de esta interacción aún se desconoce [60]. Desde entonces, su función en el mantenimiento de la integridad genómica se ha investigado intensamente. 53BP1 es un traductor del código de histonas, ya que se une a modificaciones específicas de la cromatina que se producen en respuesta a las DSBs. Cuando

se originan DSBs en el ADN, 53BP1 se acumula rápidamente en la cromatina que rodea el daño, por ello es utilizado como marcador de DSBs [61]. El proceso de reclutamiento de 53BP1 se inicia tras la fosforilación de H2AX mediada por ATM. La fosforilación de esta histona recluta a MDC1 (*Mediator of DNA damage Checkpoint protein 1*), que en conjunto con  $\gamma$ H2AX, promueve la movilización de otras proteínas al sitio de la ruptura interviniendo además en la detención del ciclo celular [62]. Estas proteínas (no nombradas aquí) promueven modificaciones en las histonas que conforman la cromatina y que se encuentran adyacentes a la DSB. Específicamente, desencadenan la ubiquitinación del residuo Lisina 15 de H2A (H2AK15Ub) y la metilación de Lisina 20 de la histona H4 (H4K20me2). Estas modificaciones específicas en las histonas H2A y H4 reclutan a 53BP1 [63]. Una vez unido al ADN dañado 53BP1 lleva a cabo varias funciones (Figura 1.3). Primero, actúa como un almacén molecular para proteínas de reparación y de señalización de DSBs [62]. La segunda función consiste en amplificar la actividad de ATM y promover los puntos de control dependientes de ATM en presencia de bajos niveles de daño en el ADN [64]. Se ha demostrado que 53BP1 es capaz de estimular la actividad de ATM a través de su interacción directa [65]. Una tercera función de 53BP1 es la de proteger los extremos de las DSBs durante su procesamiento por la maquinaria de resección en la fase G1, regulando así el mecanismo de reparación del ADN que va a intervenir. Por último, promueve la sinapsis de los extremos distales de ADN durante la NHEJ, si bien no es un componente estructural de esta vía de reparación [66].

Al igual que  $\gamma$ H2AX, la determinación de focos de 53BP1 es utilizada en investigación básica como marcadores de DSBs en el ADN. Desde hace algunos la expresión de 53BP1 también es empleada en el campo de la investigación traslacional para el monitoreo del daño en el ADN y como marcador predictivo de respuesta al tratamiento oncológico en linfocitos de sangre periférica o en biopsias de pacientes [67-69].



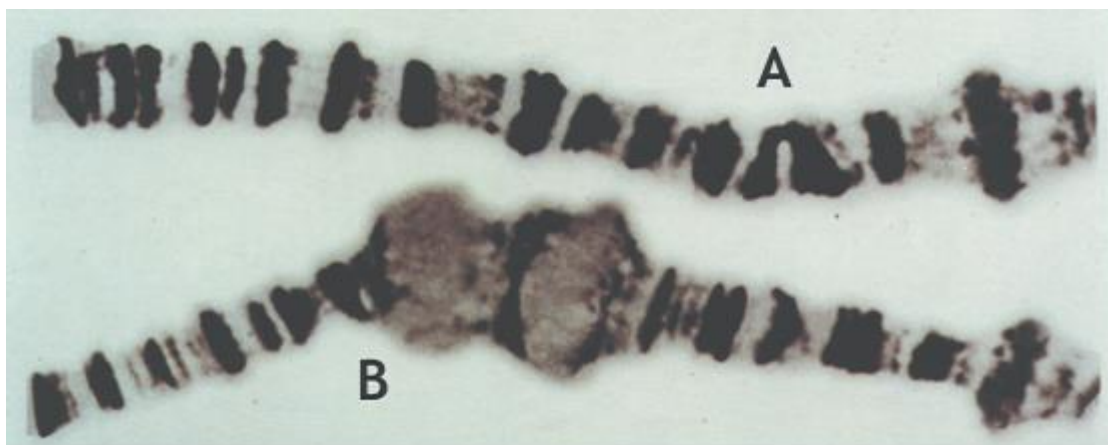
**Figura 1.3. Secuencia de reclutamiento de los marcadores de daño en el ADN.** En presencia de un daño en el ADN, la variante de histona H2AX es fosforilada por miembros de la familia PI3K; ATR en el caso de las lesiones que impiden la replicación del ADN o por ATR/DNA-PK en presencia de rupturas de doble cadena (DSBs). La fosforilación de esta histona recluta numerosos factores necesarios para la reparación, entre ellos MDC1. MDC1 luego de unirse al ADN activa a otras proteínas (no nombradas aquí) que desencadenan modificaciones en las histonas que conforman la cromatina y que se encuentran adyacentes a la DSB. A su vez, estos cambios en la cromatina son detectados por 53BP1, el cual se une al sitio del daño. Del mismo modo que  $\gamma$ H2AX, 53BP1 sirve de plataforma para el reclutamiento de proteínas accesorias, formando los denominados “focos de reparación”. Las flechas de color negro representan *activación*, las flechas verdes significan *reclutamiento* y las flechas de color azul señalan la *función* de estos marcadores.

## 1.4. Proteínas de golpe de calor

### 1.4.1. Generalidades

Los estudios sobre la respuesta al estrés térmico comenzaron en 1962 con los hallazgos de Ferruccio M. Ritossa, quien describió abultamientos en los cromosomas politénicos (“*puffs*”) de las glándulas salivales de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. Estos abultamientos, que correspondían a regiones de intensa actividad transcripcional, fueron inducidos rápidamente en respuesta a la exposición transitoria de los cultivos a elevadas temperaturas (30°C, 30 min), (Figura 1.4.1) [70]. Posteriormente en 1974, Tissieres y Mitchell

caracterizaron estos ARNm que resultaron en la síntesis de un grupo de proteínas a las cuales denominaron proteínas de golpe de calor (*Heat Shock Proteins*, HSPs) [71].



**Figura 1.4.1.** Abultamientos en los cromosomas politénicos de *Drosophila melanogaster* que corresponden a la expresión de genes de las proteínas de golpe de calor de la familia HSP70 (HSPA). **(A)** Cromosoma normal. **(B)** Cromosoma luego de la exposición a un golpe de calor. Extraído de Welch W.J. "How cells respond to stress", *Scientific American*, 1993:56-64.

Las HSPs se encuentran altamente conservadas a lo largo de la cadena evolutiva, desde las bacterias hasta organismos superiores como los animales y las plantas, y representan un mecanismo de defensa universal frente a un amplio rango de condiciones dañinas para la célula [71]. La síntesis de HSPs no sólo es inducida por el calor, sino también por diversas situaciones de estrés ambiental, como estrés oxidativo, metales pesados, análogos de aminoácidos, inhibidores del metabolismo energético, radiación UV; y también bajo condiciones patológicas, tales como fiebre, inflamación, daño tisular, isquemia, infecciones y proteínas mutantes asociadas con enfermedades genéticas [72]. Por otra parte, muchas de estas proteínas también se expresan en células normales no expuestas a un estrés. Por ello se las ha dividido en dos grupos: las "*HSPs constitutivas*", que se expresan en las células en condiciones normales y las "*HSPs inducibles*", que se sintetizan bajo condiciones de estrés celular [73].

Las chaperonas moleculares son proteínas que interactúan, estabilizan o ayudan a una proteína no nativa a adquirir su conformación nativa sin estar presente en su estructura final. Las HSPs constituyen el grupo más grande de chaperonas moleculares, que no solamente interactúan con polipéptidos nacientes para asistir su plegamiento y translocación a través de las membranas intracelulares, sino que además cumplen un rol crítico durante el estrés celular al capturar proteínas desnaturalizadas y prevenir su plegamiento defectuoso y su agregación.

Las HSPs intervienen en la recuperación del estrés ya sea reparando las proteínas dañadas (replegamiento proteico) o degradándolas, restaurando así la homeostasis proteica y promoviendo la supervivencia celular [74].

En las células de los mamíferos, las HSPs se clasifican tradicionalmente según su peso molecular en kDa: HSP110 (HSPH), HSP90 (HSPC), HSP70 (HSPA), HSP60 (HSPD), HSP40 (DNAJ) y pequeñas HSPs (HSPB). Debido a la creciente expansión de los miembros de cada familia de HSPs, se ha comenzado a utilizar una nueva nomenclatura, la cual se menciona entre paréntesis [73].

En sus niveles basales, las HSPs constitutivas llevan a cabo funciones de mantenimiento, no sólo limitándose a su actividad como chaperonas de polipéptidos nacientes, sino también participando en la estabilización de receptores de hormonas esteroideas, factores de transcripción y quinasas. A su vez, una misma HSP puede ser constitutiva e inducible, por ejemplo, Hsp27 (HSPB1) se expresa en niveles basales, pero su síntesis es inducida en condiciones de estrés [73]. En otros casos, el estrés induce una forma diferente pero estrechamente relacionada de HSP. Por ejemplo, Hsc70 o Hsp73 (HSPA8) es la forma constitutiva de Hsp70 (HSPA), mientras que Hsp72 o HSP70-1 (HSPA1A) es su forma inducible. Otro miembro inducible de la familia HSPA es la proteína HSP70-2 (HSPA1B) la cual difiere en sólo dos aminoácidos de Hsp72 (HSPA1A) [75]. Además, dentro de una misma familia se encuentran proteínas que cumplen las mismas funciones en determinado compartimento subcelular o que son específicas de tejido. Tal es el caso de Hsp75 (HSPA9) que se expresa en mitocondria, Grp78 (HSPA5) en el retículo endoplásmico mientras que Hsp70-1t (HSPA1L) se expresa exclusivamente en testículo [76].

#### **1.4.2. Expresión génica de las HSPs**

En vertebrados, la activación de los genes que codifican a las HSPs (*“heat shock genes”*) está mediada por cuatro factores de transcripción denominados *“Heat Shock Factors”* (HSF1-4). En humanos, sólo tres de estos factores han sido caracterizados (HSF1, HSF2 y HSF4). HSF1 es el principal factor activado por el estrés, mientras que HSF2 se activa en etapas específicas del desarrollo, en la diferenciación celular y durante la inhibición del proteosoma dependiente de ubiquitina. HSF4 se expresa en tejidos específicos (cardíaco, músculo esquelético, cerebro), está unido constitutivamente al ADN, y al menos una de sus isoformas actúa como inhibidor de la expresión génica inducida por el estrés [72,77].



La respuesta transcripcional al golpe de calor (exposición transitoria a temperaturas por encima de las fisiológicas) es un proceso de múltiples pasos [78]. En condiciones normales, HSF1 se expresa en forma de monómero. En condiciones de estrés, la desacetilasa SIRT1 activa a HSF1, el cual se conjuga con otras moléculas de HSF1 para formar un homotrímero o con una molécula de HSF2 para formar un heterotrímero, los cuales son capaces de unirse a las regiones promotoras de los “*heat shock genes*” [79]. El homotrímero HSF1 o heterotrímero HSF1<sub>2</sub>-HSF2 se une al ADN en la región denominada “*Heat Shock Elements*” (HSE), caracterizada por múltiples repeticiones adyacentes e inversas del pentanucleótido 5'-nGAA-3' [80] y que se localiza cientos de pares de bases “aguas arriba” del sitio de inicio de la transcripción [77]. La formación del homotrímero HSF1 está relacionada con la respuesta al estrés celular, mientras que la formación del heterotrímero HSF1-HSF2 ocurre frecuentemente durante procesos del desarrollo [79]. Una vez unido al ADN, se produce la fosforilación inducida del residuo Ser230 de HSF1 por la quinasa CaMKII (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*). La fosforilación de este residuo es crítica para que el homo o heterotrímero se vuelvan transcripcionalmente activo [81]. Entre los genes que se activan se encuentran aquellos que codifican a las chaperonas moleculares, entre ellas, Hsp70 y Hsp90. Durante la atenuación de la respuesta al estrés, Hsp70 y su co-chaperona Hdj1 interactúan directamente con el dominio de activación de HSF1 para iniciar su retroalimentación negativa y así inhibir su actividad transcripcional [82]. Por lo tanto, la expresión de los genes que codifican HSPs está regulada positivamente por los HSFs y negativamente por los mismos productos de su expresión.

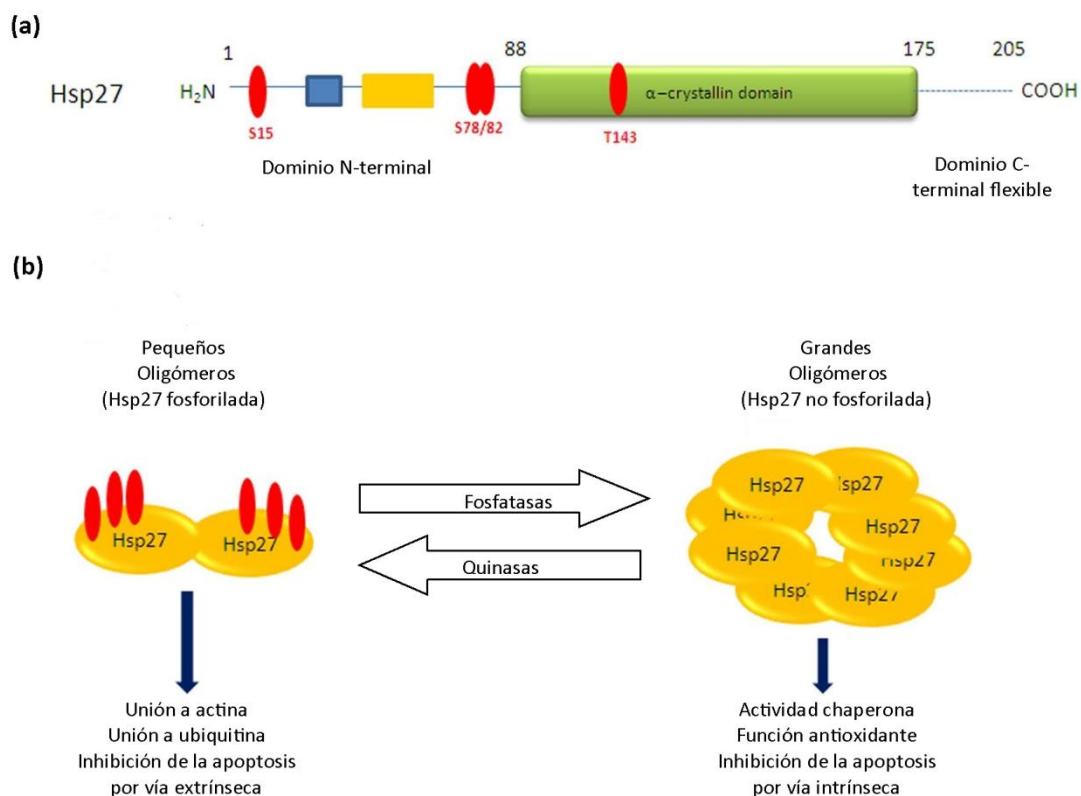
A continuación se describirán las proteínas Hsp27 y Hsp72 debido a que son las HSPs seleccionadas para el desarrollo de esta tesis. La elección de estas proteínas se basó en resultados previos del grupo de trabajo donde se observó correlación entre la expresión nuclear de Hsp27 y Hsp72 en tumores de mama con resistencia a la administración de antraciclinas [83]. En un segundo estudio realizado en linfocitos de sangre periférica de personas sanas expuestos *in vitro* a H+cPt se caracterizó la expresión de Hsp27, Hsp60, Hsp70 y Hsp90, encontrándose niveles de expresión elevados estadísticamente significativos para Hsp27 y Hsp70 [84].

### **1.4.3. Estructura y función de la proteína Hsp27**

La proteína Hsp27, también conocida como HSPB1, pertenece a la familia de las pequeñas HSPs (*small HSPs*, sHSPs o HSPB). Las sHSPs se caracterizan por la presencia de un dominio cristalino conservado, flanqueado por los dominios variables amino y carboxilo

terminal. Los extremos N- y C- terminal, junto con parte del dominio cristalino, están involucrados en la unión del sustrato (Figura 1.4.3.a). Los miembros de esta familia son chaperonas independientes de ATP, forman complejos oligoméricos, y requieren de otras familias HSP para el procesamiento de sus sustratos. Dependiendo del sustrato y/o demás proteínas chaperonas, el sustrato puede ser llevado a degradación o replegamiento [75].

Hsp27 puede encontrarse en una estructura de alto peso molecular (por ej. hexadecámeros) o de bajo peso molecular (ej. tetrameros y dímeros). En situaciones no estresantes, la forma no fosforilada de alto peso molecular de Hsp27 es la más predominante, formando multímeros que alcanzan los 800 kDa. La fosforilación de Hsp27 resulta en cambios conformacionales que conducen a una significativa reducción del tamaño oligomérico y a la disociación de los complejos [85].



**Figura 1.4.3. Estructura y función de Hsp27 (HSPB1).** (a) Representación esquemática de la organización estructural de la proteína Hsp27 con sus sitios de fosforilación en Serina 15 (S15), 78 (S78), 82 (S82) y Treonina 143 (T143). (b) Regulación de la oligomerización de Hsp27 por la acción de proteínas quinasas y fosfatasas. Esquema adaptado de *Katsogiannou M y colaboradores, Front Genet. 2014;5:346* [85].

Por ejemplo, durante el estrés térmico, los niveles de los multímeros declinan incrementando la cantidad de formas fosforiladas de bajo peso molecular. La dinámica entre dímeros y oligómeros parece ser requerida para la unión del sustrato y la protección contra la agregación. Una vez que Hsp27 se une a sus sustratos en estado no-nativos, requiere para su liberación de la ayuda de chaperonas dependientes de ATP (Hsp70) o proteasas (Hsp104) que posteriormente procesarán la proteína cliente [86] (véase más adelante figura 1.4.4.2).

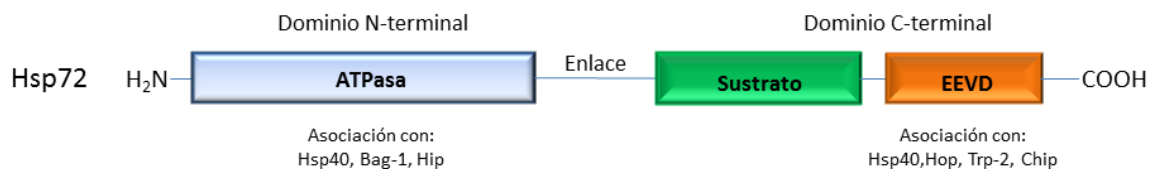
La regulación de las funciones de Hsp27 depende en gran parte de su fosforilación. Hsp27 posee sitios de fosforilación en los residuos serina (S) 15, 78, 82 y treonina (T) 143 (Figura 1.4.3.b) [87, 88]. La oligomerización de Hsp27 es regulada por la fosforilación en S78 y/o S82 mientras que S15 parece tener un efecto pequeño en la oligomerización [89]. El balance fosforilación/defosforilación es modulado por diversas quinasas y fosfatasas. Entre las quinasas involucradas en el proceso se encuentran: MAPK, MK2, MK3, MK5 y las proteínas quinasas (PK) A, B, C y D [90]. Hasta el momento la proteína fosfatasa 2A (PP2A) ha sido involucrada en la defosforilación de Hsp27, aunque no se descarta la participación de otras fosfatasas [91].

Una de las funciones mejor caracterizada de Hsp27 es su habilidad para interactuar con varios componentes del citoesqueleto, incluyendo actina, filamentos intermedios y microtúbulos [92,93]. Por ejemplo, en el tejido muscular, Hsp27 se ha encontrado asociada con los sarcómeros sugiriendo un rol cardioprotector [94]. Luego del estrés térmico, Hsp27 se acumula en forma reversible en el núcleo en “*SC35 splicing speckles*”, estructuras implicadas en el procesamiento de ARN. La localización de Hsp27 en estas estructuras no está asociada con el repliegamiento de proteínas nucleares desnaturalizadas por el calor, sino que colocaliza con sitios de degradación de proteínas nucleares [95]. Una de las funciones más estudiadas de Hsp27 es su rol antiapoptótico. Hsp27 es capaz de inhibir la apoptosis al inactivar a Bax, bloquear la liberación de Smac/Diablo y de citocromo C de la mitocondria. También es capaz de inhibir la vía extrínseca y de inactivar la formación del apoptosoma [96].

#### **1.4.4. Estructura y función de la proteína Hsp72**

La familia HSP70 (HSPA) constituye para la célula la gran maquinaria que asiste el plegamiento proteico. Por este motivo, las proteínas de esta familia se dividen funcionalmente en dos grupos [97]. Uno de ellos interviene en la traducción de las proteínas, se asocia a los ribosomas y se encarga del correcto plegamiento de polipéptidos nacientes; mientras que el segundo grupo protege al proteoma de diversas condiciones de estrés ambiental. Dentro de

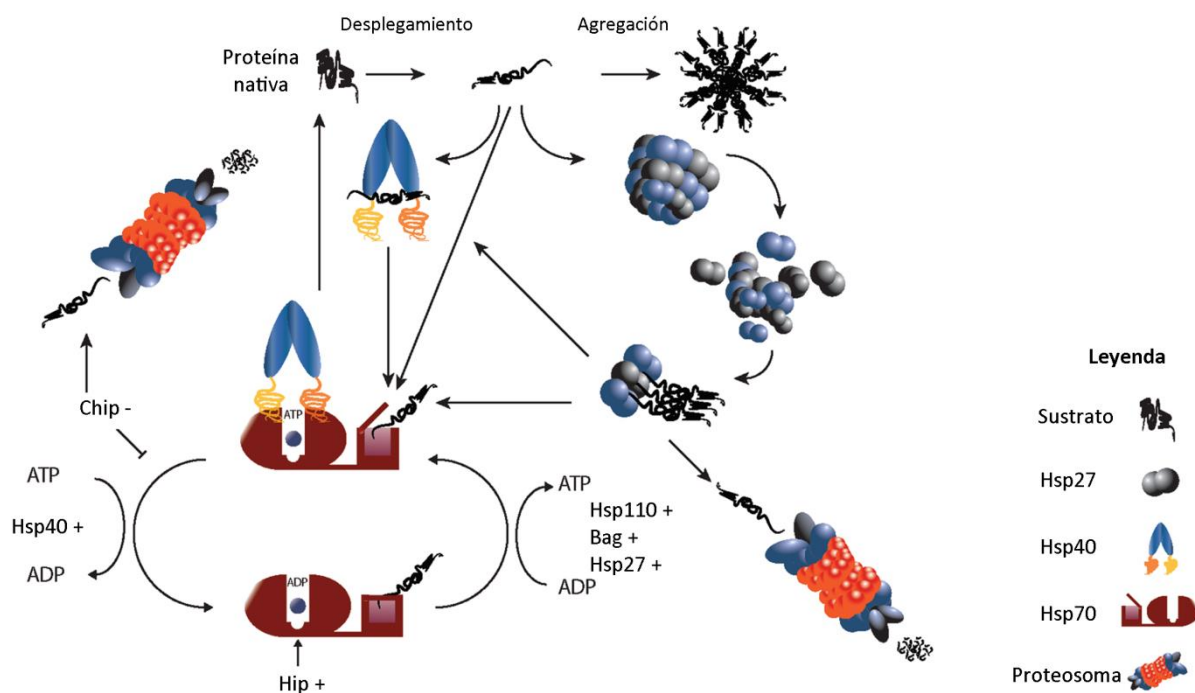
esta familia se encuentran las proteínas más inducibles por el estrés, entre ellas, Hsp72 (HSPA1A) [75].



**Figura 1.4.4.1. Representación esquemática de la organización estructural de Hsp72 (HSPA1A).** La actividad ATPasa de Hsp72 reside en su dominio N-terminal, al cual también se asocian co-chaperonas. El dominio C-terminal contiene el sitio de unión al sustrato y una región con un motivo EEVD al cual pueden unirse otras chaperonas. El enlace hidrofóbico conecta el dominio de unión de nucleótido y el dominio de unión de sustrato.

Hsp72 está constituida por un dominio N-terminal de 45 kDa con actividad ATPasa y un dominio C-terminal de 25 kDa, que permite la unión del sustrato. Los dominios ATPasa y C-terminal están unidos por un dominio de enlace pequeño que acopla la hidrólisis de ATP a la apertura y cierre de la cavidad de unión del sustrato (Figura 1.4.4.1). Hsp72 asiste a una gran variedad de procesos de plegamiento en la célula, por medio de la asociación transitoria de su dominio de unión a sustrato con segmentos peptídicos hidrofóbicos cortos de sus proteínas clientes. En la región C-terminal también se encuentra un motivo EEVD involucrado en la unión de co-chaperonas y otras HSPs. Al igual que otros miembros de la familia HSP70, Hsp72 oscila constantemente entre un estado unido a ATP, y otro unido a ADP, y además funciona con la asistencia de cofactores [97]. Por ejemplo, la co-chaperona Hsp40 (DNAJ) estimula la hidrólisis de ATP, Hip estabiliza el complejo Hsp70-ADP, mientras que Hsp110, Bag-1 y Hsp27 estimulan el intercambio ADP-ATP. El cofactor Chip puede inhibir la capacidad de hidrolizar ATP de Hsp70 [75]. La figura 1.4.4.2 muestra el rol de la familia HSP70 en la recuperación de proteínas mal plegadas luego de un estrés.

Además de prevenir la agregación y asistir en el replegamiento proteico, Hsp72 posee otras funciones. Por ejemplo, al igual que Hsp27, Hsp72 es capaz de inhibir la apoptosis en diferentes etapas de la vía: impide la translocación mitocondrial y activación de Bax, uniéndose a Apaf-1 y bloqueando el reclutamiento de pro-caspasa 9 al apoptosoma, interactuando y bloqueando AIF, o también inhibiendo a caspasa 3. Además, Hsp72 puede suprimir la senescencia, promover la respuesta inmune y estabilizar la membrana lisosomal afectando el proceso de autofagia [96-100].



**Figura 1.4.4.2. Representación esquemática del procesamiento de un sustrato por medio de las proteínas de golpe de calor (HSPs).** Después de la exposición a un estrés, el sustrato en su conformación nativa puede desplegarse. Una vez desplegado, puede agregarse o unirse a una HSP, como Hsp27, Hsp40 o Hsp70 (Hsc70 o Hsp72). Hsp27 y Hsp40 eventualmente llevan el sustrato a Hsp70, la cual posee la maquinaria para procesarlo. Además, los sustratos también pueden ser marcados para la degradación proteosómica por Hsp27 y Chip. En la figura también se aprecian los diversos cofactores de la familia Hsp70. Esquema traducido de Vos MJ y colaboradores, *Biochemistry*. 2008;47:7001-11 [75].

### 1.4.5. Hsp27 y Hsp72 en cáncer

Las HSPs se encuentran altamente expresadas en diversos tipos de tumores. En general, la expresión aberrante de HSPs en cáncer se ha asociado con mayor agresividad tumoral, resistencia a la quimioterapia y mal pronóstico para el paciente [101]. Es sabido que las células tumorales sintetizan una gran cantidad de proteínas necesarias para la formación y crecimiento del tumor, y para el escape de las células malignas desde el tumor primario a otros tejidos originando tumores secundarios o metástasis, aumentando así la demanda de HSPs. El principal rol de las HSPs en el tumor consiste en estabilizar la gran cantidad de proteínas que se sintetizan, entre ellas factores de crecimiento, oncogenes y otras proteínas mutadas, como p53 [102]. Además se ha observado que, ejerciendo sus distintas funciones, las HSPs

intervienen en el desarrollo tumoral, promueven la angiogénesis, la invasión y metástasis, e influyen en la inmunidad del tumor [103].

Como se ha mencionado, Hsp27 y Hsp72 son poderosos inhibidores de las vías de muerte celular, por lo tanto, su elevada expresión en las células cancerígenas puede indirectamente estimular el crecimiento tumoral. Se ha descrito que la proteína Hsp27 es proangiogénica cuando es liberada de las células tumorales, ya que puede unirse a los receptores y estimular la transcripción de VEGF a través de la vía NF- $\kappa$ B [104]. Sin embargo, Hsp27 en el medio extracelular también puede ejercer propiedades anti-angiogénicas a través de interacciones directas con VEGF, secuestrando este factor [103]. Por otra parte, se ha reportado que la fosforilación de Hsp27 regula la transición epitelio-mesenquimática, y el remodelamiento de los filamentos de actina requeridos para las actividades pro-invasivas y pro-metastásicas [85]. La presencia extracelular de Hsp27 y Hsp70, influye en el comportamiento de las células circundantes y estimula la inmunidad a través de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) y anti-inflamatorias (IL-10). Por último, se ha reportado que las células madres cancerígenas (CSC) poseen una alta expresión de HSPs, siendo por ejemplo Hsp27 y Hsp72 requeridas para el mantenimiento de CSC mamarias [103].

#### **1.4.6. HSPs y reparación del ADN**

Las HSPs son proteínas que por excelencia promueven la supervivencia celular. Como se mencionó previamente, son capaces de conferir citoprotección al inhibir distintas etapas de la apoptosis. Además, en los últimos años se han reportado evidencias de que, en su rol de chaperonas, las HSPs podrían facilitar la actividad de ciertos mecanismos de reparación del ADN, promoviendo así también la supervivencia celular. A continuación se mencionan los principales hallazgos sobre la participación de Hsp27 y Hsp72 en la reparación del ADN.

Los estudios de Robert Bases fueron los primeros que establecieron una relación entre HSPs y la reparación del ADN, en este caso en particular, con el sistema BER. Con sus colaboradores reportó que Hsp72 es capaz de unirse a la endonucleasa HAP1, perteneciente a este mecanismo de reparación, incrementando hasta 100 veces su actividad [105]. Más tarde demostraron que Hsp72 también se une a Pol $\beta$  aumentando 5 a 10 veces su actividad polimerasa [106].

Por otra parte, las HSPs también se han asociado con la funcionalidad del sistema NER. Se ha reportado que células RSa (fibroblastos humanos derivados de embrión, sensibles a radiación UVC) con elevada expresión de Hsp27, pudieron reparar mejor los daños causados

por la radiación UVC que las células control, mientras que células con menor expresión de Hsp27 no fueron capaces de reparar el daño [107]. Los primeros estudios sobre Hsp72 reportaron una correlación inversa entre la expresión de esta chaperona y el daño residual del ADN, generado por la exposición a benzopireno [108, 109]. Posteriormente, se encontró un incremento en la colocalización de Hsp72 con las proteínas XPA y XPG del sistema NER en los núcleos de células 16HBE (células de epitelio bronquial humano) expuestas durante 24 h a diferentes dosis de benzopireno [110]. Recientemente, el mismo grupo de investigadores, reportó que las células 16HBE transfectadas con Hsp72 exhibieron mayor capacidad de reparación de los aductos de benzopireno-7,8-diol-9,10-epóxido (BPDE)-ADN, mientras que el silenciamiento de la proteína inhibió la reparación de los aductos, proporcionando así evidencia sobre el rol de Hsp72 en la reparación del ADN a través de la vía NER [111].

En el caso del sistema MMR, nuestro grupo de trabajo reportó en linfocitos de sangre periférica (LSP) de personas sanas que una hipertermia a 42°C, 24 h antes del tratamiento con doxorubicina indujo la acumulación nuclear de las proteínas Hsp27 y Hsp72, lo cual se asoció con una elevada capacidad de reparación del ADN (evaluada por ensayo cometa alcalino) y con alta expresión de las proteínas MLH1 y MSH2 [112]. Más tarde se comprobó, en LSP de pacientes oncológicos expuestos *in vitro* a cisplatino y al tratamiento combinado hipertermia + cisplatino, una mayor expresión nuclear de las proteínas MLH1, MSH2 y Hsp72. En estos pacientes se verificó además correlación entre un elevado cociente N/C (expresión nuclear/citoplasmática) de Hsp27 con mayor sobrevida libre de enfermedad y sobrevida global; mientras que una elevada expresión de MSH2 se asoció con mayor sobrevida global de los pacientes. Esto indica que aquellos pacientes cuyos LSP presentaron mayor expresión nuclear de Hsp27 y MSH2 respondieron mejor al tratamiento. También se reportó en LSP de personas sanas expuestas *in vitro* a hipertermia y cisplatino la colocalización nuclear de Hsp27 y Hsp72 con las proteínas MLH1 y MSH2 del sistema MMR [84]. Esto demuestra que en respuesta a la acción de un agente genotóxico como el cisplatino, Hsp27 es capaz de translocarse al núcleo y colocalizar con proteínas del sistema MMR. Este comportamiento también se observó en líneas celulares tumorales de glioma expuestas al agente alquilante temozolamida, donde se encontró que Hsp27 interactuaba con MSH2 [113].

Hsp27 ha sido escasamente estudiada en la reparación de rupturas de doble cadena (DSBs). En 2014, un estudio del interactoma de Hsp27 identificó nuevas proteínas que se unen a esta chaperona, como es el caso de KU80, perteneciente al mecanismo NHEJ [114]. KU80 junto con KU70 forman un heterodímero con alta afinidad por los extremos de las DSBs, que

una vez unido al ADN recluta a la quinasa DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*), la cual se dimeriza y proporciona una plataforma para el procesamiento de los extremos de ADN [5]. Las células con niveles reducidos de Hsp27 mostraron menor acumulación de focos  $\gamma$ H2AX (marcador de DSBs) que las células control, luego del tratamiento con zeocina. Los ensayos *in vitro* de NHEJ demostraron que las células control presentaban una mayor capacidad de reparación en relación a las células transfectadas con siHsp27. Además, la proteína KU80 interactuó con Hsp27 luego de un tiempo de recuperación, pero no lo hizo con DNA-PK. Los autores postularon que Hsp27 podría regular negativamente el mecanismo NHEJ interactuando con KU80 y de esta forma, impidiendo su unión con DNA-PK [114].

Actualmente, la proteína Hsp90 (HSPC1) continúa siendo la chaperona más estudiada en el campo de la reparación del ADN, especialmente de DSBs. El desarrollo y empleo de diferentes inhibidores de Hsp90 ha facilitado su estudio. Se ha establecido que esta chaperona puede cooperar con los sistemas NHEJ y HR, ya que varias de sus proteínas clientes intervienen en estas vías [115].

## 1.5. Cisplatino

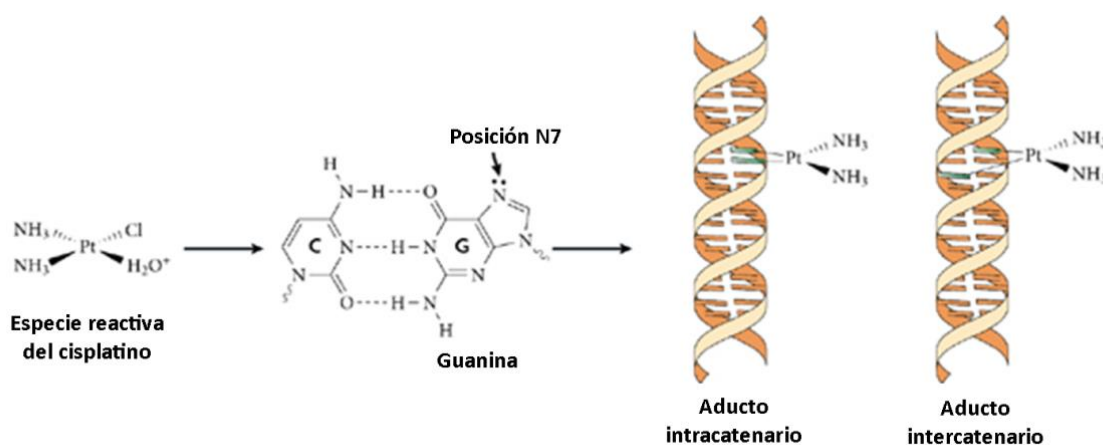
### 1.5.1. Descripción general

El cisplatino, *cis*-diaminodicloroplatino(II), es una droga antineoplásica que desde su aprobación por la FDA (*Food and Drug Administration*) en el año 1978, ha sido ampliamente utilizada en el tratamiento de tumores sólidos, entre ellos pulmón, testículo y colon [116]. Sus propiedades biológicas fueron descubiertas accidentalmente en 1965 en el laboratorio de Barnett Rosenberg, donde se colocó un set de electrodos de platino en un cultivo de bacterias. Al aplicar la corriente eléctrica observaron que se inhibía la división celular de *E. coli* como resultado de los productos de la electrólisis del platino. Tres años después, se demostró su capacidad de producir regresión tumoral al administrar la droga intraperitonealmente en un modelo *in vivo* de sarcoma murino [117].

El mecanismo de acción del cisplatino (cPt) involucra la formación de uniones covalentes con el ADN, conocidas como aductos (producto de adición entre dos moléculas). Dentro de la célula, la concentración de cloruros por debajo de los 100 mM, permite la sustitución de uno o dos grupos *cis*- cloro del cPt y la generación de especies acuosas, que representan la forma reactiva de la droga (Figura 1.5.1) [118]. De esta forma, el platino se une



al ADN con predilección por los sitios nucleofílicos N7 de las purinas, generando diferentes tipos de lesiones: aductos intra e intercatenarios, monoadductos y uniones cruzadas proteína-ADN [116]. La mayoría de los aductos cPt-ADN son intracatenarios, correspondiendo el 60-65% a uniones entre dos guaninas adyacentes (1,2GpG), el 20-25% involucra enlaces entre adenina y guanina adyacentes (1,2ApG) y aproximadamente el 5% son aductos 1,3GpXpG (donde otra base se encuentra entre las dos G involucradas en el aducto). Los aductos monofuncionales (aproximadamente el 2%) y los enlaces intercatenarios entre guaninas (G-G, aproximadamente el 2%) son poco frecuentes [119]. Las lesiones causadas por este agente afectan varios procesos celulares que median su citotoxicidad. Los aductos cPt-ADN inhiben la replicación y transcripción del ADN y, además, pueden causar la detención del ciclo celular, la activación de mecanismos de reparación del ADN y la apoptosis [120-122].



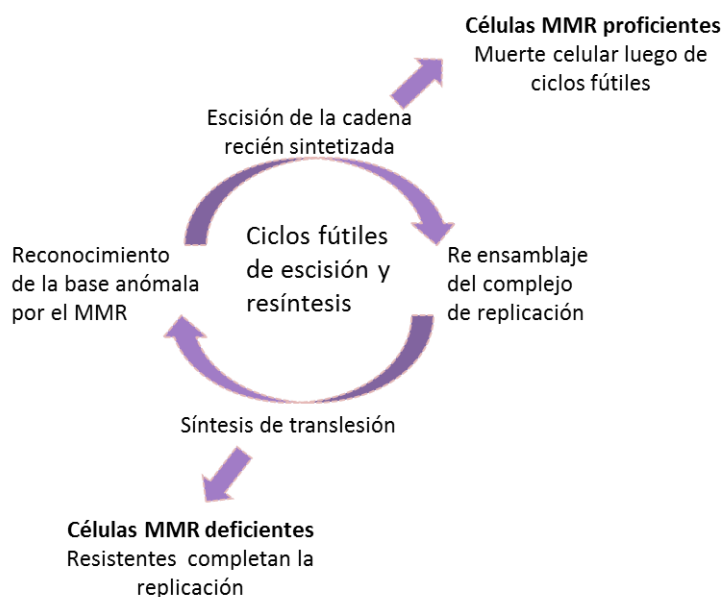
**Figura 1.5.1. Representación esquemática de los aductos formados por el cisplatino en el ADN.** Dentro de la célula, el cisplatino se hidroliza y se une al ADN con preferencia por la posición N7 de las purinas, formando principalmente aductos intracatenarios e intercatenarios. Estos aductos representan aproximadamente el 90% de las lesiones producidas por el cisplatino. Esquema modificado de Kelland L, *Nat Rev Cancer*. 2007;7:573-84 [117].

### 1.5.2. Reparación de las lesiones causadas por cPt

Los aductos de cPt, en general, son reparados con una baja eficiencia en las células. Esta característica es una de las causas de su éxito como agente antineoplásico [123, 124]. El principal responsable de la reparación de los aductos intracatenarios de cPt es el sistema NER [125], mientras que los intercatenarios son corregidos por un mecanismo complejo que involucra componentes de los sistemas NER y HR, y síntesis de translesión [126]. Además, los aductos de cPt pueden ser detectados (pero no removidos) por el sistema MMR [127]. La vía

NER involucra el reconocimiento de la lesión en el ADN, la escisión y remoción de un fragmento de simple cadena de ADN, la resíntesis y la unión de la cadena recién sintetizada a la cadena pre-existente [128]. Se ha reportado que líneas celulares deficientes en el sistema NER son altamente sensibles al cPt [129]. En la clínica se ha observado que pacientes que desarrollaron resistencia a la droga, expresaban altos niveles de XPA y ERCC1 (componentes del NER) en el tejido tumoral, mientras que las células tumorales de los pacientes hipersensibles al cisplatino presentaban deficiencias en estas proteínas [123].

A diferencia del sistema NER, la pérdida de función del sistema de reparación MMR está relacionada con un aumento en la tolerancia al daño inducido por cPt. Dos modelos han sido propuestos para explicar cómo un sistema MMR funcional puede potenciar la citotoxicidad de la droga [120]. El primer modelo involucra “ciclos fútiles” de escisión y reparación del ADN (Figura 1.5.2). Si bien el cPt inhibe la replicación del ADN, algunos aductos intracatenarios pueden ser “salteados” mediante la síntesis de translesión, incorporándose de esta manera nucleótidos al azar en la cadena complementaria al aducto y generándose así un *mismatch*. El reconocimiento de ese mal apareamiento por las proteínas del sistema MMR desencadena la escisión de la hebra de ADN recién sintetizada y la síntesis de reparación. Sin embargo, como el aducto se encuentra en la cadena parental, el *mismatch* se vuelve a producir y comienza este ciclo fútil que acumula intermediarios de reparación (rupturas de cadena y *gaps*) y finalmente conduce a la muerte celular. Sin embargo, en las células deficientes en el sistema MMR, luego de la síntesis de translesión, donde pueden intervenir ADN polimerasas no convencionales, el daño en el ADN no sería detectado y se acumularían mutaciones generando resistencia a la droga [130]. En el segundo modelo de “señalización”, las proteínas del sistema MMR reconocen la lesión, actuando como sensores del daño, e inician una cascada de señalización a través de la vía ATM/ATR, que activa los puntos de control del ciclo celular y la apoptosis [131]. Estudios con líneas celulares isogénicas competentes e incompetentes en el sistema MMR han evidenciado una mayor sensibilidad al cPt por parte de las células con un sistema MMR funcional en relación a su contraparte MMR deficiente [132]. La deficiencia de la proteína MLH1 se ha asociado con resistencia al cPt, mientras que la mutación de *MSH2* o su baja expresión se ha observado en algunos tumores con resistencia adquirida a la droga [116]. Se ha reportado que la pérdida de funcionalidad del sistema MMR incrementa 2 a 5 veces la resistencia al cPt, lo que representa un significativo valor desde el punto de vista clínico [122].



**Figura 1.5.2. Representación esquemática del modelo de ciclos fútiles de escisión y resíntesis del ADN.** De acuerdo con este modelo, las células con un sistema MMR funcional avanzarían en este ciclo que comprende: el reconocimiento del mal apareamiento, la escisión de la lesión y la síntesis de reparación. Sin embargo, como el aducto se encuentra en la cadena parental del ADN, y la reparación está dirigida a la cadena hija, el *mismatch* se produciría nuevamente comenzando otro ciclo de escisión y resíntesis. Las células competentes en el sistema MMR acumularían intermediarios de reparación que las conducirían a la muerte celular. En cambio, las células deficientes en el sistema MMR completarían la replicación del ADN a través de la síntesis de translesión, los malos apareamientos no serían reconocidos o procesados, acumulando mutaciones y contribuyendo con la resistencia de estas células a la droga.

### 1.5.3. Respuesta celular al daño en el ADN inducido por cisplatino

La principal cascada de señalización del daño al ADN inducida por las lesiones de cPt involucra la activación de ATR y su efector CHK1, el cual fosforila a TP53 en el residuo Ser20 promoviendo su estabilización [133, 134]. En respuesta al cPt, también se ha reportado que se induce la activación de las quinasas c-Jun y JNK [135]. Además, se ha observado que ATM participa en la detención del ciclo celular inducido por cPt, pero no en la muerte celular, mientras que su efectora CHK2 participaría en la señalización de apoptosis en forma independiente de ATM [136]. La proteína TP73, miembro de la familia TP53, también puede ser inducida por cPt para desencadenar la apoptosis. Sin embargo, esto requiere la activación de la tirosina quinasa c-Abl y la funcionalidad del sistema MMR [137].

### 1.5.4. Resistencia al cisplatino

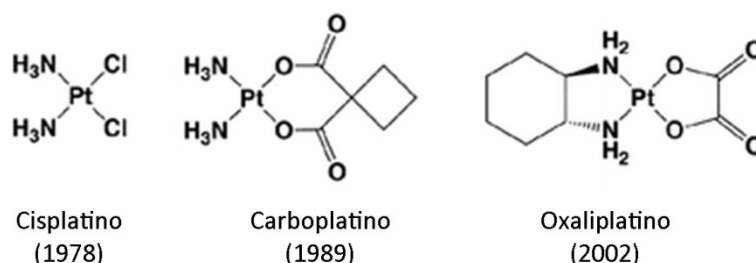
Una de las limitantes del éxito de la quimioterapia es la aparición de resistencia a la droga. Esta resistencia puede ser adquirida a través de la exposición crónica a la droga o puede presentarse como un fenómeno intrínseco de las células tumorales. Los principales mecanismos de resistencia al cPt pueden resumirse en [120]:

- ✓ Inactivación intracelular del cPt por glutatión, metalotioneína y otras moléculas que contienen sulfuro.
- ✓ Incremento en la reparación de los aductos de cPt.
- ✓ Reducción en la acumulación intracelular de la droga.
- ✓ Incremento en la tolerancia a los aductos y falla en las vías apoptóticas.

