

# **CARACTERIZACIÓN DE INHIBIDORES CATALÍTICOS DE LA ENZIMA TOPOISOMERASA II DE ADN: MODULACIÓN DEL DAÑO POR RADIACIÓN IONIZANTE.**

*Memoria realizada en el Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, para optar al grado de Doctor en Biología por el Licenciado*

Nabil Hajji



*Sevilla, 2004*

*Directores*



*Dr. Santiago Mateos Cordero  
Profesor Titular de Biología Celular  
Universidad de Sevilla*



*Dr. Felipe Cortés Benavides  
Catedrático de Biología Celular  
Universidad de Sevilla*



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA  
BIBLIOTECA

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral Caracterización de los inhibidores catalíticos de la proteína topoisomerasa II: Modulación del daño por radiación ionizante. sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

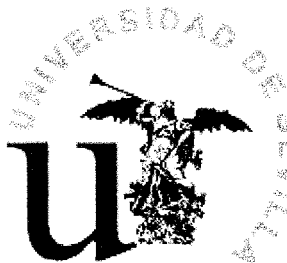
- Consulta en depósito.
- Préstamo interbibliotecario.
- Reproducción parcial.
- Reproducción total.
- Tipo de Usuarios. *Todos*
- Otros términos.

Firmado:

Nabil Hajji

Sevilla, a 2 de Noviembre de 199  
2006

0-10729781



**Universidad de Sevilla**  
**Departamento de Biología Celular**

**CARACTERIZACIÓN DE INHIBIDORES CATALÍTICOS  
DE LA ENZIMA TOPOISOMERASA II DE ADN:  
MODULACIÓN DEL DAÑO POR RADIACIÓN  
IONIZANTE.**

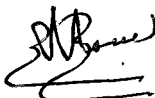
**Nabil Hajji**  
**Tesis Doctoral**  
**2004**

# CARACTERIZACIÓN DE INHIBIDORES CATALÍTICOS DE LA ENZIMA TOPOISOMERASA II DE ADN: MODULACIÓN DEL DAÑO POR RADIACIÓN IONIZANTE.

*Memoria realizada en el Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, para optar al grado de Doctor en Biología por el Licenciado*

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE BIOLÓGICA  
DEPARTAMENTO DE BIOLÓGICA CELULAR  
C/ Tarfia s/n 41013 Sevilla  
Teléfono: 954 55 60 60  
E-mail: [biologia@us.es](mailto:biologia@us.es)  
Sevilla, 31-05-04  
El Jefe del Departamento de Biología Celular  
*Sergio Caffaro*

Nabil Hajji

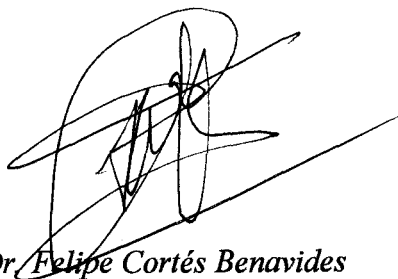


Sevilla, 2004

*Directores*



*Dr. Santiago Mateos Cordero*  
*Profesor Titular de Biología Celular*  
*Universidad de Sevilla*



*Dr. Felipe Cortés Benavides*  
*Catedrático de Biología Celular*  
*Universidad de Sevilla*

**A mi familia**

Esta tesis ha sido posible gracias al apoyo de muchas personas y no quisiera dejar de expresarles mi más sincero agradecimiento:

A los Doctores *Felipe Cortés* y *Santiago Mateos* por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio, por la orientación y formación científica por ellos recibida y por la ayuda que en todo momento me han prestado.

A la Dra *Inmaculada Domínguez* por su sincera amistad, por sus comentarios acerca de los experimentos con micronúcleos de los últimos meses y por su espíritu crítico.

A la Dra *Nuria Pastor* por la ayuda prestada durante estos años y por ser una buena compañera.

Al Dr. *Juan Carlos Mateos*, por esas tardes “aceleradas” sin las cuales este trabajo no hubiera sido posible y sin cuya presencia, la irradiación de las células hubiera sido mucho menos agradable. A los responsables del *Centro Regional de Oncología “Duques del Infantado”*, quienes facilitaron los medios necesarios para ello.

A *Jose Manuel Álvaro* por haberme ayudado mucho en los papeleos de extranjería, y por su amistad.

A *Marga, Lucía* y *Miguel Ángel* por su sincera amistad .

A *Josefina* y *Ángel* por alegrar el departamento y por ser muy amables.

A la *familia Cascales* por ser mi segunda familia.

A *Olga*, en especial, por haber estado siempre a mi lado confiando en mí más que yo mismo y por ese regalo de reyes tan especial. Sin olvidar su inestimable ayuda en la confección y corrección del manuscrito (infinita paciencia...).

A mis *compañeros del Departamento* de Biología Celular por los buenos momentos que hemos disfrutado juntos.

Quiero dar las gracias también a *todas aquellas personas*, a las que no he nombrado y que de una u otra manera, me ayudaron en la realización de este trabajo.

## **ÍNDICE**

---

<b>1-INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 LA INESTABILIDAD DEL GENOMA.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 REPARACIÓN DEL ADN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.3 TOPOLOGÍA DEL ADN.....</b>	<b>4</b>
<b>TOPOISOMERASAS DE ADN.....</b>	<b>6</b>
<b>1.4 TOPOISOMERASAS DE ADN :ENZIMOLOGÍA Y BIOLOGÍA CELULAR.....</b>	<b>6</b>
<b>1.4.1 Topoisomerasa I de mamíferos.....</b>	<b>7</b>
<b>1.4.2 Topoisomerasa II de mamíferos.....</b>	<b>9</b>
<b>1.5 CICLO CATALÍTICO DE LAS TOPOISOMERASAS DE ADN DE MAMÍFEROS.....</b>	<b>10</b>
<b>1.5.1 Ciclo catalítico de la topoisomerasa I .....</b>	<b>10</b>
<b>1.5.2 Ciclo catalítico de la topoisomerasa II.....</b>	<b>11</b>
<b>1.6 PAPEL BIOLÓGICO DE LAS TOPOISOMERASAS.....</b>	<b>12</b>
<b>1.6.1 Topoisomerasa y superenrollamiento del ADN.....</b>	<b>13</b>
<b>1.6.2 Topoisomerasas en replicación.....</b>	<b>13</b>
<b>1.6.3 Topoisomerasas en segregación .....</b>	<b>14</b>
<b>1.6.4 Topoisomerasas en transcripción.....</b>	<b>15</b>
<b>1.6.5 Topoisomerasas en recombinación.....</b>	<b>16</b>
<b>1.7 TOPOISOMERASAS EN LA REPARACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN.....</b>	<b>17</b>
<b>1.7.1 Implicación en una fase previa a la reparación.....</b>	<b>17</b>
<b>1.7.2 Implicación en la transcripción de genes de respuesta al daño.....</b>	<b>18</b>
<b>1.7.3 Implicación en la reparación por recombinación.....</b>	<b>19</b>
<b>1.8 REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD Y CANTIDAD DE LAS TOPOISOMERASAS A LO LARGO DEL CICLO CELULAR EUCARIÓTICO.....</b>	<b>20</b>