### 1.5.5. Otras drogas análogas al platino

#### 1.5.5.1. Carboplatino

Si bien el cPt es una droga muy efectiva, particularmente en pacientes con cáncer de ovario y testículo, su notoria nefrotoxicidad impulsó el desarrollo de análogos menos tóxicos que retuvieran la actividad antitumoral [116]. El carboplatino, *cis*-diamino (ciclobutano-1,1-dicarboxilato-*O,O'*)platino(II), fue aprobado por la FDA en el año 1989 y en su estructura química presenta un grupo saliente más estable que el cloruro (Figura 1.5.5). A diferencia del cPt, el carboplatino no genera nefrotoxicidad y es menos tóxico para el tracto digestivo, sin embargo, puede causar trombocitopenia que limita la dosis a emplear [117]. Carboplatino genera el mismo tipo de aductos en el ADN que el cPt, pero se requieren concentraciones 20 a 40 veces más altas de carboplatino para igualar al cPt en toxicidad, y además, la tasa de formación de aductos es aproximadamente 10 veces más lenta [138]. Actualmente, en la mayoría de los países se utiliza para cáncer de ovario un esquema terapéutico basado en carboplatino [117].



**Figura 1.5.5. Estructura química de las drogas análogas al platino.** Entre paréntesis se detalla el año de aprobación por la FDA de cada uno de los compuestos. Los aductos formados por el carboplatino tienen la misma estructura que los aductos cisplatino-ADN. Sin embargo, los enlaces generados por el oxaliplatino difieren a los anteriores debido a la presencia del grupo estable 1,2-diaminociclohexano (DACH). Figura adaptada de *Todd RC y Lippard SJ, Metallomics. 2009;1:280-291* [121].

#### 1.5.5.2. Oxaliplatino

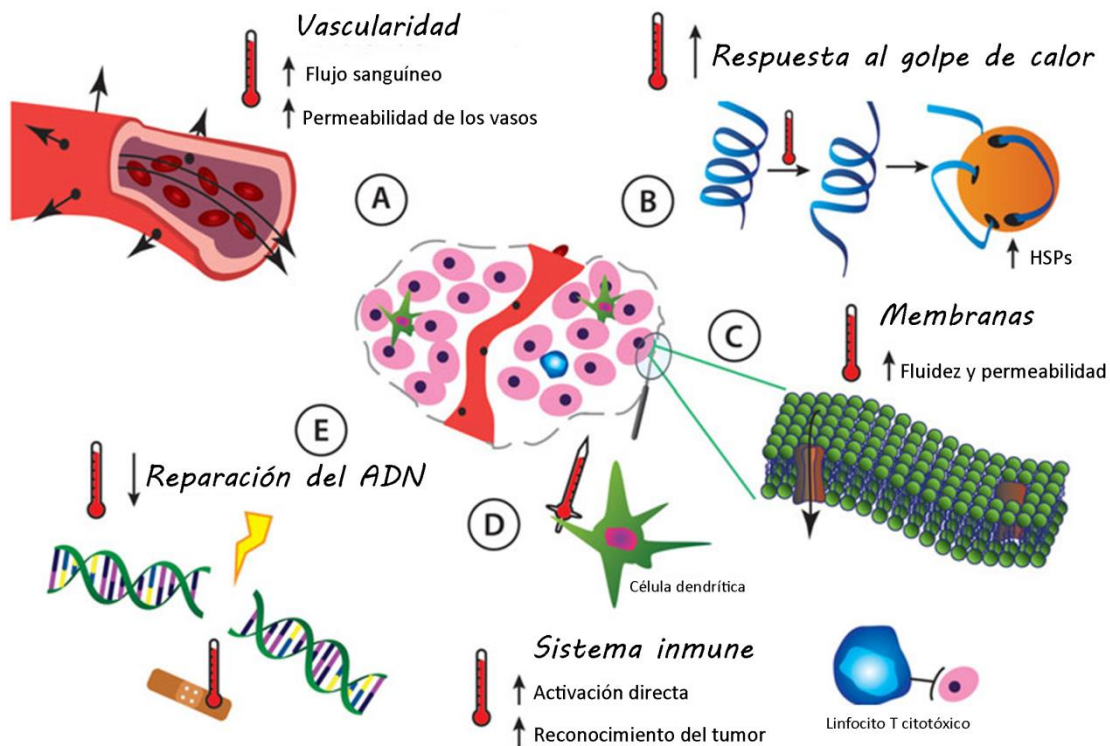
El oxaliplatino, 1R,2R-diaminociclohexano oxalato-platino(II), fue aprobado por la FDA en el 2002 y está basado en el grupo estable 1,2-diaminociclohexano (DACH); como consecuencia, existen algunas diferencias en la estructura química de los aductos generados por el oxaliplatino con el ADN (Figura 1.5.5). El oxaliplatino presenta menor reactividad con el ADN que el cPt por la baja tasa de disociación del grupo oxalato, y por lo tanto, la formación de aductos es menor mientras que la formación de rupturas de simple cadenas es mucho mayor en comparación con el cPt [139]. En contraste con el cPt y el carboplatino, las proteínas del sistema MMR no detectan los aductos inducidos por el oxaliplatino, lo cual puede explicarse por la presencia del grupo DACH en el aducto que le otorga diferentes propiedades biológicas [127]. Se ha demostrado que esta droga, retiene actividad antitumoral en líneas celulares con resistencia adquirida al cPt y en tumores que son intrínsecamente resistentes al cPt y carboplatino [139]. Entre los efectos adversos del oxaliplatino se ha descrito la neurotoxicidad [117].

### 1.6. Hipertermia

La hipertermia en oncología se define como el incremento de la temperatura por encima de los niveles fisiológicos con el objeto de alcanzar un beneficio terapéutico [140]. Es un tratamiento donde el área tumoral del paciente se expone a una cierta temperatura, comprendida entre un rango de 39 y 45°C, usando una fuente de energía exógena [141]. La hipertermia ha sido utilizada en combinación con radioterapia y/o quimioterapia con el objeto de incrementar la efectividad del tratamiento de diversos tipos de tumores (cáncer colorectal, cáncer de mama, melanoma, cáncer cervical, etc.) [142]. El tratamiento con calor puede distinguirse de acuerdo al rango de temperatura aplicado. Las temperaturas <42°C se definen como *hipertermia moderada*, la *hipertermia severa* comprende temperaturas entre 42-45°C y el tratamiento con temperatura >45°C se denomina *ablación térmica*. Otra clasificación se basa en la extensión corporal sometida a la hipertermia. En la *hipertermia total*, el tratamiento es aplicado en el cuerpo completo del paciente. En la *hipertermia regional* una parte aislada del cuerpo, como una cavidad corporal, un miembro o un órgano son expuestos a la temperatura elevada, mientras que durante la *hipertermia local* sólo el tumor es sometido a la hipertermia [140].

En un principio la investigación en el campo de la hipertermia estuvo centrada en el hallazgo de la dosis térmica óptima (temperatura y tiempo de exposición). Estos estudios traslacionales se enfocaron en obtener una dosis térmica con el máximo beneficio y efectos secundarios mínimos [143, 144]. En ese momento se creía que la hipertermia era efectiva sólo si producía la muerte celular directa en las células tumorales, lo cual ocurre por encima de los 42,5°C. Sin embargo, se observó que la hipertermia moderada en el rango de 39°C a 41°C no inducía citotoxicidad por sí sola en las células tumorales, pero sí mostraba un sinergismo con la radioterapia y con ciertas drogas antineoplásicas [145]. Actualmente sabemos que este sinergismo se debe a los efectos celulares y fisiológicos que la hipertermia ejerce en los tumores. Es así que el campo de la investigación biológica consiste en entender los mecanismos biológicos que ocurren a cada temperatura para poder explotarlos en la clínica [141]. También existe otra área de investigación que relaciona la física con la hipertermia, y consiste en mejorar no sólo las técnicas de administración de la hipertermia, sino también el método para depositar localmente el calor y medirlo en el paciente [146, 147].

La figura 1.6. ilustra los efectos biológicos bien caracterizados de la hipertermia local en el tumor. Uno de los cambios fisiológicos inducidos por la hipertermia tiene como blanco el sistema vascular (A). La hipertermia causa un aumento en el flujo sanguíneo en el área expuesta al calor y al expandir el calor, los vasos incrementan su permeabilidad [148]. Además, la conformación primitiva y la baja organización de los vasos del tumor tienen como consecuencia que sean más permeables que los vasos del tejido normal [149]. El flujo sanguíneo en los tumores es el principal factor responsable del microambiente del tumor, y por eso las células privadas de oxígeno y en condiciones de acidificación responden mejor a los efectos del calor. Las altas temperaturas (>42°C) causan el colapso vascular con una posterior reducción en la llegada de oxígeno y nutrientes a las células tumorales. Esto se refleja en un aumento en la privación de energía, acumulación de ácido láctico, acidificación e hipoxia [141]. Con temperaturas menores, el incremento en la perfusión se asocia con un aumento en la disponibilidad de oxígeno, lo cual conduce a un mayor consumo del mismo por parte del tumor [150]. En la actualidad existe controversia respecto a la duración de este efecto de la hipertermia en el sistema vascular. Algunos estudios han postulado que pueden durar hasta 24 h luego de la exposición a una hipertermia moderada [151]. Cabe destacar que este incremento transitorio en el flujo sanguíneo y en la permeabilidad de los vasos constituye la base para incrementar la disponibilidad de la droga antineoplásica en el sitio de interés [152].



**Figura 1.6. Efectos biológicos de la aplicación de una hipertermia moderada en el tumor.** (A) La hipertermia altera la fisiología del tumor al afectar su vascularidad, incrementando el flujo sanguíneo y la permeabilidad de los vasos. (B) La hipertermia causa desnaturalización y agregación de proteínas, como consecuencia la respuesta al golpe de calor se caracteriza por un incremento de proteínas de golpe de calor (HSPs). (C) Las temperaturas que exceden los 37°C incrementan la fluidez de la membrana celular, influenciando su permeabilidad. (D) El calor ayuda a activar el sistema inmune, el cual ataca al tumor directamente y también a células tumorales distantes de la zona tratada. (E) La hipertermia afecta mecanismos de reparación del ADN, inactivando proteínas específicas de reparación. Esquema adaptado de *van den Tempel N y colaboradores, Int J Hyperthermia. 2006;18:1-9* [141].

La exposición de las células a una hipertermia transitoria no letal causa la activación de la respuesta celular al estrés, un mecanismo que protege a las células contra el estrés proteico (Figura 1.6.B). Esta respuesta al golpe de calor se caracteriza por una rápida síntesis de las chaperonas HSPs [71]. La hipertermia produce desnaturalización y agregación de proteínas, inhibición de la síntesis y transcripción del ADN, inhibición del procesamiento y traducción del ARNm, y también el bloqueo de la progresión del ciclo celular. Además, la agregación de proteínas puede incluir otras que no son alteradas directamente por la hipertermia, afectando así un número mayor de proteínas que las alteradas por el golpe de calor [153]. Sin embargo, durante el tratamiento de un tumor con una hipertermia moderada, la respuesta al golpe de calor puede tener un efecto no deseado, provocando que los tumores se conviertan en termotolerantes. La termotolerancia puede definirse como la insensibilidad al tratamiento con

calor luego de una exposición inicial a la hipertermia [154]. Con respecto a este fenómeno, es bien conocido que las HSPs contribuyen al desarrollo de la termotolerancia, ya que son las encargadas de proteger a la célula de la desnaturalización proteica inducida por la hipertermia [155, 156]. Como se mencionó en el apartado 1.4.5., los tumores suelen tener niveles constitutivos altos de HSPs que los protegen del estrés proteico intrínseco que los caracteriza.

A nivel celular, la hipertermia incrementa la sensibilidad a la quimioterapia al aumentar la fluidez de la membrana plasmática (Figura 1.6.C) [157]. El calor afecta las interacciones entre lípidos y proteínas de la membrana celular y como consecuencia, ésta se vuelve más permeable a algunos compuestos, como por ejemplo el cisplatino [158, 159].

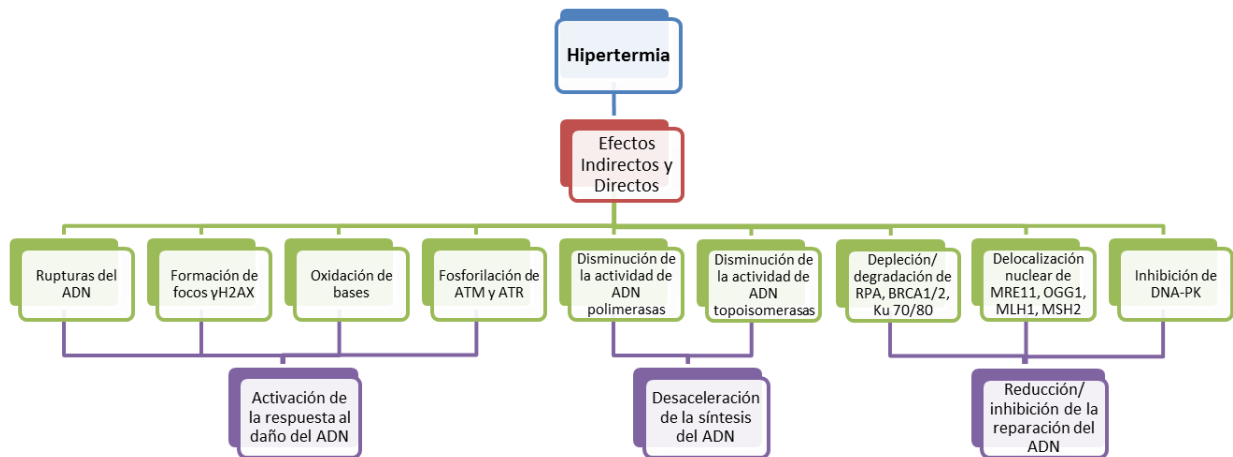
Es bien conocido que las temperaturas elevadas, como el caso de la fiebre, contribuyen a la activación del sistema inmune (Figura 1.6.D) [160]. Se postula que la hipertermia local puede modular el sistema inmune en la zona del tumor expuesta a la hipertermia, y además, tendría un efecto antitumoral sistémico en el cual las células del sistema inmune atacarían a las células tumorales distantes de la zona tratada [161]. El efecto de la hipertermia en el sistema inmune no sólo depende de la temperatura aplicada sino también de la duración de la exposición [160]. El incremento en el flujo sanguíneo que ocurre como consecuencia de una hipertermia moderada puede promover la atracción de las células inmunes al aumentar el tráfico entre el tumor y los ganglios linfáticos. También se ha reportado que la hipertermia altera la expresión de las moléculas de adhesión en los vasos del tumor [162]. A temperaturas febriles, el calor induce la expresión de MICA (secuencia A relacionada a MHC clase I) en las células tumorales, una molécula que aumenta la sensibilidad a los NK [163]. En ese rango de temperatura también se ha reportado que el tratamiento con calor amplifica la función presentadora de antígenos de las células dendríticas, aumentando la activación de células T [160]. Una hipertermia a 43°C incrementa los niveles de moléculas MHC clase I, las cuales atraen a los linfocitos T citotóxicos [162]. Por último, entre los efectos biológicos de la hipertermia, cabe destacar la relación entre la respuesta al golpe de calor y la inmunidad. Como consecuencia de la hipertermia, los niveles de Hsp72 dentro de la célula aumentan, pero también esta proteína puede ser liberada al ambiente extracelular. Como se mencionó previamente, en el ambiente extracelular, Hsp70 se une a receptores de superficie de las células inmunes, las cuales liberan moléculas proinflamatorias [99]. También se ha reportado que Hsp70 puede estimular macrófagos y células dendríticas al actuar como moléculas DAMPs (patrones moleculares asociados al daño) [160]. Además, como chaperona, puede transferir proteínas tumorales a células presentadoras de antígeno, evocando una



respuesta de células T específica del tumor, y estimulando así el sistema inmune adaptativo [161, 164].

La reparación del ADN también es afectada por la exposición a la hipertermia (Figura 1.6.E). Esto se refleja en la administración de la hipertermia en combinación con agentes que dañan el ADN, que resulta en la sensibilización de las células a este tipo de agentes. El conocimiento sobre los efectos de la hipertermia en el daño y la reparación del ADN ha aumentado considerablemente en los últimos años [165]. Está ampliamente aceptado que el principal blanco de la hipertermia son las proteínas, y por lo tanto, las proteínas nucleares también resultan afectadas por la exposición al calor, causando su desnaturalización y alterando sus asociaciones [166]. Se ha postulado que los efectos de la hipertermia en el ADN no son directos, sino secundarios a los efectos del calor en las proteínas involucradas en la replicación y reparación del ADN y en la segregación cromosómica [167]. Se ha reportado una disminución de la actividad de ciertas polimerasas (alpha, beta) y de topoisomerasa II, enzimas indispensables durante la etapa de síntesis del ADN, necesaria para la replicación y también para la reparación del ADN [168-170]. También se conoce que la hipertermia es capaz de generar especies reactivas de oxígeno [171]. Como consecuencia de los fenómenos nombrados, a nivel genómico, la hipertermia puede producir estallido de la horquilla de replicación y rupturas de cadena del ADN, aberraciones cromosómicas [153], formación de micronúcleos [172], desaminación y oxidación de bases [171, 173]. Después de la exposición al calor, las proteínas que se unen a la matriz nuclear asociada al ADN, podrían por un lado enmascarar las rupturas de cadena retardando la reparación y por otro lado, alterar el superenrollamiento del ADN, desencadenantes críticos de la reparación [167]. Vanderwaal ha reportado un número de proteínas que incrementan su unión al ADN después de la hipertermia, impidiendo el acceso de las proteínas de reparación a los sitios dañados [174]. A su vez, diversos grupos de investigación han observado la fosforilación de H2AX, ATM y ATR luego de la exposición al calor, demostrando la activación de una respuesta celular frente a la presencia del daño en el ADN [165, 175]. La hipertermia afecta a proteínas de reparación individuales interrumpiendo al mismo tiempo la actividad de varios mecanismos de reparación. Este efecto pleiotrópico del calor sobre la reparación del ADN puede ser extremadamente beneficioso en el desarrollo de esquemas terapéuticos. Se ha reportado que una hipertermia de 42°C inactiva e induce la degradación proteosomal de OGG1 (8-oxo-guanina ADN glicosilasa) comprometiendo la funcionalidad del sistema BER [176]. La hipertermia moderada también inactiva a RPA [177], produce la delocalización nuclear de MRE11 [178] y disrumpe la interacción de los miembros del complejo MRN [179], alterando la

reparación de DSBs; disminuye la expresión de BRCA1 y estimula la degradación de BRCA2 inhibiendo la vía HR [180, 181]. En la HR, BRCA1 promueve la resección del extremo 5' de la DSB [66], mientras que BRCA2 actúa “aguas abajo” reclutando a la recombinasa RAD51 al ADN [4]. La hipertermia de 43-45°C se ha asociado con la depleción y agregación de Ku70/80 y disminución de la actividad de DNA-PK interfiriendo así con el sistema NHEJ [180, 182, 183]. También se ha reportado la delocalización nuclear de las proteínas MLH1 y MSH2 en células deficientes y proficientes en el sistema MMR (MMR-/+), 4 h después de la exposición a una hipertermia moderada. Sin embargo, esta depleción nuclear no afectó la capacidad de recuperación de las células MMR-/+ frente al daño ejercido por la hipertermia [184]. El cuadro 1.6. resume los efectos indirectos y directos de la hipertermia sobre el daño y la reparación del ADN reportados hasta el momento.



**Cuadro 1.6. Efectos indirectos y directos de la hipertermia en el metabolismo del ADN.** Está ampliamente aceptado que la hipertermia produce indirectamente rupturas de simple y doble cadena en el ADN y oxidación de bases con la consecuente fosforilación de H2AX, ATM y ATR, los cuales median la respuesta del daño en el ADN. Entre los efectos directos del tratamiento con hipertermia se encuentran la desnaturalización, aglomeración, degradación de proteínas y la alteración de las asociaciones proteicas. Además, entre las proteínas afectadas se pueden nombrar enzimas involucradas en la síntesis del ADN y también proteínas pertenecientes a mecanismos de reparación del ADN, esto conduce a una reducción o inhibición de estos procesos.

## **CAPÍTULO 2**

### **OBJETIVOS**

Uno de los principales obstáculos para el éxito del tratamiento oncológico lo constituye la aparición de resistencia a las drogas antineoplásicas. Por eso, es fundamental conocer los mecanismos moleculares involucrados en la aparición de dicha resistencia, que permitiría no sólo optimizar los tratamientos actuales sino también poder predecir la respuesta individual a la quimioterapia. El cisplatino es uno de los agentes antineoplásicos más utilizados en la terapia oncológica. Desafortunadamente, en muchas ocasiones su eficacia se ve afectada por la aparición de resistencia. Entre los mecanismos vinculados con la resistencia a cisplatino se encuentra la deficiencia del sistema *Mismatch Repair* (MMR). El tratamiento con hipertermia es utilizado en otros países en combinación con quimioterapia o radioterapia para potenciar la terapia oncológica. Una de las características de la hipertermia es la inducción de las proteínas de golpe de calor (*Heat Shock Proteins*, HSPs). Las HSPs en su rol de chaperonas pueden promover la supervivencia celular incrementando la actividad de ciertos mecanismos de reparación del ADN. Anteriormente, el grupo de trabajo al que pertenezco reportó la colocalización nuclear entre MLH1 y MSH2 (proteínas del sistema MMR), y las proteínas Hsp27 y Hsp72 en linfocitos de sangre periférica de personas sanas expuestos *in vitro* a hipertermia y cisplatino. Sin embargo, aún no se ha determinado: a) si el efecto de la hipertermia y b) si el rol de Hsp27 y Hsp72 en la sensibilidad/resistencia a drogas análogos del platino es dependiente o no del sistema MMR. Teniendo en cuenta estas consideraciones se proponen los siguientes objetivos.

#### **2.1. Objetivo General**

Establecer si la reparación de aductos causados por análogos de platino y la toxicidad de los mismos dependen de la interrelación entre Hsp27 (HSPB1) y Hsp72 (HSPA1A) y MMR.

#### **2.2. Objetivos Específicos**

##### **Primer Objetivo**

Determinar los efectos de una hipertermia moderada antes del tratamiento con cisplatino a nivel de: a) la expresión génica y proteica de Hsp27, Hsp72, MLH1 y MSH2; b) el daño al ADN y c) la citotoxicidad en líneas celulares tumorales de colon MMR competentes/incompetentes.

La hipótesis planteada es que *la hipertermia aumenta la sensibilidad al cisplatino en células competentes en el sistema MMR.*

### **Segundo Objetivo**

Establecer si Hsp27 y Hsp72 interactúan con las proteínas MLH1 y MSH2 en células expuestas a cisplatino.

La hipótesis planteada es que *Hsp27 y Hsp72 interactúan con proteínas del sistema MMR.*

### **Tercer Objetivo**

Evaluar en linfocitos de sangre periférica (LSP) de pacientes oncológicos, expuestos *in vitro* a hipertermia y/o análogos de platino, la utilidad predictiva de la determinación del daño en el ADN mediante ensayo cometa alcalino.

La hipótesis es que *la determinación del daño al ADN evaluada en LSP de pacientes oncológicos mediante ensayo cometa alcalino permite predecir la respuesta individual a la quimioterapia.*

### **Cuarto Objetivo**

Evaluar en LSP de pacientes oncológicos obtenidos antes de la quimioterapia y expuestos *in vitro* a análogos del platino, la utilidad predictiva de: a) la determinación de focos de  $\gamma$ H2AX; y b) la determinación de focos de 53BP1.

La hipótesis planteada para este objetivo es que *en LSP de pacientes oncológicos la detección de focos de  $\gamma$ H2AX y de 53BP1, permiten predecir la respuesta individual a la quimioterapia.*

## CAPÍTULO 3

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Sección I: Metodologías empleadas para los estudios en líneas celulares

##### 3.1.1. Líneas celulares

Se utilizaron las líneas celulares de adenocarcinoma colorrectal humano deficiente en la proteína MLH1 (HCT116+ch2, MMR-) y su contraparte no deficiente en MLH1 (HCT116+ch3, MMR+). Las líneas celulares HCT116+ch2 y HCT116+ch3 derivan de la línea HCT116, que contiene una mutación en hemicirosis (C > A) en el codón 252 del gen *MLH1*, que da origen a una proteína trunca, no funcional [185]. La línea celular HCT116+ch3 ha sido complementada con el cromosoma 3, que contiene el gen salvaje *MLH1* y por lo tanto un sistema MMR funcional. La línea celular HCT116+ch2 fue complementada con el cromosoma 2, su sistema MMR es incompetente, y se utiliza como línea control de transferencia cromosómica [186]. Las líneas celulares fueron gentilmente donadas por el Dr. C.R. Boland y el Dr. M. Koi (Baylor University Medical Center, Dallas, TX, USA) y mantenidas a 37°C, con 5% CO<sub>2</sub> en medio Dulbecco modificado por Iscove (IMDM, Gibco, Invitrogen Life Technologies, NY, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco). Las líneas con transferencia de cromosomas se mantuvieron en el mismo medio de cultivo con 400 µg/mL de geneticina (G418, Gibco). Este modelo de estudio fue empleado para los objetivos 1 y 2 de esta tesis.

##### 3.1.2. Tratamientos

Para el tratamiento de las líneas celulares se utilizó cisplatino procedente de la empresa Sigma-Aldrich (cat. P4394). La droga fue disuelta inmediatamente antes de su uso en agua estéril para obtener una solución de trabajo de concentración 1 mM y los remanentes fueron descartados atendiendo a las normas de seguridad vigentes para residuos patogénicos.

Las líneas celulares fueron expuestas a: 1- cisplatino (cPt) 10 µM durante 1 h; y 2- H+cPt, cPt 10 µM (1 h) 24 h después de una hipertermia a 42°C (1 h). Las células fueron recolectadas a distintos tiempos luego terminada la incubación con la droga (tiempos de recuperación) y conservadas a -80°C (Tabla 3.1.2). De este modo, un grupo de células fue recolectado inmediatamente después del cPt, y los otros grupos se dejaron recuperar en medio fresco suplementado con SFB a 37°C durante 2, 4, y 24 h.

**Tabla 3.1.2: Diseño experimental empleado en el cultivo de las líneas celulares**

	Grupo Control (C)	Grupo Hipertermia + Cisplatino (H+cPt)	Grupo Cisplatino (cPt)
<b>Día 1</b>			
Inicio del cultivo	Sí	Sí	Sí
<b>Día 3</b>			
Hipertermia (42°C, 1h)	-	Sí	-
<b>Día 4</b>			
Cisplatino (10 µM, 1h)	-	Sí	Sí
Cosecha a tiempo 0 (T0) <sup>a</sup>	Sí	Sí	Sí
Recuperación (2,4 y 24 h a 37°C)	-	Sí	Sí
Cosecha a tiempo 2 (T2) y 4 (T4) <sup>a</sup>	-	Sí	Sí
<b>Día 5</b>			
Cosecha a tiempo 24 (T24) <sup>a</sup>	-	Sí	Sí

(a) T0, T2, T4 y T24: tiempo en h de recuperación a 37°C luego de la exposición a cPt.

### 3.1.3. Ensayo Clonogénico

Este ensayo es utilizado tradicionalmente para determinar el efecto citotóxico de la radiación ionizante o drogas antitumorales en líneas celulares, el cual es representado en forma de una curva de supervivencia [187]. Es un ensayo a largo plazo que evalúa el daño celular permanente inducido por un tratamiento, al medir la habilidad de una célula para formar un clon y producir una colonia viable [188].

Las células sin tratar o inmediatamente después de ser expuestas a una hipertermia (42°C, 1 h), se sembraron (350 células/pocillo) en placas de 6 pocillos (Corning, NY, USA). Luego de 24 h, las células fueron tratadas durante 1 h con cPt a concentraciones crecientes (0, 5, 10, 15 y 20 µM). Finalizado el tratamiento, se extrajo el medio con la droga y se adicionó medio fresco suplementado con SFB al 10%. Luego de 8-10 días, se removió el medio y las células fueron lavadas con PBS 1X (buffer fosfato salino pH 7, preparado por dilución 1:10 del PBS 10X: 1,4 M NaCl; 0,03 M KCl; 0,1 M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H; 0,2 M KPO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>). Después de aspirar el PBS, las colonias fueron fijadas con metanol durante 30 min y teñidas 10 min con una solución de cristal violeta al 0,5% p/v en agua. Finalmente, las colonias se lavaron cuidadosamente con agua corriente para remover el colorante excedente. Se contaron las colonias con un mínimo

de 50 células. La eficiencia de plaqueo y el factor de sobrevivencia fueron calculados de acuerdo a las siguientes fórmulas [189]:

$$\text{Eficiencia de Plaqueo (EP) \%} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de colonias en el control}}{\text{N}^\circ \text{ de células sembradas}} \times 100$$

$$\text{Factor de Sobrevivencia (FS) \%} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de colonias formadas después del tratamiento}}{(\text{N}^\circ \text{ de células sembradas} \times \text{EP})} \times 100$$

#### 3.1.4. Extracción de ARN total

Las células tratadas y criopreservadas a  $-80^\circ\text{C}$  (50% medio de cultivo, 40% SFB y 10% DMSO) fueron descongeladas en un baño termostático a  $37^\circ\text{C}$ , centrifugadas a 1.200 rpm durante 7 min a  $4^\circ\text{C}$  y lavadas dos veces con 1X PBS estéril. Luego de la eliminación del sobrenadante, la extracción de ARN total se llevó a cabo utilizando Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen Life Technologies). Se adicionó al pellet de células 1 mL de Trizol<sup>®</sup> por cada  $5 \times 10^6$  células, las cuales fueron lisadas mediante agitación en vórtex y con la ayuda de una jeringa y aguja de tuberculina. El homogenato se incubó durante 5 min a temperatura ambiente (TA) y posteriormente se adicionó cloroformo (0,2 mL/1mL de Trizol<sup>®</sup>), seguido de una agitación vigorosa durante 15 segundos. Luego de incubar las muestras a TA durante 3 min, se centrifugaron a 12.000 rpm durante 15 min a  $4^\circ\text{C}$  para la separación de las distintas fases. Se transfirió la fase acuosa (superior) a un tubo estéril y se añadió alcohol isopropílico (0,5 mL/1 mL Trizol<sup>®</sup>) para la precipitación del ARN. Después de agitar en vórtex, las muestras se incubaron a TA durante 15 min y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 10 min a  $4^\circ\text{C}$ . Luego de descartar el sobrenadante, el precipitado de ARN se lavó con etanol al 75% a  $4^\circ\text{C}$  (1mL/1mL de Trizol<sup>®</sup>) mediante agitación vigorosa. Posteriormente, el ARN se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min a  $4^\circ\text{C}$ . Tras eliminar el sobrenadante, el ARN obtenido fue secado durante 15 min a TA y resuspendido en 30  $\mu\text{L}$  de agua libre de ARNasa.

Para la cuantificación de los productos de extracción, se realizó una dilución 1:10 de cada muestra (5  $\mu\text{L}$  de muestra en 45  $\mu\text{L}$  de agua). La cuantificación del ARN diluido se llevó a cabo por lectura de densidad óptica (DO) a 260 nm mediante un espectrofotómetro Jenway Genova MK3, considerando que 1 DO equivale a 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ARN. Se utilizó el agua de dilución como blanco de lectura. La calidad del ARN se determinó a partir del cociente A260/A280.

El ARN total fue conservado a  $-80^\circ\text{C}$  hasta el momento de la retrotranscripción.

### 3.1.5. Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR)

La retrotranscripción se realizó utilizando la transcriptasa reversa Molony del virus de la leucemia murina (M-MLV, Invitrogen) y cebadores hexámeros aleatorios (Promega, Madison, WI, USA) en un volumen final de reacción de 20  $\mu$ L siguiendo las instrucciones del fabricante. Se colocó en hielo un tubo de 0,2 mL, al cual se incorporaron 100 ng de cebadores; 3  $\mu$ g de RNA total; 0,5 mM de dNTPs (Promega) y finalmente agua destilada libre de ARNasa hasta un volumen final de 12  $\mu$ L. La mezcla se calentó a 65°C durante 5 min y luego se colocó inmediatamente en hielo. Posteriormente se adicionó Buffer *First-Strand* 1X, 10 mM de ditiotretitol (DTT) y 40 UI de *RNasa OUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor* (Invitrogen). La mezcla se agitó y se incubó a 37°C durante 2 min, se incorporaron 200 UI de la enzima M-MLV y la mezcla se mantuvo a TA durante 10 min. La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo incubando la mezcla a 37°C durante 50 min, tras lo cual se inactivó mediante calentamiento durante 15 min a 70°C. Se incluyó como control negativo una mezcla de reacción sin transcriptasa reversa.

El ADN copia (ADNc) obtenido fue conservado a -20°C para su empleo posterior como templado de la amplificación por PCR cuantitativa.

### 3.1.6. PCR cuantitativa en tiempo real

Para la amplificación de los genes  *$\beta$ -actina*, *Hsp72* y *Hsp27* se emplearon 1,5 ng/ $\mu$ L de ADNc y para los genes *MLH1* y *MSH2* se utilizaron 2,5 ng/ $\mu$ L de templado. Se preparó una mezcla de reacción con un volumen final 10  $\mu$ L compuesta por: agua destilada; Buffer 1X; 2,5mM MgCl<sub>2</sub>; 200  $\mu$ M dNTPs (Promega); 250 nM de cebadores (Invitrogen); EvaGreen® 1X (Biotium, Hayward, CA, USA) y 1 UI de Taq ADN polimerasa (Invitrogen). La amplificación de cada gen incorporó como controles negativos un tubo de reacción sin ADNc y otro tubo de reacción donde se usó como templado el control negativo de la RT-PCR (sin transcriptasa reversa). La amplificación se realizó en un equipo Corbett Research Rotor Gene 6000 (Qiagen, USA). Los cebadores específicos empleados se mencionan en la Tabla 3.1.6.1 [190-193] y las condiciones de ciclado para cada gen en la Tabla 3.1.6.2 Las reacciones de PCR comenzaron con una desnaturalización inicial de 95°C durante 5 min seguido de 40 ciclos de desnaturalización, apareamiento y extensión.

**Tabla 3.1.6.1: Cebadores utilizados para cada gen**



Gen	Cebador sentido 5'→3'	Cebador antisentido 5'→3'	ID Gene <sup>a</sup>
<b>Hsp27</b>	CCCAAGTTTCCTCCTCCCTGTC	GCGGCAGTCTCATCGGATTTT	3315
<b>Hsp72</b>	GCTGACCAAGATGAAGGAGATC	GAGTCGATCTCCAGGCTGGC	3303
<b>MLH1</b>	GGCCAGCTAATGCTATCAAAGAG	CTTTAACAATCACTTGAATACTTGTGGA	4292
<b>MSH2</b>	ATCCAAGGAGAATGATTGGTATTTG	CAAAGAGAATGTCTTCAAACCTGAGAGA	4436
<b><i>β-actina</i></b>	CTGGCACCCAGCACAATG	GGACAGCGAGGCCAGGAT	60

(a) ID Gene: Número de identificación del gen en la base de datos *National Center for Biotechnology Information*.

**Tabla 3.1.6.2: Condiciones de ciclado para los genes estudiados**

Condiciones de ciclado		<i>β-actina</i>	<i>HSP27</i>	<i>HSP72</i>	<i>MLH1</i>	<i>MSH2</i>
Ciclos	Desnaturalización	95°C 20 s	95°C 20 s	95°C 20 s	95°C 20 s	95°C 20 s
	Apareamiento	59°C 30 s	62°C 40 s	54°C 40 s	57°C 35 s	57°C 35 s
	Extensión	72°C 40 s	72°C 40 s	72°C 45 s	72°C 35 s	72°C 35 s

En cada reacción, la especificidad de los productos de amplificación fue determinada utilizando la curva de disociación derivada (*melting curve*). El análisis de la curva de disociación al final del proceso, permitió identificar los productos de PCR sin necesidad de realizar una electroforesis en gel. Esto resultó posible debido a que todos los fragmentos de ADN tienen una temperatura de disociación específica a la cual el 50 % del ADN es monocatenario [194]. Para cada gen estudiado se consideraron cantidad, fluorescencia y temperatura de los picos de disociación obtenidos.

El monitoreo de la reacción en tiempo real se realizó midiendo el aumento de la fluorescencia causada por la unión del colorante EvaGreen<sup>®</sup> al producto de PCR al final de cada ciclo de amplificación. La cuantificación relativa del ARNm se llevó a cabo a través del método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Para determinar los niveles de expresión, se midieron las diferencias ( $\Delta$ ) entre los ciclos umbral ( $C_T$ ) del gen de interés (GDI) en la muestra en relación a un control no tratado, normalizando con un gen de referencia (GDR), tal como se visualiza en las ecuaciones 1-3 [195]. Se utilizó como gen de referencia *β-actina*. Los valores de  $C_T$  fueron obtenidos a partir del software provisto por el equipo Rotor Gene 6000 Series 1.7. El valor de  $C_T$  fue calculado en la fase exponencial y resulta inversamente proporcional al número inicial de copias presentes en la muestra.

Ecuación 1      Radio=  $2^{-[(C_T \text{ GDI} - C_T \text{ GDR}) \text{ muestra} - (C_T \text{ GDI} - C_T \text{ GDR}) \text{ control}]}$

Ecuación 2      Radio=  $2^{-[\Delta C_T \text{ muestra} - \Delta C_T \text{ control}]}$

Ecuación 3      Radio=  $2^{-\Delta \Delta C_T}$

### 3.1.7. Inmunodetección de proteínas en membranas de nitrocelulosa

#### 3.1.7.1. Extracción de proteínas

Luego de finalizado el tratamiento con cPt o H+cPt, se removió el medio de las placas de 6 pocillos, las células se lavaron con 1X PBS frío, y se recolectaron mediante raspado en 1 mL de 1X PBS frío. Posteriormente, las células se centrifugaron a 2.000 rpm durante 5 min a 4°C y tras eliminar el sobrenadante, se adicionaron al pellet 150 a 200  $\mu\text{L}$  buffer de lisis (100 mM Tris-HCl, pH 6,8; 20% v/v glicerol, 4% p/v dodecil sulfato de sodio, SDS; H<sub>2</sub>O MiliQ) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (1mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo, PMSF; 1mM ortovanadato de sodio, 1 mM fluoruro de sodio; cocktail de inhibidores de proteasas 1X; cocktail de inhibidores de fosfatasas 1X). El cocktail de inhibidores de proteasas (cat. P8340, Sigma-Aldrich) está constituido por leupeptina, aprotinina y pepstatina A, mientras que el cocktail de inhibidores de fosfatasas (cat. P5726, Sigma-Aldrich) contiene ortovanadato de sodio, molibdato de sodio, tartrato de sodio e imidazol. El homogenato se preservó a -20°C hasta el momento de la determinación proteica.

#### 3.1.7.2. Cuantificación de proteínas totales

La concentración de proteínas en las muestras fue determinada mediante el método del ácido bicinonínico utilizando el kit micro-BCA (cat. 23235, Pierce, Thermo Fisher Scientific, IL, USA). Se preparó una curva estándar con diluciones seriadas (0-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de albúmina de suero bovino (BSA). En una placa de 96 pocillos, se cargaron 100  $\mu\text{L}$  de cada concentración de la curva por duplicado. Para cada muestra se cargaron por duplicado 2  $\mu\text{L}$  de la misma y se adicionaron 98  $\mu\text{L}$  de agua. Posteriormente se incorporó a cada pocillo 100  $\mu\text{L}$  de la solución de trabajo recién preparada y protegida de la luz. La mezcla se dejó incubar a 37°C durante 40 min en oscuridad. La solución de trabajo fue preparada con 50% del reactivo A, 48% del reactivo B y 2% del reactivo C. La lectura de absorbancia a una longitud de onda de 570 nm se llevó a cabo en un lector de microplacas MULTISKAN EX (Thermo Scientific, Lafayette, CO, USA).

Se graficó una curva de absorbancia/concentración para BSA y se trazó la recta de regresión lineal. La ecuación de la recta fue empleada para los cálculos de la concentración de proteínas en cada muestra.

#### 3.1.7.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS

Se prepararon geles de poliacrilamida-SDS con distinto porcentaje de poliacrilamida (7,5%; 10% y 12%) según el peso molecular de las proteínas a separar, en el sistema *MiniProtean* (Bio-Rad). Se sembraron en cada calle 20-40 µg de proteínas diluidas en buffer de muestra 5X (0,2 M Tris-HCl, pH 6,8; 20% v/v glicerol, 10% p/v SDS; 0,5% p/v azul de bromofenol, 10 mM DTT, H<sub>2</sub>O miliQ). En la primer calle del gel se sembró el marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein™ Dual Color Standards*, cat. 1610374 Bio-Rad). Los geles fueron sumergidos en un buffer de corrida (25 mM Tris-base; 192 mM glicina; 0,1% p/v SDS; pH 8,6) dentro de la cuba electroforética y sometidos a 70 V durante la migración de las proteínas en el gel de apilamiento y a 100 V en el gel de resolución.

#### 3.1.7.4. Western Blot

Esta técnica se basa en el reconocimiento de proteínas transferidas a membranas de nitrocelulosa o de fluoruro de polivinilideno, mediante anticuerpos específicos. Las proteínas, separadas en el gel de poliacrilamida según su peso molecular, fueron transferidas a un papel de nitrocelulosa en un “*sandwich*” compuesto por dos esponjas plásticas, dos láminas gruesas de papel (papel de *blotting*), dos láminas de papel de filtro, una lámina de nitrocelulosa con poro de 0,45 µm (cat. RPN303D Amersham, GE Healthcare, Alemania) y el gel resolutivo de poliacrilamida-SDS, depositados dentro de dos soportes plásticos perforados. El “*sandwich*” se colocó dentro de una cuba de transferencia con la membrana orientada hacia el ánodo y el gel hacia el cátodo sumergido en el buffer de transferencia (20 mM Tris base; 150 mM glicina; 0,1% p/v SDS; 20% v/v metanol; pH 8,4). La transferencia se llevó a cabo durante 1 h a 90 V. En el caso de proteínas fosforiladas la cuba se sumergió en hielo.

#### Día 1

Finalizada la transferencia, las membranas se lavaron 5 min con buffer 1X PBST (0,1% v/v Tween-20 en buffer 1X PBS) y se bloquearon con 1% p/v BSA en 1X PBST durante 1 h a TA. Luego de un lavado de 10 min con 1X PBST, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos (Ac) primarios correspondientes durante toda la noche en agitación a 4°C. Los Ac primarios fueron diluidos en buffer de dilución de anticuerpos (1% p/v BSA; 0,1% p/v

timerosal; 149 mM NaCl; 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> xH<sub>2</sub>O) según la concentración especificada en la Tabla 3.1.7.4.1. Para la inmunodetección de proteínas fosforiladas se utilizó en todos los pasos buffer 1X TBST (137 mM NaCl; 20 mM Tris; 0,1% v/v Tween-20) en lugar de 1X PBST.

**Tabla 3.1.7.4.1: Anticuerpos primarios utilizados**

Anticuerpos Primarios			
Antígeno	Anticuerpo	Dilución	Origen
MSH2	Monoclonal (ratón)	WB <sup>a</sup> 1:2000 IF <sup>b</sup> 1:25 IP <sup>c</sup> 1:500	Clon FE11, NA27, Calbiochem, EMD Millipore
MLH1	Monoclonal (ratón)	WB 1:2000 IF 1:100 IP 1:333	Clon M1, Sigma-Aldrich
ERCC1	Monoclonal (ratón)	WB 1:2000	Clon 4F9, Abcam
Hsp72	Monoclonal (ratón)	WB 1:8000	ADI-SPA-810 Enzo Life Sciences
	Policlonal (conejo)	IF 1:100	ADI-SPA-812 Enzo Life Sciences
Hsp27	Monoclonal (ratón)	WB 1:1500	ADI-SPA-800 Enzo Life Sciences
	Policlonal (conejo)	IF 1:1000	Donado por Dr. M. Gaestel (Alemania)
γH2AX (Ser139)	Policlonal (conejo)	WB 1:1000 ICQ <sup>d</sup> 1:450	Clon 20E3, Cell Signaling Technology
53BP1	Policlonal (conejo)	ICQ 1:300	4937, Cell Signaling Technology
pChk2 (Thr68)	Policlonal (conejo)	WB 1:1000	Clon C13C1, Cell Signaling Technology
pChk1 (Ser345)	Policlonal (conejo)	WB 1:1000	Clon 133D3, Cell Signaling Technology
Bcl-2	Monoclonal (ratón)	WB 1:2000	M0887, Dako
Bax	Monoclonal (conejo)	WB 1:2000	ab32503, Abcam
β-actina	Monoclonal (ratón)	WB 1:8000	A5441 Sigma-Aldrich

(a) WB: western blot, (b) IF: inmunofluorescencia, (c) IP: inmunoprecipitación, (d) ICQ: inmunocitoquímica

## Día 2

Las membranas se lavaron dos veces con buffer 1X PBST (10 min cada lavado) y se incubaron con el Ac secundario IgG anti-conejo o anti-ratón conjugado con la enzima peroxidasa “*horseradish peroxidase*” (Cell Signaling Technologies o Dako North America, CA, USA) diluido 1:3000 en buffer de bloqueo durante 1 h a TA. Las membranas se lavaron 3 veces durante 10 min con 1X PBST (3 veces) antes de revelar con los reactivos quimioluminiscentes (Sigma-Aldrich). Para el revelado se adicionó a la membrana de nitrocelulosa una mezcla de la solución 1 (100 mM Tris, pH 8,5; 2,5 mM luminol; 0,5 mM de ácido cumárico) con la solución 2 (0,1% v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en 100 mM Tris, pH 8,5) preparadas inmediatamente antes de usar. Finalmente, las imágenes fueron capturadas con un equipo de detección quimioluminiscente ChemiDoc™ XRS provisto del software Image Lab™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

**Tabla 3.1.7.4.2: Anticuerpos secundarios utilizados**

Anticuerpos Secundarios			
Antígeno	Anticuerpo	Dilución	Origen
Ratón	Policlonal (cabra)/HRP <sup>a</sup>	1:3500	P0447, Dako
	Policlonal (cabra)/Cy <sup>®</sup> 3	1:400	Molecular Probes, Invitrogen Life Sciences
Conejo	Policlonal (cabra)/HRP <sup>a</sup>	1:3000	7074, Cell Signaling Technologies
	Policlonal (cabra)/Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	1:400	Molecular Probes, Invitrogen Life Sciences

(a) HRP: *horseradish peroxidase*

### 3.1.7.5. Cuantificación relativa de los niveles de expresión

Los cambios en los niveles de expresión de las proteínas estudiadas fueron evaluados mediante el análisis densitométrico de las bandas obtenidas en los western blot. La cuantificación se llevó a cabo usando el programa Image J (NIH, MD, USA) que permitió asignarle un valor en unidades de imagen (píxeles/cm<sup>2</sup>) a cada banda del inmunoblot. La intensidad de cada banda de la proteína de interés fue normalizada a la intensidad de la correspondiente banda de la proteína constitutiva β-actina.

### 3.1.8. Ensayo cometa alcalino

Este método conocido también como “electroforesis en gel de células individuales”, es utilizado para medir el daño en el ADN causado por diferentes tipos de agentes genotóxicos. En condiciones de pH neutro, esta técnica permite estudiar las rupturas de doble cadena. Sin embargo, cuando se utiliza pH alcalino, permite la detección de rupturas de simple y doble cadena, enlaces cruzados, bases dañadas y núcleos apoptóticos. Esta técnica se basa en el hecho de que el ADN dañado o fragmentado con carga negativa puesto en un campo electroforético, es capaz de migrar en dirección al ánodo formando un cometa. La “cabeza del cometa” representa el ADN no dañado mientras que la “cola del cometa” corresponde a los extremos rotos de ADN que han migrado. La longitud e intensidad de la cola del cometa es directamente proporcional al daño inducido en el ADN [196].

#### 3.1.8.1. Obtención de los microgeles y lisado celular

Para estudiar el daño en el ADN, las células tratadas y criopreservadas (50% medio de cultivo, 40% SFB, 10% DMSO) fueron descongeladas en un baño termostático a 37°C y lavadas con 1X PBS. Con el fin de evitar daños adicionales en el ADN, se trabajó en todo momento al

abrigo de la luz y a 4°C. Una suspensión de  $5 \times 10^4$  células en 200  $\mu$ L de 1X PBS fue embebida en agarosa de bajo punto de fusión (Gibco) al 1% formando un microgel en la superficie del portaobjeto totalmente esmerilado. Los preparados se colocaron en un recipiente con buffer de lisis (1,2 M NaCl; 30 mM NaOH; 0,1% laurilsarcosina; 0,1 M  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ; pH 12) y se mantuvieron a 4°C toda la noche.

#### 3.1.8.2. Electroforesis y fijación de los geles

Los microgeles fueron lavados con buffer de electroforesis (30 mM NaOH; 2 mM EDTA; pH 12,5) 3 veces (20 min cada lavado) a 4°C. Posteriormente, fueron transferidos a una cuba electroforética para su migración a razón de 0,6 V/cm durante 25 min. Luego, los microgeles fueron lavados con agua destilada y fijados durante 10 min en una solución: 15% p/v ácido tricloroacético, 5% p/v  $\text{ZnSO}_4$ , 5% p/v glicerol. Luego, se lavaron con abundante agua desionizada y se dejaron secar en los portaobjetos hasta el día de la tinción con plata.

#### 3.1.8.3. Tinción de los cometas

La tinción con plata se realizó según el procedimiento descrito por Nadin S.B. et al [30]. Para ello, se mezclaron dos partes de solución A (5% p/v  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), con una parte de solución B (0,2% p/v  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 0,2% p/v  $\text{AgNO}_3$ ; 0,2% p/v ácido tungstosilícico; 0,15% v/v formol; 5% p/v  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), en agitación y oscuridad durante 15-20 min. La reacción fue detenida con 1% v/v de ácido acético y los geles fueron lavados con agua desionizada y secados a TA.

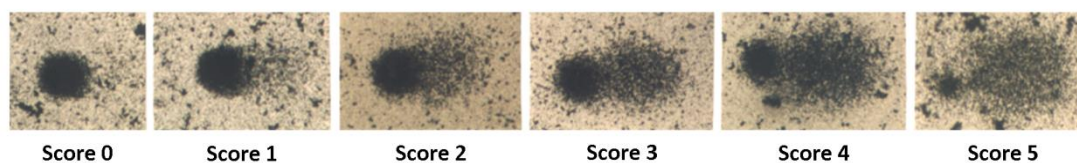
#### 3.1.8.4. Evaluación de los cometas

Cada muestra fue evaluada con un objetivo 40X en un microscopio óptico Nikon Eclipse E200 (Nikon Corp., Tokio, Japón), contando 200 células por cada muestra. El daño en el ADN se evaluó según un score visual: 0, sin daño; 1, 5-10% de daño; 2, 11-30% de daño; 3, 32-60% de daño; 4, 61-95% de daño; y 5, > 95% de daño (daño total) [197]. La figura 3.1.8 ilustra el cometa representativo de cada score. Para el cálculo de la cantidad de aductos de cPt, se utilizó un segundo agente capaz de fragmentar el ADN (580  $\mu$ M  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 1 hora a 4°C); de modo que el grado de disminución de la cola del cometa de la muestra cisplatino +  $\text{H}_2\text{O}_2$ , en relación a la muestra control (tratada sólo con  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) representa el daño causado por el cisplatino. La formación de aductos intercatenarios de cPt fue calculado mediante la fórmula [198]:

$$\text{Aductos de cPt} = 1 - \frac{(\text{MAcPt} - \text{MAC})}{(\text{MACH} - \text{MAC})}$$

Siendo **MA**: media de Migración del ADN; **cPt**: muestra tratada con cisplatino + peróxido de hidrógeno; **C**: muestra control, sin tratamientos; **CH**: muestra control + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los resultados obtenidos fueron normalizados en función de la muestra tratada con cPt a tiempo 0 (cPt T0=1).

La media de la migración del ADN [197] se calculó como:  $MA = [(\% \text{ células con score } 1) \times 1 + (\% \text{ células con score } 2) \times 2 + (\% \text{ células con score } 3) \times 3 + (\% \text{ células con score } 4) \times 4 + (\% \text{ células con score } 5) \times 5] / 100$ .



**Figura 3.1.8. Cometas teñidos con plata que muestran diferentes magnitudes de daño al ADN según score visual.** La cabeza del cometa representa el ADN íntegro, mientras que la cola del cometa representa el ADN dañado. La evaluación de cada cometa se llevó a cabo mediante el siguiente score: **0**, sin daño; **1**, 5-10% de daño; **2**, 11-30% de daño; **3**, 32-60% de daño; **4**, 61-95% de daño; y **5**, > 95% de daño (daño total).

### 3.1.9. Viabilidad celular

El bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) es un ensayo a corto plazo en el cual el incremento o disminución en el número de células viables se relaciona linealmente con la actividad mitocondrial. Esta técnica colorimétrica se fundamenta en la reducción del MTT por la enzima succinato-deshidrogenasa mitocondrial a formazán, compuesto de color violeta [199]. El ensayo de MTT permite estudiar daños permanentes y transitorios, y por lo tanto, refleja efectos citotóxicos y citostáticos [188].

El colorante MTT (cat. 5655, Sigma-Aldrich) fue disuelto en una concentración de 5 mg/mL en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco) sin rojo fenol. Las alícuotas fueron conservadas a -20°C y al abrigo de la luz hasta el momento de usar.

Se sembraron 5.000 células por pocillo en microplacas de 96 pocillos en medio IMDM suplementado con 10% de SFB. Se sembraron un total de 6 pocillos por cada grupo experimental y se dejaron 6 pocillos sólo con medio de cultivo completo sin células como blanco experimental. Luego de 24 h se inició el tratamiento correspondiente. A partir de una solución de trabajo de 10 µM de cPt diluido en medio de cultivo sin SFB, se agregaron 100 µL

de esta solución a cada pocillo y se incubó durante 1 h. El grupo control se incubó solamente con medio de cultivo. Finalizado el tratamiento con cPt, se eliminó el medio con la droga volcando la placa dentro del flujo laminar. Se agregó medio fresco con SFB y las células se dejaron recuperar a 37°C durante los tiempos establecidos. Posteriormente, se retiró el medio de las muestras invirtiendo la placa y las células se incubaron con 100 µL MTT 0,5mg/mL disuelto en 1X PBS durante 3 h a 37°C y al abrigo de la luz. Luego de retirar el MTT volcando la placa, se agregó a cada pocillo 100 µL de DMSO para disolver los anillos de formazán. La lectura de absorbancia de la placa se realizó a una longitud de onda de 570 nm en un lector de microplacas MULTISKAN EX. El experimento se repitió en 3 ensayos independientes.

Los valores de absorbancia fueron normalizados respecto al control y se estandarizó al 100% de la viabilidad celular utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{media Absorbancia del grupo tratado} - \text{blanco} \times 100}{\text{media Absorbancia del grupo control} - \text{blanco}}$$

### **3.1.10. Detección inmunocitoquímica de la actividad β-galactosidasa asociada a la Senescencia**

En 1995, Dimri y colaboradores mostraron que las células senescentes presentan actividad β-galactosidasa, la cual es detectable a pH 6, distinta de la actividad β-galactosidasa ácida (lisosomal) presente en todas las células y detectable a pH 4 [200]. Este ensayo citoquímico utiliza el sustrato cromógeno 5-bromo-4-cloro-3-indol β-D-galactopiranosido (X-gal) que produce un compuesto insoluble azul cuando es clivado por la enzima β-galactosidasa [201]. Para este ensayo, se sembraron  $4 \times 10^4$  células en cubreobjetos estériles en placas de 6 pocillos, las cuales fueron cultivadas por un lapso de 48 h antes del inicio de los tratamientos. Al finalizar la exposición al cPt y los posteriores tiempos de recuperación, las células fueron lavadas con 1X PBS y fijadas durante 5 min en una solución de 2% formaldehído y 0,2% glutaraldehído. Luego, las muestras se lavaron con 1X PBS (2 veces, 30 s) y se incubaron con solución de tinción (40 mM de ácido cítrico/buffer  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , pH 6,0; 1 mg/mL X-gal, Promega; 5 mM  $\text{K}_4 [\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ; 5 mM  $\text{K}_3 [\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ; 150 mM NaCl; 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ) en cámara húmeda a 37°C en oscuridad durante toda la noche. Posteriormente las células se lavaron con 1X PBS (2 veces, 5 min) y después con metanol. Se identificaron las células con tinción turquesa y morfología senescente, utilizando un objetivo 40X en un microscopio Nikon Eclipse E200. Se determinó el índice de senescencia para cada muestra según la siguiente fórmula:



$$\% \text{ de senescencia} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células SA-}\beta\text{gal (+)}}{\text{N}^\circ \text{ de células totales}} \times 100.$$

### 3.1.11. Análisis de ciclo celular por citometría de flujo

Esta metodología permite determinar la fase del ciclo celular en el que se encuentran las células de acuerdo a su contenido de ADN. Para esto se utiliza un colorante que se une con alta afinidad al ADN, como es el caso del yoduro de propidio (IP). La cantidad de IP que se determina en el citómetro es proporcional al contenido de ADN de la célula.

Luego de 24 h de recuperación post-cPt, las células fueron cosechadas mediante tripsinización y lavadas dos veces con una solución de 1X PBS suplementada con SFB al 1% a 4°C. El pellet de células fue resuspendido en PBS a una concentración de  $5 \times 10^5$  células/mL y posteriormente las células fueron fijadas en etanol al 70% (1 h a 4°C). En este paso, 500  $\mu$ L de suspensión celular fue goteado suavemente en un tubo de 15 mL que contenía 5 mL (10 volúmenes) de solución de fijación, agitando en vórtex para evitar aglomeraciones. Luego de 1 h en heladera, las células fueron centrifugadas (1.200 rpm, 5 min) y lavadas con 1X PBS conteniendo 1% SFB. Finalizada la última centrifugación, las células fueron resuspendidas en 300  $\mu$ L de una solución de 0,2 mg/mL de ARNasa A (Qiagen Sciences Inc, MD, USA) en 1X PBS, e incubadas a 37°C durante 30 min con agitación suave. Para la tinción del ADN, se añadió IP (Sigma) a una concentración final de 40  $\mu$ g/mL y se incubó 15 min a TA en oscuridad. Las células fueron analizadas en un citómetro FACS Aria III (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) y el contenido de ADN fue determinado usando el programa FCS Express versión 4 (De Novo Software, LA, CA) a partir de un total de 20.000 eventos grabados.

### 3.1.12. Determinación de Anexina V-Ioduro de propidio

Una de las características de las células en apoptosis temprana, es la translocación del fosfolípido fosfatidilserina (FS) desde la cara interna hacia la cara externa de la membrana plasmática. La Anexina V es una proteína que tiene alta afinidad por la FS, a la cual se une cuando se encuentra expuesta al ambiente extracelular. La Anexina V se conjuga con fluorocromos como FITC para el estudio de apoptosis y se usa en conjunto con un colorante vital como yoduro de propidio (IP) o 7-Amino-Actinomicina D (7-AAD). Debido a que las células viables excluyen estos colorantes, la doble tinción permite distinguir entre apoptosis temprana (Anexina V+/IP-) y tardía (Anexina V+/IP+) [202].

El estudio de apoptosis se realizó por citometría de flujo usando el kit FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (556547, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Se sembraron  $2 \times 10^5$  células/pocillo en placas de 6 pocillos y se dejaron crecer durante 48 h en medio suplementado con 10% de SFB hasta el inicio de los tratamientos experimentales.

#### 3.1.12.1. Obtención de la suspensión celular

Una vez finalizados los tiempos de recuperación post cPt, se recolectó el sobrenadante en un tubo cónico de 15 mL sumergido en hielo. Las células se lavaron con 1X PBS a 4°C, recolectándose luego en el mismo tubo. Se agregó tripsina a la placa de cultivo y se incubó por 5 min a 37°C. Para inactivar la tripsina, se agregó medio de cultivo a 4°C, se resuspendieron las células y se recolectaron en el tubo mencionado anteriormente. Se realizó el recuento celular en cámara de Neubauer y posteriormente las células se centrifugaron a 1.200 rpm durante 5 min. El pellet obtenido se lavó con 1 mL de 1X PBS suplementado con 1% SFB a 4°C. Las células se centrifugaron nuevamente a 1.200 rpm, 5 min, y finalmente el pellet fue resuspendido en 1X *binding buffer* a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL.

#### 3.1.12.2. Tinción

Se transfirieron 100  $\mu$ L de suspensión celular ( $1 \times 10^5$  células) a un tubo de 1,5 mL, se adicionaron 5  $\mu$ L de anexina V-FITC y se incubaron 15 min en oscuridad a 4°C. Luego, se adicionaron 200  $\mu$ L de 1X *binding buffer* y 5  $\mu$ L de IP, se mezcló en vórtex y se mantuvieron en hielo hasta su análisis en el citómetro FACS Aria III (BD, Franklin Lakes, NJ, USA).

En el ensayo se incluyeron los siguientes controles:

- ✓ Control positivo de apoptosis: Células expuestas a luz ultravioleta (UV) durante 10 minutos, y 4 h de recuperación a 37°C.
- ✓ Control de autofluorescencia: células no tratadas sin marcar.
- ✓ Controles simples marcas: para poder efectuar la compensación se utilizó un tubo con células expuestas a UV y teñidas únicamente con Anexina V-FITC y otro tubo con células expuestas a UV y teñidas sólo con IP.

La proporción de células con tinción positiva se calculó con el programa Flow Jo (Tree Star, San Carlos, CA, USA) a partir de 10.000 eventos.

#### 3.1.13. Inmunofluorescencia

Se sembraron 18.000 células por cubreobjeto en placas de 12 pocillos y se dejaron crecer durante 48 h antes de iniciar los tratamientos. Al finalizar los tiempos de recuperación post-cPt, se extrajo el medio, se lavaron las células con 1X PBS estéril y se fijaron con p-formaldehído (PFA, al 4% en buffer 1X PBS, pH 7,4) durante 30 min a TA. Luego, se eliminó el PFA, se realizaron 2 lavados con 1X PBS (5 min cada uno) y los cubreobjetos fueron conservados en 1X PBS estéril a 4°C hasta el momento de la realización de la IF.

#### *Día 1*

Los cubreobjetos fueron tratados durante 30 min con una solución 50 mM NH<sub>4</sub>Cl con el fin de eliminar la autofluorescencia. Luego se lavaron las células con 1X PBS (5 min) y se permeabilizaron durante 5 min a TA con una solución de 0,1 % v/v Tritón X-100 en 1X PBS. Después de realizar un lavado con 1X PBS (5 min) y otro con buffer saponina (0,05% p/v saponina; 0,2% p/v BSA en 1X PBS) durante 5 min, se realizó el bloqueo de los sitios inespecíficos en solución de permeabilización con 1% BSA durante 30 min. La incubación con el Ac primario (anti-MLH1 o anti-MSH2 monoclonal hecho en ratón) diluido en buffer saponina se llevó a cabo en cámara húmeda a 4°C durante toda la noche (dilución en Tabla 3.1.7.4.1).

#### *Día 2*

Se realizó un lavado con buffer saponina (10 min) y 2 lavados con 1X PBS (5 min) para remover el exceso de Ac primario. Se incubaron las muestras con el Ac secundario (anti-murino IgG conjugado con Alexa Fluor<sup>®</sup>450) diluido 1:400 en buffer saponina durante 1 h a TA en cámara húmeda y oscuridad. Luego de lavar una vez con buffer saponina (10 min) y 2 veces con 1X PBS (5 min), se incubó con el segundo Ac primario (Hsp27 o Hsp72 policlonal hecho en conejo) diluido en buffer saponina en cámara húmeda y en oscuridad (2h a TA) con el objeto de realizar ensayos de colocalización. Se repitió nuevamente el lavado con buffer saponina (10 min) y luego 2 lavados con 1X PBS (5 min). La incubación con el Ac secundario (anti-conejo IgG conjugado con Cy<sup>®</sup>3) se realizó de la misma manera en cámara húmeda 1 h a TA y en oscuridad. Posteriormente, las muestras se lavaron 3 veces con 1X PBS (5 min) y se incubaron con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, 1:10000, Sigma-Aldrich) diluido en buffer saponina (10 min a TA). Por último, se realizaron 3 lavados con PBS 1X (5 min) y se procedió al montaje en portaobjetos con 10 µL de medio Vectashield (cat. H1000, Vector laboratorios, CA, USA). Los bordes se sellaron con esmalte sintético. Los preparados se almacenaron a 4°C y en oscuridad hasta el momento de su visualización. Para examinar los preparados se utilizó un microscopio confocal OLYMPUS FV-1000 usando el programa FV10-ASW 1.7 (Olympus, Japón). Las fotos

fueron tomadas con una lente objetivo Paplon 60X. Se incluyeron controles negativos apropiados para asegurar la especificidad de la tinción observada.

#### *3.1.13.1. Análisis cuantitativo de colocalización*

El análisis de colocalización se realizó con la aplicación JACoP del programa Image J de acuerdo a Bolte y Cordelières [203]. Se deconvolucionaron imágenes de células teñidas con anticuerpos primarios anti-MLH1 y anti-Hsp27 o anti-Hsp72, anti-MSH2 y anti-Hsp27 o anti-Hsp72. Se generaron las funciones de dispersión de los puntos específicos para cada canal y la relación señal:ruido se ajustó hasta que las imágenes deconvolucionadas quedaran libres de ruido. Se calculó el coeficiente de correlación Pearson (CCP). Para el cálculo de CCP se midió la dependencia de los píxeles en las imágenes de dos canales: canal verde y rojo para MLH1 y Hsp27, para MLH1 y Hsp72, para MSH2 y Hsp27 y para MSH2 y Hsp72, respectivamente. El coeficiente CCP puede adoptar valores entre -1 y +1, donde el valor 1 indica correlación completa mientras que -1 significa correlación negativa.

#### **3.1.14. Inmunoprecipitación**

##### *3.1.14.1. Obtención del lisado celular*

Para esta técnica las líneas celulares se cultivaron en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (BD Falcon). Las células tratadas fueron tripsinizadas y transferidas a un tubo cónico para ser centrifugadas a 1.200 rpm durante 5 min. Posteriormente, el pellet fue lavado con 1X PBS, centrifugado y almacenado a -80 °C en tubos de 1,5 mL hasta su procesamiento. Se descongeló el pellet y se le adicionó directamente el buffer de lisis no desnaturante RIPA (150 mM NaCl; 1% Tritón X-100; 0,5% ácido desoxicólico; 0,1% SDS; 50mM Tris pH 8,0) suplementado con inhibidores de proteasas (1mM PMSF, cocktail de inhibidores de proteasas 1X). Luego de la cuantificación de proteínas por el método de micro-BCA, se diluyó el lisado con buffer de lisis hasta una concentración de 1 µg de proteína/µL de buffer.

##### *3.1.14.2. Preparación de las partículas magnéticas*

Para la inmunoprecipitación se utilizaron las partículas magnéticas *Dynabeads M-280 tosylactivated* (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones.

Se lavaron 20 µL de partículas magnéticas contenidas en un tubo de 1,5 mL con 500 µL de Buffer B (18,9 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>xH<sub>2</sub>O; 81 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x2H<sub>2</sub>O; pH 7,4). Para esto, se agregó el

buffer a las partículas, se agitó la solución en vórtex y se expuso en forma vertical a un campo magnético hasta lograr el aclaramiento del líquido (aproximadamente 2 min). Una vez que las partículas se separaron, se descartó el sobrenadante.

#### *3.1.14.3. Incubación con anticuerpo*

Se diluyó el anticuerpo primario anti-MLH1 (1,5 µg; dilución 1:333) o anti-MSH2 (1 µg; dilución 1:500) descritos en la Tabla 3.1.7.4.1 en Buffer B hasta alcanzar un volumen final de 500 µL. Se incubaron las partículas magnéticas con el anticuerpo durante 48 h a 4°C y en agitación suave.

#### *3.1.14.4. Lavado*

Se expusieron las partículas nuevamente al magneto y una vez separadas, se descartó el sobrenadante. Las partículas fueron lavadas durante 1 h con 1 mL Buffer D (Buffer de bloqueo: 0,5% BSA en PBS 1X, pH 7,4) a 37°C y en agitación suave. Una vez finalizado el bloqueo, se separaron los complejos partículas-Ac primario y se lavaron dos veces con 1 mL de Buffer C [3M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en Buffer B]. Para cada lavado, se añadió el buffer a las partículas, se agitó en vórtex, se acercó el tubo al imán y se descartó el sobrenadante.

#### *3.1.14.5. Proceso de inmunoprecipitación*

Los complejos partículas-Ac se incubaron 2 h con 500 µg de proteínas a TA en agitación lenta. Luego de la exposición al magneto, se separó el sobrenadante. Los controles negativos se realizaron incubando la muestra con partículas magnéticas no acopladas y con partículas acopladas al control de isotipo.

Posteriormente, los complejos fueron lavados dos veces con 1 mL de 1X PBS no estéril, y luego de descartar el sobrenadante, se agregaron 30 µL de buffer de muestra. Los complejos se almacenaron a -20°C hasta el momento de la electroforesis. Antes de realizar la electroforesis, la muestra se calentó durante 5 min a 95±5°C para romper la unión del Ac con las partículas magnéticas. Luego, se expuso la muestra al imán y se separó el sobrenadante (proteínas) de las partículas magnéticas para su siembra en el gel al 7% poliacrilamida-SDS. Luego de la corrida, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa. Para verificar la efectividad de la IP y evaluar las interacciones proteicas, las membranas se incubaron con los anticuerpos monoclonales hechos en ratón que reconocen: Hsp27 (1:1500), Hsp72 (1:8000), MLH1 (1:2000) y MSH2 (1:2000) descritos en la Tabla 3.1.7.4.1. Se continuó la técnica según el protocolo detallado para Western Blot (capítulo 3.1.7.4).

### 3.1.16. Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos se utilizó el programa GraphPad PRISM versión 6.01 (San Diego, CA, USA).

El test de normalidad D'Agostino-Pearson fue empleado para determinar si los valores obtenidos en cada ensayo correspondían a una distribución normal. Se aplicó el test no paramétrico Kruskal-Wallis con el post test de Dunn para evaluar la significancia de las diferencias entre los diferentes grupos experimentales. Se utilizó un intervalo de confianza de 95%, por lo tanto, una  $P < 0,05$  fue considerada estadísticamente significativa. Para el cálculo de diferencias estadísticas entre las muestras tratadas y la muestra control para apoptosis y ciclo celular se utilizó el test  $t$  de Student. En los estudios de clonogenicidad se utilizó el test  $t$  de Student para el análisis estadístico entre las muestras tratadas con H+cPt y cPt.

## 3.2. Sección II: Metodologías empleadas para los estudios en linfocitos de sangre periférica

### 3.2.1. Linfocitos de sangre periférica (LSP) de sujetos sanos y pacientes oncológicos

#### 3.2.1.1. Sujetos Sanos (controles)

Se incorporaron cinco voluntarios sanos, procedentes del Centro Científico Tecnológico (CCT) CONICET Mendoza, los cuales fueron seleccionados teniendo en cuenta los siguientes criterios de inclusión: edad entre 22 y 40 años, no fumadores y sin antecedentes familiares de cáncer. Estos requisitos fueron establecidos porque estudios previos realizados en LSP empleando la técnica de ensayo cometa, demostraron que el daño basal en el ADN aumenta con la edad, mientras que la eficiencia de los mecanismos de reparación declina [204-206]. También se ha comprobado, aunque existen controversias al respecto, que las personas que fuman presentan mayor daño basal en el ADN [207, 208].

**Tabla 3.2.1.1. Sujetos sanos participantes en el estudio.**

Control	Sexo	Edad (años)
1	F <sup>a</sup>	29
2	F	26
3	M <sup>b</sup>	28
4	F	35

5	F	30
---	---	----

(a)F: femenino. (b) M: masculino.

Se extrajeron aproximadamente 15 mL de sangre por punción venosa periférica, la cual fue anticoagulada con heparina. Las células mononucleares fueron separadas en gradiente de Histopaque® 1077 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), centrifugando la sangre durante 30 min a 1.400 rpm. Posteriormente, la capa de células mononucleares fue lavada con medio de cultivo RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 (Gibco) y criopreservada a -80°C en una mezcla que contenía 50% de SFB, 40% de medio RPMI 1640 y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma).

### 3.2.1.2. Pacientes oncológicos

El presente estudio fue aprobado por el Comité de Revisión de Actividades de Investigación del Centro Oncológico de Integración Regional (COIR) de la provincia de Mendoza. El criterio de selección para los pacientes incluyó: diagnóstico histológico y/o citológico de tumor compatible con el uso de análogos del platino, no haber recibido quimioterapia o radioterapia anteriormente, edad entre 22 y 75 años y función hepática y renal normales. En este trabajo participaron 12 pacientes oncológicos procedentes del COIR. Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado. La Tabla 3.2.1.2 resume las características de los pacientes que recibieron análogos del platino en su régimen quimioterápico y que se incorporaron al estudio. La respuesta a la quimioterapia se clasificó de la siguiente manera:

a) Respuesta Completa (RC): desaparición de las lesiones conocidas confirmada durante por lo menos 4 semanas.

b) Respuesta Parcial (RP): reducción del 50% del tamaño global de las lesiones medibles para la evaluación del efecto terapéutico durante al menos 4 semanas, sin aparición de nuevas lesiones, ni progresión de ninguna de las existentes.

c) Enfermedad Estable (EE): imposibilidad de establecer una reducción del 50% ni un aumento del 25% del volumen total de una o varias de las lesiones medibles.

d) Enfermedad Progresiva (EP): aumento  $\geq$  25% del volumen de una o varias lesiones medibles, o aparición de una o varias nuevas lesiones.

**Tabla 3.2.1.2. Características de los pacientes oncológicos participantes en el estudio**

Nº Caso	Edad (años)	Tumor	Tratamiento	Nº Ciclos	Estadío	Tamaño (cm)	RC <sup>a</sup>
1	70	Gástrico	Cisplatino/Antraciclina	4	III	NE <sup>b</sup>	EE
2	48	Pulmón	Cisplatino/Pemetrexed	4	III	6,4	RC
3	68	Pulmón	Cisplatino/Gemcitabine	3	IV	ND <sup>c</sup>	EP
4	81	Vejiga	Cisplatino/Gemcitabine	5	I	1,8	EE
5	71	Cervix	Cisplatino/Radioterapia	2	IIB	3,5	RP
6	73	Cuello y cabeza	Cisplatino/Radioterapia	2	IVB	5	P
7	60	Ovario	Carboplatino/Paclitaxel	6	IIIC	15	RC
8	54	Cervix	Cisplatino	1	IIB	7	SP
9	37	Cervix	Cisplatino/Radioterapia	2	III	3	P
10	54	Endometrio	Carboplatino/Paclitaxel	3	IV	5,5	P
11	55	Laringe	Cisplatino/Radioterapia	3	I	0,4	RP
12	63	Vejiga	Cisplatino/Radioterapia	2	III	0,6	RC

(a)RC: Respuesta clínica. EE: Enfermedad estable. EP: Enfermedad progresiva. RP: Respuesta parcial. RC: Respuesta completa. P: Pendiente. SP: Seguimiento perdido. (b)NE: No evaluable. (c): datos No Disponibles.

Se extrajeron entre 8-10 mL de sangre por punción venosa antes de la quimioterapia. La sangre heparinizada obtenida de los pacientes, fue procesada y criopreservada de igual manera que en el caso de los sujetos controles.

Las células procedentes de los sujetos controles y de los pacientes fueron descongeladas en un baño termostático a 37°C, lavadas con medio de cultivo RPMI 1640 y resuspendidas con medio RPMI 1640 suplementado con 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina, 2 mM de L-glutamina, 10% de SFB, para ser finalmente cultivadas en presencia de 5 µg/mL de fitohemaglutinina o lectin a 37°C en presencia de 5% CO<sub>2</sub>. La procedencia de todos los reactivos fue de Sigma, con excepción del SFB (Internegocios, Buenos Aires, Argentina). En un trabajo previo se determinó mediante inmunocitoquímica el tipo celular de la población leucocitaria predominante en los cultivos. Se comprobó que más del 95% las células eran Linfocitos T (CD43+) y B (CD20+) [112]. Los LSP fueron utilizados en la ejecución de los Objetivos específicos 3 y 4 de esta tesis.

### 3.2.2. Tratamientos

La droga cPt utilizada en el cultivo de LSP fue la misma que se le administró a los pacientes oncológicos en el curso de su tratamiento, procedente del Laboratorio Filaxis. En cada ensayo, la droga se disolvió en agua estéril, inmediatamente antes de su uso, hasta



obtener una solución de trabajo de concentración 10 mM. La dosis de cPt a utilizar fue determinada en LSP obtenidos de un sujeto control, los cuales fueron expuestos *in vitro* a concentraciones crecientes de la droga durante 1 h y posteriormente se evaluó viabilidad por azul de tripán y daño al ADN por ensayo cometa alcalino. En función de los resultados como así también de otros trabajos publicados en LSP expuestos *in vitro* a cPt [209-211], se eligió una dosis de trabajo de 200  $\mu$ M. A la dosis elegida, la viabilidad fue superior al 80% y el daño inducido en el ADN fue significativo, aunque sin incrementar el número de células con daño total. El tiempo de recuperación de 24 h fue establecido anteriormente por Nadin SB [212], teniendo en cuenta que los aductos inducidos por análogos del platino son de difícil remoción y su reparación puede demandar entre 24 y 48 h [198, 213, 214].

En base a estos resultados, se estableció el esquema experimental para LSP de sujetos controles y de pacientes oncológicos: 1- cisplatino (cPt) 200  $\mu$ M durante 1 h; y 2- H+cPt, cPt 200  $\mu$ M (1 h) 24 h después de una hipertermia a 42°C (1 h). Un grupo de LSP fue recolectado inmediatamente después del cPt, y los otros grupos se dejaron recuperar en medio completo fresco a 37°C durante 24 h. La tabla 3.2.2. resume el diseño experimental definitivo.

**Tabla 3.2.2: Diseño experimental para el cultivo de LSP de sujetos sanos y pacientes oncológicos**

	Grupo Control (C)	Grupo Hipertermia + Cisplatino (H+cPt)	Grupo Cisplatino (cPt)
<b>Día 1</b>			
Inicio del cultivo	Sí	Sí	Sí
<b>Día 3</b>			
Hipertermia (42°C, 1h)	-	Sí	-
<b>Día 4</b>			
Cisplatino (200 $\mu$ M, 1h)	-	Sí	Sí
Cosecha a tiempo 0 (T0) <sup>a</sup>	Sí	Sí	Sí
Recuperación (24 h a 37°C)	-	Sí	Sí
<b>Día 5</b>			
Cosecha a tiempo 24 (T24) <sup>a</sup>	-	Sí	Sí

(a) T0 y T24: tiempo en h de recuperación a 37°C luego de la exposición a cPt.

### 3.2.3. Ensayo cometa alcalino

Se llevó a cabo siguiendo los pasos descritos en el capítulo 3.1.8.

### 3.2.4. Inmunocitoquímica

Los linfocitos de sangre periférica (LSP) fueron cosechados luego de los tratamientos, lavados con 1X PBS y fijados durante 15 min con formaldehído (4% v/v en 1X PBS). Luego de un lavado, los LSP fueron resuspendidos en 100-500  $\mu$ L de 1X PBS. Los frotis se prepararon a partir de 20  $\mu$ L de la suspensión celular en portaobjetos previamente silanizados y se dejaron secar en estufa a 37°C.

#### *Día 1*

Los preparados se hidrataron con 1X PBS (5 min) y se permeabilizaron con una solución de 0,1% v/v Tritón en 1X PBS durante 5 min. Luego de 2 lavados de 5 min cada uno en 1X PBS, se procedió al bloqueo de la actividad de la enzima peroxidasa endógena con 3% peróxido de hidrógeno en 1X PBS durante 30 min. Posteriormente, las muestras se lavaron 2 veces con 1X PBS (5 min cada lavado) y se llevaron a ebullición durante 30 min en 0,01M buffer citrato (buffer citrato 0,1M, para 100 mL: 1,05 g de ácido cítrico monohidratado; 1,47 g citrato de sodio dihidratado; pH 6). Luego de 2 lavados con 1X PBS se realizó el bloqueo de sitios inespecíficos con leche descremada al 10% en agua destilada durante 30 min. Finalmente, las muestras se incubaron con el Ac primario correspondiente (anti- $\gamma$ H2AX o anti-53BP1, Tabla 3.1.7.4.1) diluido en buffer de dilución de anticuerpos (0,02 M  $\text{NaPO}_4\text{H}_2$ ; 0,15 M NaCl; 0,04% azida sódica; 1% BSA; pH 7,6), en cámara húmeda a 4°C durante toda la noche.

#### *Día 2*

Los preparados se lavaron durante 15 min en 1X PBS y se incubaron durante 45 min con el anticuerpo secundario anti-conejo y anti-ratón conjugado con biotina (catálogo BA-1400, Vector), diluido 1:100 en 1X PBS a TA y en cámara húmeda. Luego, las muestras se lavaron con 1X PBS (15 min) y se incubaron con estreptavidina (catálogo PK-6100, Vector) diluida 1:100 en 1X PBS en cámara húmeda (TA, 45 min). Los preparados se lavaron 10 min en 1X PBS y se incubaron con diaminobencidina (1:50, Vector) como sustrato cromógeno durante 10 min en cámara húmeda y oscuridad. La contratinción se realizó con verde de metilo (0,5% p/v en acetato de sodio 0,1 M, pH 4,6) durante 30 min a 56°C. Finalmente, se realizó la deshidratación y el montaje de los preparados con bálsamo de Canadá (Canadax, Biopur, Buenos Aires).

### **3.2.5. Análisis estadístico**

En el caso de las muestras de LSP, para evaluar las diferencias en la media de la migración del ADN y la expresión de  $\gamma$ H2AX o 53BP1 entre los distintos grupos experimentales, se utilizó el test Kruskal Wallis y el post-test de Dunn, comparando todos los grupos entre sí y al mismo tiempo. Para determinar las diferencias entre pacientes y sujetos controles se aplicó el test no paramétrico para muestras no apareadas de Mann-Whitney, considerando estadísticamente significativa una  $P < 0,05$ .

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS

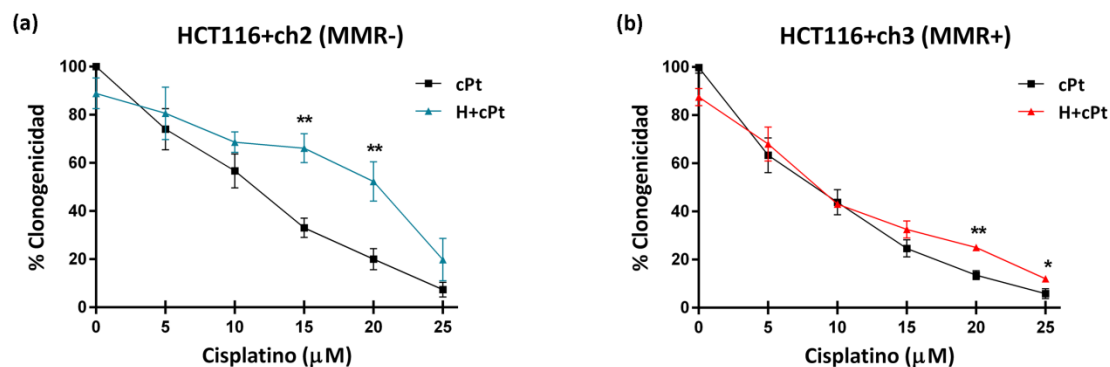
#### 4.1. Sección I: Resultados del primer objetivo específico

##### 4.1.1. Clonogenicidad de las líneas celulares HCT116, HCT116+ch2 y HCT116+ch3 luego de la exposición a cisplatino (cPt) o hipertermia+cisplatino (H+cPt)

La línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano deficiente en el sistema de reparación de bases mal apareadas HCT116+ch2 (MMR-), y la línea isogénica proficiente en el sistema MMR HCT116+ch3 (MMR+) fueron expuestas a dosis crecientes de cisplatino (cPt): 5, 10, 15, 20 y 25  $\mu\text{M}$  durante 1 h con el objeto de evaluar la capacidad de formación de colonias de estas células (Figura 4.1.1). También se evaluó el efecto del tratamiento con hipertermia (H), para lo cual otro grupo de células fue expuesto a una hipertermia 42°C durante 1 h, seguido de una recuperación a 37°C de 24 h antes del tratamiento con las dosis crecientes de cPt.

Las células MMR+ resultaron más sensibles al cPt ( $\text{IC}_{50}=10,3\pm 1,4 \mu\text{M}$ ) en comparación con las células control MMR-, HCT116+ch2 ( $\text{IC}_{50}=12,1\pm 0,9 \mu\text{M}$ ). El tratamiento con H 24 h antes del cPt aumentó la clonogenicidad a dosis mayores de cPt, tanto en las células MMR- como MMR+. Las células HCT116+ch2 expuestas a la H resultaron 1,42 veces más resistentes al cPt ( $\text{IC}_{50}=17,6\pm 2,1 \mu\text{M}$ ; Figura 4.1.1.b), siendo este incremento de clonogenicidad estadísticamente significativo con dosis de 15 y 20  $\mu\text{M}$  de cPt. En el caso de células MMR+, la H no afectó el número de colonias a concentraciones por debajo de 10  $\mu\text{M}$ , mientras que incrementó la resistencia a concentraciones superiores de la droga ( $\text{IC}_{50}=11,5\pm 1,9 \mu\text{M}$ ; Figura 4.1.1.c), siendo esta diferencia entre los tratamientos estadísticamente significativa a 20 y 25  $\mu\text{M}$  de cPt.

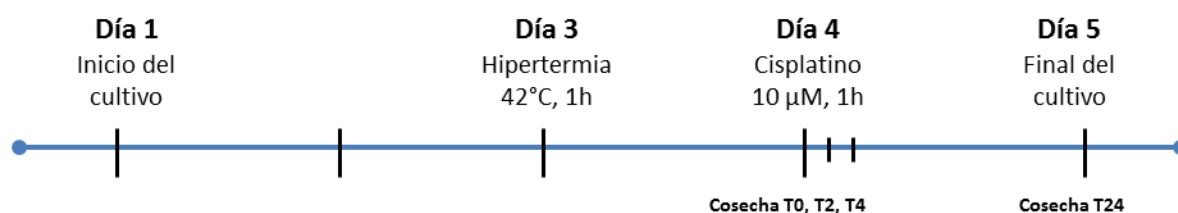
*De estos resultados se desprende que la hipertermia favoreció la clonogenicidad de células deficientes en el sistema de reparación MMR tratadas con cisplatino. Las células MMR proficientes resultaron más sensibles a ambos tratamientos en relación a las células MMR deficientes.*



**Figura 4.1.1. Curvas de clonogenicidad de las líneas celulares de cáncer de colon humano MMR- y MMR+ expuestas a cisplatino (cPt) e hipertermia+cisplatino (H+cPt).** La figura muestra el porcentaje de formación de colonias de las células (a) HCT116+ch2 y (b) HCT116+ch3 luego de 1 h de tratamiento con 5, 10, 15, 20 y 25 µM de cPt (cuadrados negros) o del tratamiento con H a 42°C, 24 h antes de las exposición a cPt (triángulos de color). Cada punto representa la media ± error estándar de la media (EE) de tres experimentos realizados por duplicado. Para el análisis estadístico se utilizó el test *t* de Student. \**P*<0,05; \*\**P*<0,01.

Para la concreción de los procedimientos experimentales posteriores, se decidió trabajar con la concentración IC<sub>50</sub> de cPt de las células MMR+, que fueron más sensibles a la droga.

A continuación se muestra un esquema del protocolo experimental aplicado con las abreviaciones utilizadas en la sección de resultados.



**Tratamientos**

C control 37°C

H células expuestas sólo a hipertermia

cPt células expuestas sólo a cisplatino

H+cPt células expuestas a hipertermia 24 h antes del cisplatino

**Tiempos de Recolección**

T0 cosecha inmediatamente finalizado el tratamiento con cisplatino

T2 cosecha luego de 2 h de recuperación del cisplatino

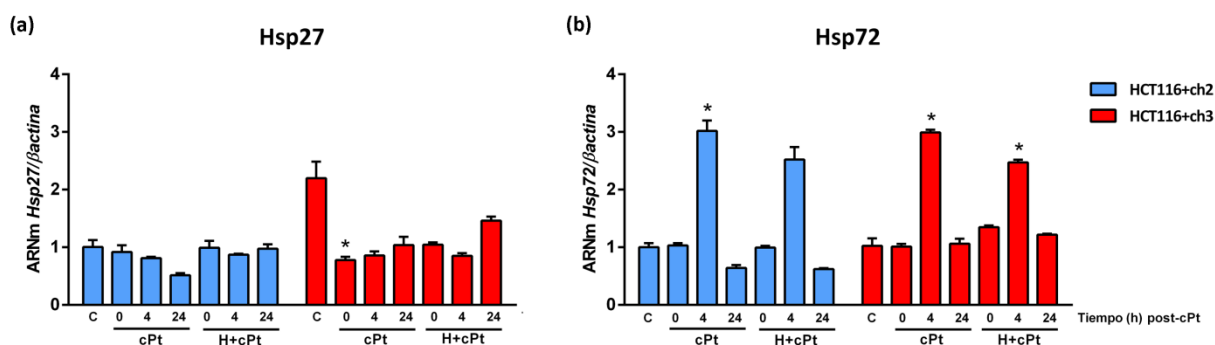
T4 cosecha a las 4 h de recuperación del cisplatino

T24 cosecha a las 24 h de recuperación del cisplatino

#### 4.1.2. Efecto del tratamiento cPt e H+cPt en la expresión de *Hsp27* (*HSPB1*) y *Hsp72* (*HSPA1A*) en células MMR- y MMR+

Las proteínas de golpe de calor (HSPs) son inducidas en la célula bajo condiciones de estrés. En caso de la exposición a agentes genotóxicos, se ha observado que *Hsp27* y *Hsp72* son capaces de translocarse al núcleo, y colocalizar con proteínas de reparación del ADN. Por este motivo, se estudió la expresión de estas chaperonas luego de un tratamiento con cPt o H+cPt en un contexto celular MMR deficiente y proficiente. Luego de los tratamientos mencionados, se evaluaron los niveles de expresión de ARNm a través de la técnica de RT-PCR en tiempo real. No se observaron cambios estadísticamente significativos en la expresión de *Hsp27* a nivel de ARNm en la línea celular HCT116+ch2 luego de los tratamientos. Llamativamente, la expresión basal de *Hsp27* fue mayor en las células HCT116+ch3 (MMR+), descendiendo en forma significativa inmediatamente después del tratamiento con cPt. Este descenso de ARNm de *Hsp27* se mantuvo estable a las 4 y 24 h del tratamiento con la droga. Los valores de expresión de *Hsp27* alcanzados como consecuencia del cPt en las células MMR+ fueron similares a los niveles de *Hsp27* en la línea MMR- (Figura 4.1.2.a).

A diferencia de lo observado para *Hsp27*, los niveles de expresión génica de *Hsp72* se incrementaron significativamente 4 h después del tratamiento con cPt en ambos grupos experimentales (cPt o H+cPt), tanto en células MMR- como MMR+. Luego de 24 h de recuperación, la expresión de *Hsp72* se redujo prácticamente al valor basal en ambas líneas celulares MMR- y MMR+ (Figura 4.1.2.b).



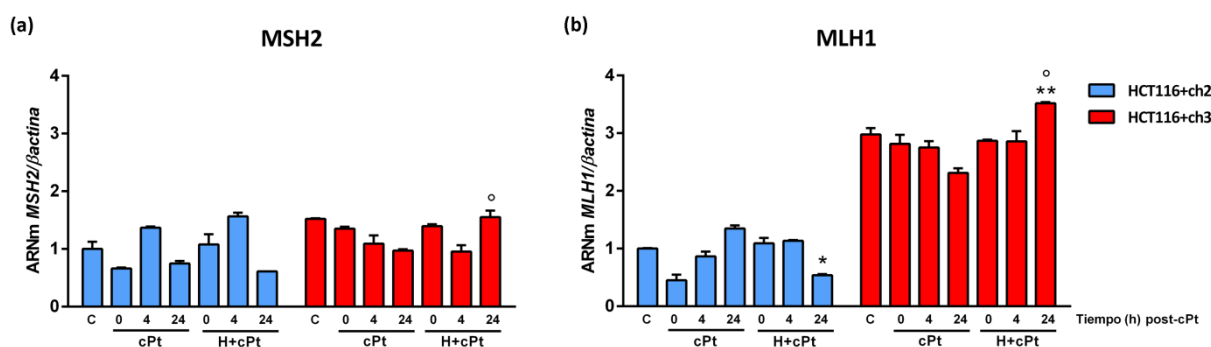
**Figura 4.1.2. Efecto del tratamiento con cisplatino (cPt) o hipertermia+cisplatino (H+cPt) en la expresión génica de *Hsp27* y *Hsp72* en células tumorales de colon HCT116 (MMR-) y HCT116+ch3 (MMR+).** Las células fueron tratadas con cPt solo (10  $\mu$ M, 1 h) o con hipertermia (42°C, 1h) 24 h antes de cPt (H+cPt). Las células se recolectaron a las 0, 4 y 24 h de finalizado el tratamiento. Cuantificación de ARNm en base al método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  de (a) *Hsp27* y (b) *Hsp72*. Las barras representan la media $\pm$ EE. Las diferencias estadísticas fueron calculadas con respecto al grupo control no tratado (C=37°C) de cada línea celular. Se aplicó el test no paramétrico Kruskal-Wallis con el post-test de Dunn. \*P<0,05.