1.8.1	Topoisomerasa II y condensación cromosómica.....	22
1.8.2	Topoisomerasa II eucariótica y segregación cromosómica.....	22
<b>LOS INHIBIDORES DE TOPOISOMERASAS Y SU UTILIZACIÓN.....</b>		<b>24</b>
1.9	<b>LOS INHIBIDORES DE TOPOISOMERASAS.....</b>	<b>24</b>
1.9.1	Drogas que envenenan a las topoisomerasas de ADN de tipo I.....	29
1.9.2	Drogas que envenenan a las topoisomerasas de ADN de tipo II.....	29
1.9.3	Inhibidores catalíticos de la topoisomerasas II.....	32
1.9.3.1	Bis(2,6 dioxopiperazinas).....	32
1.9.3.2	Aclarubicina.....	34
<b>EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LA RADIACIÓN IONIZANTE.....</b>		<b>36</b>
1.10	<b>LESIONES INDUCIDAS POR RADIACIÓN IONIZANTE.....</b>	<b>36</b>
1.11	<b>RADIOSENSIBILIDAD EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS Y HUMANAS.....</b>	<b>39</b>
<b>MECANISMOS DE DEFENSA CELULAR FRENTE AL DAÑO EN EL ADN.....</b>		<b>42</b>
1.12	<b>LA REPARACIÓN DE LAS ROTURAS DE DOBLE CADENA.....</b>	<b>42</b>
1.12.1	La reparación por recombinación homóloga (HRR).....	43
1.12.2	La Recombinación ilegítima o recombinación no homologa (NHEJ).....	45
1.12.3	Recombinación V(D)J.....	45
<b>OJETIVOS.....</b>		<b>47</b>
<b>2-MATERIALES Y METODOS.....</b>		<b>49</b>
2.1	<b>LÍNEAS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVO.....</b>	<b>49</b>
2.2	<b>MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD TOPOISOMERASA II</b>	

	<b>POR ICRF-193 Y ACLARUBICINA.....</b>	<b>50</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Extracción de proteínas nucleares.....</b>	<b>50</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Actividad topoisomerasa II en extractos nucleares.....</b>	<b>51</b>
<b>2.3</b>	<b>ESTUDIO SOBRE LA CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD DE LOS INHIBIDORES CATALÍTICOS DE TOPOISOMERASA II ICRF-193 Y ACLARUBICINA.....</b>	<b>53</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Estudio de la viabilidad celular mediante el Ensayo de la Sulforrodamina B.....</b>	<b>53</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Preparación de las drogas.....</b>	<b>53</b>
<b>2.3.2.1</b>	<b>Metodología del ensayo SRB.....</b>	<b>54</b>
<b>2.4</b>	<b>CUANTIFICACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN MEDIANTE ELECTROFORESIS DE CÉLULAS AISLADAS EN GEL DE AGAROSA (SCGE) O “ENSAYO COMETA”.....</b>	<b>56</b>
<b>2.4.1</b>	<b>Metodología del ensayo “cometa”.....</b>	<b>57</b>
<b>2.5</b>	<b>CUANTIFICACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN MEDIANTE ELECTROFORESIS DE CAMPO PULSANTE.....</b>	<b>61</b>
<b>2.5</b>	<b>CUANTIFICACIÓN DEL DAÑO CROMOSÓMICO INDUCIDO POR ICRF-193 O ACLARUBICINA MEDIANTE EL ANÁLISIS DE SU CAPACIDAD PARA INDUCIR MICRONÚCLEOS.....</b>	<b>64</b>
<b>2.6.1</b>	<b>Obtención de células binucleadas, fijación, tinción y modo de hacer las reparaciones .....</b>	<b>66</b>
<b>2.7</b>	<b>MODULACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA CELULAR Y DEL DAÑO EN EL ADN INDUCIDO POR RADIACIÓN IONIZANTE MEDIANTE EL EMPLEO DE INHIBIDORES CATALÍTICOS DE TOPOISOMERASA II.....</b>	<b>68</b>
<b>2.7.1</b>	<b>Irradiación y formación de colonias.....</b>	<b>68</b>
<b>2.7.2</b>	<b>Irradiación y daño en el ADN.....</b>	<b>70</b>

<b>ANEXOS.....</b>	<b>72</b>
<b>Anexo I.....</b>	<b>72</b>
<b>Anexo II.....</b>	<b>73</b>
<b>Anexo III.....</b>	<b>74</b>
<b>Anexo IV.....</b>	<b>75</b>
<b>3-RESULTADOS.....</b>	<b>76</b>
<b>3.1 ACERCA DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS INHIBIDORES DE TOPO II ICRF-193 Y ACLARUBICINA.....</b>	<b>76</b>
<b>3.1.1 Análisis de los efectos que producen sobre la viabilidad celular los inhibidores de topo II ICRF-193 y ACLARUBICINA.....</b>	<b>76</b>
<b>3.2 EFECTO DE LOS INHIBIDORES ICRF-193 Y ACLARUBICINA SOBRE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE TOPO II.....</b>	<b>78</b>
<b>3.3 ACERCA DE LA ACCIÓN GENOTÓXICA DEL ICRF-193 Y LA ACLARUBICINA.....</b>	<b>87</b>
<b>3.3.1 Resultados utilizando el Ensayo Cometa para la cuantificación del daño producido en el ADN.....</b>	<b>87</b>
<b>3.3.2 Resultados utilizando Electroforesis de Campo Pulsante (PFGE) para la cuantificación de roturas de doble cadena inducidas en el ADN por ICRF-193 y valoración de este inhibidor como “veneno de topoisomerasa II”.....</b>	<b>92</b>
<b>3.3.3 Resultados utilizando el ensayo de micronúcleos en células binucleadas para realizar un análisis a nivel cromosómico del daño en el ADN provocado por los inhibidores ICRF-193 y Aclarubicina.....</b>	<b>97</b>
<b>3.4 UTILIZACIÓN DE INHIBIDORES CATALÍTICOS DE TOPOISOMERASA II COMO POTENCIADORES DEL DAÑO INDUCIDO POR RADIACIÓN IONIZANTE.....</b>	<b>102</b>
<b>3.4.1 ICRF-193 y Aclarubicina como potenciadores del daño en el ADN inducido por radiación ionizante.....</b>	<b>102</b>

3.4.2	Respuesta celular de las líneas V79 e irs-2 frente al daño inducido por radiación ionizante .....	107
3.4.3	Inhibición de la actividad catalítica topo II por ICRF-193 o ACLA y modulación de la respuesta celular frente al daño inducido por radiación ionizante.....	109
<b>4-DISCUSIÓN.....</b>		<b>112</b>
4.1	<b>APORTACIONES AL ESTUDIO SOBRE LA CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD DEL ICRF-193.....</b>	<b>112</b>
4.2	<b>¿ES REALMENTE EL ICRF-193 UN INHIBIDOR CATALÍTICO DE TOPOISOMERASA II?.....</b>	<b>118</b>
4.3	<b>APORTACIONES AL ESTUDIO SOBRE LA CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD DEL INHIBIDOR DUAL DE TOPOISOMERASA I Y II ACLARUBICINA.....</b>	<b>120</b>
4.4	<b>INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD TOPO II COMO ESTRATEGIA PARA POTENCIAR LOS EFECTOS LETALES INDUCIDOS POR RADIACIÓN IONIZANTE.....</b>	<b>124</b>
<b>5-CONCLUSIONES.....</b>		<b>129</b>
<b>6-BIBLIOGRAFÍA.....</b>		<b>130</b>

## **INTRODUCCIÓN**

---

## **1-INTRODUCCIÓN.**

La molécula del ADN tiene una estructura dinámica y está sujeta a cambios constantes, que pueden dar lugar a la formación de mutaciones estables alterándose así la integridad de la información genética de los organismos. Desarrollaremos a continuación una serie de puntos concretos acerca de esta idea básica.