En base a los datos obtenidos se verificó que el tratamiento con hipertermia no indujo cambios en la expresión a nivel de ARNm de *Hsp27* y *Hsp72* de células MMR-/+ tratadas con cisplatino.

#### 4.1.3. Efecto de la hipertermia en la expresión génica de *MSH2* y *MLH1* en células MMR- y MMR+ expuestas a cPt

En las células tumorales MMR-, la expresión génica de *MSH2* mostró un ligero incremento a las 4 h de finalizada la exposición al cPt (grupos cPt e H+cPt). Por el contrario, en la línea celular HCT116+ch3 (MMR+), el nivel de ARNm de *MSH2* disminuyó a las 4 h del cPt (grupos cPt o H+cPt). Luego de 24 h de recuperación, las células MMR- expuestas solo a cPt mostraron una menor expresión de *MSH2* con respecto al control (Figura 4.1.3.a).

Un comportamiento diferente se verificó para *MLH1*. Tanto su expresión basal como la observada luego de los tratamientos con cPt e H+cPt, fue superior en la línea MMR+ respecto a la línea celular MMR-. Esta diferencia resultó estadísticamente significativa 24 h después del tratamiento con H+cPt. Por otra parte, en la línea celular MMR-, la expresión de *MLH1* se redujo luego de 24 h de recuperación en el grupo H+cPt, comportamiento similar al observado para *MSH2* (Figura 4.1.3.b).



**Figura 4.1.3. Efecto de la exposición al cisplatino (cPt) o hipertermia+cisplatino (H+cPt) en la expresión a nivel de ARNm de *MSH2* y *MLH1* en células tumorales de colon HCT116+ch2 (MMR-) y HCT116+ch3 (MMR+).** Las células fueron tratadas con cPt solo (10 μM, 1 h) o con hipertermia (42°C, 1h) 24 h antes de cPt (H+cPt). Las mismas fueron recolectadas a las 0, 4 y 24 h de finalizado el tratamiento con la droga. Cuantificación de ARNm en base al método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  de (a) *MSH2* y (b) *MLH1*. Las barras representan la media ± EE. Las diferencias estadísticas fueron calculadas con respecto al grupo control (C=37°C) de cada línea celular (\*) y entre líneas celulares (°). Se aplicó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis con el post-test de Dunn. \*P<0,05; \*\*P<0,01.

*Los resultados obtenidos determinaron que el tratamiento con hipertermia previa al cPt indujo una expresión diferencial de MLH1 entre las líneas celulares MMR- y MMR+ luego de 24 h de recuperación. Se observó una menor expresión de ARNm en las células MMR- y una mayor expresión en las células MMR+ en relación al control.*

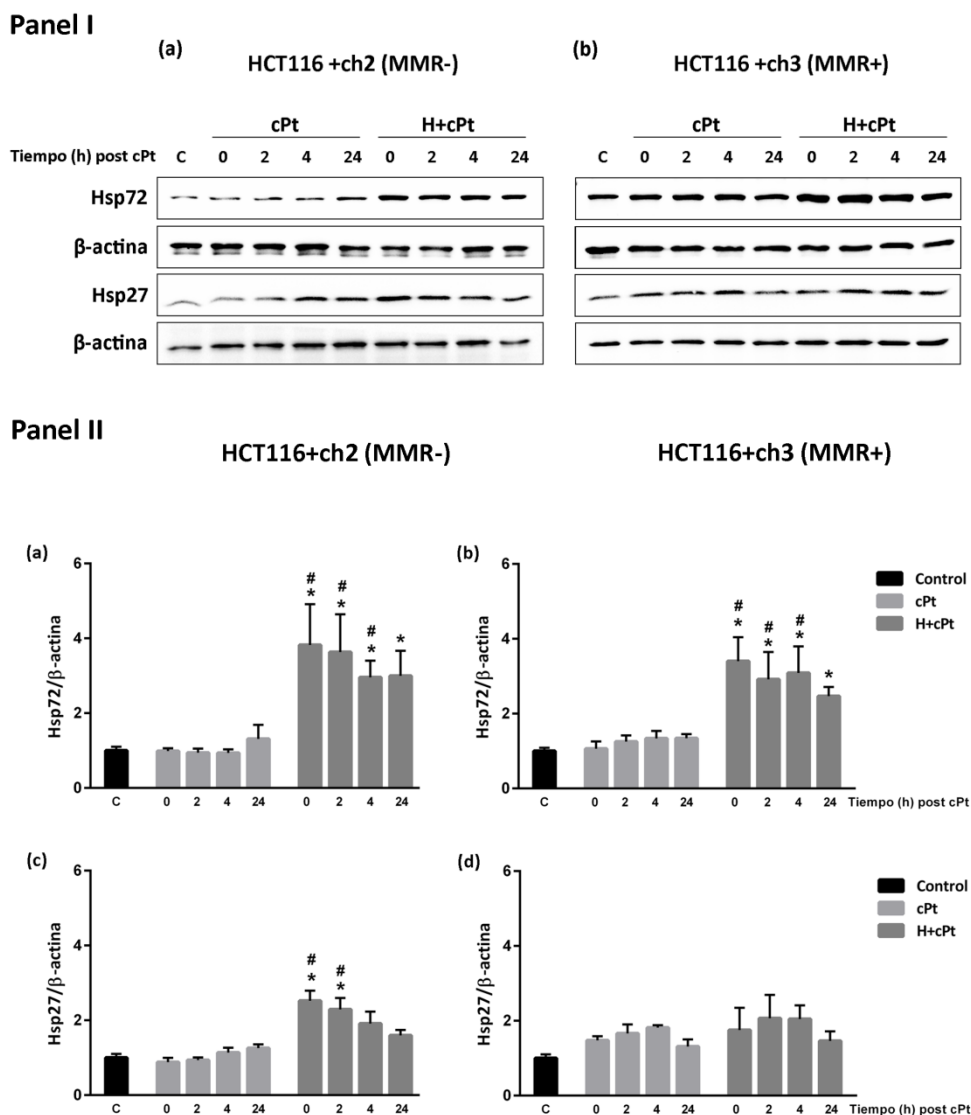
#### **4.1.4. Efecto del tratamiento cPt e H+cPt en la expresión de las proteínas Hsp27 y Hsp72 en líneas celulares MMR- y MMR+**

Luego de estudiar la expresión de las proteínas de golpe de calor Hsp27 y Hsp72 a nivel de ARNm, la misma fue analizada a nivel proteico por medio de western blot (Figura 4.1.4.Panel I). Se observó que la expresión constitutiva de ambas HSPs fue inferior en la línea celular HCT116+ch2 (MMR-) en relación a la que la línea celular HCT116+ch3 (MMR+).

Luego del tratamiento con cPt y tras los periodos de recuperación, no se observaron cambios en la expresión de Hsp72 en las líneas celulares MMR-/+. Si bien la línea HCT116+ch2 presentó un leve aumento de Hsp72 24 h del tratamiento concPt, este cambio no resultó estadísticamente significativo (Figura 4.1.4.Panel II.a). El tratamiento con calor 24 h antes de la exposición al cPt, incrementó significativamente la expresión de Hsp72 en las dos líneas celulares a T0 (inmediatamente después de la exposición a cPt) en relación al control, aunque la inducción de esta proteína fue levemente superior en la línea celular HCT116+ch2 (Figura 4.1.4.Panel II.a-b). La expresión de Hsp72 en el grupo H+cPt también fue significativamente superior en relación al grupo tratado sólo con cPt a las 0, 2 y 4 h de recuperación. La expresión de la proteína se redujo ligeramente en el grupo H+cPt, en las 24 h posteriores al tratamiento con la droga (Figura 4.1.4.Panel II.a-b).

En el caso de Hsp27, el tratamiento con cPt incrementó levemente su expresión luego de 4 y 24 h de recuperación. La expresión de Hsp27 se incrementó en el grupo de células tratadas con H+cPt, resultando estadísticamente significativa en la línea celular HCT116+ch2 (Figura 4.1.4.Panel II.c). Como se observó para Hsp72, la inducción de Hsp27 fue mayor en las líneas celulares MMR- que presentaban menor expresión basal en relación a la línea MMR+. En las células HCT116+ch2, se verificaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos cPt e H+cPt a T0 y T2. Al igual que lo descripto anteriormente para Hsp72, la expresión de Hsp27 inducida por el tratamiento H+cPt se redujo en las dos líneas celulares estudiadas, luego de 24 h de recuperación post-cPt (Figura 4.1.4.Panel II.c-d).





**Figura 4.1.4. Panel I. Inmunoblots para Hsp27 y Hsp72 de células de cáncer de colon MMR-/+ tratadas con cisplatino (cPt) o hipertermia+cisplatino (H+cPt).** Las células fueron expuestas a cPt solo (10  $\mu$ M, 1 h) o hipertermia (42°C, 1h) 24 h antes del cPt (H+cPt). Las células se recolectaron a las 0, 2, 4 y 24 h de finalizado el tratamiento con cPt. Imágenes representativas de los western blot para Hsp72 y Hsp27 en células MMR-, HCT116+ch2 (a) y células MMR+, HCT116+ch3 (b). Se sembraron 20  $\mu$ g de proteínas totales en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 10%. Se utilizó  $\beta$ -actina como control de carga. **Panel II. Cuantificación de los inmunoblots.** Los gráficos corresponden a los valores de densidad óptica obtenidos a partir del análisis de los inmunoblots para Hsp72 (a, b) y Hsp27 (c, d) normalizadas a la  $\beta$ -actina en células HCT116+ch2 y HCT116+ch3. Las diferencias estadísticas fueron calculadas con respecto al grupo control no tratado (C=37°C, \*) y entre tratamientos (cPt e H+cPt, #) de cada línea celular utilizando el test no paramétrico Kruskal-Wallis y Dunn considerando estadísticamente significativa \*#P<0,05. Las barras representan la media $\pm$ EE.

*Los datos obtenidos indican que la hipertermia previa al cPt incrementó en forma significativa la expresión de Hsp72 en ambas líneas celulares de colon, independientemente del sistema MMR. No obstante, la inducción de Hsp27 resultó significativa únicamente en las células MMR- tratadas con H+cPt.*

#### **4.1.5. Efecto de la hipertermia en la expresión de las proteínas de reparación MSH2, MLH1 y ERCC1 en células tumorales de colon MMR- y MMR+ expuestas a cPt**

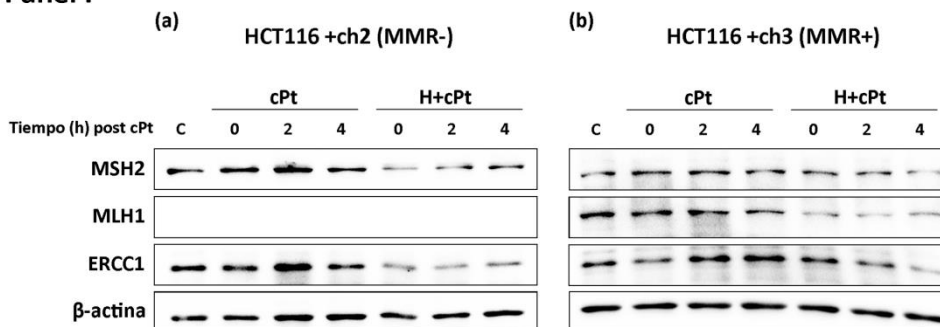
La expresión proteica de MSH2 y MLH1, componentes del sistema MMR, y de ERCC1, perteneciente al sistema NER, fue evaluada mediante inmunoblot. Tal como se describió en el capítulo Introducción (1.5.2), tanto el sistema MMR como el sistema NER intervienen en la respuesta al daño en el ADN inducido por cPt, siendo éste último el principal mecanismo que posee la célula para remover los aductos de cPt. Si bien este estudio se ha focalizado en proteínas del sistema MMR, es necesario tener en cuenta que otros factores de reparación del ADN también pueden intervenir y ser afectados por los tratamientos. Por este motivo, se incluyó en este estudio la expresión de ERCC1, una enzima específica del sistema NER. Luego de los tratamientos experimentales, las células fueron recolectadas inmediatamente finalizado el tratamiento, a las 2, 4 y 24 h de la exposición al cPt (T0, T2, T4 y T24 respectivamente) para realizar la lisis celular.

Como se puede observar en el Panel I de la figura 4.1.5, el tratamiento con cPt no modificó la expresión de MSH2 en ninguno de los tiempos estudiados para la línea celular MMR- (Figura 4.1.5.Panels II.a). No obstante, en la línea celular MMR+ se detectó un leve incremento en la expresión de MSH2 luego del tratamiento con cPt pero sin significancia estadística (Figura 4.1.5.Panels II.b). Sin embargo, en las células MMR- pretratadas con H (42°C, 1h) 24 h antes del cPt, se observó una significativa reducción en la expresión de MSH2 a T0 (inmediatamente finalizado el tratamiento con cPt) con respecto al grupo control y al tratado sólo con cPt.

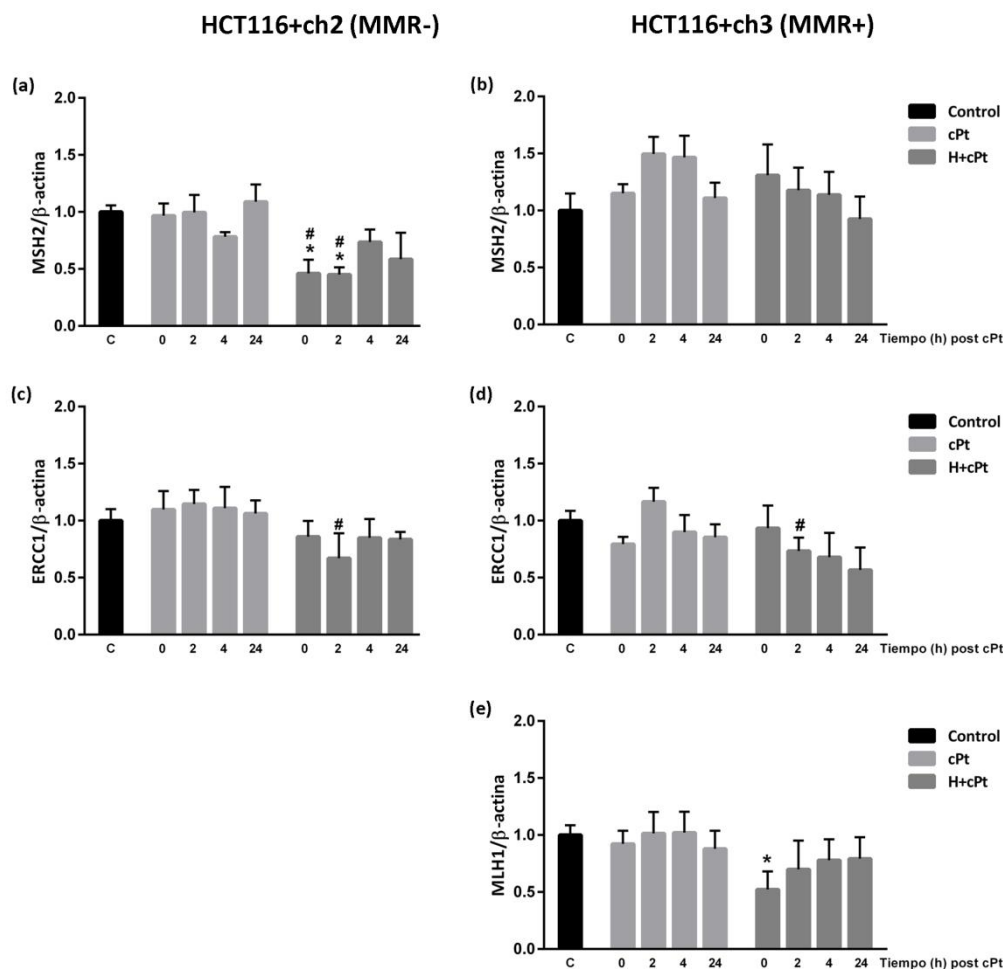
Dado que la línea celular HCT116+ch2 presenta una mutación en el gen *MLH1* que da origen a una forma truncada no funcional de la proteína MLH1, por inmunoblot sólo se pudo detectar la forma salvaje de la proteína MLH1 presente en la línea celular HCT116+ch3 (Figura 4.1.5. Panel I.b). En estas células MMR+, la expresión de MLH1 disminuyó significativamente inmediatamente finalizado el tratamiento H+cPt (Figura 4.1.5. Panel II.e). Posteriormente, se observó una tendencia a reestablecer los niveles de MLH1 a partir de las 4 h de recuperación post H+cPt.

En el caso de ERCC1, el tratamiento con cPt no indujo cambios estadísticamente significativos en las células MMR-/+. No obstante, la expresión de esta proteína se modificó una vez finalizado el tratamiento con H+cPt, principalmente en las células MMR-, observándose una disminución significativa en células HCT116+ch2 a T2 (Figura 4.1.5.Panel II.c) Las células MMR+ expuestas a H+cPt, también mostraron una reducción sostenida en la expresión de ERCC1 a partir de las 2 h de extraída la droga (Figura 4.1.5.Panel II.d).

**Panel I**



**Panel II**

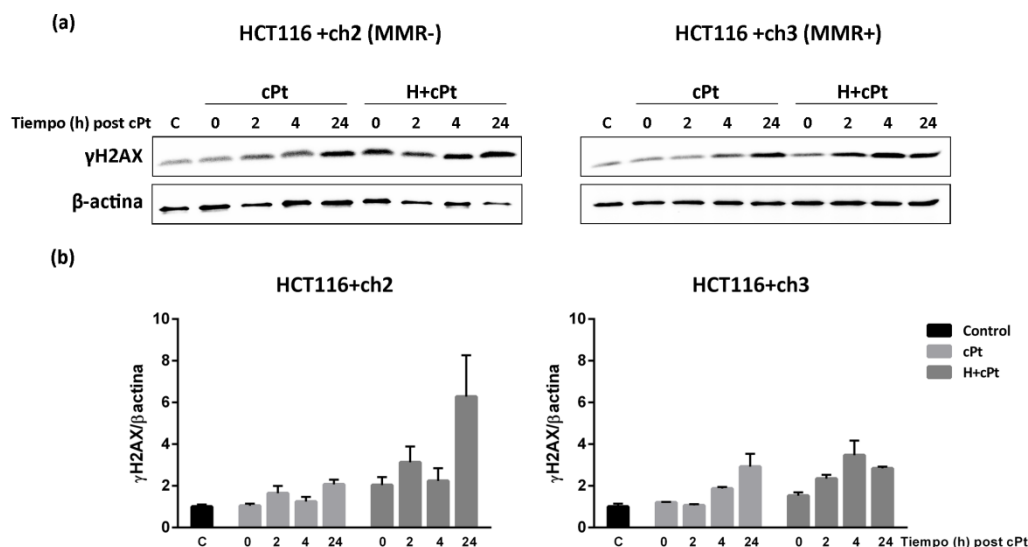


**Figura 4.1.5. Panel I. Inmunoblots para las proteínas MSH2, MLH1 y ERCC1 en células tumorales de colon MMR-/+ expuestas a cisplatino (cPt) o hipertermia+cisplatino (H+cPt).** Las células fueron tratadas con cPt solo (10  $\mu$ M, 1 h) o con hipertermia (42°C, 1h) 24 h antes del cPt (H+cPt), y fueron recolectadas posteriormente a las 0, 2, 4 y 24 h de finalizado el tratamiento con cPt. Imágenes representativas de los western blot de MSH2, MLH1 y ERCC1 en células MMR-, HCT116+ch2 **(a)** y células MMR+, HCT116+ch3 **(b)**. Se sembraron 20  $\mu$ g de proteínas totales en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 7,5%. Se utilizó  $\beta$ -actina como control de carga. **Panel II. Cuantificación de inmunoblots.** Los gráficos corresponden a la cuantificación de los inmunoblots mediante densidad óptica de las bandas MSH2 **(a, b)** y ERCC1 **(c, d)** en células HCT116+ch2 y HCT116+ch3, y de las bandas MLH1 **(e)** en células HCT116+ch3, normalizadas con respecto a  $\beta$ -actina. Las diferencias estadísticas fueron calculadas con respecto al grupo control no tratado (C=37°C, \*) y entre tratamientos (cPt e H+cPt, #) para cada línea celular utilizando el test no paramétrico Kruskal-Wallis y Dunn considerando estadísticamente significativa <sup>\*#</sup>P<0,05. Las barras representan la media $\pm$ EE.

*Los resultados de esta sección determinaron que la hipertermia previa al cPt redujo la expresión de las proteínas de reparación de MSH2 y ERCC1 en células MMR deficientes. Por otra parte, mientras que en las células MMR proficientes la expresión de MSH2 no se modificó, pero sí disminuyeron los niveles de expresión proteica de MLH1 y ERCC1.*

#### 4.1.6. Efecto de la hipertermia en el daño en el ADN inducido por cPt en células MMR- y MMR+

Una vez finalizado el tratamiento con cPt, las tres líneas celulares fueron recolectadas a las 0, 2, 4 y 24 h del mismo. Se evaluó por inmunoblot la fosforilación en el residuo serina 139 de la proteína H2AX ( $\gamma$ H2AX). Esta modificación post-traducciona l constituye un marcador de rupturas de doble cadena en el ADN, ampliamente utilizado para el estudio del daño y reparación del ADN. En las células tratadas sólo con cPt, se observó un incremento progresivo en la fosforilación de H2AX que alcanzó un pico a las 24 h de recuperación. En las dos líneas celulares, independientemente de la proficiencia del sistema MMR, el grupo tratado con H+cPt, mostró mayor expresión de  $\gamma$ H2AX que el grupo expuesto sólo a cPt. En las células MMR-, la fosforilación de H2AX continuó incrementándose hasta las 24 h posteriores al tratamiento H+cPt, mientras que en la línea MMR+ tratada con H+cPt, los niveles de  $\gamma$ H2AX se mantuvieron estables (Figura 4.1.6).

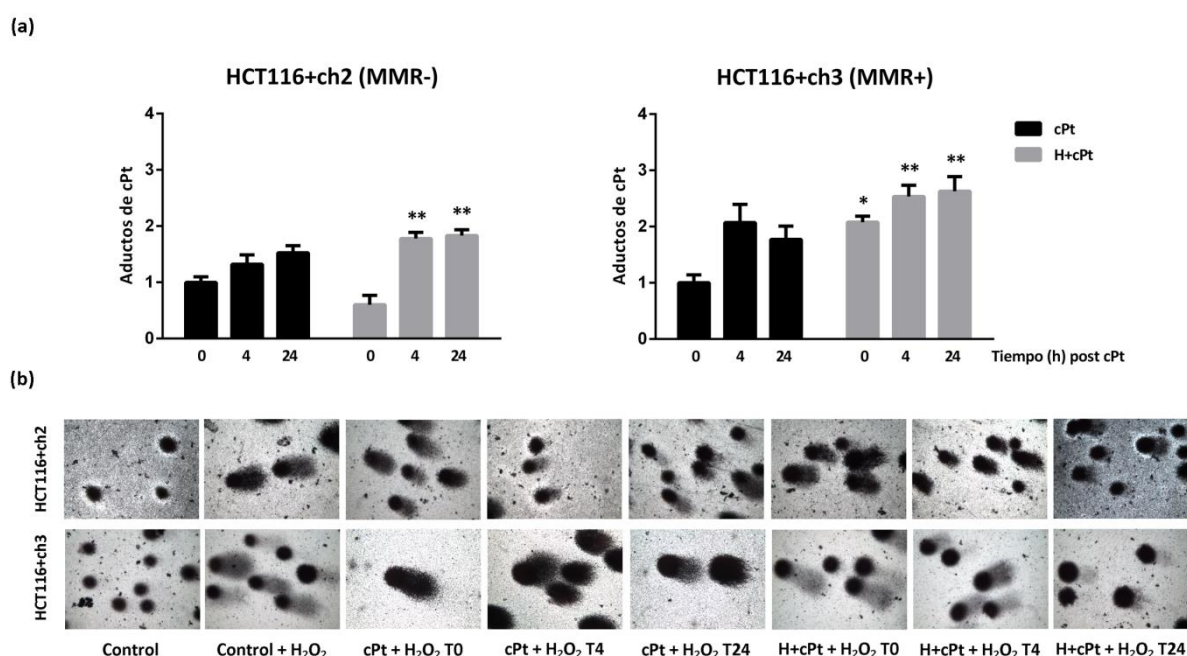


**Figura 4.1.6. Efecto del tratamiento con cisplatino (cPt) o hipertermia+cisplatino (H+cPt) en la expresión de γH2AX en líneas celulares tumorales de colon HCT116+ch2 (MMR-) y HCT116+ch3 (MMR+).** Las células fueron tratadas con cPt solo (10 μM, 1 h) o con hipertermia (42°C, 1h) 24 h antes del cPt (H+cPt). Las células se recolectaron a las 0, 2, 4 y 24 h de finalizado el tratamiento. Se sembraron 20 μg de proteínas totales en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 12%. **(a)** Imágenes representativas de los western blot de H2AX fosforilada (γH2AX) en células MMR- y MMR+. **(b)** Gráficos correspondientes a la cuantificación de los inmunoblots mediante densidad óptica de las bandas γH2AX normalizadas a la β-actina. Las diferencias estadísticas fueron calculadas con respecto al grupo control no tratado (C=37°C) de cada línea celular utilizando el test no paramétrico Kruskal-Wallis. Las barras representan la media±EE.

*Estos resultados determinaron que la hipertermia incrementó en forma no significativa el daño al ADN inducido por el cisplatino en las células tumorales de colon, independientemente de la funcionalidad del sistema MMR.*

#### 4.1.7. Efecto de la hipertermia en la formación de aductos de cPt en el ADN de células MMR- y MMR+

El ensayo cometa alcalino, también conocido como electroforesis en gel de células individuales, se utilizó para estudiar el daño en el ADN inducido por cPt e H+cPt. El cPt es una droga que produce enlaces cruzados con el ADN, originando su compactación. Por esta razón, para poder visualizar el daño en el ADN inducido por aductos de cPt a través del ensayo cometa alcalino, se necesita un segundo agente capaz de generar fragmentación. Para ello, se emplea peróxido de hidrógeno, de modo tal que una reducción en la longitud de la cola del cometa (menor migración electroforética), en relación a la muestra tratada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, es indicativo de la presencia de aductos de cPt. La evaluación de los cometas se llevó a cabo mediante score visual de la migración del ADN y la cuantificación de aductos de Pt se realizó según la fórmula propuesta por Arora S. y colaboradores [198] descrita en el Capítulo 3.8 de Materiales y Métodos.



**Figura 4.1.7. Daño en el ADN inducido por cisplatino (cPt) o hipertermia+cisplatino (H+cPt) en células tumorales de colon MMR-/+ mediante ensayo cometa alcalino.** Las células fueron tratadas con cPt (10  $\mu$ M, 1 h) o con hipertermia (42°C, 1 h) 24 h antes de la exposición al cPt (H+cPt). Las células fueron recolectadas inmediatamente después de finalizado el tratamiento con cPt (T0), y a las 4 y 24 h de la exposición a la droga (T4 y T24, respectivamente). **(a)** Gráficos correspondientes a la cuantificación de aductos de cPt en las líneas celulares MMR- (HCT116+ch2) y MMR+ (HCT116+ch3). Las diferencias estadísticas fueron calculadas con respecto al grupo tratado solo con cPt a T0 mediante los test Kruskal-Wallis y Dunn. \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001. Las barras representan la media $\pm$ EE. **(b)** Imágenes representativas de los cometas de muestras control sin tratar (37°C), control y muestras experimentales (cPt e H+cPt) expuestas con un segundo agente capaz de fragmentar el ADN (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Observe la diferencia de la extensión de las colas de los cometas entre las muestras control y control+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, así como también entre H+cPt T0 y cPt T0. Todas las fotos fueron tomadas con un objetivo de 60X.

La figura 4.1.7.a. muestra los gráficos de barra correspondientes a la cuantificación de aductos de cPt, donde puede apreciarse en las dos líneas celulares un incremento en el contenido de aductos en el ADN a lo largo del tiempo. Esta observación se corresponde con la cinética de formación de enlaces cruzados de esta droga, ya que se ha reportado que los aductos de cPt pueden continuar formándose hasta 6 h después de la exposición a la droga [198, 213, 214]. En las líneas MMR deficientes no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos cPt e H+cPt a nivel del daño al ADN inmediatamente después de finalizar el tratamiento. Sin embargo, sí se observó un aumento significativo en la cantidad de aductos en el ADN entre los grupos cPt e H+cPt cuando las células MMR- fueron analizadas a las 4 y 24 h post-cPt. La aplicación de una hipertermia 24 h antes del cPt potenció la genotoxicidad de la droga evidenciado por un aumento significativo en el porcentaje de aductos en las células con un sistema MMR funcional en todos los tiempos experimentales (T0, T4 y T24). En general, el efecto de la hipertermia en la formación de aductos de cPt se observó tanto en células MMR+ como MMR-, no obstante, resultó mayor en la línea más sensible al cPt (MMR+).

*En concordancia con el resultado de la sección 4.1.6, la hipertermia previa al cisplatino incrementó el daño al ADN, en este caso medido como contenido de aductos de cPt-ADN, independientemente de la proficiencia del sistema MMR.*

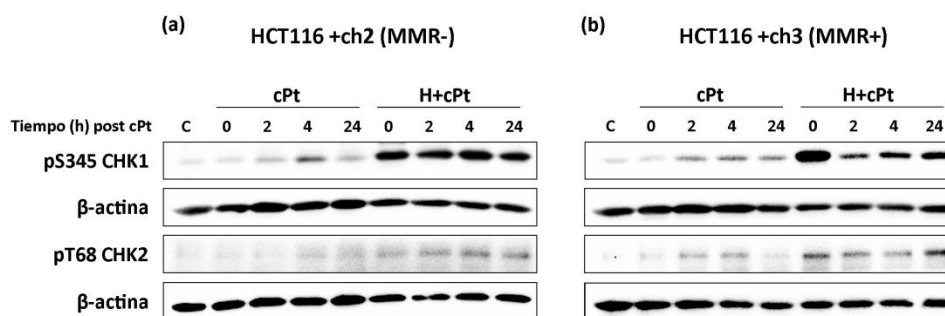
#### **4.1.8. Expresión de fosfo-CHK1 y fosfo-CHK2 luego de la exposición a cPt e H+cPt en células tumorales de colon MMR-/+**

Las proteínas CHK1 y CHK2 intervienen en los puntos de control del ciclo celular y son fosforiladas en residuos específicos en respuesta del daño al ADN. En este trabajo se estudió por inmunoblot la fosforilación en Serina 345 (pS345) y Treonina 68 (pT68) de CHK1 y CHK2, respectivamente.

En la figura 4.1.8. se puede ver la fosforilación de CHK1 tras la exposición al cPt en las dos líneas celulares, haciéndose más evidente a partir de las 2 h de recuperación. Sin embargo, la fosforilación de CHK1 fue superior en las células que fueron expuestas a una hipertermia antes del cPt (H+cPt). En la línea HCT116+ch2 (MMR-), la fosforilación de CHK1 se mantuvo constante con el transcurso del tiempo de recuperación, mientras que en las células MMR+ se evidenció un pico de pS345 CHK1 inmediatamente después de la exposición a H+cPt. Si bien en las células MMR+ tratadas con H+cPt, CHK1 permaneció fosforilada a las 2, 4 y 24 h

de recuperación, los niveles de pS345 CHK1 fueron menores que a tiempo 0, pero superiores a los observados en el grupo de células que recibieron sólo cPt.

Los efectos del cPt en la fosforilación de CHK2 resultaron más evidentes en el grupo de células MMR+ tratadas con H+cPt, donde pudo verificarse la activación de CHK2, especialmente a las 24 h de recuperación.



**Figura 4.1.8.** Efecto del tratamiento con cisplatino (cPt) o hipertermia+cisplatino (H+cPt) en la fosforilación de CHK1 (pS345) y CHK2 (pT68) en células tumorales de colon HCT116+ch2 (MMR-) y HCT116+ch3 (MMR+). Las células fueron expuestas a cPt (10 µM, 1 h) o a hipertermia (42°C, 1h) 24 h antes del cPt (H+cPt) y recolectadas a las 0, 2, 4 y 24 h de finalizado el tratamiento. Se sembraron 40 µg de proteínas totales en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 10%. La figura contiene imágenes representativas de los inmunoblot de pS345 CHK1 y pT68 CHK2 en líneas celulares (a) HCT116+ch2 y (b) HCT116+ch3. Note la inducción de la fosforilación de CHK1 y CHK2 luego del tratamiento combinado H+cPt en las dos líneas celulares.

*Los resultados obtenidos de esta sección demuestran que el tratamiento con hipertermia, 24 h antes del cisplatino, favoreció la activación CHK1 y CHK2 en células MMR- y MMR+.*

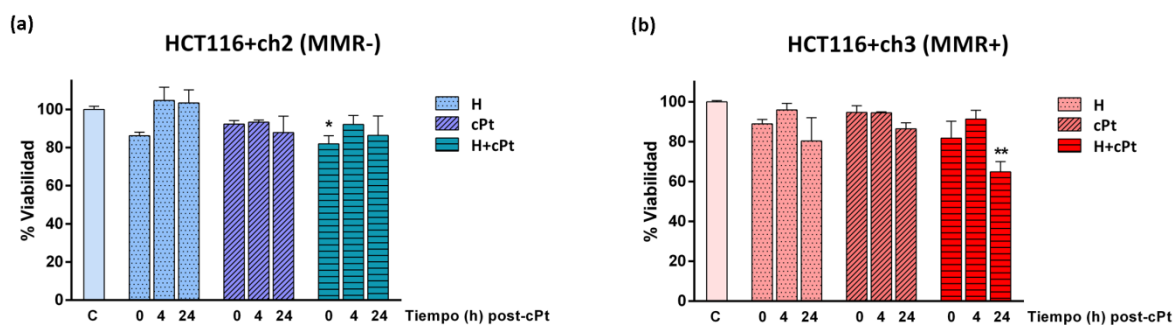
#### 4.1.9. Efecto del tratamiento cPt e H+cPt en la viabilidad de líneas celulares tumorales de colon humano MMR- y MMR+

La viabilidad de las células fue evaluada mediante el ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) luego de la exposición a hipertermia (H), cisplatino (cPt) e hipertermia+cisplatino (H+cPt). En este ensayo se estudió adicionalmente el efecto de la hipertermia, para descartar que una disminución de la viabilidad del tratamiento combinado H+cPt fuera debido a una reducción de células viables o del número de células luego del tratamiento hipertérmico.

La hipertermia causó una disminución en la viabilidad celular, en mayor proporción en la línea celular MMR- a T0, si bien los cambios no fueron estadísticamente significativos (Figura 4.1.9.). El tratamiento con cPt no afectó el número de células viables en ninguna de las



dos líneas celulares. Sin embargo, el tratamiento con hipertermia 24 h antes del cPt (H+cPt) indujo una disminución en la viabilidad en células MMR- y MMR+. En las células MMR-, la viabilidad se redujo significativamente a un 80% inmediatamente finalizado el tratamiento (T0), pero luego se incrementó un 10% con el transcurso de la recuperación. En este ensayo las células MMR+ resultaron ser más sensibles al tratamiento H+cPt, dado que la viabilidad se redujo al 65% 24 h después del cPt (P<0,01).



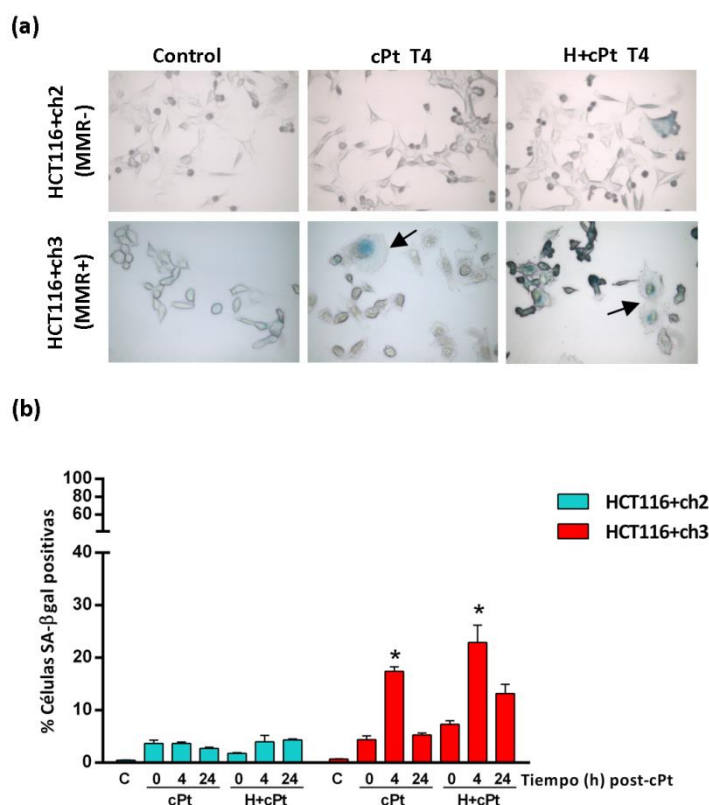
**Figura 4.1.9. Determinación de la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT en las líneas celulares HCT116+ch2 y HCT116+ch3 expuestas a cisplatino (cPt) o hipertermia+cisplatino (H+cPt).** Las células fueron tratadas con hipertermia (H) a 42°C durante 1 h, cPt (10 µM, 1 h) o con hipertermia 24 h antes de la exposición al cPt (H+cPt). Las células fueron recolectadas inmediatamente después de finalizado el tratamiento con cPt, y a las 4 y 24 h de la exposición a la droga. Gráficos correspondientes al porcentaje de viabilidad en las líneas celulares **(a)** HCT116+ch2 y **(b)** HCT116+ch3. Las mediciones de absorbancia fueron normalizadas a la muestra control sin tratar (C=37°C). Las diferencias estadísticas fueron calculadas con respecto al grupo control mediante los test Kruskal-Wallis y Dunn. \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001. Las barras representan la media±EE.

*Los datos obtenidos indican que la aplicación de una hipertermia antes del cisplatino aumentó la sensibilidad de las células con un sistema MMR proficiente, disminuyendo un 35% su viabilidad.*

#### 4.1.10. Porcentaje de células senescentes inducido por cPt o H+cPt en células tumorales MMR- y MMR+

La detección inmunocitoquímica de la actividad β-galactosidasa asociada a la senescencia (SA-βgal) es una técnica simple y rápida que permite estudiar la senescencia *in situ*. Una vez finalizados los tratamientos experimentales, las células fueron fijadas y teñidas a las 0, 4 y 24 h post-cPt (Figura 4.1.10). En las líneas celulares MMR- se detectó un leve incremento en el porcentaje de células con tinción positiva (<6%) luego de los tratamientos, aunque los cambios observados no fueron estadísticamente significativos. No obstante, el proceso de senescencia se indujo en mayor proporción en las células HCT116+ch3 con un

sistema de reparación MMR funcional (Figura 4.1.10.b). Si bien el incremento de células con tinción positiva se observó en todos los tiempos experimentales respecto a las células control, los aumentos significativos se verificaron especialmente a las 4 h de finalizados los tratamientos cPt (17%) e H+cPt (22%). Finalmente, una hipertermia 24 h antes del cPt (H+cPt) potenció el porcentaje de células senescentes inducido por la droga (cPt) en todos los tiempos de recuperación.

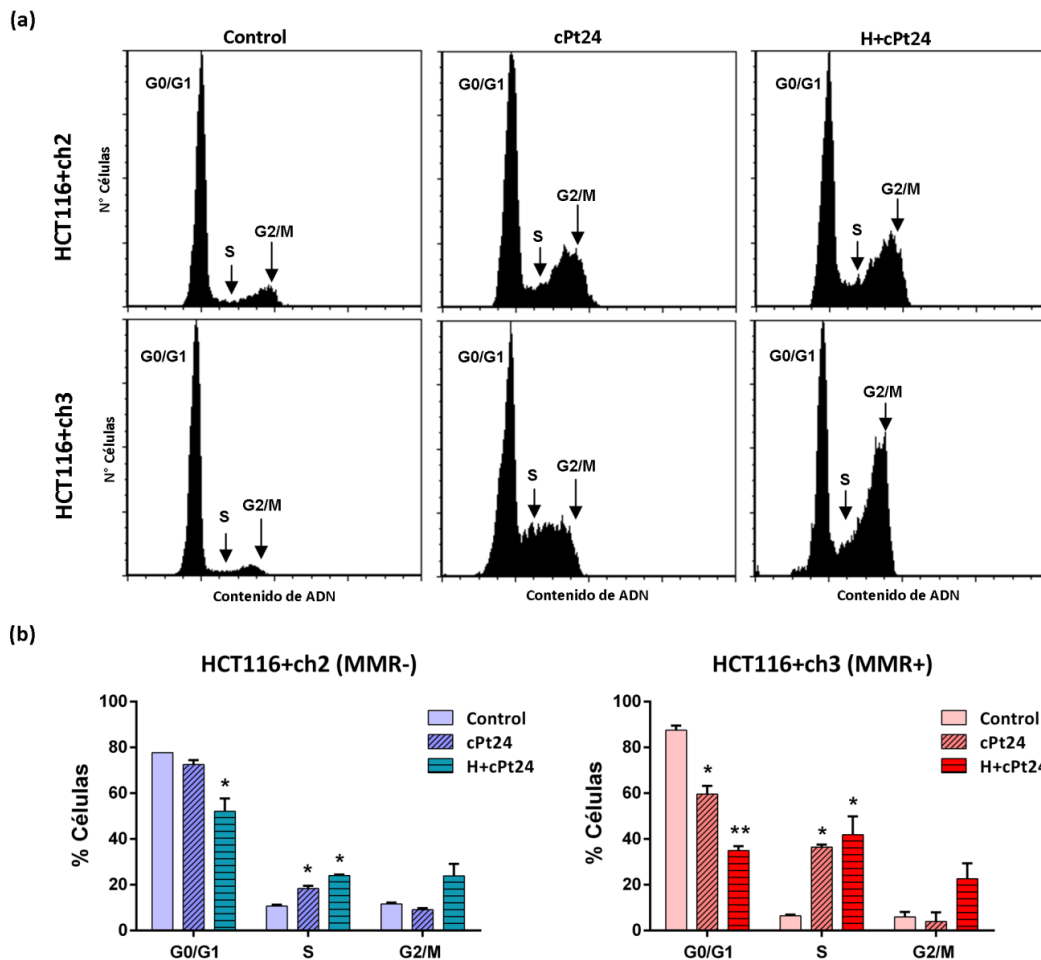


**Figura 4.1.10. Porcentaje de células positivas para la actividad  $\beta$ -galactosidasa asociada a la senescencia (SA- $\beta$ gal) como consecuencia de la exposición al cisplatino (cPt) o hipertermia+cisplatino (H+cPt) en líneas celulares tumorales de colon MMR-/+.** Las líneas celulares MMR- (HCT116+ch2) y MMR+ (HCT116+ch3) fueron tratadas con cPt (10  $\mu$ M, 1 h) o con hipertermia (42°C, 1 h) 24 h antes de la exposición al cPt (H+cPt). Las células fueron recolectadas inmediatamente después de finalizado el tratamiento con cPt (T0), y a las 4 y 24 h de la exposición a la droga (T4 y T24, respectivamente). **(a)** Imágenes representativas de las células control sin tratar (37°C), y de las células expuestas a cPt e H+cPt y recolectadas a las 4 h post cPt (T4). Las flechas indican células HCT116+ch3 con tinción positiva. **(b)** Gráficos correspondientes al porcentaje de células positivas para la tinción SA- $\beta$ gal en las líneas celulares HCT116+ch2 y HCT116+ch3. Las diferencias estadísticas fueron calculadas mediante los test Kruskal-Wallis y Dunn. \*P<0,05. Las barras representan la media $\pm$ EE. Las fotos fueron tomadas con un objetivo de 40X.

*Los resultados de esta sección indican que la aplicación de una hipertermia 24 h antes del cisplatino aumentó la sensibilidad a la droga de células MMR proficientes al incrementar el porcentaje de células senescentes, sin causar efecto en la línea celular MMR deficiente.*

**4.1.11. Efecto de la hipertermia en la progresión del ciclo celular en líneas celulares de cáncer de colon MMR- y MMR+ expuestas a cPt**

La distribución de células HCT116+ch2 (MMR-) y HCT116+ch3 (MMR+) en las diferentes fases del ciclo celular fue estudiada por citometría de flujo 24 h después de la exposición al cPt. En la figura 4.1.11. se presentan los resultados obtenidos luego de la adquisición y análisis de las muestras en el citómetro. La proporción de células en la fase G1 se redujo significativamente en respuesta a los tratamientos en las líneas celulares MMR- y MMR+, pero esta reducción fue más evidente en el grupo tratado con el H+cPt ( $P < 0,05$ ) y en las células MMR+. El porcentaje de células en la fase S se incrementó significativamente luego de los dos tratamientos tanto en las células MMR- como en las células MMR+, aunque en estas últimas los niveles alcanzados prácticamente duplicaron los obtenidos para las células MMR-. La exposición a cPt no afectó la proporción de células MMR-/+ en la fase G2/M. Sin embargo, la aplicación de la hipertermia (H+cPt) causó la detención en la fase G2/M del ciclo celular y este efecto resultó mas notorio en células MMR+ ( $P = 0,057$ ).