### **1.1 LA INESTABILIDAD DEL GENOMA.**

Los diversos mecanismos de reparación del ADN y la plasticidad de los mismos ayudan a mantener la homeostasis celular y permiten la continuidad de un genoma en algunos casos altamente inestable. Esta inestabilidad se manifiesta en forma de mutaciones puntuales o cambios en el número y estructura de los cromosomas (deleciones, amplificaciones e inversiones). Estos cambios pueden tener su origen en la alteración de los procesos de replicación, reparación, recombinación y segregación, así como en la alteración de genes responsables del control del ciclo celular. El ADN reacciona fácilmente con gran variedad de compuestos químicos y un número menor de agentes físicos. Cada una de las modificaciones de la estructura molecular del material genético, capaz de alterar el funcionamiento normal de la célula, se considera como daño al ADN y puede ser clasificado como endógeno o exógeno. Los principales agentes endógenos que dañan el ADN suelen ser enzimas o los productos de las mismas, que dan lugar a despurinaciones, despirimidinaciones, daño en las bases, producción de aductos o roturas de cadena. Los agentes oxidantes se producen en la célula por distintos procesos asociados con el metabolismo aeróbico, por lo que el daño oxidativo parece ser el daño endógeno más significativo e inevitable, con una frecuencia estimada de  $10^4$  lesiones por célula y día en humanos. Mientras los diferentes agentes exógenos son de origen físico o químico (U.V., la radiación ionizante y cósmica, agentes alquilantes, drogas, venenos.....)

### **1.2 REPARACIÓN DEL ADN.**

Las moléculas de ADN son irremplazables, y el mantenimiento de la información contenida es por tanto un imperativo celular por lo que, para su integridad en la célula, encontramos un complicado conjunto de sistemas de reparación del ADN

(Figura 1). No es sorprendente por tanto que en la respuesta celular exista una gran gama de sistemas enzimáticos que catalizan por un lado algunas de las transformaciones químicas más interesantes halladas en el metabolismo del ADN, y por otro lado las transformaciones topológicas.

El ADN está altamente compactado en un espacio limitado, permitiendo el acceso a la información contenida en esta molécula, lo que lleva implícito un alto grado de organización estructural, tales como tensiones superhelicoidales que genera la iniciación y elongación tanto de la replicación, como de la transcripción y segregación de los cromosomas.

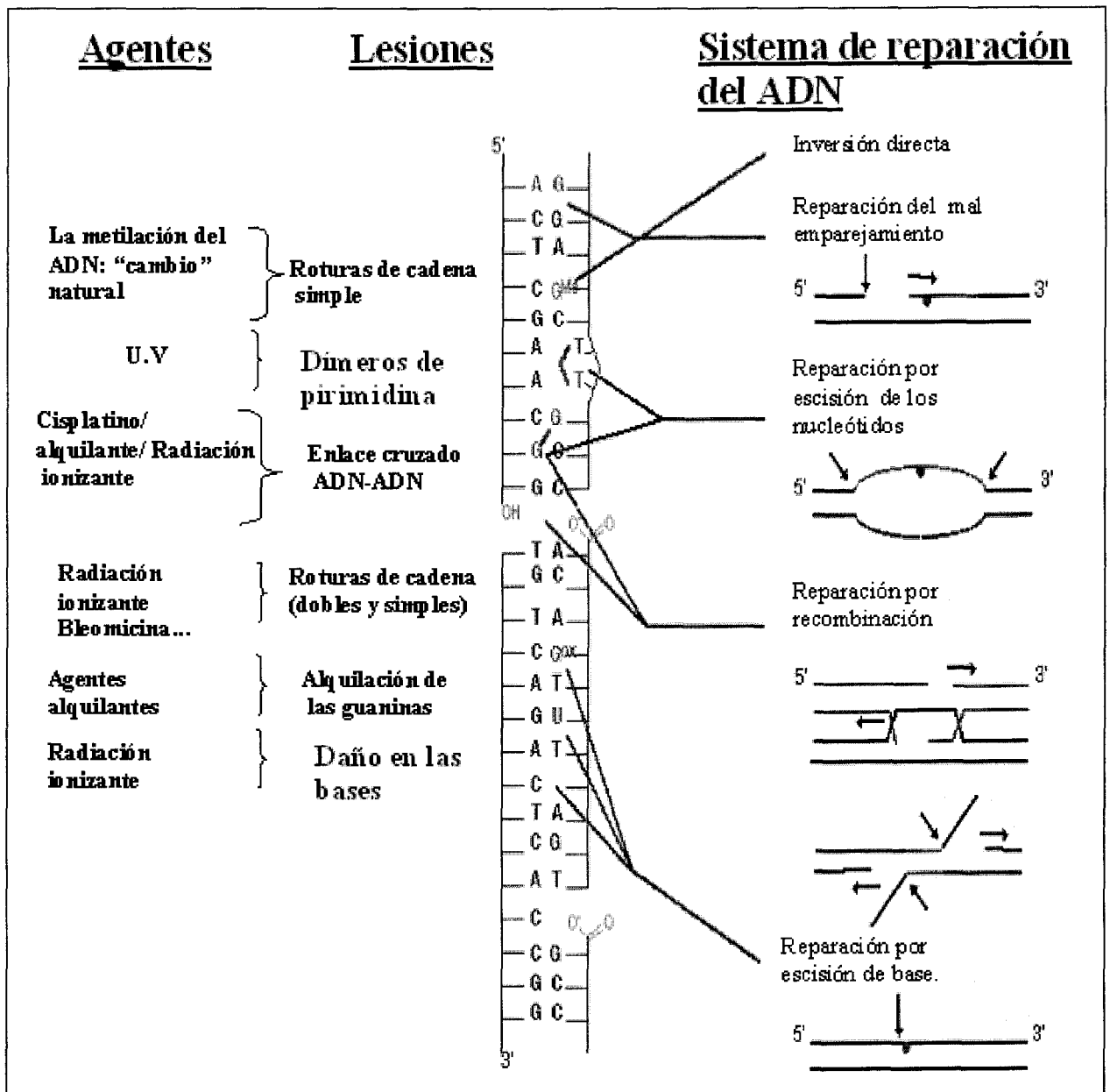


Fig. 1. Principales tipos de lesiones producidas en el ADN por diferentes agentes genotóxicos y sus correspondientes sistemas de reparación.



### **1.3 TOPOLOGÍA DEL ADN**

En los años sesenta se produjo un descubrimiento sorprendente en la topología del ADN. Se hallaron moléculas de ADN circulares retorcidas sobre sí mismas de una manera singular. Este superenrollamiento es consecuencia de la torsión generada por exceso, o por un defecto, del valor del número de enlace entre ambas cadenas de la doble hélice (Roca, 2003).

El superenrollamiento del ADN se define como un giro o doblamiento del eje alrededor del cual se enrollan las dos cadenas del ADN y es generalmente una manifestación de una tensión estructural. Se manifiesta en todos los ADN celulares y se encuentra estrictamente regulado en cada célula. Si no existe torsión o doblez del eje sobre sí mismo, se dice que el ADN se encuentra en su estado relajado. Casi todas las propiedades físicas, químicas y biológicas del ADN (comportamiento hidrodinámico, densidad, actividad de replicación y transcripción, enzimología, etc.) resultan afectadas por el fenómeno de circularidad y el estado relajado o superenrollado del ADN circular.

El ADN de células eucarióticas actúa topológicamente de forma similar a moléculas circulares de ADN de 2 cadenas cerrado covalentemente. Para una molécula de ADN circular cerrada en estado relajado, el así llamado número de enlace ( $L_{k0}$ ) es el número de pares de bases de la molécula dividido por el número de pares de bases por vuelta de hélice (10.5) y se utiliza como referencia para cualquier otro estado de enrollamiento de esa misma molécula. Sabemos hoy que la torsión constituye un fenómeno presente en el ADN intracelular, que presenta en promedio un déficit del 5 % en el valor de su número de enlace. En moléculas de ADN circulares, esta torsión no puede disiparse mientras no se produzcan cortes en las cadenas que permiten a sus extremos rotar libremente. En moléculas lineales de ADN de gran longitud, la torsión queda confinada a dominios discretos entre las estructuras que las mantienen condensadas. Los cambios de torsión y superenrollamiento generado en la doble hélice determinan la conformación local del ADN a lo largo del cromosoma; influyen de un modo notable en la transcripción y recombinación del genoma.

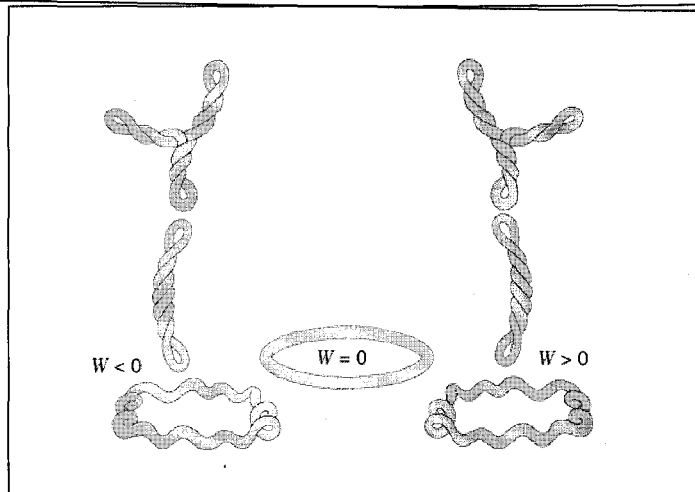


Figura 2. Estado de superenrollamiento del ADN.  
 Negativo < Relajado > Positivo.  
 W es la cantidad de vueltas de superenrollamiento existentes en una molécula de ADN circular.

Las células deben disponer de mecanismos para eliminar los encadenamientos y anudamientos generados en el ADN, así como para modificar el número de enlace de la doble hélice y modular, por ende, su grado de torsión y superenrollamiento. Tales mecanismos tendrían que operar cortando las cadenas del ADN para permitir el paso de otras cadenas, finalizando con la restauración de la continuidad de las cadenas escindidas. Una modificación estructural en una región limitada de la molécula circular de ADN modifica la topología a lo largo de todo el círculo. Estos cambios arquitectónicos son sumamente importantes porque modifican la relación del ADN con proteínas reguladoras y ejercen, por lo tanto, un profundo efecto en el funcionamiento génico. Esta función de organización y restauración del ADN está dirigida por unos enzimas específicos nucleares llamados **topoisomerasas de ADN**.

## **TOPOISOMERASAS DE ADN.**

Las topoisomerasas de ADN (topos) son enzimas nucleares muy conservados en la evolución desde levaduras hasta humanos (Kunze y col., 1991). Estos enzimas se encargan de regular el estado topológico de las moléculas de ADN mediante dos procesos coordinados, uno de rotura simple o doble de las hebras de ADN, y otro proceso mediante el cuál se produce una ligación de dichas roturas.

### **1.4 TOPOISOMERASAS DE ADN: ENZIMOLOGÍA Y BIOLOGÍA CELULAR.**

En células de mamíferos han sido descritos dos tipos de topoisomerasa: la topo I y la topo II, siendo la girasa de ADN de bacterias la equivalente a la topo II de mamíferos, con la que presenta algunas analogías, aunque ambas enzimas difieren tanto a nivel estructural como funcional en algunos aspectos. Además, la topo II de eucariotas purificada no actúa como una girasa y no tiene capacidad para superenrollar ADN relajado. El análisis de la secuencia de la topo II de eucariotas sugiere que ésta evolucionó desde la topo II bacteriana por fusión de las dos subunidades girasa en una sola cadena polipeptídica (Tsai-Pflugfelder y col., 1988). En cambio, han sido tres topoisomerasas las descritas en el caso de levaduras: la topo I, la topo II y la topo III.

Dos isoenzimas de la topo II de peso molecular ligeramente diferente han sido aislados en humanos y roedores: la topo II $\alpha$  y la topo II $\beta$ , codificadas por genes diferentes (Drake y col., 1989; Jenkins y col.,1992; Zechiedrich y col.,1990). El gen de la topo II $\alpha$  se encuentra en el cromosoma 17q21-22( Jenkins y col.,1992; Tsai-Pflugfelder y col., 1988)) mientras que el gen de la topo II $\beta$  está en el cromosoma 3p24 (Jenkins y col., 1992). Ambos isoenzimas difieren: en sus masas moleculares (170kDa para topo II $\alpha$  y 180kDa para topo II $\beta$ ), en sus propiedades enzimáticas (Drake y col., 1989), según sus funciones y regulación a lo largo del ciclo celular (Capanico y col.,1992; Tsutsui K y col.,1993), así como en la distribución celular (Negri y col.,1993; Petrov y col., 1993). Aunque los mecanismos catalíticos de topo II $\alpha$  y la topo II $\beta$  parecen ser los mismos, hay pruebas que indican que las dos isoformas difieren en las funciones fisiológicas, distinguidas en base a sus propiedades bioquímicas y

farmacológicas (Drake y col., 1987; 1989b). Por ejemplo: las topoisomerasas  $\text{II}\alpha$  y  $\beta$  difieren en sus expresiones a través el ciclo celular y en su distribución dentro el tejido, durante el desarrollo embrionario en vertebrados. Ambas isoformas se acumulan en el nucleoplasma pero sólo topoisomerasa  $\text{II}\beta$  se distribuye fuera del núcleo durante la interfase [8]. La topoisomerasa  $\text{II}\alpha$  es esencial para la división de la célula, una característica que refleja su localización citosólica durante la mitosis, estando asociadas al cromosoma, mientras que sólo una fracción menor de la topoisomerasa  $\text{II}\beta$  se asocia al cromosoma más tarde en la mitosis.

Con mucho, la mayoría de la información referente a las topoisomerasas de ADN de tipo II de mamíferos proviene de la topoisomerasa  $\text{II}\alpha$ , a la cual nos referiremos de ahora en adelante de manera genérica como topoisomerasa II.

### 1.4.1 Topoisomerasa I de mamíferos

La topoisomerasa I de mamíferos es una proteína monomérica, perteneciente a la subfamilia IB (Tabla 1), que existe en la célula como una fosfoproteína con un peso molecular de aproximadamente 100 KDa (Liu y Miller, 1981; Samuels y Shimizu, 1992; Cardellini y Durban, 1993). Esta enzima presenta un alto porcentaje de aminoácidos cargados, lo que explica la razón por la cual su actividad puede ser modulada por moléculas con carga (el ion  $\text{Mg}^{++}$  y los policationes estimulan la actividad de la enzima mientras que los polianiones la inhiben) (Ishii y col., 1987).

Topoisomerasas de ADN	Tipo	Estructura	P.M. (kD)	Interacción ADN	Localización del gen (Cromosoma humano)
<b>I</b>	<b>IB</b>	Monomero	100	ssb	20 (20q 12-13.2)
<b>III<math>\alpha</math></b>	<b>IA</b>	2 isoformas (maduración alternativa)	110	ssb	17 (17p 11.2-12)
<b>III<math>\beta</math></b>	<b>IA</b>	3 isoformas (maduración alternativa)	96	ssb	22 (22q 11-12)
<b>II<math>\alpha</math></b>	<b>II</b>	Homodímero	170	R.D.C	17 (17q 21-22)
<b>II<math>\beta</math></b>	<b>II</b>	Homodímero	180	R.D.C	3 (3p 24)

**Tabla 1.** Clasificación de las topoisomerasas de humanos

La topo I parece estar implicada en transcripción, replicación y recombinación (Wang y col., 1990; Wang, 1991) en base a una serie de actividades que lleva a cabo dicha enzima.