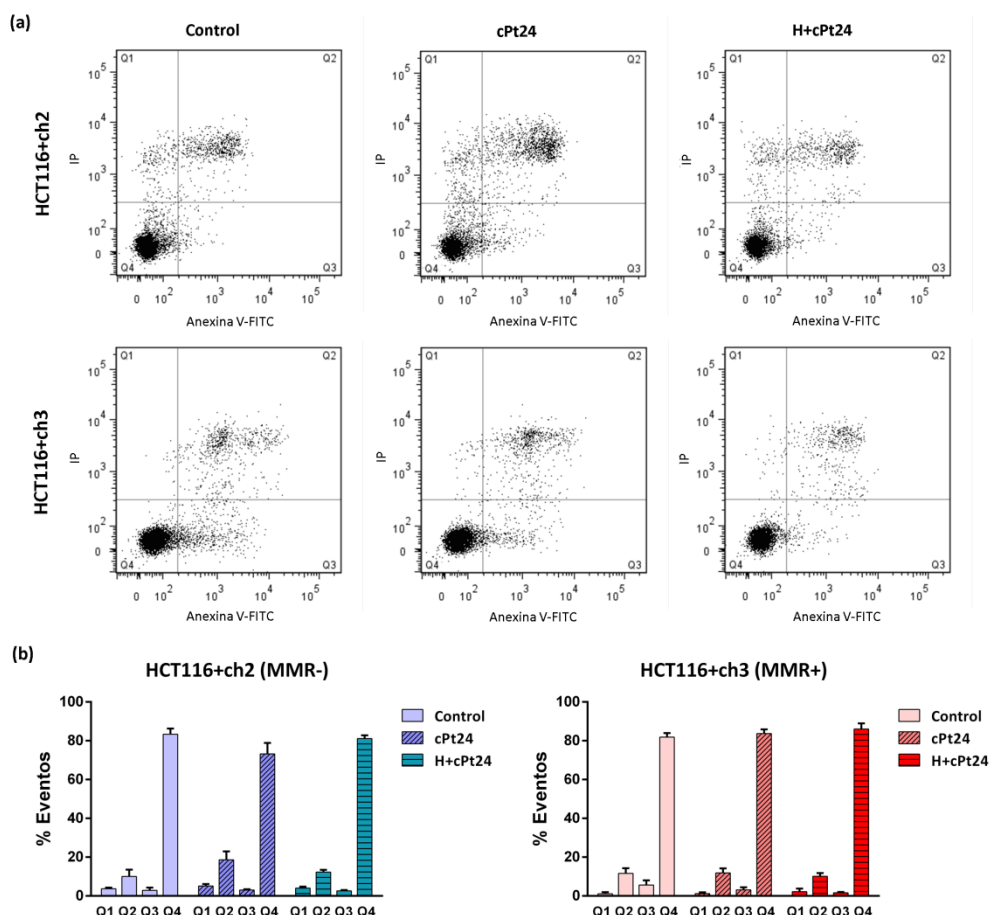
**Figura 4.1.11. Efectos del tratamiento con cisplatino (cPt) o hipertermia+cisplatino (H+cPt) en la distribución de líneas celulares HCT116+ch2 (MMR-) y HCT116+ch3 (MMR+) en las distintas fases del ciclo celular.** Las células tumorales fueron tratadas con cPt solo (10  $\mu$ M, 1 h) o con hipertermia (42°C, 1h) 24 h antes del cPt (H+cPt) y se recolectaron a las 24 h de finalizado los tratamientos. Las muestras fueron teñidas con ioduro de propidio para su análisis por citometría de flujo. **(a)** Histogramas representativos del contenido de ADN de células MMR-/MMR+. **(b)** Gráficos correspondientes al porcentaje de células MMR-/+ en las fases G0/G1, S y G2/M del ciclo celular. Las barras representan la media $\pm$ EE. Se aplicó el test *t* de Student. Las diferencias estadísticas fueron calculadas con respecto al grupo control no tratado (C=37°C). \*P<0,05; \*\*P<0,01.

*Los datos obtenidos demuestran que el tratamiento previo con hipertermia contribuyó a incrementar la sensibilidad al cisplatino, acentuando la detención en la fase G2/M del ciclo celular tanto en células MMR+ y MMR- expuestas a la droga.*

#### **4.1.12. Efecto citotóxico de la exposición a cPt e H+cPt en células de adenocarcinoma de colon MMR- y MMR+**

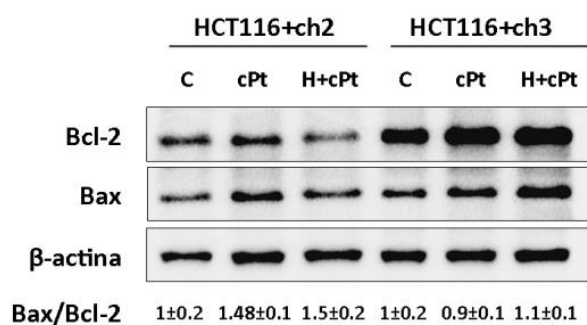
Con el fin de profundizar en los mecanismos involucrados en la significativa disminución en la viabilidad de células MMR+ obtenida a las 24 h del tratamiento H+cPt por el ensayo de MTT, se estudió la muerte celular mediante: 1) el análisis de Anexina V-FITC en conjunto con el colorante vital ioduro de propidio (IP) por citometría de flujo, y 2) la determinación del cociente Bax/Bcl-2 por inmunoblot.

La figura 4.1.12.1.a muestra los gráficos de puntos correspondientes a las células HCT116+ch2 (MMR-) y HCT116+ch3 (MMR+) de muestras control y tratadas solo con cPt o con H+cPt y en la figura 4.1.12.1.b el análisis de los porcentajes de eventos correspondientes a necrosis (Q1), apoptosis tardía (Q2), apoptosis temprana (Q3) y células viables (Q4). Luego del tratamiento con cPt, la proporción de células MMR- con apoptosis tardía se incrementó levemente, pero no fue así con el grupo tratado con H+cPt. Los tratamientos con cPt e H+cPt no indujeron cambios apreciables en el porcentaje de apoptosis temprana o tardía de las células MMR+.



**Figura 4.1.12.1. Estudio de muerte celular mediante tinción de Anexina V-FITC e ioduro de propidio de células HCT116+ch2 (MMR-) y HCT116+ch3 (MMR+) expuestas a cPt o H+cPt.** Las células fueron tratadas con cPt solo (10  $\mu$ M, 1 h) o con hipotermia (42°C, 1h) 24 h antes del cPt (H+cPt). Las muestras fueron recolectadas a las 24 h de finalizado el tratamiento y teñidas con Anexina V-FITC e ioduro de propidio (IP) para su análisis mediante citometría de flujo. **(a)** Citofluorogramas representativos de uno de los ensayos que muestra los eventos correspondientes a: necrosis (Q1, Anexina V-/IP+), apoptosis tardía (Q2, Anexina V+/IP+), apoptosis temprana (Q3, Anexina V+/IP-) y células viables (Q4, Anexina V-/IP-). **(b)** Porcentaje de células MMR- y MMR+ en cada uno de los cuadrantes (Q1, Q2, Q3 y Q4). Las barras representan la media  $\pm$  EE. Para el análisis estadístico se utilizó el test *t* de Student.

Por otra parte, se estudió también la expresión de la proteína proapoptótica Bax y de la proteína antiapoptótica Bcl-2. El comportamiento de estas proteínas fue diferente en las dos líneas celulares. En respuesta al tratamiento combinado H+cPt, las células MMR- exhibieron una disminución en los niveles de expresión de las proteínas Bax y Bcl-2, mientras que en las células MMR+, los niveles de expresión se incrementaron. El análisis del cociente Bax/Bcl-2 mostró un leve incremento de esta relación en las células MMR- luego de los tratamientos con cPt e H+cPt con respecto al control; sin embargo estos cambios no fueron estadísticamente significativos. Por otro lado, en el caso de las células MMR+, el cociente Bax/Bcl-2 prácticamente no se modificó con los tratamientos realizados (Figura 4.1.12.2).



**Figura 4.1.12.2. Inmunoblot de las proteínas Bcl-2 y Bax en las líneas celulares HCT116+ch2 (MMR-) y HCT116+ch3 (MMR+).** Las células fueron recolectadas 24 h después de finalizado el tratamiento con 1) cPt (10  $\mu$ M, 1 h) o 2) hipertermia (42°C, 1h) 24 h antes del cPt (H+cPt). Se sembraron 30  $\mu$ g de proteínas totales en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 12%. La figura contiene imágenes representativas de los inmunoblot. Se utilizó  $\beta$ -actina como control de carga. La imagen contiene los valores del radio Bax/Bcl-2 (media $\pm$ EE) obtenido por densitometría. Para el análisis estadístico se utilizó el test *t* de Student.

*Los resultados de esta sección indican que el tratamiento con hipertermia 24 h antes del cisplatino no modificó la apoptosis en células MMR- y MMR+ expuestas a la droga.*

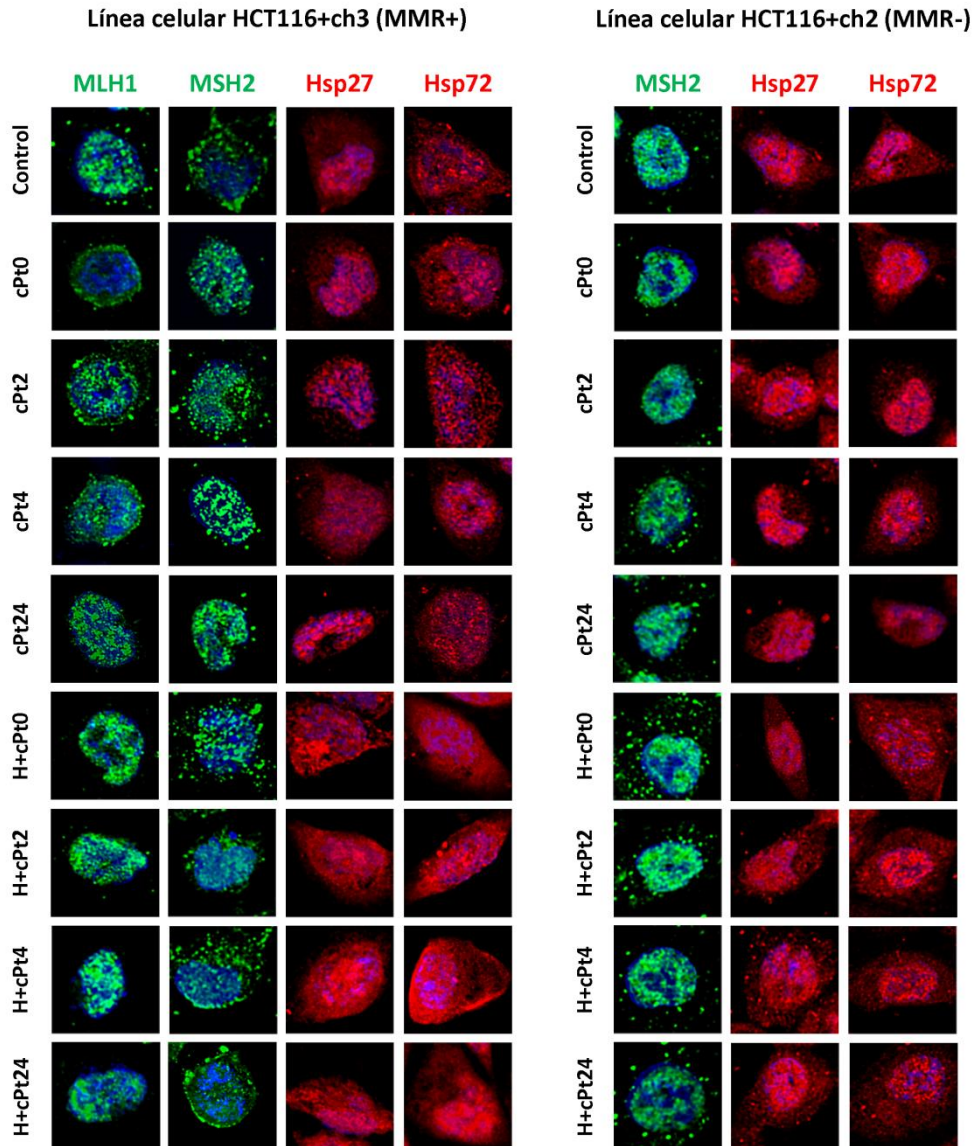
## 4.2. Sección II: Resultados del segundo objetivo específico

### 4.2.1. Distribución celular de las proteínas Hsp27, Hsp72 y proteínas del sistema MMR en líneas celulares HCT116+ch2 y HCT116+ch3 expuestas a cPt o H+cPt

Los efectos de los tratamientos cPt e H+cPt en la localización subcelular de las proteínas MLH1, MSH2, Hsp27 y Hsp72, fueron estudiados en células MMR-/+ , a las 0, 2, 4 y 24 h de su finalización mediante inmunofluorescencia. Para diferenciar el núcleo de las células tumorales, se utilizó el colorante DAPI (4', 6-diamino-2-fenilindol), el cual se intercala con el ADN en regiones ricas en A-T.

En condiciones basales, la proteína MLH1 se expresó exclusivamente en el núcleo de las células HCT116+ch3 (MMR+), como puede observarse por la tinción con DAPI (Figura 4.2.1). Como se mencionó anteriormente, las células HCT116+ch2 (MMR-) expresan una forma truncada no funcional de la proteína MLH1 que no es reconocida por el anticuerpo monoclonal empleado (verificada por inmunoblot en la figura 4.1.5). La proteína MSH2 se observó en el núcleo de las células control MMR-/+; sin embargo se notó una escasa expresión también en el citoplasma (Figura 4.2.1). La observación de las células a los distintos tiempos de recuperación post tratamiento (cPt o H+cPt) evidenció que MLH1 permaneció en el núcleo de las células tumorales MMR+. Sin embargo, la proteína MSH2 mostró un comportamiento diferente. Luego del tratamiento con cPt, MSH2 se localizó exclusivamente en el núcleo tanto en las células MMR- como en las células MMR+. Llamativamente, la aplicación de una hipertermia moderada antes del cPt causó la relocalización parcial de MSH2 en el citoplasma (en mayor proporción que en el grupo control).

En el caso de las HSPs, las líneas celulares MMR+/- expresaron constitutivamente las proteínas Hsp27 y Hsp72 tanto en el núcleo como en el citoplasma, las cuales se incrementaron en respuesta al tratamiento H+cPt, tal como se demostró por western blot. Hsp27 y Hsp72 se localizaron en los compartimentos nucleares y citoplasmáticos de las células control y tratadas con H+cPt. Sin embargo, luego de la exposición al cPt, se observó que Hsp27 y Hsp72 translocaron al núcleo. La translocación nuclear se hizo más evidente con el transcurso de la recuperación en ambas líneas celulares por igual, independientemente de la funcionalidad del sistema MMR (Figura 4.2.1).



**Figura 4.2.1.** Imágenes de inmunofluorescencia para las proteínas MLH1, MSH2, Hsp27 y Hsp72 en células MMR-/+ tratadas con cPt e H+cPt. Las muestras fueron fijadas a las 0, 2, 4 y 24 h de finalizado el tratamiento. Las células tumorales fueron inmunomarcadas para MLH1 o MSH2 (Alexa Fluor®488) y Hsp27 o Hsp72 (Cy®3) y analizadas por microscopía confocal. El núcleo fue teñido con DAPI. El solapamiento de los canales verde y rojo con el canal azul permitió diferenciar la localización subcelular de las proteínas de reparación del ADN y las HSPs. Note la diferencia en la distribución de las HSPs luego de los tratamientos cPt e H+cPt en las dos líneas celulares. Las fotos fueron tomadas con un objetivo de inmersión de 60X. Control: células sin tratar. cPt 24: células recolectadas 24 h después de la exposición a 10 µM de cPt. H+cPt 24: células tratadas con cPt 24 h después de la H, y recolectadas 24 h después del tratamiento.

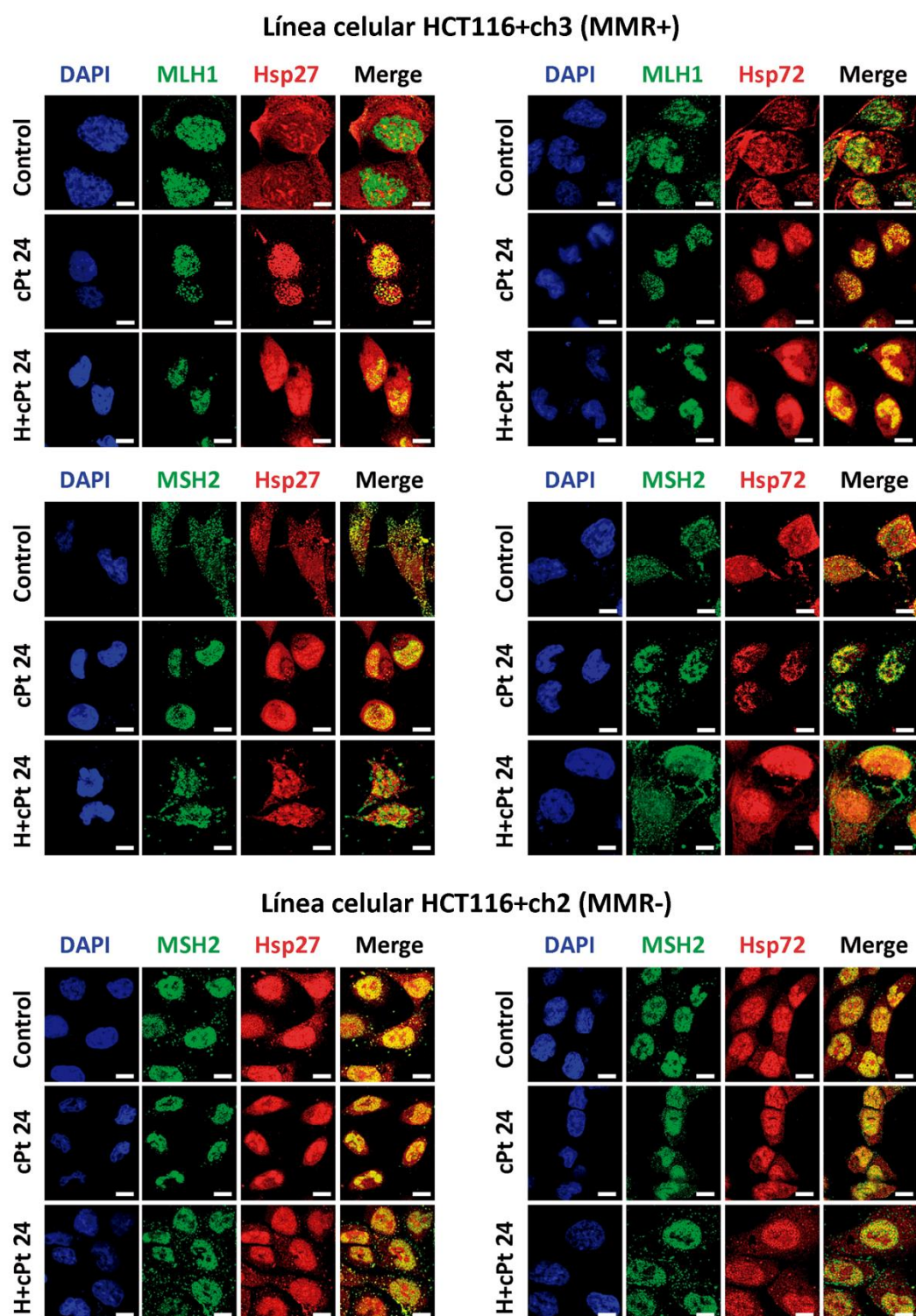


#### 4.2.2. Colocalización de Hsp27 y Hsp72 con proteínas componentes del sistema MMR en líneas celulares HCT116+ch2 y HCT116+ch3 luego de los tratamientos cPt e H+Pt

La asociación entre Hsp27 y Hsp72 con las proteínas MLH1 y MSH2 fue estudiada a las 0, 2, 4 y 24 h luego de los tratamientos mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. Las imágenes obtenidas de las proteínas de golpe de calor fueron superpuestas con las imágenes de las proteínas de reparación del ADN. La superposición de imágenes de los canales estudiados reveló que MLH1 y MSH2 colocalizaban con Hsp27 y Hsp72 en células MMR+, especialmente luego del tratamiento con cPt (Figura 4.2.2.1). Para determinar el grado de colocalización de las proteínas del sistema MMR con las HSPs se evaluó el coeficiente de correlación de Pearson (CCP). De esta manera, los resultados observados a partir de la superposición de las imágenes fueron corroborados por los valores obtenidos de CCP, los cuales se incrementaron en las células tratadas con cPt (Figura 4.2.2.2). Los valores de CCP demostraron que la colocalización de las proteínas estudiadas en las células tumorales MMR+ fue parcial. Los coeficientes más altos se obtuvieron a las 24 h post-cPt para los pares MLH1-Hsp27, MLH1-Hsp72, MSH2-Hsp27, aunque no estadísticamente significativos, como se puede observar en la Figura 4.2.2.2.a-c. Si bien se observó un CCP más alto para MSH2-Hsp72 inmediatamente finalizado el tratamiento con cPt, las diferencias no fueron significativas con respecto a los otros tiempos de recuperación post cPt (Figura 4.2.2.2.d).

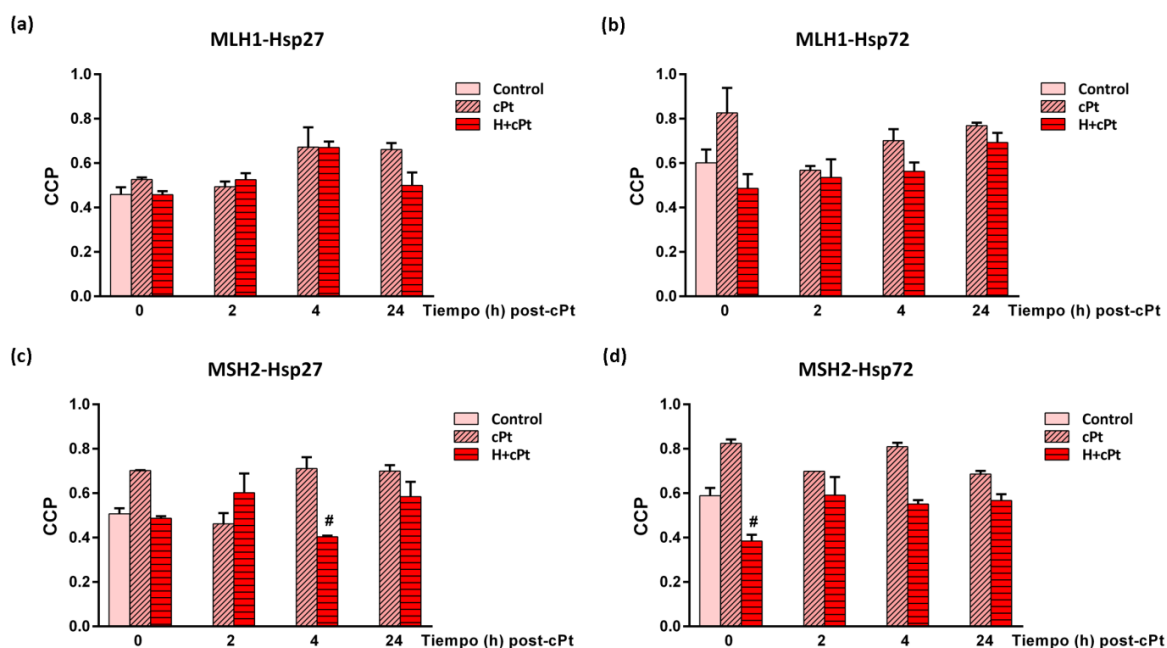
En muestras tratadas con hipertermia se observaron valores de CCP inferiores para los cuatro pares de proteínas en células MMR+ tratadas con cPt, alcanzando incluso niveles por debajo del control en ciertos tiempos de recuperación. En el caso de MLH1-Hsp27, MLH1-Hsp72, y MSH2-Hsp72 los niveles más bajos de asociación se obtuvieron inmediatamente finalizado el tratamiento H+cPt, es decir T0, siendo estadísticamente significativo para MSH2-Hsp72. En cambio, la menor asociación entre MSH2-Hsp27 se observó a las 4 h de recuperación de la exposición a H+cPt, siendo estadísticamente significativa con respecto al CCP del grupo tratado sólo con cPt (Figura 4.2.2.2.c).

Por otro lado, las células MMR- exhibieron en condiciones basales valores más altos de CCP para Hsp27-MSH2 y Hsp72-MSH2, que las células control MMR+. No obstante, los valores de CCP en las células MMR- de estas proteínas prácticamente no se modificaron con la exposición al cPt (Figure 4.2.2.3). Por otra parte, en las células MMR-, la hipertermia no modificó en gran medida los valores de CCP para MSH2-Hsp27; aunque en el caso de MSH2-Hsp72, los valores de CCP fueron inferiores a los observados en condiciones basales y luego de la exposición al cPt solo.



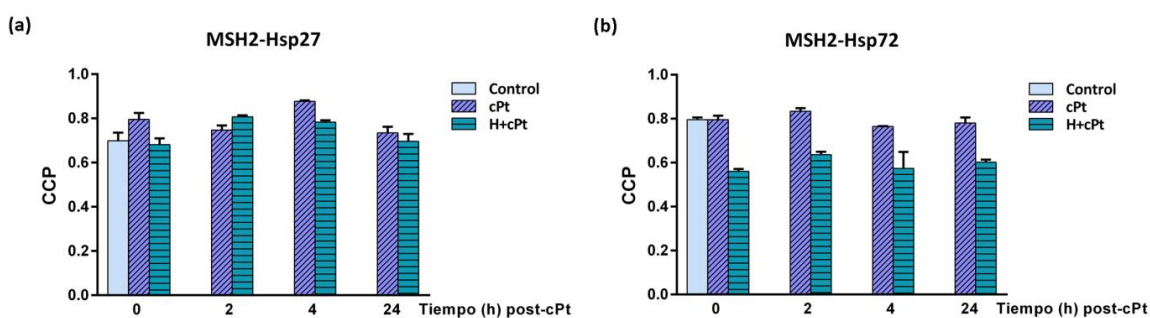
**Figura 4.2.2.1 Colocalización de MLH1 y MSH2 con Hsp27 y Hsp72 en células HCT116+ch3 (MMR+) y HCT116+ch2 (MMR-).** Las líneas celulares fueron tratadas con cPt solo (10  $\mu$ M, 1 h) o con hipertermia (42°C, 1h) 24 h antes del cPt (H+cPt). Las muestras fueron fijadas a las 0, 2, 4 y 24 h de finalizado el tratamiento. Las células tumorales fueron inmunomarcadas para MLH1 o MSH2 (Alexa Fluor®488) y Hsp27 o Hsp72 (Cy®3) y analizadas por microscopía confocal. El solapamiento de los canales verde y rojo (merge) muestra la colocalización entre las proteínas de reparación del ADN y las HSPs (señal amarilla). Barra: 20  $\mu$ m. Control: células sin tratar. cPt 24: células recolectadas 24 h después de la exposición a 10  $\mu$ M de cPt. H+cPt 24: células tratadas con cPt 24 h después de la H, y recolectadas 24 h después del tratamiento.

### HCT116+ch3 (MMR+)



**Figura 4.2.2.2 Coeficiente de Correlación de Pearson (CCP) de células HCT116+ch3 (MMR+) luego de la exposición a cPt o H+cPt.** Las células fueron tratadas con cPt solo (10  $\mu$ M, 1 h) o con hipertermia (42°C, 1h) 24 h antes del cPt (H+cPt). Las muestras fueron fijadas a las 0, 2, 4 y 24 h de finalizado el tratamiento y analizadas por inmunofluorescencia. El valor del CCP fue estimado con el programa Image J y la aplicación JACoP. Los gráficos corresponden a los valores obtenidos para CCP. Los coeficientes muestran que MLH1 colocaliza con Hsp27 (a) y Hsp72 (b). MSH2 colocaliza con Hsp27 (c) y Hsp72 (d). Las barras representan la media $\pm$ EE. Para el análisis estadístico se utilizó el test Kruskal-Wallis y Dunn. Las diferencias significativas fueron calculadas con respecto al grupo control (\*) y entre cPt e H+cPt (#), siendo P<0,05.

### HCT116+ch2 (MMR-)

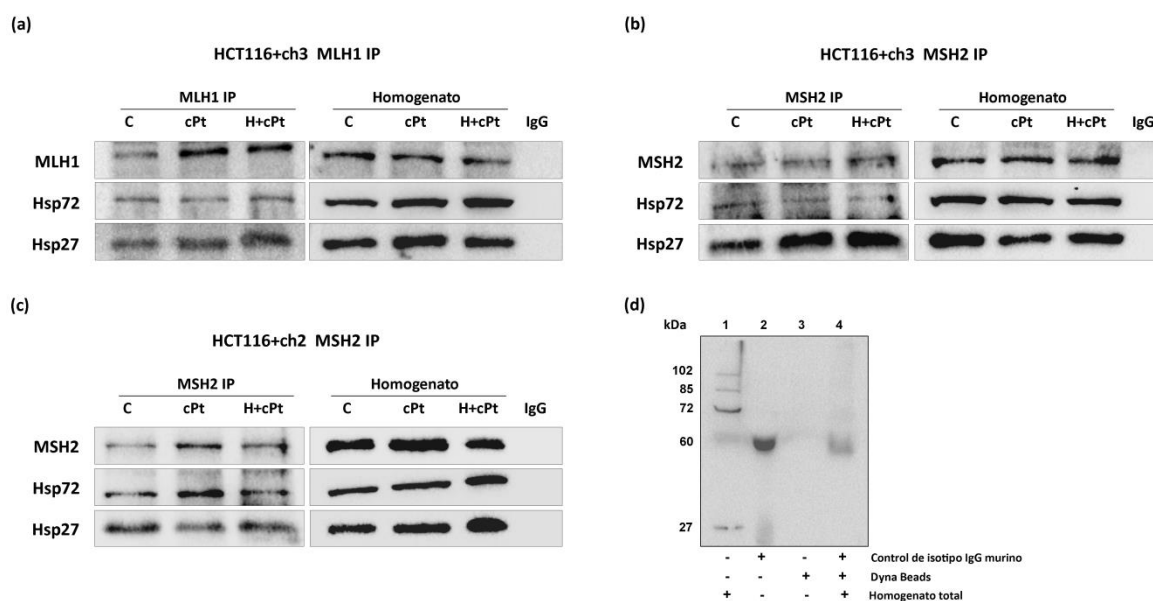


**Figura 4.2.2.3. Coeficiente de Correlación de Pearson (CCP) de células HCT116+ch2 (MMR-) luego de la exposición a cPt o H+cPt.** Las células fueron tratadas con cPt solo (10  $\mu$ M, 1 h) o con hipertermia (42°C, 1h) 24 h antes del cPt (H+cPt). Las muestras fueron fijadas a las 0, 2, 4 y 24 h de finalizado el tratamiento y analizadas por inmunofluorescencia. El CCP fue obtenido con la aplicación JACoP del programa Image J. Los gráficos muestran los valores del CCP para MSH2 con Hsp27 (a) y Hsp72 (b). Las barras representan la media $\pm$ EE. Para el análisis estadístico se utilizó el test Kruskal-Wallis.

Los resultados obtenidos demuestran que las proteínas MLH1 y MSH2 colocalizan con Hsp27 y Hsp72 en las líneas celulares MMR- y MMR+ en condiciones basales y luego de los tratamientos experimentales.

#### 4.2.3. Interacción entre las proteínas MLH1 y MSH2 con Hsp27 y Hsp72 en células MMR- y MMR+ expuestas a cPt o H+cPt

Los resultados de inmunofluorescencia y microscopía confocal fueron corroborados posteriormente por inmunoprecipitación, la cual confirmó las interacciones entre las proteínas de golpe de calor Hsp27 y Hsp72 con las proteínas de reparación MLH1 y MSH2 en células HCT116+ch3 (MMR+) control y tratadas con cPt e H+cPt (Figura 4.2.3.a-b). Además, las interacciones entre Hsp27 y Hsp72 con MSH2 también se demostraron en células MMR- (Figura 4.2.3.c). Los controles negativos fueron incluidos con el fin de verificar la especificidad de las bandas de inmunoprecipitación (Figura 4.2.3.d).



**Figura 4.2.3. Inmunoprecipitación de MLH1 y MSH2 en células HCT116+ch3 y HCT116+ch2.** Las células fueron tratadas con cPt solo (10  $\mu$ M, 1 h) o con hipertermia (42°C, 1 h) 24 h antes del cPt (H+cPt). Las muestras fueron cosechadas a las 24 h de finalizado el tratamiento. Las proteínas de reparación MLH1 **(a)** y MSH2 **(b)** fueron inmunoprecipitadas a partir de extractos de células MMR+ y analizadas por western blot para detectar co-precipitación con Hsp27 y Hsp72. **(c)** Inmunoprecipitación de MSH2 a partir de extractos de células MMR-. **(d)** Se incluyeron los siguientes controles negativos: 20  $\mu$ g de lisado celular (*calle 1*), control de isotipo IgG de ratón (*calle 2*), partículas magnéticas *Dynabeads* sin conjugar (*calle 3*), incubación del lisado celular con las partículas magnéticas *Dynabeads* conjugadas con IgG de ratón (*calle 4*).

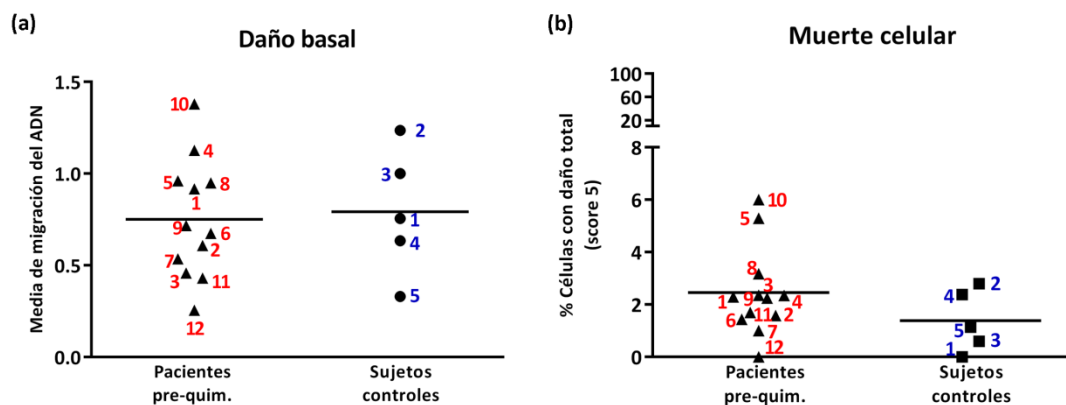
*De estos resultados se desprende que las proteínas del sistema MMR interactúan con Hsp27 y Hsp72 en las células de colon HCT116 independientemente de la funcionalidad del sistema MMR, tanto en condiciones basales como luego de los tratamientos con cPt e H+cPt.*

### 4.3. Sección III: Resultados del tercer objetivo específico

#### 4.3.1. Daño en el ADN y muerte celular en linfocitos de sangre periférica de pacientes oncológicos

El ensayo cometa alcalino fue utilizado para evaluar el daño en el ADN en linfocitos de sangre periférica (LSP) de pacientes oncológicos. Las muestras fueron obtenidas antes del inicio del primer ciclo de quimioterapia con cisplatino o carboplatino. La técnica permitió determinar el daño en el ADN en condiciones basales y además diferenciar aquellos núcleos de linfocitos con fragmentación total del ADN correspondientes a células en apoptosis (score 5).

En primer lugar, se verificó una elevada variabilidad interindividual a nivel del daño basal tanto en los LSP de los pacientes analizados (n=12) como de los sujetos controles (n=5), con un coeficiente de variación de 43% y 44%, respectivamente (Figura 4.3.1). No se observaron diferencias significativas en el daño basal entre pacientes oncológicos y controles sanos (test de Mann-Whitney). El porcentaje promedio de LSP con daño total en el ADN (score 5) fue mayor, aunque no significativo, en los pacientes oncológicos que en los individuos sanos, con un valor de 2,5% y 1,4%, respectivamente.



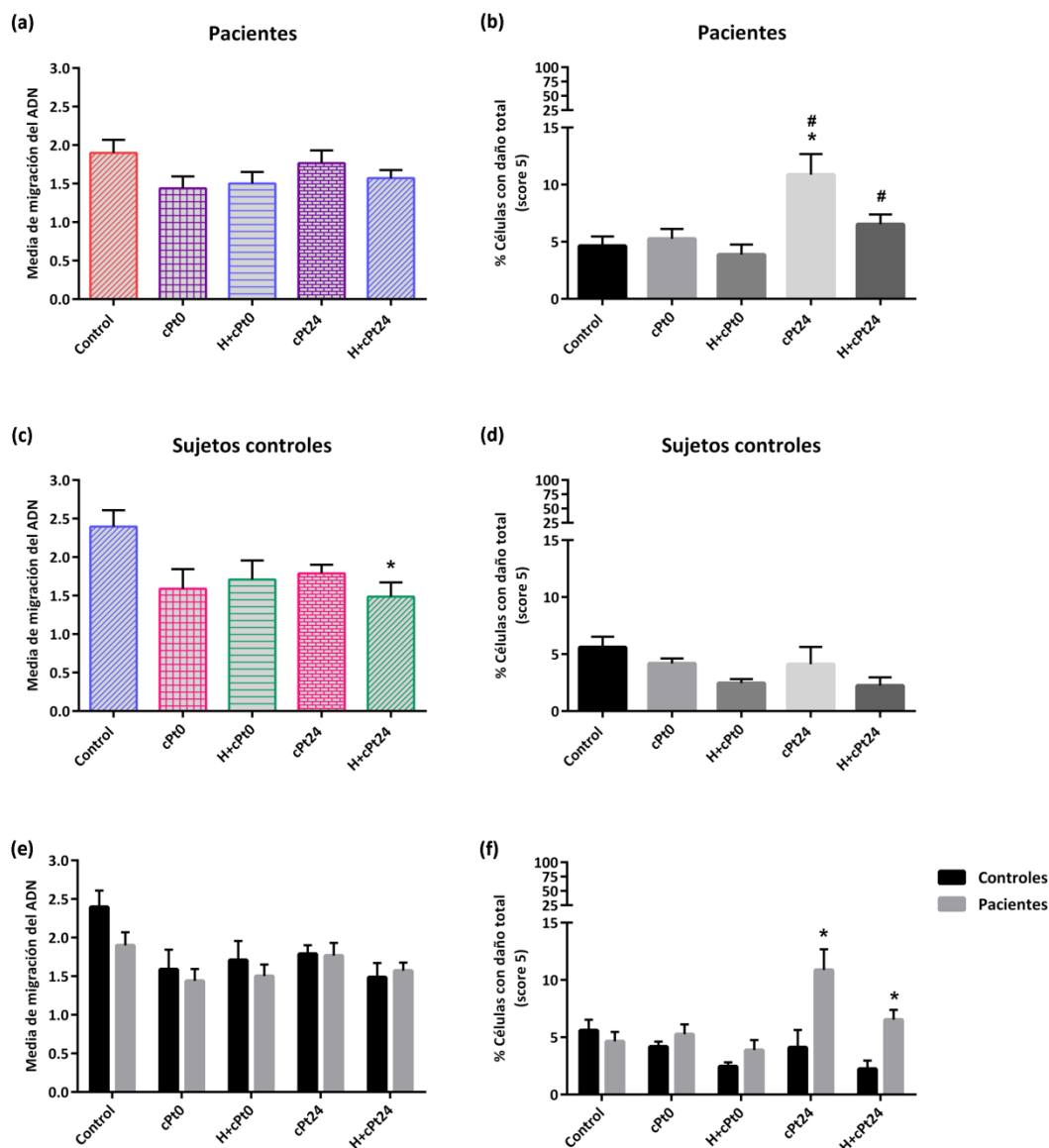
**Figura 4.3.1. Daño basal y número de células apoptóticas en linfocitos de individuos sanos y en linfocitos de pacientes oncológicos antes de la quimioterapia. (a)** Media de migración del ADN (daño basal) en muestras pre-quimioterapia de pacientes oncológicos y en muestras de sujetos controles. **(b)** Porcentaje de células con score 5 (apoptóticas) en muestras pre-quimioterapia de pacientes oncológicos e individuos controles. Cada dato representa la media de al menos 80 células por individuo. Los números de los símbolos indican cada paciente y cada sujeto control como se ha descrito en las tablas 3.2.1.2 y 3.2.1.1, respectivamente (Capítulo 3). Las líneas horizontales representan la media de los pacientes (n=9) y de los individuos sanos (n=5).

#### 4.3.2. Efecto de la hipertermia en la migración del ADN inducida por cPt en LSP

El ensayo cometa alcalino también permitió estudiar el daño en el ADN en los LSP inducido por la exposición *in vitro* a cPt e H+cPt. Al igual que en el caso de las líneas celulares tumorales de colon expuestas a cPt, se utilizó peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como segundo agente inductor de fragmentación en el ADN, para poder evaluar el efecto del cPt (productor de uniones cruzadas que generan compactación del ADN). Como se mencionó anteriormente, una reducción en la cola del cometa se correlaciona con una mayor formación de aductos de platino, debido a que este tipo de droga produce enlaces cruzados en el ADN, retardando la migración electroforética (detallado en Capítulo 3.8).

En la figura 4.3.2.a. se muestran los valores de la media de migración del ADN obtenidos para cada grupo experimental en LSP de pacientes. El tratamiento con cPt (T0) redujo la media de migración del ADN con respecto al grupo control, evidenciando la formación de aductos de cPt. La migración del ADN también fue menor en las muestras pretratadas con hipertermia (H+cPt0) respecto al control, sin embargo las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Luego de una recuperación de 24 h a 37°C, se observó un leve incremento no significativo en la media de migración del ADN en relación a los grupos T0. En LSP de sujetos controles, la media de migración también se redujo luego del tratamiento *in vitro* con cPt e H+cPt, aunque se observó un leve aumento no significativo 24 h después de la exposición al cPt (Figura 4.3.2.c). Sin embargo, en el grupo experimental H+cPt, la media de migración del ADN disminuyó significativamente luego del tiempo de recuperación.

Al evaluar el porcentaje de linfocitos con daño total (score 5) en pacientes oncológicos, se observó un significativo aumento en los grupos experimentales con 24 h de recuperación (T24) en comparación con los grupos recolectados a T0 (Figura 4.3.2.b). Dado el significativo número de linfocitos con daño total, se puede inferir que el elevado daño al ADN observado en las células apoptóticas, estaría contribuyendo a la media de la migración del ADN de los grupos cPt e H+cPt a T24, tal como se representa en la figura 4.3.2.a. Al comparar el número de células con daño total de los grupos cPt e H+cPt, aquellos expuestos a una hipertermia previa mostraron un menor porcentaje de células apoptóticas, tanto a T0 como a T24. En el caso de los sujetos controles, los grupos expuestos a un tratamiento con calor presentaron menor porcentaje de células con score 5, tanto a T0 como a T24 (Figura 4.3.2.d). A diferencia de lo observado en LSP de pacientes, el número de figuras apoptóticas en LSP de individuos sanos no se modificó con la recuperación.



**Figura 4.3.2. Daño y reparación del ADN en linfocitos de pacientes y de individuos sanos.** Los LSP fueron expuestos *in vitro* a cPt (200  $\mu$ M, 1h) o a una hipertermia (42°C, 1 h) 24 h antes del tratamiento con cPt (H+cPt). Los LSP fueron recolectados inmediatamente de finalizado el tratamiento (T0) o 24 h después de una recuperación a 37°C (T24). Todas las muestras fueron tratadas con un segundo agente ( $H_2O_2$ ) capaz de generar rupturas de cadena antes de realizar el ensayo cometa alcalino. **(a)** Media de migración del ADN y **(b)** porcentaje de células con daño total (score 5) en linfocitos de pacientes expuestos a los tratamientos. **(c)** Media de la migración del ADN y **(d)** porcentaje de células con daño total en linfocitos de sujetos sanos expuestos *in vitro* a los tratamientos mencionados. Las barras representan la media $\pm$ EE. Para el análisis estadístico se utilizó el test Kruskal-Wallis y Dunn. Las diferencias significativas fueron calculadas con respecto al grupo control (\*) y entre los tiempos experimentales T24 y T0 (#), siendo  $P < 0,05$ . Comparación de **(e)** la media de migración del ADN y **(f)** porcentaje de células con score 5 entre linfocitos procedentes de pacientes y de individuos sanos. Las diferencias estadísticas fueron determinadas para cada grupo experimental entre pacientes y sujetos controles con el test no paramétrico de Mann-Whitney para muestras no apareadas considerando  $P < 0,05$  estadísticamente significativo.



En la figura 4.3.2.e se muestra que la media de migración del ADN de linfocitos sin tratar de sujetos sanos fue superior en relación a los pacientes ( $P=0.054$ ). No se observaron diferencias entre controles y pacientes en la media de migración para los distintos tratamientos administrados. Sin embargo, al evaluar el porcentaje de figuras apoptóticas, este valor fue significativamente superior en LSP de pacientes con respecto a individuos sanos luego de 24 h de recuperación post tratamientos (T24), tanto para los grupos expuestos a cPt solo como para los grupos H+cPt (Figura 4.3.2.f).

*Estos resultados indican que entre LSP de controles y pacientes oncológicos no existen diferencias en la media de la migración del ADN luego de los tratamientos. No obstante, los pacientes oncológicos presentaron mayor porcentaje de células con daño total en el ADN a las 24 h de los tratamientos.*

#### **4.3.3. Media de migración del ADN. Evaluación de la respuesta clínica en pacientes oncológicos**

El daño basal y el porcentaje de células con daño total (score 5) en LSP de pacientes oncológicos obtenidos antes del primer ciclo de quimioterapia se comparó con la respuesta clínica. En la Figura 4.3.3 se incluyeron sólo aquellos pacientes que hasta la fecha presentaron evaluación de la respuesta clínica, agrupada en respuesta clínica completa (RC) y respuesta parcial (RP), enfermedad estable (EE) o enfermedad progresiva (EP).