La topo I es capaz de:

- Relajar ADN superenrollado tanto positiva como negativamente, aunque tiene mucha más afinidad por moléculas de ADN superenrolladas negativamente. Esta afinidad va disminuyendo a medida que la molécula se va acercando a su estado relajado (Figura 3A).
- Anudar y desanudar moléculas circulares de ADN de una sola cadena (la formación de nudos depende de la presencia de regiones de apareamiento local de bases) (Figura 3B).
- Formar moléculas de ADN circular de 2 cadenas a partir de 2 moléculas circulares de ADN de 1 cadena en las condiciones en que la molécula de 2 cadenas sea más estable. La transformación de una molécula de ADN circular de 1 cadena en un ADN lineal con una mella, seguida por la recircularización en presencia de otra molécula de ADN circular cerrada de una cadena, es seguramente responsable de la reacción de encadenamiento de la topo I (McCoubrey y Champoux, 1986) (Figura 3C).

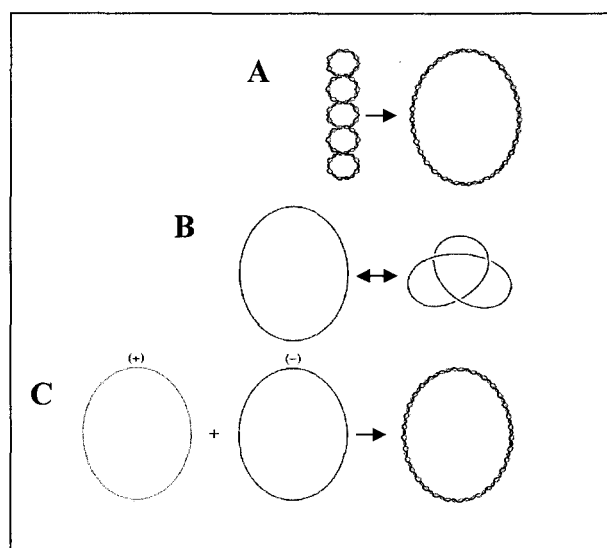


Figura 3 . Reacciones de las topoisomerasas tipo I de eucariotas.

### 1.4.2 Topoisomerasa II de mamíferos

La topo II de eucariotas, es una proteína homodimérica, la cual a diferencia de la topo I, es ATP-dependiente. Esta enzima es esencial para la supervivencia de las células eucariotas (Goto y Wang, 1984), ya que se requiere para la segregación de cromosomas mitóticos (DiNardo y col., 1984; Uemura y Yanagida, 1984; Holm y col., 1985; Uemura y col., 1987) y meióticos (DiNardo y col., 1984) y para el mantenimiento de la estructura cromosómica (Earnshaw y col., 1985; Earnshaw y Heck, 1985; Berrios y col., 1985; Gasser y col., 1986; Gasser y Laemmli, 1986). Además, la topo II está implicada probablemente en replicación, transcripción y recombinación (Wang, 1985; Bae y col., 1988; Dillehay y col., 1989; Osheroff, 1989a; Rose y col., 1990).

La topo II es capaz de promover las siguientes reacciones (siempre en presencia de  $Mg^{2+}$  y ATP; Figura 4):

- Si el segmento transportado y el segmento mellado de ADN residen en la misma molécula de ADN la topo II puede:

- ❖ eliminar superenrollamiento de la molécula de ADN (Figura 4A).
- ❖ añadir o eliminar nudos (Figura 4B).

-Si el segmento transportado y el segmento mellado pertenecen a moléculas diferentes de ADN la topo II puede:

- ❖ encadenar y desencadenar moléculas de ADN (figura 4C).

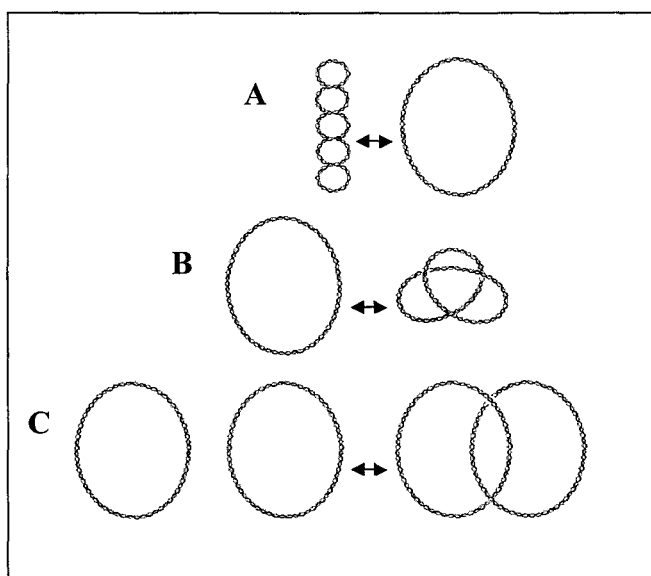


Figura 4. Reacciones de las topoisomerasas tipo II de eucariotas

## **1.5 CICLO CATALÍTICO DE LAS TOPOISOMERASAS DE ADN DE MAMÍFEROS**

La topo I no requiere un cofactor energético para catalizar cambios topológicos en el ADN. La topo II, sin embargo, requiere ATP y  $Mg^{2+}$  para completar su ciclo catalítico. La reacción catalizada por las topoisomerasas lleva consigo una serie de pasos que describimos a continuación (la Figura 5 representa el ciclo catalítico de la topo II).

El ciclo de la enzima comienza con el reconocimiento del sustrato de ADN. Se establece una interacción no covalente entre la enzima y su sustrato y se forma el llamado “complejo de no rotura”. Esta interacción depende de dos propiedades de la doble hélice: la secuencia de nucleótidos y la topología de la molécula. La secuencia de nucleótidos dicta el sitio en el cual la topo se va a unir al ADN; sin embargo, aunque la enzima tiene preferencia por ciertas secuencias, su especificidad está lejos de ser tan rigurosa como por ejemplo la de las endonucleasas de restricción. Esta falta de rigor es, probablemente, importante para las funciones fisiológicas de las topoisomerasas, ya que permite a la enzima actuar en cualquier punto del genoma con problemas topológicos, con independencia de la secuencia nucleotídica.

El estado topológico del ADN también modula la unión de la enzima a su sustrato, ya que la enzima puede discernir entre estructuras topológicas distintas e interacciona preferentemente (de 3 a 10 veces más) con ácidos nucleicos superenrollados que con moléculas relajadas (Osheroff y col., 1983; Osheroff, 1986; Zechiedrich y Osheroff, 1990). Esta capacidad para reconocer distintos estados topológicos de una misma molécula de ADN permite a la enzima distinguir entre el sustrato y el producto de su reacción catalítica.

### **1.5.1 Ciclo catalítico de la topoisomerasa I .**

Una vez la topo I esta unida al sustrato, rompe una de las hebras del dúplex de ADN y cataliza la transferencia de una unión fosfodiéster desde el ADN hasta un residuo específico de la enzima, de manera que se forma un intermediario covalente ADN-proteína entre un residuo de tirosina de la enzima y el extremo 3'fosfato de la rotura en el ADN, llamado “complejo de rotura”. La energía del enlace fosfodiéster se conserva, ya que un residuo de tirosina de la enzima actúa transitoriamente como receptor y donante del extremo fosforilo de la hebra rota. Una vez que la enzima topo I ha creado la mella en una de las dos hebras del

ADN de doble cadena, la región adyacente a la rotura puede rotar sobre la hebra intacta. Posteriormente se ligan los extremos rotos; este paso puede tener lugar después de cada ciclo de “paso de la hebra”, o después de varios ciclos a fin de devolver al ADN su integridad inicial. Aunque al principio se propuso la posible participación de una ligasa en este paso, es la propia topoisomerasas la que lo lleva a cabo.

Una vez que las roturas en el ADN han sido selladas, la topo I sufre un cambio conformacional que regenera el estado activo de la enzima y le confiere la capacidad de disociarse de su ADN producto.

### **1.5.2 El ciclo catalítico de la topoisomerasa II.**

En la Figura 5 se presenta el ciclo catalítico de la interacción entre topo II y su sustrato. El enzima topo II pasa por dos conformaciones alternativas, una como complejo abierto y otra como complejo cerrado. El enzima se encontrará en un estado u otro según la ausencia (complejo abierto) o presencia (complejo cerrado) de ATP. La topo II “*in vivo*” utiliza  $Mg^{2+}$ , pero “*in vitro*”, el  $Ca^{2+}$ , y en menor extensión el  $Mn^{2+}$  y el  $Co^{2+}$ , pueden sustituir al  $Mg^{2+}$  (Bauer, 1978; Lee y col., 1989).

El enzima se une a dos moléculas de ADN de doble cadena, a las que denominamos ADN o segmento G (de “gap” = hueco) y ADN o segmento T (de “transfer” = transferido), (Andoh y col., 1988), formando inicialmente un complejo de pre-rotura (reacción 3). Cuando la molécula de ATP está presente, el enzima sufre un cambio conformacional, pasando de complejo abierto a cerrado y simultáneamente se producen ataques nucleofílicos que provocan la rotura de ambas cadenas del segmento G, transfiriéndose el fosfato del extremo 5' al residuo catalítico hidroxilo de la tirosina 480 (tyr 480) del enzima (Pommier 1997). Se forma así una unión covalente entre el ADN roto y cada una de las subunidades del enzima topo II unidas por un enlace covalente  $O^4$ -fosfotirosina a uno de los extremos 5' final de la rotura formándose también en este caso el “complejo de rotura”, paso que requiere la presencia de un catión divalente (Osheroff, 1987; Osheroff y Zechiedrich, 1987). En cambio el segmento T pasa a través del hueco producido en el segmento G dando lugar a un complejo post-rotura



(reacción 4), siendo dicho segmento T transferido fuera del complejo ADN (G) – enzima. Se produce por último, la unión de los extremos del segmento G (reacción 5) y en este momento la actividad intrínseca de la ATPasa hidroliza el ATP, con lo cual ocurre un nuevo cambio conformacional del enzima a complejo abierto.

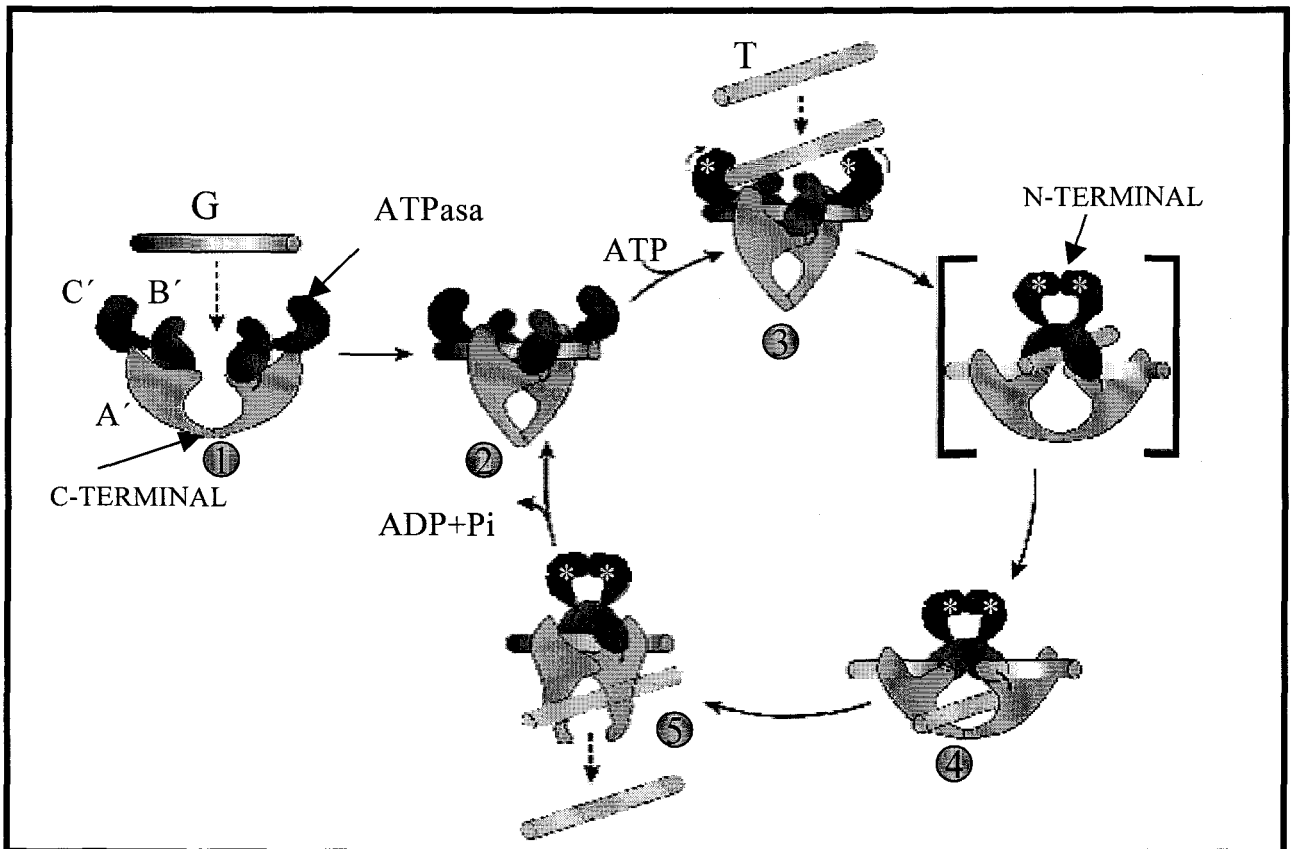


Figura 5: Distintas etapas del Ciclo catalítico de la enzima topoisomerasa II.  
El segmento T = ADN transferido, Segmento G (gap) = ADN cortado.

\*= sitios de la unión del ATP.

## 1.6 PAPEL BIOLÓGICO DE LAS TOPOISOMERASAS

Las topoisomerasas pueden participar en procesos celulares de dos formas: indirectamente, controlando el estado de superenrollamiento del ADN así como su estado de encadenamiento y anudamiento, y directamente, participando en procesos que requieren una rotura y reunión acoplada de la molécula de ADN.

### **1.6.1 Topoisomerasas y el superenrollamiento intracelular del ADN**

El ADN circular de dos cadenas covalentemente cerrado aislado de células se encuentra superenrollado negativamente, con una diferencia en el número de enlace que va de -0.03 a -0.09 dependiendo de la fuente (Bauer, 1978). En células eucariotas la mayoría del superenrollamiento puede ser explicado por la unión de las histonas al ADN combinado con la actividad de relajación de una topoisomerasa de ADN. La unión de los octámeros de histonas al ADN para formar nucleosomas resulta en un superenrollamiento negativo del ADN sobre el complejo histónico, de modo que si no fuera por la actividad topoisomerasa la parte del ADN que está fuera del nucleosoma permanecería superenrollada positivamente. Este mecanismo permite la ausencia de estrés torsional en el ADN nuclear eucariota.

### **1.6.2 Topoisomerasas en replicación**

Las topoisomerasas de ADN podrían jugar varios papeles en la replicación del ADN (Figura 6):

a) En la fase de iniciación de la replicación, el grado de superenrollamiento influye en la unión de factores requeridos para el comienzo de la replicación.

b) La replicación es un proceso que genera superenrollamiento positivo por delante y negativo por detrás de la maquinaria de replicación, conforme esta avanza. Si hay barreras que impiden la libre rotación del complejo de replicación puede darse una acumulación estable del superenrollamiento, y por ello durante la fase de elongación es indispensable una topoisomerasa capaz de relajar el superenrollamiento y eliminar el estrés que, de otra forma, se acumularía en la molécula de ADN. Esta actividad de relajación podría ser llevada a cabo tanto por topo I como por topo II.