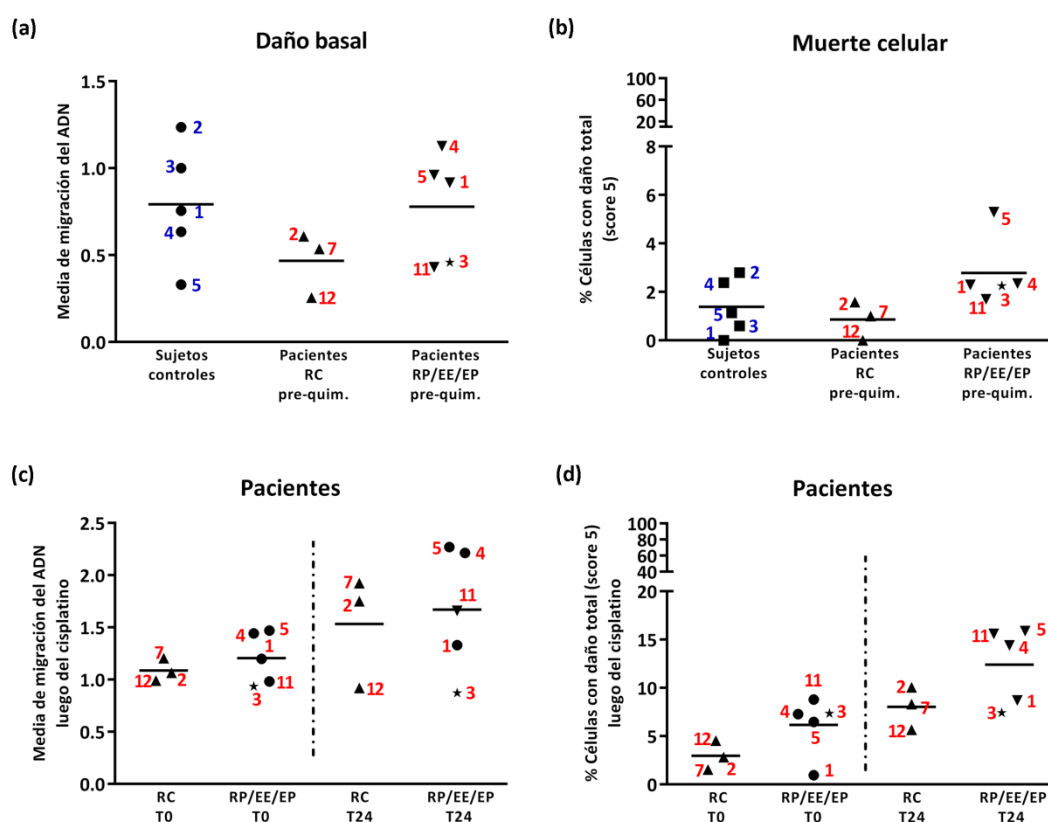
La media de migración del ADN en condiciones basales resultó menor en pacientes con RC en relación al grupo de pacientes con RP/EE/EP. No se observaron diferencias entre la media de migración de LSP de sujetos controles y de pacientes con RP/EE/EP. Cabe destacar que en el grupo de personas sanas se obtuvo una variabilidad interindividual elevada (Figura 4.3.3.a).

Al estudiar las células con daño total, indicador de apoptosis, los pacientes con RP/EE/EP presentaron mayor porcentaje de figuras apoptóticas en relación a los sujetos controles y a los pacientes con RC (Figura 4.3.3.b).

Luego de la exposición *in vitro* al cPt, también se comparó la media de migración del ADN entre los pacientes con distinta respuesta clínica. Inmediatamente finalizado el tratamiento (T0), se observó una menor migración del ADN en aquellos pacientes con RC (Figura 4.3.3.c). El mismo comportamiento se obtuvo cuando los LSP fueron evaluados 24 h

después del cPt (T24), aunque la variabilidad interindividual fue elevada en los LSP del grupo de pacientes con RP/EE/EP. En los dos grupos de pacientes, la media de migración del ADN fue mayor a T24 con respecto a T0.

Por otra parte, el porcentaje de células con daño total fue superior en pacientes con RP/EE/EP, tanto en T0 como a T24 (Figura 4.3.3.d.). En los dos grupos de pacientes se obtuvo un mayor número de figuras apoptóticas en T24 en relación a T0, siendo mayor esta diferencia en el grupo de pacientes con RP/EE/EP.



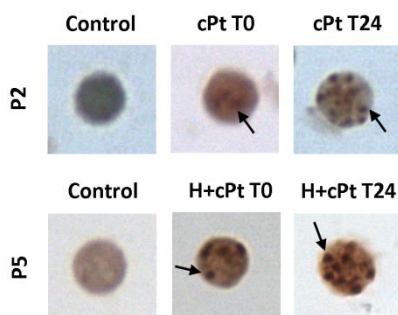
**Figura 4.3.3. Media de migración del ADN en LSP de pacientes oncológicos y su relación con la respuesta clínica.** Diferencias en (a) media de migración del ADN y (b) porcentaje de células con daño total entre LSP de sujetos controles y de pacientes oncológicos con RC y RP/EE/EP. Diferencias en (c) media de migración del ADN y (d) porcentaje de células con daño total entre LSP de pacientes oncológicos expuestos con RC y RP/EE/EP *in vitro* a cPt. Los LSP fueron tratados con 200  $\mu$ M de cPt durante 1 h y recolectados inmediatamente finalizado el tratamiento (T0), y luego de 24 h de recuperación a 37°C (T24). Los números indican cada sujeto control o paciente como se ha descrito en las tablas 3.2.1.1 y 3.2.1.2, respectivamente (Capítulo 3). Las líneas horizontales representan la media de cada grupo. Las diferencias estadísticas entre grupos fueron calculadas con el test no paramétrico de Mann-Whitney, considerando  $P < 0,05$  estadísticamente significativa. RC: respuesta completa; RP: respuesta parcial; EE: enfermedad estable; EP: enfermedad progresiva.

*A pesar del bajo número de pacientes incluido en este trabajo y a la elevada variabilidad interindividual, puede observarse que LSP de pacientes con RC presentaron menor daño basal y mayor formación de aductos cPt-ADN en relación a los pacientes no respondedores. Este comportamiento será corroborado en estudios que incorporarán mayor número de pacientes para definir la utilidad del ensayo cometa en la predicción de la respuesta individual a la quimioterapia con análogos del platino.*

#### 4.4. Sección IV: Resultados del cuarto objetivo específico

##### 4.4.1. Respuesta al daño en el ADN inducido por cPt e H+cPt en LSP

La fragmentación del ADN (rupturas de doble cadena) fue cuantificada en LSP de pacientes oncológicos (n=9) y de individuos sanos (n=4) por medio de la detección de focos  $\gamma$ H2AX. En la evaluación de la tinción sólo se consideraron los núcleos esféricos con un diámetro < 15  $\mu$ m, excluyendo de esta manera a monocitos y granulocitos que pudieran haber sobrevivido al cultivo (Figura 4.4.1.1). Los LSP con daño morfológico severo y los agregados celulares también fueron excluidos de la evaluación. Así mismo, las células con una señal de  $\gamma$ H2AX  $\geq$  70% del núcleo, patrón denominado “*pan-nuclear*”, fueron excluidas del análisis [69].



**Figura 4.4.1.1. Linfocitos con tinción positiva para el marcador  $\gamma$ H2AX.** Formación de focos  $\gamma$ H2AX luego de los tratamientos cPt e H+cPt en LSP pertenecientes a los casos 2 y 5, respectivamente. Nótese el incremento en el número de focos por núcleo luego de 24 h de recuperación post tratamiento.

Como se observa en la figura 4.4.1.2, la media de focos de  $\gamma$ H2AX por núcleo en condiciones basales fue inferior en los pacientes oncológicos en relación a los individuos sanos, con valores promedio de 1,46 y 1,94, respectivamente (Figura 4.4.1.2.a, c y e). El porcentaje de células positivas para este marcador fue menor en LSP de pacientes oncológicos en relación al

---

*Proteínas de golpe de calor y reparación del ADN en líneas celulares tumorales y en pacientes oncológicos tratados con análogos del platino*

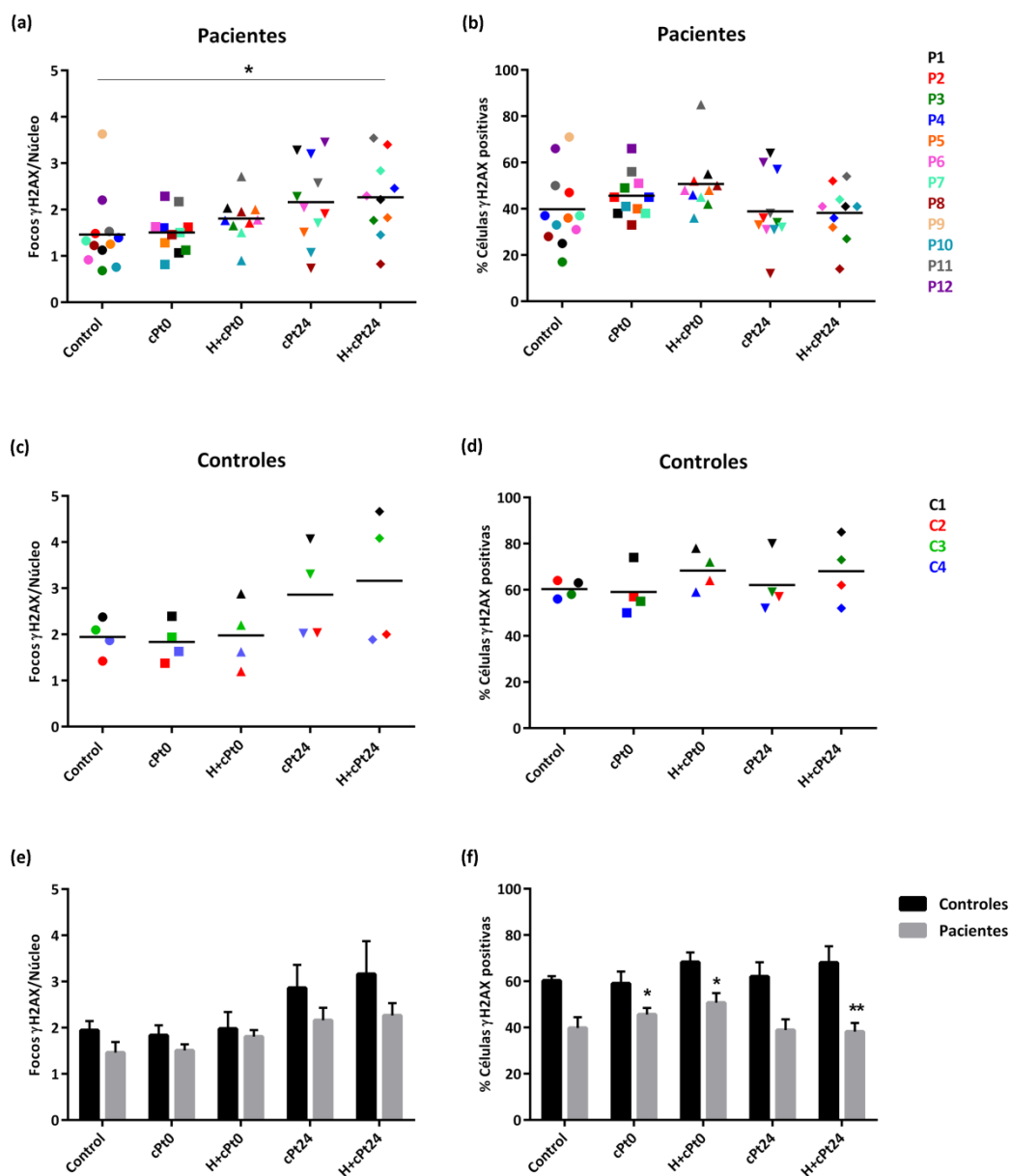
encontrado en personas sanas, con valores medios de 39,8 % y 60,2%, respectivamente (Figura 4.4.1.2.b,d y f).

Luego del tratamiento *in vitro* con cPt, no se observaron cambios en el número de focos de  $\gamma$ H2AX por núcleo tanto en LSP de pacientes como en sujetos sanos, pero se verificó un leve incremento en el porcentaje de células positivas en LSP de pacientes (Figura 4.4.1.2.a). El pretratamiento térmico (H+cPt) indujo en los LSP de pacientes un incremento de focos  $\gamma$ H2AX y del porcentaje de células con tinción positiva para  $\gamma$ H2AX (Figura 4.4.1.2.b). Sin embargo, en LSP de sujetos controles, se observó un leve aumento en el porcentaje de células  $\gamma$ H2AX positivas, pero no se modificó el número de focos  $\gamma$ H2AX por núcleo (Figura 4.4.1.2.c-d).

Con el propósito de evaluar la respuesta al daño en el ADN y la capacidad de reparación, de LSP tratados con cPt e H+cPt se dejaron recuperar 24 h a 37°C (T24). En LSP de pacientes oncológicos se observó un aumento significativo en el número de focos por núcleo en las muestras tratadas con cPt e H+cPt (T24) en relación al grupo control (Figura 4.4.1.2.a). Sin embargo, no se observaron cambios en el porcentaje de células positivas para  $\gamma$ H2AX respecto al control, incluso se verificó una reducción en el porcentaje de células  $\gamma$ H2AX positivas en los grupos cPt e H+cPt a T24, en comparación con los porcentajes registrados T0 (Figura 4.4.1.2.b).

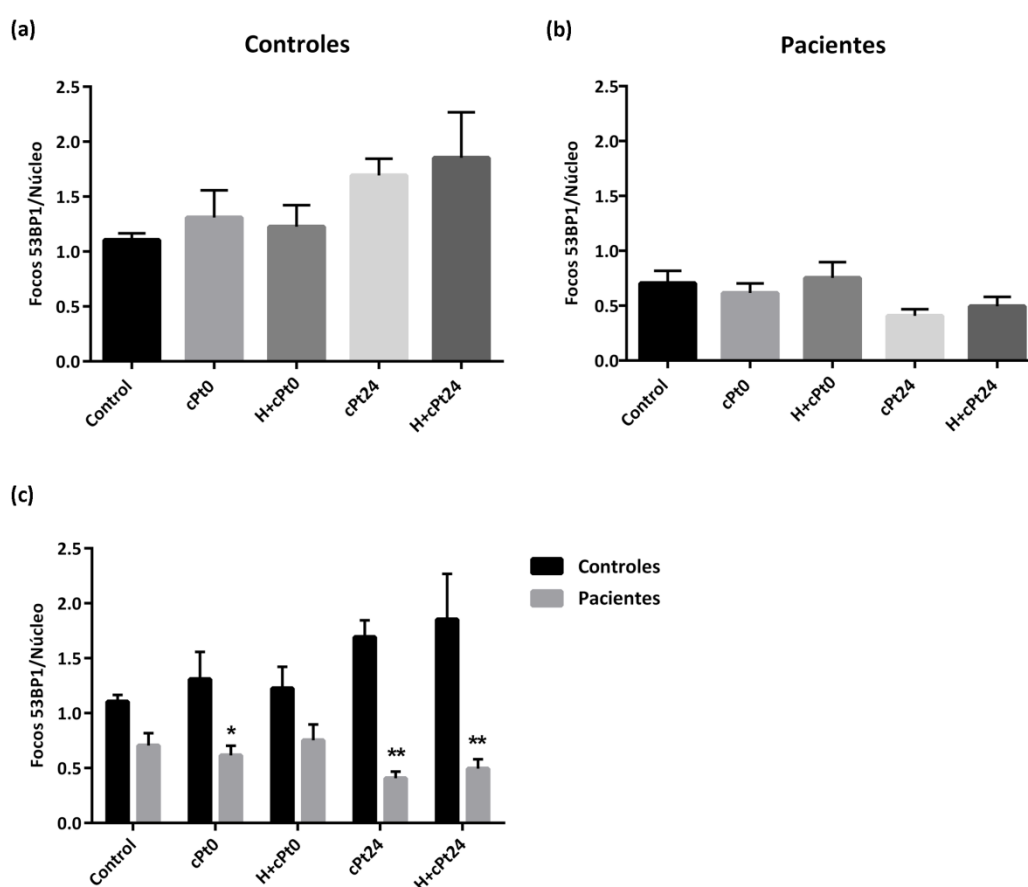
En los individuos controles, se evidenció un aumento pronunciado en el número de focos por núcleo de las muestras tratadas con cPt e H+cPt luego de 24 h de recuperación (T24) en relación al grupo control (Figura 4.4.1.2.c). A diferencia de los resultados obtenidos en pacientes oncológicos, en personas sanas el porcentaje de células  $\gamma$ H2AX positivas se mantuvo prácticamente sin modificaciones luego de 24 h de recuperación (T24) con respecto a los grupos recolectados inmediatamente finalizado el tratamiento (Figura 4.4.1.2.d).

Por otra parte, aunque la media de focos de  $\gamma$ H2AX por núcleo obtenida en cada grupo experimental fue menor en LSP de pacientes oncológicos que en LSP de sujetos controles, las diferencias no resultaron estadísticamente significativas (Figura 4.4.1.2.e). Sin embargo, el porcentaje de linfocitos con tinción positiva para  $\gamma$ H2AX, fue significativamente más elevado en LSP de individuos sanos que en LSP de pacientes oncológicos, excepto en el grupo tratado con cPt a T24 (Figura 4.4.1.2.f).



**Figura 4.4.1.2. Efecto del cPt e H+cPt en la formación de focos de  $\gamma$ H2AX en LSP.** Los LSP fueron expuestos *in vitro* a cPt (200  $\mu$ M, 1h) o a una hipertermia (42°C, 1 h) 24 h antes del tratamiento con cPt (H+cPt). Los LSP fueron recolectados inmediatamente de finalizado el tratamiento (T0) o 24 h después de una recuperación a 37°C (T24). **(a)** Número de focos  $\gamma$ H2AX por núcleo en LSP de pacientes oncológicos y **(c)** de individuos sanos. **(b)** Porcentaje de LSP con tinción positiva para  $\gamma$ H2AX en pacientes oncológicos y **(d)** en individuos sanos. Cada dato representa la media de al menos 80 células por individuo. En la derecha de la figura, los números indican cada paciente o sujeto control como se ha descrito en las tablas 3.2.1.2 y 3.2.1.1, respectivamente (Capítulo 3). Las líneas horizontales representan la media del grupo de pacientes (n=12) y del grupo de individuos controles (n=4). Para el análisis estadístico se utilizó el test Kruskal-Wallis y Dunn. Las diferencias significativas fueron calculadas con respecto al grupo control (37°C, \*) y entre los tiempos experimentales T24 y T0 (#), considerando  $P < 0,05$  estadísticamente significativa. **(e)** Número de focos  $\gamma$ H2AX por núcleo y **(f)** porcentaje de células positivas para  $\gamma$ H2AX en sujetos sanos y en pacientes oncológicos. Las barras representan la media  $\pm$  EE. Se utilizó el test de Mann-Whitney para establecer las diferencias estadísticas entre pacientes y controles. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

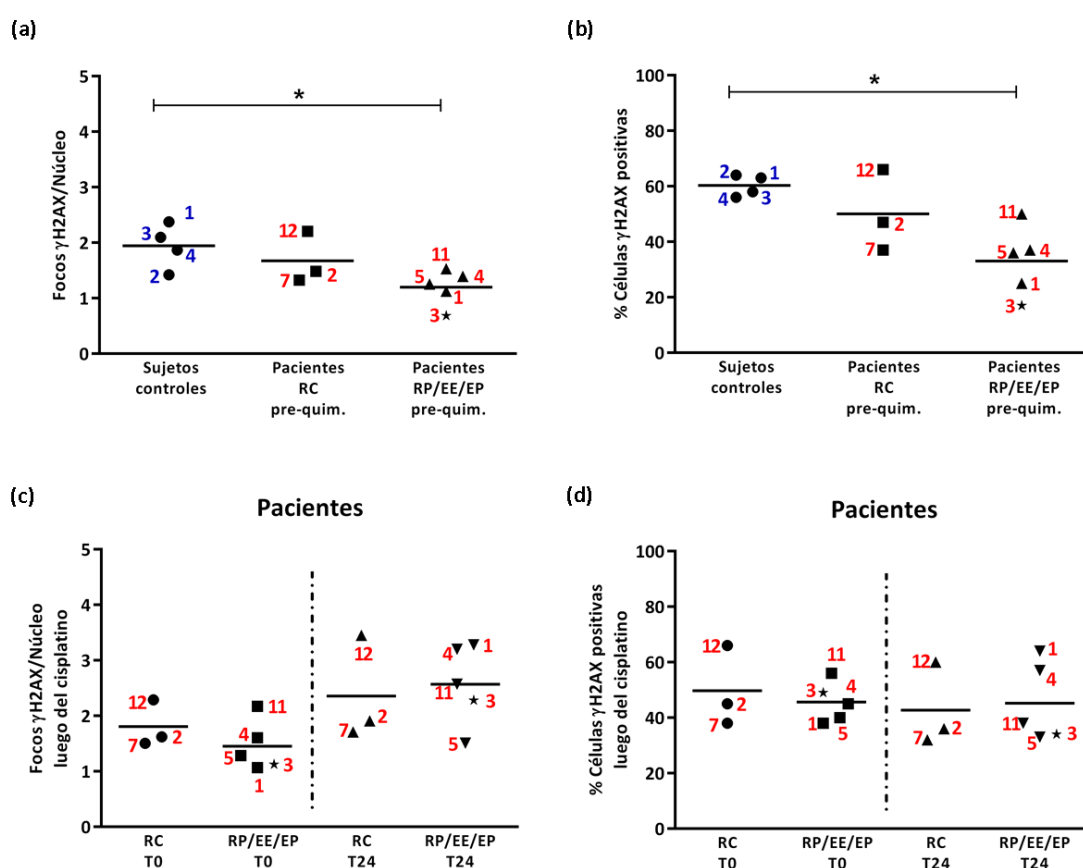
Se estudió también el reclutamiento de 53BP1 en los sitios de daño al ADN mediante inmunocitoquímica, cuantificando los focos de este marcador por cada núcleo linfocitario. En los LSP de pacientes se observó un menor reclutamiento de 53BP1, en relación a los sujetos controles (Figura 4.4.1.3. a-b). Los tratamientos experimentales con cPt o H+cPt no indujeron cambios significativos a T0 tanto en pacientes como en personas sanas. Sin embargo, tras 24 h de recuperación post- cPt o H+cPt en LSP de sujetos controles, se obtuvo un leve aumento en la formación de focos de 53BP1. No obstante, este comportamiento no se verificó en pacientes oncológicos. Por el contrario, en LSP de pacientes se obtuvo una reducción de los focos de 53BP1 luego de la recuperación.



**Figura 4.4.1.3. Efecto de los tratamiento cPt o H+cPt en la formación de focos de 53BP1 en LSP.** Los LSP fueron expuestos *in vitro* a cPt (200  $\mu$ M, 1h) o a una hipertermia (42°C, 1 h) 24 h antes del tratamiento con cPt (H+cPt). Los LSP fueron recolectados inmediatamente de finalizado el tratamiento (T0) o 24 h después de una recuperación a 37°C (T24). **(a)** Número de focos de 53BP1 por núcleo en individuos sanos y **(b)** en pacientes oncológicos. Las barras representan la media $\pm$ EE del grupo de pacientes (n=12) y del grupo de individuos controles (n=4). Para el análisis estadístico se utilizó el test Kruskal-Wallis y Dunn. Las diferencias significativas fueron calculadas con respecto al grupo control (37°C, \*) y entre los tiempos experimentales T24 y T0 (#), siendo P<0,05 estadísticamente significativa. **(c)** Comparación del número de focos de 53BP1 por núcleo entre sujetos sanos y pacientes oncológicos. Se utilizó el test de Mann-Whitney para establecer las diferencias estadísticas entre pacientes y controles. \*P<0,05; \*\*P<0,01.

#### 4.4.2. Respuesta celular al daño en el ADN inducido por cisplatino. Evaluación de la respuesta clínica.

Los datos obtenidos a partir de la determinación de focos de  $\gamma$ H2AX fueron correlacionados con la respuesta clínica de los pacientes. En condiciones basales, se observó mayor formación de focos de  $\gamma$ H2AX en LSP de sujetos controles ( $P < 0,05$ ), en relación a los pacientes oncológicos, independientemente de la respuesta clínica a la quimioterapia (Figura 4.4.2.1.a). Similares resultados se verificaron en el porcentaje de células con tinción positiva para  $\gamma$ H2AX, obteniéndose un mayor porcentaje promedio en LSP de personas sanas ( $P < 0,05$ ) que en LSP de pacientes con RP/EE/EP (Figura 4.4.2.1.b).

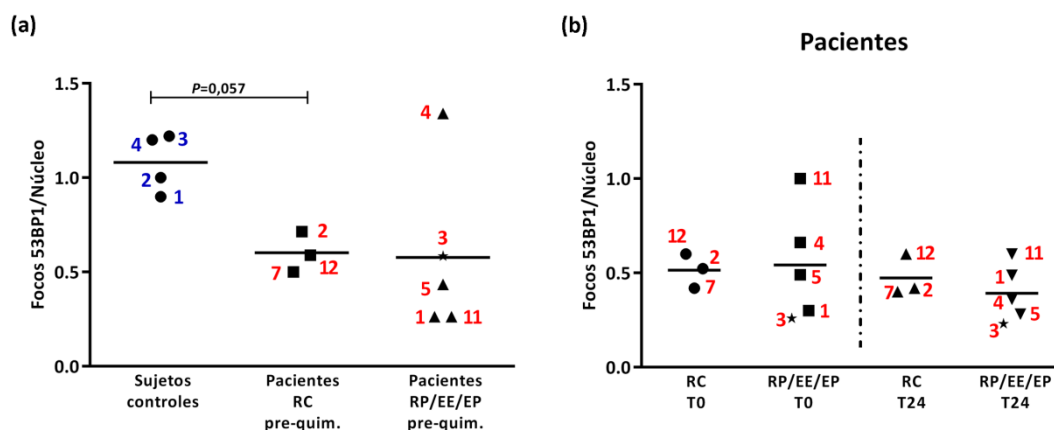


**Figura 4.4.2.1, Focos de  $\gamma$ H2AX en LSP de pacientes oncológicos obtenidos antes de la quimioterapia y su relación con la respuesta clínica.** Diferencias en (a) focos de H2AX por núcleo y (b) porcentaje de células positivas para  $\gamma$ H2AX entre LSP de sujetos controles y de pacientes oncológicos con RC y RP/EE/EP. Diferencias en (c) focos de H2AX por núcleo y (d) porcentaje de células positivas para  $\gamma$ H2AX entre LSP de pacientes oncológicos con RC y RP/EE/EP expuestos *in vitro* a cPt. Los LSP fueron tratados *in vitro* con 200  $\mu$ M de cPt durante 1 h y recolectados inmediatamente finalizado el tratamiento (T0), y luego de 24 h de recuperación a 37°C (T24). Los números indican cada sujeto control o paciente como se ha descrito en las tablas 3.2.1.1 y 3.2.1.2, respectivamente (Capítulo 3). Las líneas horizontales representan la media de cada grupo. Las diferencias estadísticas entre grupos fueron calculadas con el test no paramétrico de Mann-Whitney, considerando  $P < 0,05$  estadísticamente significativa. RC: respuesta completa; RP: respuesta parcial; EE: enfermedad estable; EP: enfermedad progresiva.

Inmediatamente finalizado el tratamiento con cPt, el número de focos H2AX fue superior en aquellos pacientes con respuesta clínica completa. Sin embargo, luego de 24 h de recuperación, se incrementó el número de focos por núcleo celular tanto en pacientes con RC como aquellos con RP/EE/EP, aunque el promedio de focos de H2AX fue levemente superior en LSP de pacientes con RP/EE/EP (Figura 4.4.2.1.c). Resultados similares se obtuvieron en la evaluación del porcentaje de células con tinción positiva para  $\gamma$ H2AX (Figura 4.4.2.1.d).

Cuando se estudió el número de focos de 53BP1 en condiciones basales, al igual que para  $\gamma$ H2AX, la media resultó superior en LSP de sujetos controles ( $P=0,057$  en comparación con los pacientes con RC). Si bien no se observaron diferencias en el número de focos de 53BP1 entre pacientes con RC y pacientes con RP/EE/EP, se notó elevada variabilidad interindividual en el grupo de pacientes con RP/EE/EP (Figura 4.4.2.2.a).

Una vez finalizada la exposición *in vitro* al cPt, no se encontraron diferencias en el número de focos de 53BP1 por núcleo en pacientes con RC y RP/EE/EP (Figura 4.4.2.2.b). Tras 24 h de recuperación post cPt, el promedio de focos de 53BP1 por núcleo disminuyó en pacientes con RC y en aquellos con RP/EE/EP, con un valor promedio levemente inferior para el grupo de pacientes con RP/EE/EP.



**Figura 4.4.2.2. Focos de 53BP1 en LSP de pacientes oncológicos obtenidos antes de la quimioterapia y su relación con la respuesta clínica.** Diferencias en (a) focos de 53BP1 por núcleo entre LSP de sujetos controles y de pacientes oncológicos con RC y RP/EE/EP. Diferencias en (b) focos de 53BP1 por núcleo entre LSP de pacientes oncológicos con RC y RP/EE/EP expuestos *in vitro* a cPt. Los LSP fueron tratados *in vitro* con 200  $\mu$ M de cPt durante 1 h y recolectados inmediatamente finalizado el tratamiento (T0), y luego de 24 h de recuperación a 37°C (T24). Los números hacen referencia a cada caso incorporado en el estudio (persona sana o paciente oncológico), como se ha descrito en las tablas 3.2.1.1 y 3.2.1.2, respectivamente (Capítulo 3). Las líneas horizontales representan la media de cada grupo. Las diferencias estadísticas entre grupos fueron calculadas con el test no paramétrico de Mann-Whitney, considerando  $P<0,05$  estadísticamente significativa. RC: respuesta completa; RP: respuesta parcial; EE: enfermedad estable; EP: enfermedad progresiva.



*En esta sección no se observaron diferencias en la detección de focos  $\gamma$ H2AX en LSP de sujetos controles y pacientes oncológicos con respuesta clínica completa, expuestos in vitro a cPt. Sin embargo, los LSP de pacientes con respuesta clínica RP/EE/EP presentaron menor número de focos  $\gamma$ H2AX que los LSP de sujetos controles y pacientes con RC. Por lo tanto, la detección de focos de  $\gamma$ H2AX en LSP de pacientes oncológicos podría ser útil para predecir la respuesta a análogos del platino, resultado que debe ser corroborado en próximos estudios que incorporen mayor número de pacientes.*

*Por otro lado, la determinación del número de focos de 53BP1 en LSP no resultó útil para predecir la respuesta individual a la quimioterapia.*

## **CAPÍTULO 5.**

### **DISCUSIÓN.**

En varios países, se utiliza la hipertermia en combinación con quimioterapia o radioterapia para potenciar la toxicidad de estas terapias oncológicas. Una de las características del tratamiento con calor es la inducción de la síntesis de las proteínas de golpe de calor (HSPs) [71]. Desafortunadamente, el éxito de la terapia oncológica está condicionado por la aparición de resistencia a la misma. Entre las múltiples moléculas que han sido relacionadas con la resistencia a drogas antineoplásicas, se encuentran por ejemplo las HSPs y algunos componentes de los sistemas de reparación del ADN. Las HSPs son proteínas que por excelencia promueven la supervivencia celular. El rol de las HSPs en la inhibición de la apoptosis ha sido ampliamente estudiado, aunque estas chaperonas también pueden promover la supervivencia celular facilitando la actividad de ciertos mecanismos de reparación, como es el caso del sistema de reparación por escisión de bases (BER), por escisión de nucleótidos (NER) y de rupturas de doble cadena [105, 111, 115]. Sin embargo, poco se conoce acerca de las implicancias de las HSPs en la reparación de daños en el ADN inducidos por cisplatino (cPt) y más específicamente de la relación entre las proteínas Hsp27 (HSPB1) y Hsp72 (HSPA1A) con el sistema de reparación de bases mal apareadas (MMR).

Previamente, el grupo de trabajo al que pertenezco, reportó la colocalización nuclear de las proteínas Hsp27 y Hsp72 con MLH1 y MSH2, componentes claves del sistema de reparación MMR, en linfocitos de sangre periférica (LSP) de personas sanas expuestas *in vitro* a hipertermia y cPt [84]. La escasa cantidad de proteínas que puede obtenerse a partir de los LSP constituyó un factor limitante para realizar ensayos de inmunoprecipitación y comprobar la interacción entre HSPs y componentes del sistema MMR. Por ese motivo, en esta tesis se utilizaron como modelo experimental, además de LSP de pacientes oncológicos, líneas celulares de cáncer de colon humano isogénicas, deficientes y proficientes en la proteína MLH1, designadas como MMR- y MMR+, respectivamente. Anteriormente, Nadin y colaboradores caracterizamos el efecto de una hipertermia a 41 y 42 °C (1 h) en las líneas celulares HCT116, HCT116+ch2 y HCT116+ch3, sin la administración de drogas antineoplásicas. En ese trabajo se reportó la acumulación nuclear de Hsp27 y Hsp72, cambios en la localización subcelular de las proteínas MLH1 y MSH2 en las células MMR+, como así también mayor daño al ADN en las células MMR+ inducido por los tratamientos [184]. Si bien, varios estudios científicos han mostrado los efectos biológicos de la hipertermia en la supervivencia de líneas celulares tumorales sensibles y resistentes al cPt, aún no se han determinado en líneas

celulares MMR-/ + las consecuencias de la aplicación de una hipertermia a 42°C, 24 h antes del tratamiento con cPt [215-221]. Por lo expuesto, en este trabajo se propuso establecer si el pretratamiento con hipertermia modula la sensibilidad al cPt y si su efecto es dependiente del sistema MMR. Existe un amplio consenso de que la hipertermia administrada en forma simultánea o inmediatamente antes del cPt potencia la sensibilidad de las células tumorales a la droga [222]. Sin embargo, cuando la hipertermia precede el tratamiento con cPt, la sensibilización disminuye gradualmente al incrementarse el intervalo de tiempo transcurrido entre el tratamiento térmico y la exposición a la droga, produciendo entonces un efecto aditivo o una citotoxicidad similar en células pre-tratadas y no tratadas con calor. Este comportamiento no sólo ha sido descrito para el cPt, sino también para otras drogas antineoplásicas, tales como el carboplatino y mitomicina-C [218, 219]. Un estudio comparativo sobre la sensibilidad al cPt en células de hámster chino HA-1, demostró que la administración de una hipertermia 12 h antes del cPt causó mayor resistencia a la droga [220]. Por el contrario, Majima y colaboradores reportaron que la sensibilización térmica al cPt en células CHO (ovario de hámster chino) se mantuvo 12 h después de la hipertermia. Además, es interesante mencionar que en estas células expuestas a 43°C 24 h antes del cPt, la sensibilidad a la droga no se modificó cuando el cPt fue administrado a 37°C, mientras que las células resultaron más resistentes cuando la droga se suministró a 43°C, como consecuencia de la termotolerancia [221]. Estos resultados sugieren la existencia de una sensibilidad diferencial al cPt entre las distintas líneas celulares como resultado del desarrollo de la termotolerancia. Este fenómeno puede depender del momento de aplicación de la hipertermia (antes o durante la exposición de la droga) o puede deberse a las características intrínsecas de cada línea celular. En este trabajo de tesis, los ensayos con hipertermia aplicada 24 h antes del cPt, demostraron mayor termotolerancia en las células control HCT116+ch2 (MMR-) que en las células HCT116+ch3 (MMR+), sugiriendo que la deficiencia del sistema MMR quizás podría comprometer la sensibilidad al cPt inducida por el calor (Figura 1.4.1). Previamente, Nadin y colaboradores reportamos que las células MMR- toleraron mejor los efectos de la hipertermia a nivel del daño al ADN evidenciado por un menor porcentaje de daño severo en el ADN inmediatamente finalizado el tratamiento, en relación a la línea isogénica MMR+ [184].

Además del intervalo de tiempo, la sensibilización por la hipertermia también puede depender de la fase del crecimiento celular. La sensibilidad a la hipertermia puede resultar mayor en células que se encuentran en fase estacionaria, mientras que el cambio en el número de células durante el experimento puede afectar la citotoxicidad en fase exponencial [219]. Se ha reportado que líneas celulares de glioma y cáncer de ovario fueron más sensibles al cPt

durante la fase estacionaria que en la fase de crecimiento exponencial. Si bien las células que se replican más rápidamente deberían ser más sensibles a la droga, en este caso, los autores atribuyeron esta mayor sensibilidad al cPt de las células en fase plateau al pH ligeramente ácido (6,8-6,9) encontrado en los cultivos de las cuatro líneas celulares, descartando un rol de los parámetros del ciclo celular. Por otra parte, se ha reportado que el efecto sensibilizador de la hipertermia (42°C) en las células en fase exponencial fue más efectivo en células sensibles al cPt que en células resistentes [216]. En resumen, el efecto de la hipertermia en la quimiosensibilización, puede ser afectado por diversos factores tales como: a) temperatura y duración del tratamiento térmico, b) intervalo de tiempo entre el tratamiento con calor y la exposición a la droga, c) temperatura a la cual la droga es aplicada, d) fase del crecimiento celular y e) sensibilidad intríneca de cada línea celular a la droga. En cuanto a la participación del sistema MMR en el desarrollo de la termotolerancia permanece aún sin resolver.

Con el fin de explicar los resultados obtenidos en los ensayos clonogénicos y de viabilidad, donde las células con un sistema MMR+ resultaron más sensibles al tratamiento H+cPt con respecto a las células MMR-, se procedió a estudiar ciclo celular y apoptosis. Aunque el cPt indujo la detención del ciclo celular en la fase S de las células MMR-/+, este efecto fue menor en células que carecen de un sistema MMR funcional. Por su parte, el pretratamiento con hipertermia causó la acumulación de las células en las fases S y G2/M 24 h después del cPt en las líneas MMR-/+, siendo este efecto superior en las células MMR+. Esto significa que el pretratamiento con calor detuvo la progresión del ciclo celular e inhibió el crecimiento de las células tumorales.

Posteriormente, la determinación de Anexina V/IP por citometría de flujo y el cociente Bax/Bcl-2 por western blot demostraron que los tratamientos cPt e H+cPt no indujeron diferencias significativas entre células MMR-/+ en el proceso de apoptosis. Dado que el sistema MMR está involucrado en la activación de la apoptosis inducida por cPt, se puede inferir que para desencadenar la apoptosis podría necesitarse un mayor tiempo de exposición a la droga, concentraciones más elevadas de cPt, e incluso otros periodos de recuperación. La técnica del MTT para determinar la viabilidad celular estima el número de células viables en una relación lineal con la actividad mitocondrial. En células MMR+ expuestas a H+cPt la viabilidad se redujo un 35%, aunque sin activar la apoptosis, tratándose entonces de un efecto citostático. En otras palabras, el tratamiento con H+cPt causó la detención del ciclo celular en las fases S y G2/M especialmente en células MMR+, en ausencia de cambios apoptóticos, probablemente para permitir la reparación del daño en el ADN antes del inicio de la división

celular. Estas observaciones se corresponden con las de otro grupo de investigación que ha reportado que el estrés térmico activa la vía de señalización ATR-CHK1, causando la detención del ciclo celular en G2/M y reduciendo o bien evadiendo la apoptosis en líneas celulares humanas de leucemia y de tumores sólidos [223]. En concordancia, en las líneas celulares MMR-/+ estudiadas, se observó que la hipertermia incrementó notablemente la fosforilación de CHK1 inducida por el cPt, indicando la activación de esta vía de señalización. Aún se encuentra en discusión si la hipertermia induce en forma directa DSBs, las cuales son responsables de la activación de la vía ATM-CHK2 [165]. En este estudio, las células de colon MMR-/+ mostraron que la fosforilación de CHK2 fue significativamente inferior a la de CHK1, evidenciando que la activación de la vía ATR-CHK1 fue la que predominó en respuesta a los tratamientos administrados. Por otra parte, es sabido que el estrés térmico aumenta los niveles de ROS en la célula, lo cual genera SSBs persistentes, que pueden acumularse originando el colapso de la horquilla de replicación durante la fase S del ciclo celular [224]. Estos daños mencionados constituyen el principal fundamento de la activación de la vía ATR-CHK1 en células expuestas al calor, tal como se observó en este modelo celular MMR-/+ estudiado.

La activación y persistencia de las vías de señalización de respuesta al daño en el ADN constituye una característica que comparten también las células senescentes [225]. La senescencia inducida por el acortamiento de los telómeros ha sido ampliamente estudiada. Sin embargo, la senescencia inducida por el estrés (metales pesados, drogas antineoplásicas, etc.) ha recibido menor atención. Además, la senescencia también es un mecanismo de sensibilidad, además de la apoptosis [226]. Se ha propuesto que este proceso representa un estado irreversible de detención del ciclo celular, donde las células permanecen metabólicamente activas [225]. Esta es una de las razones por la cual, este tipo de respuesta celular no puede ser distinguida mediante los ensayos de viabilidad asociados a la actividad mitocondrial, como la reducción del colorante MTT. Volviendo al presente estudio, la línea celular MMR+ mostró una inducción de células senescentes, especialmente a las 4 h de recuperación de los tratamientos, siendo el porcentaje de senescencia superior en las células que recibieron tratamiento térmico. Llamativamente, a pesar de ser considerado un proceso irreversible, se observó que el porcentaje de células senescentes MMR+ disminuyó aproximadamente un 10% a las 24 h de recuperación. Otros autores han reportado que el cisplatino es capaz de inducir senescencia en células CNE1 (carcinoma nasofaríngeo). En el mismo trabajo, se determinó además, que el porcentaje de células SA- $\beta$ gal positivas disminuyó 96 h después del tratamiento, sugiriendo que la senescencia inducida por dosis subletales de la

droga podía ser reversible [227]. El proceso fue acompañado por detención del ciclo celular en fase S, y resultó irreversible a elevadas dosis de cisplatino, proponiendo que la capacidad de revertir la senescencia podría ser dependiente de la extensión del daño celular. Si bien actualmente, existe consenso sobre la irreversibilidad del proceso de senescencia, en los últimos años nuevos estudios han demostrado que las células tumorales son capaces de “escapar” de la senescencia y restablecer la división celular mediante inactivación de p53 o de p16, o también a través de la sobre expresión de survivina o de cdc2 [228]. Trabajos previos, han asociado a las proteínas Hsp27 y Hsp72 con la inhibición del proceso de senescencia [229], si bien en nuestro modelo celular MMR+, observamos un mayor porcentaje de senescencia como consecuencia del tratamiento H+cPt acompañado de una elevada expresión de estas chaperonas (determinada por inmunoblot, Figura 4.1.4). En células mesenquimales (MSC) se ha reportado que una hipertermia de 45°C durante 10 ó 30 min es capaz de activar la senescencia, a pesar de la elevada inducción de Hsc70 y Hsp72 luego del tratamiento con calor [230]. En consecuencia, la expresión de las HSPs no constituiría un factor determinante para desencadenar o inhibir el proceso de senescencia. Sin embargo, dado que en las células MMR- el tratamiento con cPt o H+cPt no incrementó el porcentaje de células SA-βgal positivas, es posible inferir que la funcionalidad del sistema MMR+ podría condicionar la activación del mecanismo de senescencia luego del tratamiento con cisplatino, quizás al ejercer su función en la activación de la respuesta al daño en el ADN [36]. Futuros estudios serán necesarios para profundizar en el conocimiento del rol del sistema MMR en la activación de la senescencia.

Diversos trabajos de investigación han demostrado que la hipertermia puede inhibir la reparación del ADN [166]. Durante años se han empleado líneas celulares deficientes y proficientes en una vía de reparación específica, por ejemplo en la vía NHEJ, para determinar si ese sistema es un blanco de la hipertermia. El razonamiento consiste en que si el mecanismo de reparación es un blanco de la hipertermia, las células proficientes serán sensibilizadas por el tratamiento térmico. Por el contrario, las células deficientes en dicha vía de reparación no resultarán sensibilizadas por la hipertermia [165]. Teniendo en cuenta este antecedente, el sistema MMR podría ser afectado, al menos parcialmente, por la hipertermia. A nivel experimental, si bien la hipertermia acentuó la detención en las fases S y G2/M del ciclo celular de las dos líneas celulares, su efecto sensibilizador pudo verificarse mayormente en las células MMR+, en coincidencia con el ensayo de viabilidad celular MTT. Por otro lado, la expresión de la proteína MLH1 se redujo notablemente inmediatamente finalizado el tratamiento con H+cPt, explicando en parte de qué modo la hipertermia podría afectar la funcionalidad del sistema MMR en las células competentes para este sistema. Sin embargo, la disminución

proteica de MLH1 no se acompañó de un descenso en los niveles de ARNm, sugiriendo la intervención de mecanismos de regulación post-transcripcionales o pretraduccionales. En las células MMR-, el tratamiento H+cPt redujo la expresión proteica de MSH2, pero no su expresión génica. El descenso de la expresión proteica de MLH1 y MSH2 verificado en las células MMR+ y MMR-, respectivamente, podría ser causado por la degradación proteosomal inducida por el estrés térmico. Diversos reportes muestran que la hipertermia puede inhibir la reparación del ADN a través de la depleción/degradación de las proteínas de reparación, como en el caso de BRCA1, BRCA2, OGG1 y Ku70/80 [176, 180-182]. Esto se debe a que el principal blanco de la hipertermia son las proteínas en su conjunto, y por lo tanto, las proteínas nucleares, muchas de las cuales participan en la reparación del ADN, también se ven afectadas por el calor [166]. Por esta razón, es importante tener en cuenta que la hipertermia podría estar causando la degradación de las proteínas del sistema MMR en las células HCT116+ch2 y HCT116+ch3 expuestas al cPt.