En ausencia de topo I, sin embargo, la elongación de las cadenas se retrasa en las primeras fases de la replicación. Por otro lado, mutaciones en topo II tienen poco efecto en la tasa de elongación de la cadena, sugiriendo que la topo I debe ser importante, al menos en esta fase de la replicación, y que ésta debe ser la enzima que normalmente actúa eliminando el superenrollamiento que se origina durante esta fase del ciclo (Kim y Wang, 1989).

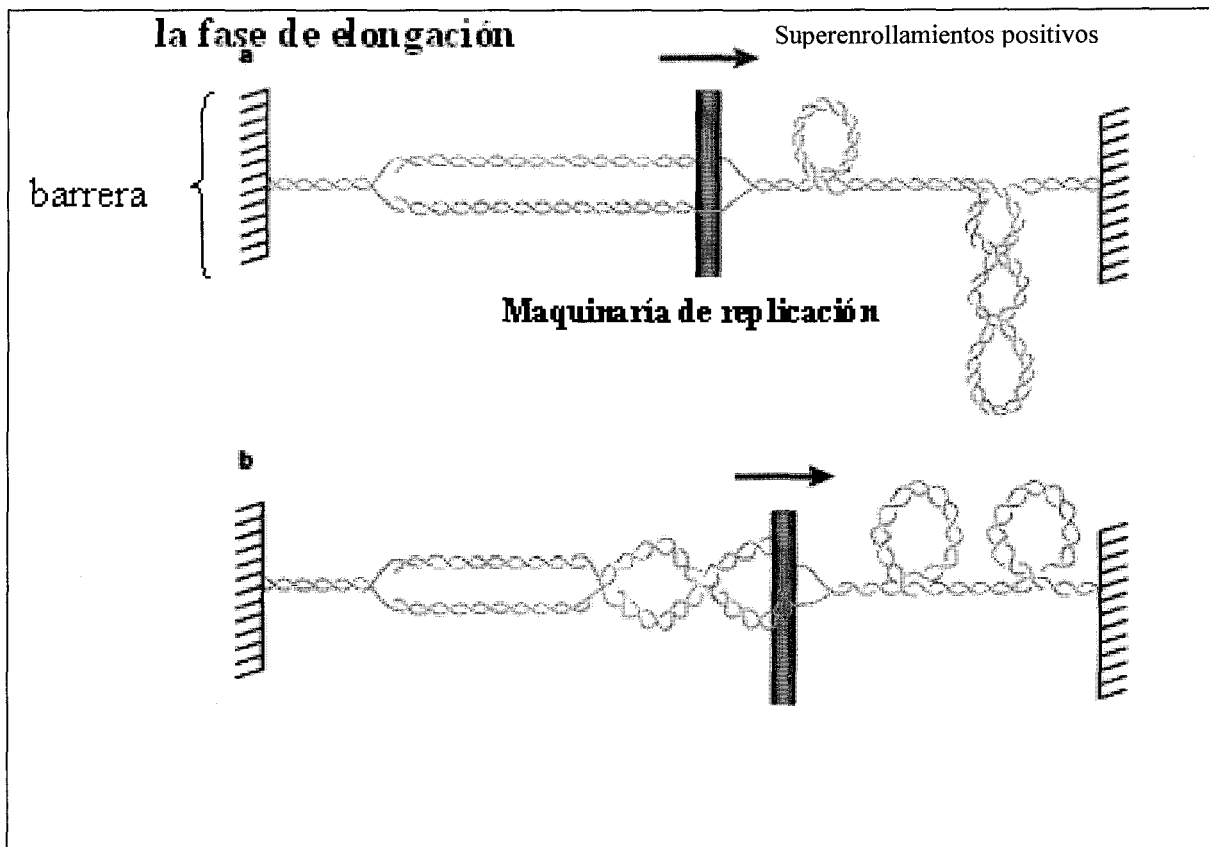


Figura 6 .Las consecuencias de la fase de elongación de ADN, (a) Acumulación de superenrollamiento positivo por delante y negativo por detrás de la maquinaria de replicación, (b) el giro de la maquina de replicación sobre el eje la helice de la doble cadena de ADN, permite la redistribución de los superenrollamientos positivos que se encuentran delante de la horquilla de replicación permitiéndose el avance a la maquinaria de replicación.

### 1.6.3 Topoisomerasas en segregación

Al final de la replicación, se forman productos encadenados (Holm, 1994) que una topoisomerasa podría resolver por medio de roturas de cadena simple o doble. La topo I purificada, en ausencia de topo II, permite la replicación completa del ADN del virus SV40 en un sistema de replicación *in vitro* (Yang y col., 1987), sin embargo, los productos de la replicación permanecen enlazados. La topo II, por el contrario, sí puede sustituir completamente a la topo I en un sistema *in vitro*. En eucariotas existen datos muy representativos procedentes de estudios realizados en levaduras con la topo II mutada. En estos mutantes termosensibles se observa la acumulación de plásmidos en forma de múltiples dímeros encadenados después de una ronda de replicación a temperatura no permisiva (Caron

y col., 1994). Este papel crucial de la topo II para una correcta segregación de los cromosomas durante la mitosis se ha observado también en *Drosophila melanogaster* (Buchenau y col., 1993) y en células de mamífero (Downes y col., 1994). La topo II parece ser por tanto crucial al final de la replicación para el desencadenamiento de cromosomas encadenados *in vivo*.

#### **1.6.4 Topoisomerasas en transcripción**

Durante la transcripción también se generan tensiones topológicas que hay que eliminar, de manera que sea posible la rotación de un segmento de ADN alrededor de su eje en vez de la rotación de toda la cadena naciente de ARN alrededor del ADN (Figura 7). El descubrimiento de las topoisomerasas, naturalmente, dirigió la discusión hacia la posible implicación de estas enzimas en la transcripción, además de en la replicación (Botchan y col., 1973). Diversas pruebas directas e indirectas han sugerido que en eucariotas, la topo I en particular puede estar especialmente implicada en esta función. Esta enzima se ha localizado asociada con loci transcripcionalmente activos mediante tinción con inmunofluorescencia del nucleolo de *Drosophila* (Fleischmann y col., 1984), y se ha demostrado además que el nucleolo, donde hay una alta actividad transcripcional, está enriquecido en topo I (Muller y col., 1985); de hecho, la síntesis de ARNr se puede bloquear mediante la microinyección de anticuerpos anti-topo I en el núcleo celular, y esta inhibición se puede revertir mediante la adición de topo I exógena (Egyhazi y Durban, 1987). Todo esto sugiere, de forma clara, que la topo I es un componente esencial durante la transcripción.