Posteriormente se evaluó el daño en el ADN inducido por el cPt mediante ensayo cometa alcalino. Esta metodología permitió determinar la proporción de aductos de cPt-ADN, y su reparación. Se observó una mayor cantidad de aductos a las 4 h de finalizado el tratamiento con la droga en células MMR+ y a las 24 h en células MMR-. Se ha reportado que la formación de uniones cruzadas en el ADN inducida por análogos del platino es un proceso lento, alcanzando su pico máximo entre las 6 y 8 h posteriores a la exposición con la droga [213]. En las células MMR-, los aductos de cPt no fueron reparados tras una resuperación de 24 h. Sin embargo, en células MMR+ se verificó una disminución en la proporción de aductos, indicando una proficiencia en el proceso de reparación. Aunque ambas líneas celulares, MMR-/+ , poseen un sistema de reparación NER funcional, que es el principal responsable de la remoción de los aductos de cPt, puede inferirse que el sistema MMR, el cual participa en la detección y señalización de este tipo de daño [36, 116, 125], posibilita una respuesta celular más rápida y eficiente frente a este tipo de daño en células MMR+. Por otro lado, el tratamiento con hipertermia incrementó significativamente la formación de aductos de cPt en las dos líneas celulares, aunque la proporción de aductos resultó mayor en las células con un sistema MMR+. En concordancia con observaciones anteriores, esto puede deberse a que la línea MMR- es más tolerante al daño en el ADN inducido por la hipertermia en relación a la línea MMR+, como se ha reportado previamente [184]. Además, luego del tratamiento con H+cPt, las células MMR+ no fueron capaces de remover los aductos cPt-ADN. Las consecuencias de la hipertermia en la formación de aductos de platino han sido también documentadas en otros trabajos de investigación. Van de Vaart y colaboradores determinaron

una mayor formación de aductos de platino en líneas celulares de cáncer de ovario expuestas a hipertermia y cPt [231]. Rietbroek y colaboradores, obtuvieron resultados similares en células SW1573, expuestas simultáneamente a drogas análogas del platino (cisplatino, lobaplatino u oxaliplatino) e hipertermia, involucrando la mayor formación de aductos inducido por la hipertermia en el aumento de la citotoxicidad de las drogas [232]. Por su parte, Hettinga y colaboradores estudiaron la acumulación de cPt en la célula y la formación de aductos Pt-ADN mediante espectrofotometría de absorción atómica en líneas celulares sensibles y resistentes a la droga. Reportaron que la administración combinada de H+cPt potenció la acumulación intracelular de cPt, incrementó la formación de aductos de cPt-ADN, y disminuyó la remoción de los mismos, independientemente de la sensibilidad de la línea celular al agente antineoplásico [233]. Los autores atribuyeron el primer efecto a una disminución de los niveles de GSH inducido por el tratamiento térmico, afectando en consecuencia la detoxificación del metal. Por otra parte, tal como se describió en la introducción (capítulo 1.5.), el estrés térmico aumenta la permeabilidad y fluidez de la membrana plasmática, factor que puede también contribuir a incrementar el contenido de cPt en la célula [158, 159]. Por consiguiente, una mayor proporción intracelular de cPt puede incrementar la formación de aductos Pt-ADN, ya que hay mayor número de moléculas disponibles para reaccionar con el ADN. Sin embargo, los cambios en la estructura de la cromatina inducido por la hipertermia, que pueden modificar el acceso al ADN, constituye la explicación preferente para el incremento en la formación de aductos de cPt cuando las células son expuestas al tratamiento combinado H+cPt [154]. Otra de las razones por la cual la hipertermia aumentó la cinética de formación/reparación de aductos Pt-ADN, es debido a su acción sobre las proteínas en general, entre ellas, componentes de los sistemas de reparación, ya sea induciendo su desnaturalización o degradación, e inactivando de este modo los mecanismos que posee la célula para reparar el daño en el ADN [233]. Esto también podría explicar los resultados obtenidos en el presente trabajo, donde las proteínas del sistema MMR fueron afectadas por el tratamiento térmico, observándose que en células MMR-/+ tratadas con H+cPt se formaron mayor número de aductos de cPt que no pudieron ser removidos eficazmente en las células MMR+.

También se determinó la fosforilación de la histona H2AX, marcador de rupturas de doble cadena, las cuales se producen tras la exposición a agentes alquilantes, durante la replicación o la reparación del ADN [49]. La cuantificación de  $\gamma$ H2AX a distintos tiempos de recuperación post-tratamientos con agentes genotóxicos, suele utilizarse como un indicador de la reparación del daño en el ADN. El tratamiento con cPt en las células MMR-/+ causó la máxima fosforilación de H2AX a las 24 h de finalizado el tratamiento. Los focos de  $\gamma$ H2AX



alcanzaron su máxima expresión tardíamente, ya que se forman durante la fase S del ciclo celular una vez que la horquilla de replicación encuentra los aductos intercatenarios generados por el cPt, los cuales a su vez demoran horas en formarse, tal como se mencionó previamente [213]. Un estudio realizado en líneas celulares de cáncer de endometrio expuestas a cPt, demostró que la fosforilación de H2AX ocurrió solamente durante la fase S del ciclo celular, a diferencia de doxorubicina que indujo la fosforilación de H2AX a lo largo de todo el ciclo celular. Además, la máxima expresión de  $\gamma$ H2AX fue alcanzada a distintos tiempos de exposición a la droga en función de la línea celular [234]. Barr M y colaboradores, estudiando diferentes tiempos de recuperación post-cPt en líneas celulares sensibles y resistentes a la droga, detectaron la máxima formación de focos de  $\gamma$ H2AX entre las 12 y 24 h después del tratamiento [235]. Además, en líneas celulares de carcinoma de pulmón, se obtuvo el mayor número de focos de  $\gamma$ H2AX a las 24 h de finalizado el tratamiento con cPt, disminuyendo gradualmente con el transcurso del tiempo, pero persistiendo aún después de 72 h de recuperación [198]. Estos reportes demuestran que las DSBs constituyen un daño severo y difícil de reparar para la célula, necesitando tiempos de recuperación más prolongados que los estudiados en este trabajo para detectar su completa remoción. Similarmente a lo observado mediante ensayo cometa alcalino, el tratamiento con H+cPt no sólo incrementó el daño en el ADN en las dos líneas celulares con respecto al tratamiento con cPt, sino que además no se detectó la remoción de este daño, al menos 24 h después de finalizado el tratamiento, evidenciando nuevamente el efecto del estrés térmico en el daño y reparación del ADN.

Además de inducir la degradación de proteínas nucleares, otro mecanismo por el cual la hipertermia puede inhibir la reparación del ADN, es a través de la delocalización nuclear de proteínas componentes de los sistemas de reparación [165]. La localización subcelular de las proteínas Hsp27, Hsp72, MLH1 y MSH2 se caracterizó por inmunofluorescencia antes y después del tratamiento con cPt e H+cPt. En condiciones basales, la proteína MSH2 se expresó principalmente en el núcleo de células MMR-/+, aunque también se observó una escasa expresión en el citoplasma, la cual se incrementó luego de ser expuestas a la hipertermia. Esta observación coincide con resultados previos del grupo de trabajo, que reportó una expresión citoplasmática de MSH2 en LSP de pacientes oncológicos, aunque su significancia clínica permanece incierta [84]. Es importante mencionar que tanto MLH1 como PMS2 presentan señales de localización nuclear, formándose el heterodímero antes de translocarse al núcleo, y sirviendo de respaldo la presencia de señal de localización nuclear en cada componente del complejo MutL $\alpha$  [236]. Por el contrario, en el complejo MutS $\alpha$ , la proteína MSH6 presenta

señal de localización nuclear pero no así MSH2, por lo que es necesaria su heterodimerización para su transporte al núcleo celular. Si bien MLH1 y MSH2 son proteínas sensoras de daño en el ADN, que cumplen su función en el núcleo, se ha descrito la presencia de MSH2 en el citoplasma, que también suele observarse cuando MSH6 se expresa en baja proporción en la célula. Diversos estudios han reportado la localización independiente de MSH2 en el citoplasma de células no dañadas aunque aún se desconoce su función [237]. Los resultados de los inmunoblots no mostraron aumento significativo en los niveles de expresión totales de MSH2 cuando las células fueron tratadas con H+cPt, sugiriendo quizás que una hipertermia previa al cPt indujo la translocación de una pequeña cantidad de MSH2 fuera del núcleo. Estos resultados también coinciden con estudios previos, donde la hipertermia indujo la translocación de MLH1 y MSH2 del núcleo al citoplasma en células MMR+ [184]. Otros autores también han reportado la deslocalización nuclear de proteínas de reparación como consecuencia de la hipertermia. Xu y colaboradores evidenciaron que temperaturas iguales o superiores a 41°C inducían la translocación núcleo-citoplasma de la proteína de reparación MRE11 [178]. Esta redistribución celular disrumpe el complejo MRN, necesario para sensor e iniciar la reparación de las DSBs en el ADN [179]. En el caso de la ADN glicosilasa OGG1, se ha reportado que la hipertermia moderada no sólo causó su degradación, sino que además la proteína residual permaneció en la región perinuclear, impidiendo la reparación de las bases dañadas por el sistema BER [176]. En este trabajo de tesis verificamos en las células expuestas a H+cPt una combinación de los efectos ya publicados por la hipertermia: una disminución de MSH2 en células MMR-, y una depleción de MLH1 y redistribución citoplasmática de MSH2 en células MMR+. Estos resultados sugieren que la hipertermia es capaz de afectar al sistema MMR.

En el caso de las HSPs, en condiciones basales, las proteínas Hsp27 y Hsp72 se localizaron en el núcleo y citoplasma de células MMR-/+. Sin embargo, estas proteínas se observaron principalmente en el núcleo luego de la exposición al cPt. Dado que los análisis de inmunoblots no mostraron un incremento en la expresión total de HSPs inmediatamente finalizado el tratamiento con cPt, se puede deducir que las proteínas Hsp27 y Hsp72 se translocaron desde el citoplasma al núcleo luego del tratamiento con la droga. En numerosos reportes se ha documentado que Hsp27 y Hsp70 (HSPA) pueden dirigirse y acumularse en el núcleo bajo condiciones de estrés, participando probablemente en la protección o recuperación del daño al ADN [184, 238-240]. Laszlo y colaboradores demostraron que Hsc70 (forma constitutiva de Hsp70, también conocida como HSPA8) y Hsp72 son los componentes mayoritarios del exceso de proteínas nucleares inducidas por el estrés; que se asocian con una

recuperación más rápida de los procesos nucleares y citoplasmáticos y con el desarrollo de termotolerancia en células resistentes al calor [241, 242]. Considerando estos resultados en su conjunto, se puede asumir que la expresión de Hsp27 y Hsp72 inducida por la hipertermia podría facilitar la recuperación de las células expuestas al cPt en el grupo H+cPt. Así, el mayor incremento en los niveles de HSPs observado en las células HCT116+ch2 en relación a su contraparte MMR+, podría explicar en parte el estado de tolerancia o resistencia de las células MMR-, reflejado en un aumento del IC50 cuando fueron pretratadas con calor.

El segundo objetivo planteado consistió en establecer si Hsp27 y Hsp72 interactuaban con las proteínas MLH1 y MSH2 en células tratadas con cPt. Para ello, se realizó inmunofluorescencia y se determinó la asociación de las proteínas a través del coeficiente de correlación de Pearson (CCP), y mediante inmunoprecipitación. En las células MMR+, las asociaciones entre los pares de las proteínas estudiadas se incrementaron después del tratamiento con cPt, que por el contrario disminuyeron cuando las células fueron previamente expuestas a la hipertermia. En el caso de la colocalización de Hsp72 con MLH1 y MSH2, el pretratamiento con calor descendió el CCP a valores incluso por debajo de las condiciones basales. En las células MMR- expuestas a H+cPt, también se observó menor colocalización entre la proteína MSH2 y las HSPs, comparada con las células tratadas únicamente con cPt. Los valores inferiores de CCP en el grupo H+cPt, pueden ser explicados principalmente por el incremento significativo en la expresión de Hsp27 y Hsp72, observado por inmunoblot en las líneas celulares estudiadas y además, por la relocalización citoplasmática de las proteínas Hsp27 y Hsp72. Es bien conocido que la hipertermia no sólo induce HSPs, sino que también recluta HSPs a proteínas desnaturalizadas o mal plegadas, abandonando transitoriamente a sus proteínas clientes y estableciendo asociaciones con otras moléculas para asistirles en el correcto plegamiento o degradación [166]. Los ensayos de inmunoprecipitación confirmaron las interacciones entre Hsp27 y Hsp72 con MLH1 y MSH2 en células MMR+ en condiciones basales y luego de los tratamientos experimentales. En las células MMR- también se demostraron las interacciones entre Hsp27 y Hsp72 con MSH2, lo cual indica que estas asociaciones proteicas son independientes de la funcionalidad del sistema MMR.

Este trabajo reporta por primera vez las interacciones de Hsp27 y Hsp72 con proteínas del sistema MMR en líneas celulares de cáncer de colon deficientes y proficientes en el sistema MMR, expuestas a los efectos de la hipertermia y cisplatino. Castro y colaboradores reportamos también la interacción entre Hsp27 y MSH2 en células de glioma humano Gli36 expuestas a temozolamida. En concordancia con el presente trabajo, se verificó un significativo

incremento en asociación de estas proteínas luego del tratamiento con la droga [113]. Numerosos autores han documentado la participación de chaperonas moleculares en mecanismos de reparación del ADN. Hasta la fecha, Hsp90 ha sido proteína de golpe de calor más estudiada en el contexto del daño y la reparación del ADN [115]. Si bien se ha demostrado que las HSPs interactúan con diversas proteínas de reparación del ADN, aún quedan por identificar proteínas clientes de Hsp27 y Hsp72 [243]. Años atrás, Kenny y colaboradores describieron que Hsp70 se une a la endonucleasa APE1 aumentando de 10 a 100 veces su actividad enzimática [105]. El mismo grupo de investigación demostró posteriormente que el dominio N-terminal de Hsp70 podía estimular de 5 a 10 veces la actividad de la polimerasa Pol $\beta$ , acrecentando la eficiencia de la reparación [106]. Guttman y colaboradores reportaron la colocalización entre Hsp27 y ATM en condiciones basales y luego de la exposición a radiación ionizante en líneas celulares tumorales de cabeza y cuello. Observaron además, que la disminución de la expresión de Hsp27 atenuó la reparación de las DSBs, aumentando la sensibilidad de estas células a la radiación. Estos autores postularon un rol para Hsp27 en la señalización de la reparación de las DBSs, proponiendo a esta chaperona como un potencial blanco terapéutico [244]. En el caso del sistema MMR, los resultados de esta tesis ponen de manifiesto la interacción de la proteína MSH2 con Hsp27 y Hsp72, tanto en células MMR+ como también en células MMR-. Por lo tanto, es necesario profundizar en estudios posteriores el rol de las HSPs, para determinar si están facilitando la reparación del daño al ADN inducida por cPt a través del sistema MMR o si estas interacciones son sólo una consecuencia de sus funciones como chaperonas moleculares.

En el tercer objetivo de esta tesis se propuso evaluar en LSP de pacientes oncológicos obtenidos antes de la quimioterapia y expuestos *in vitro* a cisplatino, la utilidad predictiva de la determinación del daño en el ADN mediante ensayo cometa alcalino. Además de su capacidad para detectar SSBs y DSBs, así como también sitios álcali lábiles, el ensayo cometa alcalino, constituye una herramienta para detectar uniones cruzadas en el ADN. Los agentes alquilantes como el cisplatino, generan uniones ADN-ADN y/o ADN con proteínas histonas, que a diferencia de otros agentes genotóxicos, reducen la migración del ADN durante el ensayo cometa [245]. Se ha postulado que la capacidad de reparación del daño en el ADN causado por análogos del platino podría reflejar la sensibilidad celular a estas drogas [246, 211]. El número creciente de investigaciones enfocadas en demostrar la utilidad de la reparación del ADN como biomarcador en pacientes oncológicos [246-249], se debe a que proporciona mayor información sobre la funcionalidad y eficiencia de los sistemas de reparación que la cuantificación de la expresión génica o proteica [250, 251]. En este contexto, el ensayo cometa

alcalino se ha propuesto como herramienta para el monitoreo de la capacidad de reparación del ADN en estudios clínicos, ya que presenta la ventaja de ser un método de bajo costo, sensible y que requiere una pequeña cantidad de células [247-249]. Además, estudios previos del grupo de trabajo mostraron que las células con daño total medido por ensayo cometa (score 5) se correlacionaron con la muerte celular, siendo esta metodología no solamente útil para evaluar el daño en el ADN, sino también para estimar la proporción de apoptosis en la población celular [112]. En pacientes oncológicos, la extracción de una muestra de sangre periférica para la separación de células mononucleares, es menos invasiva que la de cualquier otro tejido. Además, se ha postulado que los LSP podrían servir de alternativa (o sustituto) en el caso de aquellos tumores procedentes de tejidos que no resulten fácilmente accesibles [248-250]. Sumado a esto, se ha reportado que los resultados obtenidos en leucocitos de pacientes oncológicos expuestos *in vitro* a la droga utilizada en el esquema terapéutico, reflejan la respuesta del paciente a la quimioterapia [252, 253, 211]. En este trabajo, utilizando ensayo cometa alcalino, se verificó una elevada variabilidad interindividual en el daño basal de LSP de pacientes oncológicos, resultado que se corresponde con los obtenidos por otros autores [212, 250, 254, 255]. Es importante mencionar que se ha reportado que la existencia de variabilidad interindividual es uno de los requisitos para que un estudio sea verdaderamente predictivo [210, 252, 256]. Asimismo, no se encontraron diferencias significativas a nivel del daño basal entre individuos sanos y pacientes oncológicos, aunque en otros trabajos se ha reportado una mayor media de migración del ADN en LSP de pacientes oncológicos que en sujetos sanos [211, 212, 250, 257]. Esta discordancia puede estar dada por la elevada variabilidad interindividual y el bajo número de casos estudiados. En coincidencia con reportes previos del grupo de trabajo, el porcentaje de células con daño total (score 5) en condiciones basales fue mayor en pacientes oncológicos que en individuos sanos [212].

Tal como se ha menciononado anteriormente, no sólo la formación de aductos de Pt-ADN es lenta sino que también lo es su remoción. El sistema NER es el encargado de llevar a cabo la remoción de los aductos de los análogos del platino, y se ha observado en leucocitos de pacientes oncológicos que este proceso puede tardar más de 21 h [253]. Fikrova y colaboradores, demostraron mediante ensayo cometa en LSP de pacientes con cáncer, el máximo contenido de aductos de platino 24 h después de la quimioterapia, persistiendo aún durante varios días y disminuyendo gradualmente hasta una semana después de la administración de la droga [250]. Bonetti y colaboradores, determinaron mediante espectrometría de masas, el contenido de aductos de platino en LSP de pacientes oncológicos y encontraron la mayor proporción de aductos en el ADN a las 24 h de la administración de la quimioterapia [258]. En el presente trabajo de tesis, una vez finalizado el tratamiento con cPt *Proteínas de golpe de calor y reparación del ADN en líneas celulares tumorales y en pacientes oncológicos tratados con análogos del platino*

(T0), se verificó un descenso en la migración del ADN, debido a un mayor contenido de los aductos. Sin embargo, a las 24 h de finalizado el tratamiento (T24) se observó un incremento significativo en el porcentaje de células con daño total (score 5), que contribuyó a elevar los valores de migración del ADN en este grupo. A diferencia de los resultados obtenidos en líneas celulares, la hipertermia no aumentó la formación de aductos de cPt en LSP. Este resultado se corresponde con lo reportado por Nadin SB y colaboradores, donde utilizando el ensayo cometa alcalino, no encontraron diferencias significativas en la migración del ADN entre muestras tratadas con cPt y con H+cPt [84]. Sin embargo, luego de 24 h de recuperación, se observó un mayor contenido de aductos en LSP expuestos previamente a una hipertermia y no así en LSP expuestos sólo a cPt. Estas diferencias pueden ser debidas a los efectos del tratamiento térmico en la formación de aductos de cPt y en la inhibición de su reparación. Además, luego de la recuperación, los LSP tratados con H+cPt, mostraron menor porcentaje de apoptosis que aquellos LSP que recibieron sólo cPt, originado probablemente por el efecto citoprotector del tratamiento con calor. Se ha reportado la inducción de HSPs en LSP de pacientes oncológicos expuestos *in vitro* a una hipertermia 24 h antes del cPt [84]. Por último, es bien conocido el rol antiapoptótico de las HSPs que tiene como fin promover la supervivencia celular.

Posteriormente, se correlacionaron los resultados obtenidos a partir de estudios de la migración del ADN con la respuesta clínica de los pacientes. En aquellos pacientes con respuesta clínica completa al tratamiento, se observó menor daño basal en LSP, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas debido al número limitado de pacientes. Un estudio reciente ha reportado lo contrario, es decir, mayor daño basal en LSP de pacientes sensibles a la terapia con análogos del platino [211]. Por otro lado, Nadin y colaboradores no encontraron diferencias en la media de la migración en condiciones basales de LSP de pacientes con RC y pacientes con RP/EE/EP, que también recibieron terapia con análogos del platino [212]. Luego del tratamiento *in vitro* con cPt, los LSP de pacientes con RC mostraron mayor contenido de aductos de cPt (menor migración del ADN) y menor porcentaje de células con daño total. En concordancia, otros estudios han demostrado que el daño en el ADN inducido *in vitro* por cisplatino en leucocitos de pacientes, se correlaciona con la respuesta individual a la quimioterapia, de modo que los pacientes con mejor respuesta al tratamiento poseen mayor número de aductos [252, 253, 259]. Por el contrario, Bonneti y colaboradores no encontraron correlación entre la formación de aductos de platino en leucocitos expuestos *in vitro* a la droga y la respuesta individual a la quimioterapia [258]. Por su parte, Nadin y colaboradores reportaron una menor migración del ADN (mayor contenido de aductos) en

pacientes con RP/EE/EP en relación a los pacientes con RC [212]. Es importante mencionar que muchos de estos trabajos han estimado la formación de aductos de platino mediante espectrometría de absorción atómica, que si bien es una técnica sensible, es más laboriosa, costosa y requiere un mayor número de células que el ensayo cometa. En el presente trabajo, el ensayo cometa alcalino también permitió estimar el porcentaje de células apoptóticas (células con daño total, score 5). En pacientes con RC se verificó un porcentaje más bajo de células apoptóticas que en pacientes con RP/EE/EP luego de la exposición *in vitro* a cPt, aunque sin significancia estadística. Por el contrario, otro grupo de investigación ha reportado una mayor tasa de apoptosis en LSP de pacientes sensibles al tratamiento, luego de la exposición *in vitro* de los LSP a análogos del platino. Sin embargo, en ese estudio se utilizó un ensayo de ELISA para evaluar apoptosis [211]. La existencia de controversia en los resultados, puede deberse a la inclusión de grupos reducidos de pacientes, tratamientos quimioterápicos combinados y diferentes metodologías de análisis. Por lo tanto, es necesario diseñar estudios a mayor escala y más homogéneos para obtener conclusiones más firmes.

En el cuarto objetivo se evaluó la utilidad predictiva de la determinación de focos de  $\gamma$ H2AX y de 53BP1, marcadores de daño en el ADN, en LSP de pacientes oncológicos obtenidos antes de la quimioterapia y expuestos *in vitro* a cisplatino. Estas proteínas intervienen en la vía de señalización de respuesta al daño en el ADN. La desregulación de esta vía ha sido asociada con transformaciones malignas y con la respuesta a agentes antineoplásicos que dañan el ADN [211]. La fosforilación de la variante de histona H2AX en el residuo serina 139 y la formación de focos de  $\gamma$ H2AX se ha correlacionado con la generación de rupturas de doble cadena, y en consecuencia, se ha propuesto como marcador de daño en el ADN [51]. Sin embargo, se han hallado algunas inconsistencias a nivel cuantitativo y temporal entre focos  $\gamma$ H2AX y DSBs. También se han descrito focos de  $\gamma$ H2AX “espontáneos”, que pueden ser desencadenados por factores intrínsecos como el estrés replicativo, daño oxidativo, envejecimiento o el metabolismo del ADN [54]. En este trabajo se encontró, en condiciones basales, mayor número de focos  $\gamma$ H2AX en LSP de sujetos controles que en LSP de pacientes oncológicos. Existe cierta controversia al respecto, ya que por un lado algunos estudios han reportado menor número de focos  $\gamma$ H2AX en LSP de sujetos controles en relación a pacientes oncológicos [211, 260, 261]. Sin embargo, otros trabajos no han encontrado diferencias en el nivel basal de  $\gamma$ H2AX en LSP de pacientes oncológicos y sujetos controles [262, 263]. El resultado obtenido en este estudio puede deberse al número reducido de casos controles evaluado y a la elevada variabilidad interindividual. Aunque también es necesario considerar que la fosforilación de H2AX es desencadenada por las proteínas ATM, ATR y DNA-PK, cuya expresión suele estar

alterada en algunos tumores causando una deficiencia en la capacidad de las células para sentir el daño en el ADN [264]. Incluso, se ha reportado que la inactivación de estas proteínas puede incrementar el riesgo de desarrollar ciertos tumores, como es el caso de cáncer de próstata, mama, ovario, endometrio, pulmón o cervix [264-267]. Teniendo en cuenta estos antecedentes, la menor expresión de  $\gamma$ H2AX observada en los pacientes oncológicos, podría ser indicativo de una deficiencia en la señalización del daño en el ADN. Recientemente se ha reportado que LSP de sujetos controles expuestos a radiación ionizante presentaron mayor intensidad de  $\gamma$ H2AX (evaluado por citometría de flujo) en relación a pacientes deficientes en ATM [56]. Un gran número de agentes genotóxicos inducen focos de  $\gamma$ H2AX solo como un evento secundario cuando las lesiones causan la detención de la horquilla de replicación. En consecuencia, la generación de focos de  $\gamma$ H2AX puede demorar varias horas desde la exposición a radiación UV o a agentes alquilantes [54]. En consistencia con esto, no se observaron cambios en el valor medio de focos de  $\gamma$ H2AX por núcleo inmediatamente después de efectuada la exposición al cPt, pero en cambio se notó un leve aumento de este marcador en las muestras de LSP expuestas a H+cPt. Esto puede deberse en primer lugar a la capacidad de la hipertermia para inducir focos de  $\gamma$ H2AX [268], y en segundo lugar a que el tratamiento con calor fue aplicado 24 h antes del cPt, otorgando tiempo suficiente para la activación de las vías de señalización y fosforilación de H2AX. Finalizadas las 24 h de recuperación, disminuyó el porcentaje total de células  $\gamma$ H2AX positivas alcanzando los valores del grupo control, aunque el número promedio de focos por núcleo se incrementó. En otras palabras, algunas células (en grupos T24) pudieron recuperarse del daño inducido, mientras que en otras el número de focos  $\gamma$ H2AX aumentó considerablemente, coincidiendo con el incremento en el porcentaje de células con daño total con score 5 (evaluado mediante ensayo cometa alcalino).

Por otro lado, se analizaron correlaciones entre la respuesta clínica de los pacientes al tratamiento con el número de focos de  $\gamma$ H2AX/célula y el porcentaje de células con tinción positiva para  $\gamma$ H2AX. Los pacientes oncológicos con RC a la quimioterapia presentaron mayor número de focos  $\gamma$ H2AX positivos y mayor porcentaje LSP positivos, en relación a los pacientes con RP/EE/EP. Esta correlación se verificó tanto en condiciones basales como inmediatamente después del tratamiento con cPt, aunque en ambos casos las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Otros autores reportaron en LSP de pacientes con cáncer de ovario, que un mayor porcentaje de células  $\gamma$ H2AX positivas se asociaba con mayor sensibilidad a la quimioterapia tanto en condiciones basales como luego del tratamiento *in vitro* con análogos del platino [211]. La expresión de  $\gamma$ H2AX se ha utilizado principalmente para estudiar los efectos genotóxicos de la radiación ionizante. Además, la aplicación de esta



metodología es más habitual en muestras de LSP obtenidas de pacientes luego del tratamiento oncológico y es más infrecuente en muestras de pacientes expuestas *in vitro* a la terapia antineoplásica. Djuzenova C y colaboradores, reportaron en LSP de pacientes con cáncer de mama obtenidos luego de la radioterapia, que un mayor número de focos de  $\gamma$ H2AX se correlacionaba con mayor sensibilidad al tratamiento [262]. Posteriormente, el mismo grupo estudió la la formación de estos focos en LSP de pacientes con cáncer rectal expuestos *in vitro* a la radiación, sin embargo no encontraron asociación con la respuesta al tratamiento [261].

De forma similar a  $\gamma$ H2AX, los LSP de sujetos controles presentaron mayor número de focos de 53BP1 que los de pacientes oncológicos. Si bien estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas en condiciones basales, el efecto fue más notorio a las 24 h del tratamiento con cPt o con H+cPt. Otros autores han reportado similares niveles de expresión basal de 53BP1 en LSP de pacientes oncológicos y de individuos sanos [261, 262, 269]. Como se mencionó para  $\gamma$ H2AX, el estudio de 53BP1 en LSP de pacientes oncológicos se ha enfocado especialmente en los efectos de la radioterapia. Djuzenova C y colaboradores no observaron diferencias en el valor medio de focos 53BP1 entre LSP de pacientes con cáncer de mama y de sujetos controles, inmediatamente o a las 24 h de la exposición *in vitro* a la radiación ionizante (0,5 Gy); pero observaron mayor número de focos a las 24 h de la exposición *in vitro* a una dosis de 2 Gy [262]. En otro estudio también se observaron similares valores basales de focos de  $\gamma$ H2AX/53BP1 en LSP de pacientes oncológicos e individuos sanos; sin embargo, 24 h después de la irradiación *in vitro*, el número de focos fue significativamente mayor en LSP de pacientes. Este grupo cuantificó únicamente los focos  $\gamma$ H2AX que colocalizaban con los de 53BP1 por inmunofluorescencia [269]. Anteriormente, los mismos autores no encontraron diferencias en el valor medio de focos  $\gamma$ H2AX/53BP1 en LSP de pacientes y controles media hora después de la irradiación *in vitro*, pero el número de focos fue significativamente más elevado en pacientes oncológicos luego de 24 h de recuperación [270]. Además, reportaron una baja varibilidad interindividual en el grupo de pacientes al inicio del ensayo, pero luego de 24 h de recuperación encontraron una variabilidad elevada [270]. Estos datos indican diferente capacidad de respuesta al daño en el ADN entre los pacientes oncológicos.

Por otro lado, los resultados de esta tesis no mostraron diferencias en el valor medio de focos de 53BP1 por núcleo entre pacientes con RC y RP/EE/EP tanto en condiciones basales, como tampoco después de la exposición al cPt. Otro estudio ha reportado que la expresión de 53BP1 en LSP de pacientes con cáncer rectal a nivel basal, inducido y residual (luego de 24 h de recuperación post radiación), no resultaron de utilidad para predecir la respuesta individual a

la radioterapia [261]. A su vez, el mismo grupo de trabajo determinó en LSP de pacientes con cáncer de mama que la cuantificación de focos de 53BP1 era menos sensible que la de focos de  $\gamma$ H2AX, encontrando una débil correlación entre estos dos marcadores [262]. Consistente con esto, Schuler N y colaboradores determinaron que  $\gamma$ H2AX permitía discriminar pacientes pediátricos heterocigotas para ATM, pero no se obtuvo lo mismo con 53BP1, sugiriendo que  $\gamma$ H2AX es un marcador más sensible y confiable para detectar deficiencias en la vía de reparación de DBSs [260]. La expresión de 53BP1 también ha sido evaluada por inmunohistoquímica en biopsias de pacientes con cáncer de pulmón que recibieron cPt en su esquema terapéutico, correlacionando con progresión y recurrencia de la enfermedad [68].

Como se ha descrito en los párrafos anteriores, en los distintos reportes existen resultados contradictorios en LSP de pacientes oncológicos, mientras que otros no son concluyentes. Estas controversias pueden deberse a distintas metodologías de detección empleadas y a su falta de estandarización mundial: ensayo cometa, espectrometría de absorción atómica o ELISA para determinar el daño inducido por cPt, y citometría de flujo, inmunofluorescencia o inmunocitoquímica para detección de focos de  $\gamma$ H2AX o 53BP1. En algunos casos la elevada variabilidad interindividual entre pacientes, no permite diferenciar entre grupos respondedores y resistentes a la terapia oncológica. En esta tesis se verificó como tendencia un mayor daño en el ADN inducido por cPt (evaluado por ensayo cometa alcalino y focos de  $\gamma$ H2AX) en LSP de pacientes con RC a la quimioterapia en relación a los pacientes con RP/EE/EP. La ausencia de diferencias estadísticamente significativas puede deberse probablemente al número limitado de casos incorporados al estudio y quizás a la variabilidad interindividual entre los pacientes. Un estudio que involucre un número más elevado de pacientes será necesario para poder verificar los resultados obtenidos y determinar la potencial utilidad predictiva de la determinación del daño al ADN mediante ensayo cometa alcalino y el estudio de focos de  $\gamma$ H2AX en LSP de pacientes oncológicos.

## CAPÍTULO 6.

### CONCLUSIONES.

- ✓ La exposición a una hipertermia previa al cisplatino (cPt) aumentó el daño en el ADN en las líneas celulares HCT116+ch2 (MMR deficiente, MMR-) y HCT116+ch3 (MMR proficiente, MMR+), potenciando de esta manera la genotoxicidad de la droga, independientemente de la funcionalidad del sistema MMR.
- ✓ En células MMR+, la exposición a una hipertermia 24 h antes del cPt indujo la deslocalización nuclear de la proteína MSH2 y la depleción de MLH1. El pretratamiento con calor redujo la expresión de MSH2 en células MMR-. De esta manera, el sistema MMR resultó afectado por el tratamiento H+cPt.
- ✓ La hipertermia incrementó la sensibilidad al cPt en células MMR+, potenciando la detención del ciclo celular en las fases S y G2/M y la activación del mecanismo de senescencia. No se verificaron diferencias significativas en los niveles de apoptosis entre células MMR- y MMR+, ni entre tratamientos cPt e H+cPt.
- ✓ Las proteínas Hsp27 y Hsp72 interactuaron en condiciones basales con las proteínas de reparación MLH1 y MSH2. El tratamiento con cPt aumentó significativamente la asociación entre las proteínas MSH2-Hsp27 y MSH2-Hsp72 en la línea celular MMR competente. Además, las interacciones resultaron ser independientes de la funcionalidad del sistema MMR.
- ✓ Linfocitos de sangre periférica de pacientes oncológicos con respuesta clínica completa, expuestos *in vitro* a cPt, presentaron menor daño basal y mayor formación de aductos cPt-ADN (evaluado por ensayo cometa alcalino) en relación a los pacientes no respondedores. Sin embargo las diferencias encontradas no fueron estadísticamente significativas. Un estudio con mayor número de pacientes será necesario para corroborar la tendencia observada y la potencial utilidad del ensayo cometa alcalino como herramienta predictiva de respuesta a la quimioterapia en estudios clínicos.
- ✓ En linfocitos de sangre periférica de pacientes oncológicos con respuesta clínica completa, expuestos *in vitro* a cPt, se determinó en condiciones basales e inducidas un mayor número de focos  $\gamma$ H2AX por núcleo y un mayor porcentaje de células con inmunotinción positiva en relación a los pacientes no respondedores a la

quimioterapia, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Es necesario incrementar el tamaño de la muestra para verificar la tendencia observada y la utilidad predictiva de este marcador.

- ✓ No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con RC y RP/EE/EP en el valor medio de focos de 53BP1 en LSP en condiciones basales ni luego de la exposición *in vitro* a cPt e H+cPt. La determinación del número de focos de 53BP1 en LSP no resultó útil para predecir la respuesta individual a la terapia basada en análogos de platino.

## CAPÍTULO 7.

### **BIBLIOGRAFÍA.**

- [1] Li GM. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research*. 2008;18:85-98.
- [2] McCulloch SD, Kunkel TA. The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases. *Cell Research*. 2008;18:148-161.
- [3] Hoeijmakers JHJ. Genomic maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001;411:366-374.
- [4] Altieri F, Grillo C, Maceroni M, Chichiarelli S. DNA Damage and Repair: From Molecular Mechanisms to Health Implications. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2008;5:1-48.
- [5] Branzei D, Foiani M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008;9:297-308.
- [6] Reyes GX, Schmidt TT, Kolodner RD, Hombauer H. New insights into the mechanism of DNA mismatch repair. *Chromosoma*. 2015;124:443-62.
- [7] Kunkel TA, Erie DA. DNA mismatch repair. *Annu. Rev. Biochem.* 2005;74:681-710.
- [8] Modrich P. Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. *J. Biol. Chem.* 2006;281:30305-09.
- [9] Jiricny J. Postreplicative mismatch repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(4):a012633.
- [10] Tong D, Ortega J, Kim C, Huang J, Gu L, Li GM. Arsenic Inhibits DNA Mismatch Repair by Promoting EGFR Expression and PCNA Phosphorylation. *J Biol Chem.* 2015;290:14536-41.
- [11] Jiricny J. The multifaceted mismatch repair system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006;7:335-346.
- [12] Kadyrov FA, Dzantiev L, Constantin N, Modrich P. Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair. *Cell*. 2006;126:297-308.
- [13] Lipkin SM, Moens PB, Wang V, Lenzi M, Shanmugarajah D, Gilgeous A, et al. Meiotic arrest and aneuploidy in MLH3-deficient mice. *Nature Genet.* 2002;31:385-390.
- [14] Zakharyevich K, Tang S, Ma Y, Hunter N. Delineation of joint molecule resolution pathways in meiosis identifies a crossover-specific resolvase. *Cell*. 2012;149:334-47.
- [15] Campbell CS, Hombauer H, Srivatsan A, Bowen N, Gries K, Desai A, et al. Mlh2 is an accessory factor for DNA mismatch repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* 2014;10(5):e1004327.
- [16] Malkov VA, Biswas I, Camerini-Otero RD, Hsieh P. Photocross-linking of the NH2-terminal region of Taq MutS protein to the major groove of a heteroduplex DNA. *J. Biol. Chem.* 1997;272:23811-17.
- [17] Dufner P, Marra G, Raschle M, Jiricny J. Mismatch recognition and DNA-dependent stimulation of the ATPase activity of hMutS $\alpha$  is abolished by a single mutation in the hMSH6 subunit. *J. Biol. Chem.* 2000;275:36550-55.
- [18] Gupta S, Gellert M, Yang W. Mechanism of mismatch recognition revealed by human MutS $\beta$  bound to unpaired DNA loops. *Nat Struct Mol Biol.* 2011;19:72-8.

- [19] Blackwell LJ, Wang S, Modrich P. DNA chain length dependence of formation and dynamics of hMutS $\alpha$ .hMutL $\alpha$ .heteroduplex complexes. *J Biol Chem.* 2001;276:33233-40.
- [20] Allen DJ, Makhov A, Grilley M, Taylor J, Thresher R, Modrich P, Griffith JD. MutS mediates heteroduplex loop formation by a translocation mechanism. *EMBO J.* 1997;16:4467-76.
- [21] Gradia S, Acharya S, Fishel R. The human mismatch recognition complex hMSH2-hMSH6 functions as a novel molecular switch. *Cell.* 1997;91:995-1005.
- [22] Mazur DJ, Mendillo ML, Kolodner RD. Inhibition of Msh6 ATPase activity by mispaired DNA induces a Msh2(ATP)-Msh6(ATP) state capable of hydrolysis-independent movement along DNA. *Mol Cell.* 2006;22:39-49.
- [23] Junop MS, Obmolova G, Rausch K, Hsieh P, Yang W. Composite active site of an ABC ATPase: MutS uses ATP to verify mismatch recognition and authorize DNA repair. *Mol. Cell.* 2001;7:1-12..
- [24] Pluciennik A, Modrich P. From de cover: protein roadblocks and helix discontinuities are barriers to the initiation of mismatch repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007;104:12709-13.
- [25] Clark AB, Valle F, Drotschmann K, Gary RK, Kunkel TA. Functional interaction of proliferating cell nuclear antigen with MSH2-MSH6 and MSH2-MSH3 complexes, *J. Biol. Chem.* 2000;275:36498-501.
- [26] Lee SD, Alani E. Analysis of interactions between mismatch repair initiation factors and the replication processivity factor PCNA. *J Mol Biol.* 2006;355:175-84.
- [27] Lau PJ, Kolodner RD. Transfer of the MSH2-MSH6 complex from proliferating cell nuclear antigen to mispaired bases in DNA. *J. Biol. Chem.* 2003;278:14-17.
- [28] Pluciennik A, Dzantiev L, Iyer RR, Constantin N, Kadyrov FA, Modrich P. PCNA function in the activation and strand direction of MutL $\alpha$  endonuclease in mismatch repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:16066-71.
- [29] Genschel J, Bazemore LR, Modrich P. Human Exonuclease I is required for 5' and 3' mismatch repair. *J. Biol. Chem.* 2002;277:13302-11.
- [30] Dzantiev L, Constantin N, Genschel J, Iyer RR, Burgers PM, Modrich P. A defined human system that supports bidirectional mismatch-provoked excision. *Mol. Cell.* 2004;15:31-41.
- [31] Genschel J, Modrich P. Functions of MutL $\alpha$ , replication protein A (RPA), and HMGB1 in 5'-directed mismatch repair. *J Biol Chem.* 2009;284:21536-44.
- [32] Guo S, Zhang Y, Yuan F, Gao Y, Gu L, Wong I, Li GM. Regulation of replication protein A functions in mismatch repair by phosphorylation, *J. Biol. Chem.* 2006;281:21607-16.
- [33] Yuan F, Gu L, Guo S, Wang C, Li GM. Evidence for involvement of HMGB1 protein in human DNA mismatch repair, *J. Biol. Chem.* 2004;279:20935-40.
- [34] Spies M, Fishel R. Mismatch repair during homologous and homeologous recombination. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(3):a022657.
- [35] Stojic L, Brun R, Jiricny J. Mismatch repair and DNA damage signaling. *DNA Repair.* 2004;3:1091-101.
- [36] Li Z, Pearlman AH, Hsieh P. DNA mismatch repair and the DNA damage response. *DNA Repair.* 2016;38:94-101.

- [37] Crouse GF. Non-canonical actions of mismatch repair. *DNA Repair*. 2016;38:102-9.
- [38] Owen BA, Yang Z, Lai M, Gajec M, Badger JD, Hayes JJ, et al. (CAG)(n)-hairpin DNA binds to Msh2-Msh3 and changes properties of mismatch recognition. *Nat Struct Mol Biol*. 2005;12:663-70.
- [39] Cascalho M, Wong J, Steinberg C, Wabl M. Mismatch repair co-opted by hypermutation. *Science* 1998;279:1207-10.
- [40] Li Z, Woo CJ, Iglesias-Ussel MD, Ronai D, Scharff MD. The generation of antibody diversity through somatic hypermutation and class switch recombination. *Genes Dev*. 2004;18:1-11.
- [41] Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, Snyder CL, Lynch JF, Boland CR. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin Genet*. 2009;76:1-18.
- [42] Heinen CD, Schmutte C, Fishel R. DNA repair and tumorigenesis. *Cancer Biol. Ther*. 2002;1: 477-85.
- [43] Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N. Engl. J. Med*. 2003;348: 919-32.
- [44] Wu Y, Berends MJW, Sijmons RH, Mensink RGJ, Verlind E, Kooi KA, et al. A role for MLH3 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nature Genet*. 2001;29:137-38.
- [45] Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for Cancer Detection and Familial Predisposition: Development of International Criteria for the Determination of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Cancer Res*. 1998;58:5248-57.
- [46] Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res*. 1997;57: 808-11.
- [47] Grady WM, Markovitz SD. Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet*. 2002;3:101-28.
- [48] Fink D, Aebi S, Howell SB. The Role of Mismatch Repair in Drug Resistance. *Clin. Cancer Res*. 1998;4:1-6.
- [49] Dickey JS, Redon CE, Nakamura AJ, Baird BJ, Sedelnikova OA, Bonner WM. H2AX: functional roles and potential applications. *Chromosoma*. 2009;118:683-92.
- [50] Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*. 1998;273:5858-68.
- [51] Ivashkevich A, Redon CE, Nakamura AJ, Martin RF, Martin OA. Use of the  $\gamma$ -H2AX assay to monitor DNA damage and repair in translational cancer research. *Cancer Lett*. 2012;327:123-33.
- [52] Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol*. 2000;10:886-95.
- [53] Unal E, Arbel-Eden A, Sattler U, Shroff R, Lichten M, Haber JE, Koshland D. DNA damage response pathway uses histone modification to assemble a double-strand break-specific cohesin domain. *Mol Cell*. 2004;16:991-1002.

- [54] Rothkamm K, Barnard S, Moquet J, Ellender M, Rana Z, Burdak-Rothkamm S. DNA damage foci: Meaning and significance. *Environ Mol Mutagen*. 2015;56:491-504.
- [55] Shahi A, Lee JH, Kang Y, Lee SH, Hyun JW, Chang IY, et al. Mismatch-repair protein MSH6 is associated with Ku70 and regulates DNA double-strand break repair. *Nucleic Acids Res*. 2011;39:2130-43.
- [56] Johansson P, Fasth A, Ek T, Hammarsten O. Validation of a flow cytometry-based detection of  $\gamma$ -H2AX, to measure DNA damage for clinical applications. *Cytometry B Clin Cytom*. 2016 Apr 6. doi: 10.1002/cyto.b.21374.
- [57] Raavi V, Basheerudeen SA, Jagannathan V, Joseph S, Chaudhury NK, Venkatachalam P. Frequency of gamma H2AX foci in healthy volunteers and health workers occupationally exposed to X-irradiation and its relevance in biological dosimetry. *Radiat Environ Biophys*. 2016 Jun 10.
- [58] Gerić M, Gajski G, Garaj-Vrhovac V.  $\gamma$ -H2AX as a biomarker for DNA double-strand breaks in ecotoxicology. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2014;105:13-21.
- [59] Wang B, Matsuoka S, Carpenter PB, Elledge SJ. 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science*. 2002;298:1435-8.
- [60] Iwabuchi K, Bartel PL, Li B, Marraccino R, Fields S. Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:6098-102.
- [61] Anderson L, Henderson C, Adachi Y. Phosphorylation and rapid relocalization of 53BP1 to nuclear foci upon DNA damage. *Mol Cell Biol*. 2001;21:1719-29.
- [62] Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Celeste A, Ward I, Romanienko PJ, Morales JC, et al. DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. *Nat Cell Biol*. 2002;4:993-7.
- [63] Panier S, Boulton SJ. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15:7-18.
- [64] Mochan TA, Venere M, DiTullio RA Jr, Halazonetis TD. 53BP1, an activator of ATM in response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)*. 2004;3:945-52.
- [65] Zgheib O, Huyen Y, DiTullio RA Jr, Snyder A, Venere M, Stavridi ES, Halazonetis TD. ATM signaling and 53BP1. *Radiother Oncol*. 2005;76:119-22.
- [66] Bunting SF, Callén E, Wong N, Chen HT, Polato F, Gunn A, et al. 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell*. 2010;141:243-54.
- [67] Willers H, Gheorghiu L, Liu Q, Efstathiou JA, Wirth LJ, Krause M, von Neubeck C. DNA Damage Response Assessments in Human Tumor Samples Provide Functional Biomarkers of Radiosensitivity. *Semin Radiat Oncol*. 2015;25:237-50
- [68] Lai TC, Chow KC, Lin TY, Chiang IP, Fang HY, Chen CY, Ho SP. Expression of 53BP1 as a cisplatin-resistant marker in patients with lung adenocarcinomas. *Oncol Rep*. 2010;24:321-8.
- [69] Rasche L, Heiserich L, Behrens JR, Lenz K, Pfuhl C, Wakonig K, et al. Analysis of Lymphocytic DNA Damage in Early Multiple Sclerosis by Automated Gamma-H2AX and 53BP1 Foci Detection: A Case Control Study. *PLoS One*. 2016 Jan 28;11(1):e0147968.
- [70] Ritossa F. Discovery of the heat shock response. *Cell Stress Chaperones*. 1996;1:97-8.



- [71] Lindquist S. The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.* 1986;55:1151-91.
- [72] Morimoto RI. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.* 1998;12:3788-96.
- [73] Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, et al. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones.* 2009;14:105-11.
- [74] Jolly C, Morimoto RI. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J. Natl. Cancer Inst.* 2000;92:1564-72.
- [75] Vos MJ, Hageman J, Carra S, Kampinga HH. Structural and functional diversities between members of the human HSPB, HSPH, HSPA, and DNAJ chaperone families. *Biochemistry.* 2008;47:7001-11.
- [76] Daugaard M, Rohde M, Jäättelä M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett.* 2007;581:3702-10.
- [77] Wu C. Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 1995;11:441-69.
- [78] Cotto JJ, Kline M, Morimoto RI. Activation of Heat Shock Factor 1 DNA Binding precedes stress-induced serine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 1996;271:3355-8.
- [79] Sandqvist A, Björk JK, Akerfelt M, Chitikova Z, Grichine A, Vourc'h C, et al. Heterotrimerization of heat-shock factors 1 and 2 provided a transcriptional switch in response to distinct stimuli. *Mol. Biol. Cell.* 2009;20:1340-7.
- [80] Akerfelt M, Morimoto RI, Sistonen L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2010;11:545-55.
- [81] Holmberg C, Hietakangas V, Mikhailov A, Rantanen JO, Kallio M, Meinander A, et al. Phosphorylation of Serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor 1. *EMBO J.* 2001;20:3800-10.
- [82] Shi Y, Mosser DD, Morimoto RI. Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev.* 1998;12:654-66.
- [83] Vargas-Roig LM1, Gago FE, Tello O, Aznar JC, Ciocca DR. Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *Int J Cancer.* 1998;79:468-75.
- [84] Nadin SB, Vargas-Roig LM, Drago G, Ibarra J, Ciocca DR. Hsp27, Hsp70 and mismatch repair proteins hMLH1 and hMSH2 expression in peripheral blood lymphocytes from healthy subjects and cancer patients. *Cancer Lett.* 2007;252:131-46.
- [85] Katsogiannou M, Andrieu C, Rocchi P. Heat shock protein 27 phosphorylation state is associated with cancer progression. *Front Genet.* 2014;5:346.
- [86] Haslbeck M, Miess A, Stromer T, Walter S, Buchner J. Disassembling protein aggregates in the yeast cytosol. The cooperation of Hsp26 with Ssa1 and Hsp104. *J Biol Chem.* 2005;280:23861-8.
- [87] Butt E, Immler D, Meyer HE, Kotlyarov A, Laass K, Gaestel M. Heat shock protein 27 is a substrate of cGMP-dependent protein kinase in intact human platelets: phosphorylation-induced actin polymerization caused by HSP27 mutants. *J Biol Chem.* 2001;276:7108-13.

- [88] Mymrikov EV, Seit-Nebi AS, Gusev NB. Large potentials of small heat shock proteins. *Physiol Rev.* 2011;91:1123-59.
- [89] Lambert H, Charette SJ, Bernier AF, Guimond A, Landry J. HSP27 multimerization mediated by phosphorylation-sensitive intermolecular interactions at the amino terminus. *J Biol Chem.* 1999;274:9378-85.
- [90] Kostenko S, Moens U. Heat shock protein 27 phosphorylation: kinases, phosphatases, functions and pathology. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66:3289-307.
- [91] Tar K, Csontos C, Czikora I, Olah G, Ma SF, Wadgaonkar R, et al. Role of protein phosphatase 2A in the regulation of endothelial cell cytoskeleton structure. *J Cell Biochem.* 2006;98:931-53.
- [92] Landry J, Huot J. Modulation of actin dynamics during stress and physiological stimulation by a signaling pathway involving p38 MAP kinase and heat-shock protein 27. *Biochem Cell Biol.* 1995;73:703-7.
- [93] Clarke JP, Mearow KM. Cell stress promotes the association of phosphorylated HspB1 with F-actin. *PLoS One.* 2013;8(7):e68978.
- [94] Sakamoto K, Urushidani T, Nagao T. Translocation of HSP27 to sarcomere induced by ischemic preconditioning in isolated rat hearts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;269:137-42.
- [95] Bryantsev AL, Kurchashova SY, Golyshev SA, Polyakov VY, Wunderink HF, Kanon B, et al. Regulation of stress-induced intracellular sorting and chaperone function of Hsp27 (HspB1) in mammalian cells. *Biochem J.* 2007;407:407-17.
- [96] Beere HM. "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J Cell Sci.* 2004;117:2641-51.
- [97] Radons J. The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? *Cell Stress Chaperones.* 2016;21:379-404.
- [98] Murphy ME. The Hsp70 family and cancer. *Carcinogenesis* 2013;34:1181-8.
- [99] Guzhova IV, Shevtsov MA, Abkin SV, Pankratova KM, Margulis BA. Intracellular and extracellular Hsp70 chaperone as a target for cancer therapy. *Int J Hyperthermia* 2013;29:399-408.
- [100] Murshid A, Eguchi T, Calderwood SK. Stress proteins in aging and life span. *Int J Hyperthermia* 2013;29:442-7.
- [101] Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones.* 2005;10:86-103.
- [102] Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci.* 2006;31:164-72.
- [103] Calderwood SK, Gong J. Heat Shock Proteins Promote Cancer: It's a Protection Racket. *Trends Biochem Sci.* 2016;41:311-23.
- [104] Thuringer D, Jego G, Wettstein G, Terrier O, Cronier L, Yousfi N, et al. Extracellular HSP27 mediates angiogenesis through Toll-like receptor 3. *FASEB J.* 2013;27:4169-83.

- [105] Kenny MK, Mendez F, Sandigursky M, Kureekattil RP, Goldman JD, Franklin WA, Bases R. Heat shock protein 70 binds to human apurinic/aprimidinic endonuclease and stimulates endonuclease activity at abasic sites, J. Biol. Chem. 2001;276:9532-6.
- [106] Mendez F, Kozin E, Bases R. Heat shock protein 70 stimulation of the deoxyribonucleic acid base excision repair enzyme polymerase beta. Cell Stress Chaperones 2003;8:153-61.
- [107] Wano C, Kita K, Takahashi S, Sugaya S, Hino M, Hosoya H, Suzuki N. Protective role of HSP27 against UVC-induced cell death in human cells. Exp. Cell Res. 2004;298:584-92.
- [108] Xiao C, Chen S, Li J, Hai T, Lu Q, Sun E, et al. Association of HSP70 and genotoxic damage in lymphocytes of workers exposed to coke-oven emission. Cell Stress Chaperones. 2002;7:396-402.
- [109] Gao YJ, Xiao CF, Chen S, Wang RB, He HZ, Tanguay RM, Wu TC.. In vitro study on role of Hsp70 expression in DNA damage of human embryonic lung cells exposed to Benzo[a]pyrene. Biomed Environ Sci. 2004;17:144-52.
- [110] Yang J, Liu X, Niu P, Zou Y, Duan Y. Correlations and co-localizations of Hsp70 with XPA, XPG in human bronchial epithelia cells exposed to benzo[a]pyrene. Toxicology. 2009;265:10-4.
- [111] Duan Y, Huang S, Yang J, Niu P, Gong Z, Liu X, et al. HspA1A facilitates DNA repair in human bronchial epithelial cells exposed to Benzo[a]pyrene and interacts with casein kinase 2. Cell Stress Chaperones. 2014;19:271-9.
- [112] Nadin SB, Vargas-Roig LM, Cuello-Carrión FD, Ciocca DR. Deoxyribonucleic acid damage induced by doxorubicin in peripheral blood mononuclear cells: possible roles for the stress response and the deoxyribonucleic acid repair process. Cell Stress Chaperones. 2003;8:361-72.
- [113] Castro GN, Cayado-Gutiérrez N, Zoppino FC, Fanelli MA, Cuello-Carrión FD, Sottile M, Nadin SB, Ciocca DR. Effects of temozolomide (TMZ) on the expression and interaction of heat shock proteins (HSPs) and DNA repair proteins in human malignant glioma cells. Cell Stress Chaperones. 2015;20:253-65.
- [114] Katsogiannou M, Andrieu C, Baylot V, Baudot A, Dusetti NJ, Gayet O, et al. The functional landscape of Hsp27 reveals new cellular processes such as DNA repair and alternative splicing and proposes novel anticancer targets. Mol Cell Proteomics. 2014;13:3585-601
- [115] Pennisi R, Ascenzi P, di Masi A. Hsp90: A New Player in DNA Repair? Biomolecules. 2015;5:2589-618.
- [116] Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. Oncogene. 2012;31:1869-83.
- [117] Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. Nat Rev Cancer. 2007;7:573-84.
- [118] Chu G. Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair. J Biol Chem. 1994;269:787-90.
- [119] Kelland LR. New platinum antitumor complexes. Crit Rev Oncol Hematol. 1993;15:191-219.
- [120] Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. Nat Rev Drug Discov. 2005;4:307-20.

- [121] Todd RC, Lippard SJ. Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. *Metallomics*. 2009;1:280-91.
- [122] Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. 2003;22:7265-79.
- [123] Jordan P, Carmo-Fonseca M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci*. 2000;57:1229-35.
- [124] Zamble DB, Mu D, Reardon JT, Sancar A, Lippard SJ. Repair of cisplatin--DNA adducts by the mammalian excision nuclease. *Biochemistry*. 1996;35:10004-13.
- [125] Chaney SG, Sancar A. DNA repair: enzymatic mechanisms and relevance to drug response. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88:1346-60.
- [126] Vasquez KM. Targeting and processing of site-specific DNA interstrand crosslinks. *Environ Mol Mutagen*. 2010;51:527-39.
- [127] Fink D, Nebel S, Aebi S, Zheng H, Cenni B, Nehmé A, et al. The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Res*. 1996;56:4881-6.
- [128] Hanawalt PC. Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene*. 2002;21:8949-56.
- [129] Köberle B, Masters JR, Hartley JA, Wood RD. Defective repair of cisplatin-induced DNA damage caused by reduced XPA protein in testicular germ cell tumours. *Curr Biol*. 1999;9:273-6.
- [130] Vaisman A, Varchenko M, Umar A, Kunkel TA, Risinger JI, Barrett JC, et al. The role of hMLH1, hMSH3, and hMSH6 defects in cisplatin and oxaliplatin resistance: correlation with replicative bypass of platinum-DNA adducts. *Cancer Res*. 1998;58:3579-85.
- [131] Stojic L, Brun R, Jiricny J. Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA Repair (Amst)*. 2004;3:1091-101.
- [132] Aebi S, Kurdi-Haidar B, Gordon R, Cenni B, Zheng H, Fink D, et al. Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. *Cancer Res*. 1996;56:3087-90.
- [133] Damia G, Filiberti L, Vikhanskaya F, Carrassa L, Taya Y, D'incalci M, Broggin M. Cisplatin and taxol induce different patterns of p53 phosphorylation. *Neoplasia*. 2001;3:10-6.
- [134] Zhao H, Piwnica-Worms H. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol*. 2001;21:4129-39.
- [135] Nehmé A, Baskaran R, Nebel S, Fink D, Howell SB, Wang JY, Christen RD. Induction of JNK and c-Abl signalling by cisplatin and oxaliplatin in mismatch repair-proficient and -deficient cells. *Br J Cancer*. 1999;79:1104-10.
- [136] Pabla N, Huang S, Mi QS, Daniel R, Dong Z. ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2008;283:6572-83.
- [137] Gong JG, Costanzo A, Yang HQ, Melino G, Kaelin WG Jr, Levrero M, Wang JY. The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature*. 1999;399:806-9.

- [138] Knox RJ, Friedlos F, Lydall DA, Roberts JJ. Mechanism of cytotoxicity of anticancer platinum drugs: evidence that cis-diamminedichloroplatinum(II) and cis-diammine-(1,1-cyclobutanedicarboxylato)platinum(II) differ only in the kinetics of their interaction with DNA. *Cancer Res.* 1986;46:1972-9.
- [139] Raymond E, Faivre S, Chaney S, Woynarowski J, Cvitkovic E. Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. *Mol Cancer Ther.* 2002;1:227-35.
- [140] van der Zee J, Vujaskovic Z, Kondo M, Sugahara T. The Kadota Fund International Forum 2004--clinical group consensus. *Int J Hyperthermia.* 2008;24:111-22.
- [141] van den Tempel N, Horsman MR, Kanaar R. Improving efficacy of hyperthermia in oncology by exploiting biological mechanisms. *Int J Hyperthermia.* 2016;32:446-54.
- [142] Hurwitz MD. Today's thermal therapy: not your father's hyperthermia: challenges and opportunities in application of hyperthermia for the 21st century cancer patient. *Am J Clin Oncol.* 2010;33:96-100.
- [143] Dewey WC. Interaction of heat with radiation and chemotherapy. *Cancer Res.* 1984;44:4714s-4720s.
- [144] Dewey WC. Arrhenius relationships from the molecule and cell to the clinic. *Int J Hyperthermia.* 1994;10:457-83.
- [145] Dewhirst MW, Vujaskovic Z, Jones E, Thrall D. Re-setting the biologic rationale for thermal therapy. *Int J Hyperthermia.* 2005;21:779-90.
- [146] Behrouzkhia Z, Joveini Z, Keshavarzi B, Eyvazzadeh N, Aghdam RZ. Hyperthermia: How Can It Be Used? *Oman Med J.* 2016;31:89-97.
- [147] Udroui I. Ultrasonic drug delivery in Oncology. *J BUON.* 2015;20:381-90.
- [148] Song CW, Park HJ, Lee CK, Griffin R. Implications of increased tumor blood flow and oxygenation caused by mild temperature hyperthermia in tumor treatment. *Int J Hyperthermia.* 2005;21:761-7.
- [149] Shchors K, Evan G. Tumor angiogenesis: cause or consequence of cancer? *Cancer Res.* 2007;67:7059-61.
- [150] Iwata K, Shakil A, Hur WJ, Makepeace CM, Griffin RJ, Song CW. Tumour pO<sub>2</sub> can be increased markedly by mild hyperthermia. *Br J Cancer Suppl.* 1996;27:S217-21.
- [151] Vujaskovic Z, Song CW. Physiological mechanisms underlying heat-induced radiosensitization. *Int J Hyperthermia.* 2004;20:163-74.
- [152] Mallory M, Gogineni E, Jones GC, Greer L, Simone CB 2nd. Therapeutic hyperthermia: The old, the new, and the upcoming. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016;97:56-64.
- [153] Roti Roti JL. Cellular responses to hyperthermia (40-46°C): Cell killing and molecular events. *Int. J. Hyperthermia.* 2008;24:3-15.
- [154] Kampinga HH. Thermotolerance in mammalian cells. Protein denaturation and aggregation, and stress proteins. *J Cell Sci.* 1993;104:11-7.

- [155] Nollen EA, Brunsting JF, Roelofsen H, Weber LA, Kampinga HH. In vivo chaperone activity of heat shock protein 70 and thermotolerance. *Mol Cell Biol.* 1999;19:2069-79.
- [156] Landry J, Chrétien P, Bernier D, Nicole LM, Marceau N, Tanguay RM. Thermotolerance and heat shock proteins induced by hyperthermia in rat liver cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1982;8:59-62.
- [157] Saita EA, de Mendoza D. Thermosensing via transmembrane protein-lipid interactions. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1848:1757-64.
- [158] Csoboz B, Balogh GE, Kusz E, Gombos I, Peter M, Crul T, et al. Membrane fluidity matters: hyperthermia from the aspects of lipids and membranes. *Int J Hyperthermia.* 2013;29:491-9.
- [159] Ohtsubo T, Saito H, Tanaka N, Matsumoto H, Sugimoto C, Saito T, et al. Enhancement of cisplatin sensitivity and platinum uptake by 40 degrees C hyperthermia in resistant cells. *Cancer Lett.* 1997;119:47-52.
- [160] Evans SS, Repasky EA, Fisher DT. Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat. *Nat Rev Immunol.* 2015;15:335-49.
- [161] Datta NR, Ordóñez SG, Gaipi US, Paulides MM, Crezee H, Gellermann J, et al. Local hyperthermia combined with radiotherapy and/or chemotherapy: recent advances and promises for the future. *Cancer Treat Rev.* 2015;41:742-53.
- [162] Toraya-Brown S, Fiering S. Local tumour hyperthermia as immunotherapy for metastatic cancer. *Int J Hyperthermia.* 2014;30:531-9.
- [163] Ostberg JR, Dayanc BE, Yuan M, Oflazoglu E, Repasky EA. Enhancement of natural killer (NK) cell cytotoxicity by fever-range thermal stress is dependent on NKG2D function and is associated with plasma membrane NKG2D clustering and increased expression of MICA on target cells. *J Leukoc Biol.* 2007;82:1322-31.
- [164] Milani V, Noessner E, Ghose S, Kuppner M, Ahrens B, Scharner A, et al. Heat shock protein 70: role in antigen presentation and immune stimulation. *Int J Hyperthermia.* 2002;18:563-75.
- [165] Oei AL, Vriend LE, Crezee J, Franken NA, Krawczyk PM. Effects of hyperthermia on DNA repair pathways: one treatment to inhibit them all. *Radiat Oncol.* 2015;10:165.
- [166] Eppink B, Krawczyk PM, Stap J, Kanaar R. Hyperthermia-induced DNA repair deficiency suggests novel therapeutic anti-cancer strategies. *Int J Hyperthermia.* 2012;28:509-17.
- [167] Roti Roti JL. Heat-induced alterations of nuclear protein associations and their effects on DNA repair and replication. *Int J Hyperthermia* 2007;23:3-15.
- [168] Kampinga HH, Konings AW. Inhibition of repair of X-ray-induced DNA damage by heat: the role of hyperthermic inhibition of DNA polymerase alpha activity. *Radiat Res.* 1987;112:86-98.
- [169] Dikomey E, Jung H. Correlation between thermal radiosensitization and heat-induced loss of DNA polymerase beta activity in CHO cells. *Int J Radiat Biol.* 1993;63:215-21.
- [170] Warters RL, Barrows LR. Heat sensitivity of HeLa S3 cell DNA topoisomerase II. *J Cell Physiol.* 1994;159:468-74.
- [171] Bruskov VI, Malakhova LV, Masalimov ZK, Chernikov AV. Heat-induced formation of reactive oxygen species and 8-oxoguanine, a biomarker of damage to DNA. *Nucleic Acids Res* 2002;30:1354-63.

- [172] Hintzsche H, Riese T, Stopper H. Hyperthermia-induced micronucleus formation in a human keratinocyte cell line. *Mutat Res* 2012;738-739:71-4.
- [173] Warters RL, Brizgys LM. Apurinic site induction in the DNA of cells heated at hyperthermic temperatures. *J Cell Physiol*. 1987;133:144-50.
- [174] Vanderwaal RP, Roti Roti JL. Heat induced “masking” of redox sensitive component(s) of the DNA-nuclear matrix anchoring complex. *Int. J. Hyperthermia*. 2004;20:234-239.
- [175] Mantso T, Goussetis G, Franco R, Botaitis S, Pappa A, Panayiotidis M. Effects of hyperthermia as a mitigation strategy in DNA damage-based cancer therapies. *Semin Cancer Biol*. 2016;37-38:96-105.
- [176] Fantini D, Moritz E, Auvré F, Amouroux R, Campalans A, Epe B, et al. Rapid inactivation and proteasome-mediated degradation of OGG1 contribute to the synergistic effect of hyperthermia on genotoxic treatments. *DNA Repair* . 2013;12:227-37.
- [177] Wang Y, Perrault AR, Iliakis G. Replication protein A as a potential regulator of DNA replication in cells exposed to hyperthermia. *Radiat Res*. 1998;149:284-93.
- [178] Xu M, Myerson RJ, Xia Y, Whitehead T, Moros EG, Straube WL, Roti JL. The effects of 41 degrees C hyperthermia on the DNA repair protein, MRE11, correlate with radiosensitization in four human tumor cell lines. *Int J Hyperthermia*. 2007;23:343-51.
- [179] Seno JD, Dynlacht JR. Intracellular redistribution and modification of proteins of the Mre11/Rad50/Nbs1 DNA repair complex following irradiation and heat-shock. *J Cell Physiol*. 2004;199:157-70.
- [180] Ihara M, Takeshita S, Okaichi K, Okumura Y, Ohnishi T. Heat exposure enhances radiosensitivity by depressing DNA-PK kinase activity during double strand break repair. *Int J Hyperthermia*. 2014;30:102-9.
- [181] Krawczyk PM, Eppink B, Essers J, Stap J, Rodermond H, Odijk H, et al. Mild hyperthermia inhibits homologous recombination, induces BRCA2 degradation, and sensitizes cancer cells to poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:9851-6.
- [182] Matsumoto Y, Suzuki N, Sakai K, Morimatsu A, Hirano K, Murofushi H. A possible mechanism for hyperthermic radiosensitization mediated through hyperthermic lability of Ku subunits in DNA-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;234:568-72.
- [183] Beck BD, Dynlacht JR. Heat-induced aggregation of XRCC5 (Ku80) in nontolerant and thermotolerant cells. *Radiat Res*. 2001;156:767-74.
- [184] Nadin SB, Cuello-Carrión FD, Sottile ML, Ciocca DR, Vargas-Roig LM. Effects of hyperthermia on Hsp27 (HSPB1), Hsp72 (HSPA1A) and DNA repair proteins hMLH1 and hMSH2 in human colorectal cancer hMLH1-deficient and hMLH1-proficient cell lines. *Int J Hyperthermia*. 2012;28:191-201.
- [185] Boyer JC, Umar A, Risinger JI, Lipford JR, Kane M, Yin S, et al. Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and genetic defects in human cancer cell lines. *Cancer Res*. 1995;55:6063-70.
- [186] Koi M, Umar A, Chauhan DP, Cherian SP, Carethers JM, Kunkel TA, Boland CR. Human chromosome 3 corrects mismatch repair deficiency and microsatellite instability and reduces N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine tolerance in colon tumor cells with homozygous hMLH1 mutation. *Cancer Res*. 1994;54:4308-12.

- [187] Nikzad S, Hashemi B. MTT assay instead of the clonogenic assay in measuring the response of cells to ionizing radiation. *J Radiobiology*. 2014;1:3-8.
- [188] Sumantran VN. Cellular chemosensitivity assays: an overview. *Methods Mol Biol*. 2011;731:219-36.
- [189] Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*. 2006;1:2315-9.
- [190] Tian T, Hao J, Xu A, Hao J, Luo C, Liu C, et al. Determination of metastasis associated proteins in non-small cell lung cancer by comparative proteomic analysis. *Cancer Sci*. 2007; 98:1265-74.
- [191] Calvaruso G, Giuliano M, Portanova P, Pellerito O, Vento R, Tesoriere G. Hsp72 controls bortezomib induced HepG2 cell death via interaction with pro-apoptotic factors. *Oncology reports* 2007;18;447-50.
- [192] Fang JY, Lu R, Mikovits JA, Cheng ZH, Zhu HY, Chen YX. Regulation of hMSH2 and hMLH1 expression in the human colon cancer cell line SW1116 by DNA methyltransferase 1. *Cancer Letters*. 2006;233:124-30.
- [193] Husson H, Carideo EG, Neuberg D, Schultze J, Munoz O, Marks PW, et al. Gene expression profiling of follicular lymphoma and normal germinal center B cells using cDNAarrays. *Blood* 2002;99:282-9.
- [194] Tefvik Dorak, M (Ed.). Glossary. En: Real Time PCR. School of Clinical Medical Sciences, Newcastle University, Newcastle, UK. 2006 págs. 83-90.
- [195] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25:402-8.
- [196] Olive PL, Banáth JP. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc*. 2006;1:23-9.
- [197] Branham MT, Nadin SB, Vargas-Roig LM, Ciocca DR. DNA damage induced by paclitaxel and DNA repair capability of peripheral blood lymphocytes as evaluated by the alkaline comet assay. *Mutat Res*. 2004;560:11-7.
- [198] Arora S, Kothandapani A, Tillison K, Kalman-Maltese V, Patrick SM. Downregulation of XPF-ERCC1 enhances cisplatin efficacy in cancer cells. *DNA Repair (Amst)*. 2010;9:745-53.
- [199] van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol*. 2011;731:237-45.
- [200] Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(20):9363-7.
- [201] Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc*. 2009;4:1798-806.
- [202] van Genderen H, Kenis H, Lux P, Ungeth L, Maassen C, Deckers N, et al. In vitro measurement of cell death with the annexin A5 affinity assay. *Nat Protoc*. 2006;1:363-7.
- [203] Bolte S, Cordelières FP. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc*. 2006;224:213-32.



- [204] Singh NP, Danner DB, Tice RR, Brant L, Schneider EL. DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *Mutat. Res.* 1991;237:123-30.
- [205] Piperakis SM, Visvardis EE, Sagnou M, Tassiou AM. Effects of smoking and aging on oxidative DNA damage of human lymphocytes. *Carcinogenesis.* 1998;19:695-8.
- [206] Mendoza-Nunez VM, Sánchez-Rodríguez MA, Retana-Ugalde R, Vargas-Guadarrama LA, Altamirano-Lozano MA. Total antioxidant levels, gender, and age as risk factors for DNA damage in lymphocytes of the elderly. *Mech. Ageing Dev.* 2001;122: 835-47.
- [207] Wojewodzka M, Kruszewski M, Iwanenko T, Collins AR, Szumiel I. Lack of adverse effect of smoking habit on DNA strand breakage and base damage, as revealed by the alkaline comet assay. *Mutat. Res.* 1999; 440:19-25.
- [208] Speit G, Witton-Davies T, Heepchantree W, Trenz K, Hoffman H. Investigations on the effect of cigarette smoking in the comet assay. *Mutat. Res.* 2003;542:33-42.
- [209] Blasiak J, Kowalik J, Małecka-Panas E, Drzewoski J, Wojewódzka M. DNA damage and repair in human lymphocytes exposed to three anticancer platinum drugs. *Teratog Carcinog Mutagen.* 2000;20:119-31.
- [210] Sak A, Grehl S, Engelhard M, Wierlemann A, Kaelberlah HP, Erichsen P, et al. Long-term in vivo effects of cisplatin on gamma-H2AX foci signaling in peripheral lymphocytes of tumor patients after irradiation. *Clin Cancer Res.* 2009;15:2927-34.
- [211] Stefanou DT, Bamias A, Episkopou H, Kyrtopoulos SA, Likka M, Kalampokas T, et al. Aberrant DNA damage response pathways may predict the outcome of platinum chemotherapy in ovarian cancer. *PLoS One.* 2015;10(2):e0117654.
- [212] Nadin SB, Vargas-Roig LM, Drago G, Ibarra J, Ciocca DR. DNA damage and repair in peripheral blood lymphocytes from healthy individuals and cancer patients: a pilot study on the implications in the clinical response to chemotherapy. *Cancer Lett.* 2006;239:84-97.
- [213] Olive PL, Banáth JP. Kinetics of H2AX phosphorylation after exposure to cisplatin. *Cytometry B Clin Cytom.* 2009;76:79-90.
- [214] Faivre S, Chan D, Salinas R, Woynarowska B, Woynarowski JM. DNA strand breaks and apoptosis induced by oxaliplatin in cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 2003;66:225-37.
- [215] Eichholtz-Wirth H, Hietel B. Heat sensitization to cisplatin in two cell lines with different drug sensitivities. *Int J Hyperthermia.* 1990;6:47-55.
- [216] Raaphorst GP, Chabot P, Doja S, Wilkins D, Stewart D, Ng CE. Effect of hyperthermia on cisplatin sensitivity in human glioma and ovarian carcinoma cell lines resistant and sensitive to cisplatin treatment. *Int J Hyperthermia.* 1996;12:211-22.
- [217] Hettinga JV, Konings AW, Kampinga HH. Reduction of cellular cisplatin resistance by hyperthermia—a review. *Int J Hyperthermia.* 1997;13:439-57.
- [218] Cohen JD, Robins HI. Hyperthermic Enhancement of cis-Diammine-1,1-cyclobutane Dicarboxylate Platinum(II) Cytotoxicity in Human Leukemia Cells in Vitro. *Cancer Res.* 1987;47:4335-7.
- [219] Wallner KE, Li GC. Effect of Drug Exposure Duration and Sequencing on Hyperthermic Potentiation of Mitomycin-C and Cisplatin. *Cancer Res.* 1987;47:493-5.

- [220] Hahn, G. M. Thermotolerance and drugs. En: Henle KJ, editor. Thermotolerance, Vol 1. Thermotolerance and Thermophily. Florida: CRC Press; 1987. pp 97-126.
- [221] Majima H, Kashiwado K, Egawa S, Suzuki N, Urano M. Interaction between the kinetics of thermotolerance and effect of cis-diamminedichloroplatinum(II) or bleomycin given at 37 or 43 °C. *Int J Hyperthermia*. 1992;8:431-42.
- [222] Kampinga HH. Cell biological effects of hyperthermia alone or combined with radiation or drugs: a short introduction to newcomers in the field. *Int J Hyperthermia*. 2006;22:191-6.
- [223] Furusawa Y, Iizumi T, Fujiwara Y, Zhao QL, Tabuchi Y, Nomura T, Kondo T. Inhibition of checkpoint kinase 1 abrogates G2/M checkpoint activation and promotes apoptosis under heat stress. *Apoptosis*. 2012;17:102-12.
- [224] Turner T, Caspari T. When heat casts a spell on the DNA damage checkpoints. *Open Biol*. 2014;4:140008.
- [225] d'Adda di Fagagna F. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:512-22.
- [226] Shay JW, Roninson IB. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene*. 2004;23:2919-33.
- [227] Wang X, Wong SC, Pan J, Tsao SW, Fung KH, Kwong DL, et al. Evidence of cisplatin-induced senescent-like growth arrest in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Res*. 1998;58:5019-22
- [228] Chakradeo S, Elmore LW, Gewirtz DA. Is Senescence Reversible? *Curr Drug Targets*. 2016;17:460-6.
- [229] Yaglom JA, Gabai VL, Sherman MY. High levels of heat shock protein Hsp72 in cancer cells suppress default senescence pathways. *Cancer Res*. 2007;67:2373-81.
- [230] Alekseenko LL, Zemelko VI, Domnina AP, Lyublinskaya OG, Zenin VV, Pugovkina NA, et al. Sublethal heat shock induces premature senescence rather than apoptosis in human mesenchymal stem cells. *Cell Stress Chaperones*. 2014;19:355-66.
- [231] van de Vaart PJ, van der Vange N, Zoetmulder FA, van Goethem AR, van Tellingen O, ten Bokkel Huinink WW, et al. Intraperitoneal cisplatin with regional hyperthermia in advanced ovarian cancer: pharmacokinetics and cisplatin-DNA adduct formation in patients and ovarian cancer cell lines. *Eur J Cancer*. 1998;34:148-54.
- [232] Rietbroek RC, van de Vaart PJ, Haveman J, Blommaert FA, Geerdink A, Bakker PJ, Veenhof CH. Hyperthermia enhances the cytotoxicity and platinum-DNA adduct formation of lobaplatin and oxaliplatin in cultured SW 1573 cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1997;123:6-12.
- [233] Hettinga JV, Lemstra W, Meijer C, Dam WA, Uges DR, Konings AW, et al. Mechanism of hyperthermic potentiation of cisplatin action in cisplatin-sensitive and -resistant tumour cells. *Br J Cancer*. 1997;75:1735-43.
- [234] Ikeda M, Kurose A, Takatori E, Sugiyama T, Traganos F, Darzynkiewicz Z, Sawai T. DNA damage detected with gammaH2AX in endometrioid adenocarcinoma cell lines. *Int J Oncol*. 2010;36:1081-8.
- [235] Barr MP, Gray SG, Hoffmann AC, Hilger RA, Thomale J, O'Flaherty JD, et al. Generation and characterisation of cisplatin-resistant non-small cell lung cancer cell lines displaying a stem-like signature. *PLoS One*. 2013;8(1):e54193.

- [236] Leong V, Lorenowicz J, Kozij N, Guarné A. Nuclear import of human MLH1, PMS2, and MutL $\alpha$ : redundancy is the key. *Mol Carcinog.* 2009;48:742-50.
- [237] Edelbrock MA, Kaliyaperumal S, Williams KJ. Structural, molecular and cellular functions of MSH2 and MSH6 during DNA mismatch repair, damage signaling and other noncanonical activities. *Mutat Res.* 2013;743-744:53-66.
- [238] Arrigo AP, Suhan JP, Welch WJ. Dynamic changes in the structure and intracellular locale of the mammalian low-molecular-weight heat shock protein. *Mol Cell Biol.* 1988;8:5059-71.
- [239] Ohtsuka K, Laszlo A. The relationship between hsp70 localization and heat resistance. *Exp Cell Res.* 1992;202:507-18.
- [240] Lepock JR, Frey HE, Heynen ML, Senisterra GA, Wartners RL. The nuclear matrix is a thermolabile cellular structure. *Cell Stress Chaperones.* 2001;6:136-47.
- [241] Laszlo A, Wright W, Roti Roti JL. Initial characterization of heat-induced excess nuclear proteins in HeLa cells. *J Cell Physiol.* 1992;151:519-32.
- [242] Laszlo A. The thermoresistant state: protection from initial damage or better repair?. *Exp Cell Res.* 1992;202:519-31.
- [243] Arrigo AP, Gibert B. Protein interactomes of three stress inducible small heat shock proteins: HspB1, HspB5 and HspB8. *Int J Hyperthermia* 2013;29:409-22.
- [244] Guttmann DM, Hart L, Du K, Seletsky A, Koumenis C. Inhibition of Hsp27 radiosensitizes head-and-neck cancer by modulating deoxyribonucleic acid repair. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2013;87:168-75.
- [245] Olive PL, Wlodek D, Durand RE, Banáth JP. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Exp Cell Res.* 1992;198:259-67.
- [246] Unger FT, Klasen HA, Tchartchian G, de Wilde RL, Witte I. DNA damage induced by cis- and carboplatin as indicator for in vitro sensitivity of ovarian carcinoma cells. *BMC Cancer.* 2009;9:359.
- [247] Collins AR, Azqueta A. DNA repair as a biomarker in human biomonitoring studies; further applications of the comet assay. *Mutat Res.* 2012;736:122-9.
- [248] McKenna DJ, McKeown SR, McKelvey-Martin VJ. Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. *Mutagenesis.* 2008;23:183-90.
- [249] Faust F, Kassie F, Knasmüller S, Boedecker RH, Mann M, Mersch-Sundermann V. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat Res.* 2004;566:209-29.
- [250] Fikrova P, Stetina R, Hrnčiarik M, Hrnčiarikova D, Hronek M, Zadák Z. DNA crosslinks, DNA damage and repair in peripheral blood lymphocytes of non-small cell lung cancer patients treated with platinum derivatives. *Oncol Rep.* 2014;31:391-6.
- [251] Wood JP, Smith AJ, Bowman KJ, Thomas AL, Jones GD. Comet assay measures of DNA damage as biomarkers of irinotecan response in colorectal cancer in vitro and in vivo. *Cancer Med.* 2015;4:1309-21.
- [252] Fichtinger-Schepman AM, van Oosterom AT, Lohman PH, Berends F. Interindividual human variation in cisplatin sensitivity, predictable in an in vitro assay? *Mutat Res.* 1987;190:59-62.

- [253] Fichtinger-Schepman AM, van der Velde-Visser SD, van Dijk-Knijnenburg HC, van Oosterom AT, Baan RA, Berends F. Kinetics of the formation and removal of cisplatin-DNA adducts in blood cells and tumor tissue of cancer patients receiving chemotherapy: comparison with in vitro adduct formation. *Cancer Res.* 1990;50:7887-94.
- [254] Blasiak J, Arabski M, Krupa R, Wozniak K, Rykala J, Kolacinska A, et al. Basal, oxidative and alkylative DNA damage, DNA repair efficacy and mutagen sensitivity in breast cancer. *Mutat Res.* 2004;554(1-2):139-48.
- [255] Kopjar N, Garaj-Vrhovac V, Milas I. Assessment of chemotherapy-induced DNA damage in peripheral blood leukocytes of cancer patients using the alkaline comet assay. *Teratog Carcinog Mutagen.* 2002;22:13-30.
- [256] Schellens JH, Ma J, Planting AS, van der Burg ME, van Meerten E, de Boer-Dennert M, et al. Relationship between the exposure to cisplatin, DNA-adduct formation in leucocytes and tumour response in patients with solid tumours. *Br J Cancer.* 1996;73:1569-75.
- [257] Buchynska L, Brieieva O, Glushchenko N, Vorobyova L, Bilyk O. DNA repair deficiency in peripheral blood lymphocytes of endometrial cancer patients with a family history of cancer. *BMC Cancer.* 2014;14:765.
- [258] Bonetti A, Apostoli P, Zaninelli M, Pavanel F, Colombatti M, Cetto GL, et al. Inductively coupled plasma mass spectroscopy quantitation of platinum-DNA adducts in peripheral blood leukocytes of patients receiving cisplatin- or carboplatin-based chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 1996;2:1829-35.
- [259] Oshita F, Yamamoto N, Fukuda M, Ohe Y, Tamura T, Eguchi K, et al. Correlation of therapeutic outcome in non-small cell lung cancer and DNA damage assayed by polymerase chain reaction in leukocytes damaged in vitro. *Cancer Res.* 1995;55:2334-7.
- [260] Schuler N, Palm J, Kaiser M, Betten D, Furtwängler R, Rube C, et al. DNA-damage foci to detect and characterize DNA repair alterations in children treated for pediatric malignancies. *PLoS One.* 2014;9(3):e91319.
- [261] Djuzenova CS, Zimmermann M, Katzer A, Fiedler V, Distel LV, Gasser M, Waaga-Gasser AM, Flentje M, Polat B. A prospective study on histone  $\gamma$ -H2AX and 53BP1 foci expression in rectal carcinoma patients: correlation with radiation therapy-induced outcome. *BMC Cancer.* 2015;15:856.
- [262] Djuzenova CS, Elsner I, Katzer A, Worschech E, Distel LV, Flentje M, Polat B. Radiosensitivity in breast cancer assessed by the histone  $\gamma$ -H2AX and 53BP1 foci. *Radiat Oncol.* 2013;8:98.
- [263] Vasireddy RS, Sprung CN, Cempaka NL, Chao M, McKay MJ. H2AX phosphorylation screen of cells from radiosensitive cancer patients reveals a novel DNA double-strand break repair cellular phenotype. *Br J Cancer.* 2010;102:1511-8.
- [264] Cremona CA, Behrens A. ATM signalling and cancer. *Oncogene.* 2014;33:3351-60.
- [265] Kobayashi H, Ohno S, Sasaki Y, Matsuura M. Hereditary breast and ovarian cancer susceptibility genes. *Oncol Rep.* 2013;30:1019-29.
- [266] Auckley DH, Crowell RE, Heaphy ER, Stidley CA, Lechner JF, Gilliland FD, Belinsky SA. Reduced DNA-dependent protein kinase activity is associated with lung cancer. *Carcinogenesis.* 2001;22:723-7.

[267] Someya M, Sakata K, Matsumoto Y, Yamamoto H, Monobe M, Ikeda H, et al. The association of DNA-dependent protein kinase activity with chromosomal instability and risk of cancer. *Carcinogenesis*. 2006;27:117-22.

[268] Laszlo A, Fleischer I. The heat-induced gamma-H2AX response does not play a role in hyperthermic cell killing. *Int J Hyperthermia*. 2009;25:199-209.

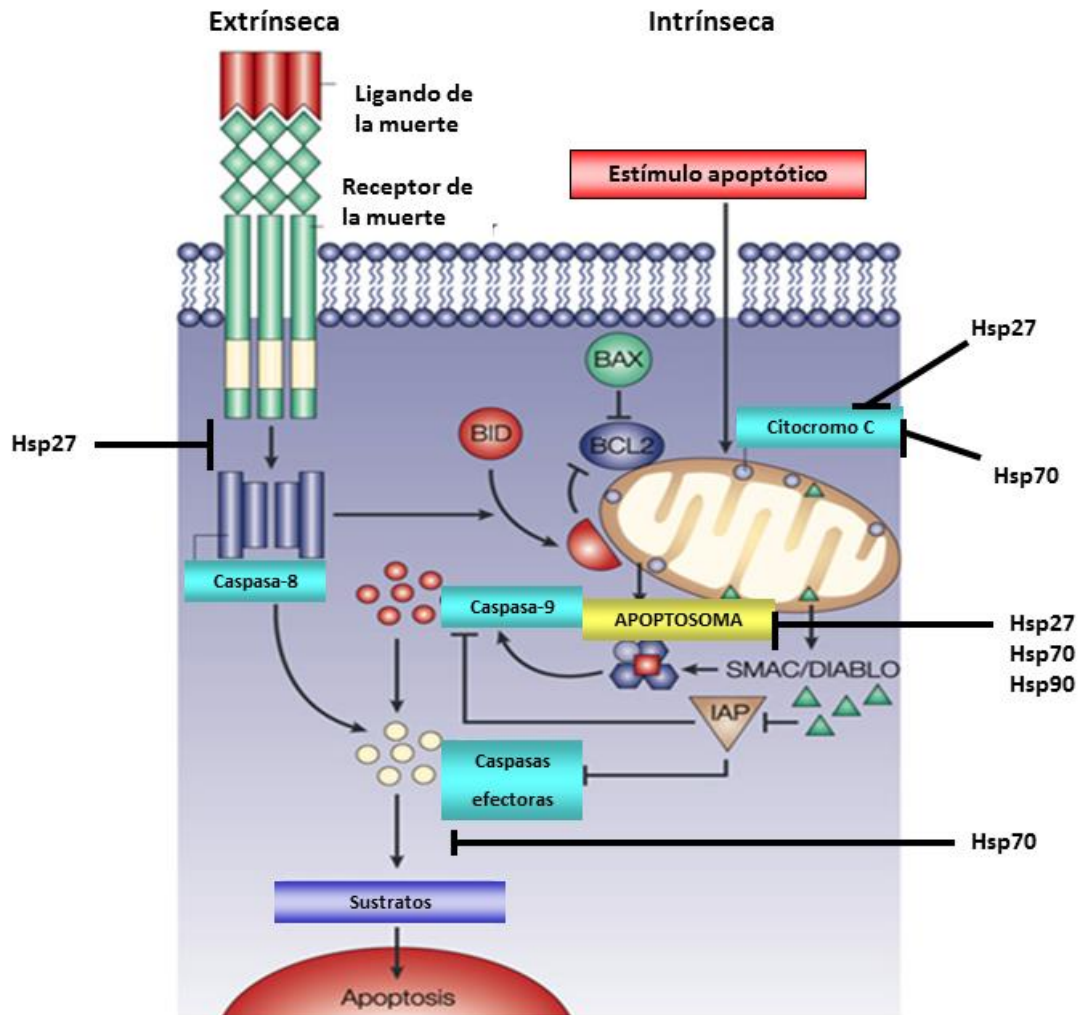
[269] Chua ML, Horn S, Somaiah N, Davies S, Gothard L, A'Hern R, et al. DNA double-strand break repair and induction of apoptosis in ex vivo irradiated blood lymphocytes in relation to late normal tissue reactions following breast radiotherapy. *Radiat Environ Biophys*. 2014;53:355-64.

[270] Chua ML, Somaiah N, A'Hern R, Davies S, Gothard L, Yarnold J, Rothkamm K. Residual DNA and chromosomal damage in ex vivo irradiated blood lymphocytes correlated with late normal tissue response to breast radiotherapy. *Radiother Oncol*. 2011;99:362-6.

**CAPÍTULO 8**

**ANEXO**

**8. Relación de las HSPs con la muerte celular programada**



**Representación esquemática de las vías extrínseca e intrínseca de apoptosis.** En la vía extrínseca, una vez unido el ligando de muerte a su receptor, se reclutan en la región citoplasmática proteínas adaptadoras que activan a caspasa-8, esta última tiene como sustrato a BID. En el caso de la vía intrínseca, la liberación del citocromo c desde la mitocondria al citoplasma es regulado por proteínas de la familia Bcl-2, algunas de las cuales son proapoptóticas (por ej. Bax) y otras antiapoptóticas (por ej. Bcl-2). En el citoplasma, el citocromo c junto con Apaf-1 y caspasa-9 forman el apoptosoma, complejo que activa a caspasa-3. Hsp27 es capaz de suprimir la vía extrínseca al unirse a proteínas adaptadoras, evitando la activación de caspasa-8. Hsp27 puede inhibir la formación del apoptosoma al unirse y secuestrar al citocromo c, mientras que Hsp90 es capaz de unirse a Apaf-1. Hsp70 también puede inhibir la vía intrínseca impidiendo la translocación mitocondrial de Bax y la liberación del citocromo c de la mitocondria, así como también de otros factores proapoptóticos como Smac/Diablo y AIF. Hsp70 es capaz de suprimir la formación del apoptosoma al asociarse con Apaf-1, y también bloquear los eventos por debajo de la activación de las caspasas, como el clivaje de sustratos. Imagen modificada de *Nature Reviews Cancer*, 2002;2:277-288.