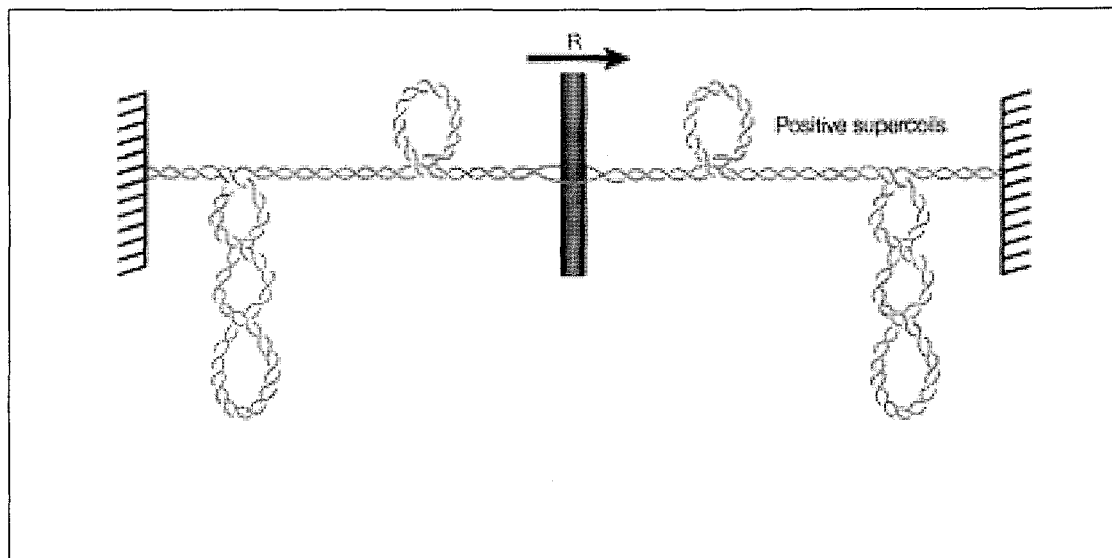


Figura 7. Generación de dominios de superenrollamientos opuestos con la transcripción. R ; maquinaria de transcripción, incluyendo la ARN polimerasa y sus proteínas asociadas .La R no puede girar sobre el eje de las doble cadenas del ADN, de modo que se forma superenrollamiento positivos delante de la maquinaria de transcripción y los superenrollamiento negativo se encuentran detrás de dicha maquinaria, de forma similar a la maquinaria de replicación. la iniciación de la transcripción implica la actividad de topo I a través de la modulación del nivel de superenrollamiento del ADN.

### 1.6.5 Topoisomerasas en recombinación

Paradójicamente, aunque las topoisomerasas de ADN son indispensables para el mantenimiento de la estabilidad genómica, podrían también alterar dicha estabilidad en ciertas condiciones. La capacidad de las topoisomerasas para romper y reunir hebras de ADN y para llevar a cabo transferencias intermoleculares sugiere que estas enzimas podrían catalizar la rotura y reunión de las hebras de ADN durante la recombinación. De hecho se ha descrito la existencia de recombinación ilegítima mediada por topo II tanto *in vitro* (Bae y col., 1988) como *in vivo* (Han y col., 1993; Negrini y col., 1993). Por otro lado, existen cepas mutantes de levadura que muestran frecuencias de recombinación muy elevadas y cuya topo I forma complejos de rotura más estables que los de la cepa silvestre (Levin y col., 1993).

Se ha propuesto también a las topoisomerasas como intermediarias para explicar el origen de los intercambios entre cromátidas hermanas (SCEs) en diferentes modelos (Ishii y Bender, 1980; Painter, 1980; Pommier y col., 1985) como responsables de producir cortes, uniones covalentes y reunión de cadenas de ADN.

## **1.7 TOPOISOMERASAS EN LA REPARACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN**

Debido a los mecanismos de acción que poseen, se ha considerado a las topoisomerasas de ADN como buenas candidatas para intervenir en los procesos de reparación llevados a cabo en la célula después de que agentes físicos o químicos hayan provocado algún tipo de daño en el ADN. Se ha propuesto que el papel desempeñado por estas enzimas podría ser directo, participando en los mecanismos moleculares de reparación de la lesión, como por ejemplo en la reparación de roturas de cadena del ADN o en la escisión de bases dañadas. Alternativamente, podrían actuar de forma indirecta en los pasos preparatorios que llevarían consigo la relajación de la cromatina de forma que se favorezca una mejor accesibilidad de las enzimas de reparación al ADN dañado (Cortés y Pastor, 2001a).

La investigación de la posible implicación de las topoisomerasas en la reparación del daño en el ADN se ha basado principalmente en las fluctuaciones de las actividades y los niveles de las topo I y II después del tratar células de mamíferos con un agente físico o químico, además de en la existencia de una posible correlación entre proteínas topoisomerasas anormales y la sensibilidad o resistencia a la radiación.

Teniendo en cuenta los resultados hasta ahora publicados acerca de la posible implicación de las topoisomerasas en la reparación del daño en el ADN producido por agentes físicos o químicos, se han establecido distintas hipótesis acerca de su intervención en dicha función celular básica para el mantenimiento de la integridad del genoma.

### **1.7.1 Implicación en una fase previa a la reparación**

La cromatina densamente empaquetada, cuando se daña por luz UV o por radiación de alta energía, pierde de forma transitoria este grado de empaquetamiento para permitir la accesibilidad de las enzimas de reparación por escisión a los sitios dañados, en particular de las helicasas y endonucleasas. La pérdida de afinidad por parte de las histonas hace que los dominios de ADN adopten un estado de fuerte superenrollamiento negativo. Este ADN “desnudo” topológicamente forzado o restringido es un mal sustrato para las enzimas de reparación (posiblemente por un impedimento para que las enzimas de reparación accedan a los sitios dañados) a menos que la topo II $\alpha$  (o la topo I) libere esta restricción (Thielmann y

Popanda, 1998a). De hecho, se ha observado que la incisión y la síntesis de reparación del ADN se ve debilitada en fibroblastos humanos irradiados con UV en presencia de distintos inhibidores de topo II (Popanda y Thielmann, 1992; Thielmann y col., 1993). De acuerdo con estas consideraciones, la acción de la topoisomerasa II $\alpha$  tendría una función preparatoria en la reparación, ya que precedería al paso de incisión específica de la reparación del ADN. Debido a su posición estratégica en las bases de los bucles y a la reacción que cataliza, la Topo II es muy probable que controle el grado de superenrollamiento dentro de los bucles, liberando el estrés producido durante la replicación y la transcripción (Thielmann y Popanda 1998b). Dada esta función, la enzima podría jugar también un papel en la reparación.

### **1.7.2 Implicación en la transcripción de genes de respuesta al daño**

De forma general se sabe que la irradiación de las células con luz UV o con rayos X estimula la transcripción de un gran número de genes, conocidos como genes de respuesta al daño en el ADN (Holbrook and Fornace, 1991; Herrlich y col., 1992 y 1994; Keyse, 1993). Este estímulo de la transcripción es probable que requiera un aumento en los niveles de topo I o II, o de ambas. La implicación de la topo I en la iniciación y elongación de la transcripción fue descrita por Wang (1996). Así, es tentador especular que la ya investigada asociación de la topo I con las regiones transcripcionalmente activas del genoma (Fleischmann y col., 1984) podría estar estrechamente conectada con la reparación por escisión preferencial que tiene lugar en dichas regiones (Bohr y col., 1985; Cortés y Pastor, 2001a).

En células no irradiadas, se observó por inmunotinción que la topo I se localizaba principalmente en el nucleolo. Se sabe que la enzima está asociada con la ARN polimerasa I (Pommier y Bertrand, 1993). La irradiación llevó, de manera dosis-dependiente, a la aparición de nuevos centros de actividad topo I (Thielmann y Popanda, 1998a), y parece razonable asumir que estos focos representan nuevos sitios de transcripción génica. De hecho, la topo I de humanos se identificó como parte del complejo TFIID (Merino y col., 1993; Kretzschmar y col., 1993). En cuanto a la topo II, se sabe menos sobre la posibilidad de que dicha enzima juegue un papel activo en la transcripción.

### 1.7.3 Implicación en la reparación por recombinación

Además de lo expuesto anteriormente también podemos considerar una implicación directa de las topoisomerasas, de tipo I y/ o tipo II, en los procesos de reparación por recombinación. Existen fuertes evidencias de que las topoisomerasas (principalmente la topo II) son capaces de estimular la recombinación tanto *in vivo* como *in vitro* (Halligan y col., 1982; Ikeda y col., 1982; Bullock y col., 1985; Ikeda, 1986; Bae y col., 1988; Zhu y Schiestl, 1996). Mientras que la mayoría de los artículos publicados apuntan a que la recombinación promovida por las topoisomerasas es del tipo ilegítima (no-homóloga), no podemos descartar que promueva la recombinación homóloga (Cortés y Pastor, 2001b).

Las topoisomerasas I y II son recombinasas con actividades de transferencia de cadenas de ADN intra e intermolecular (Halligan y col., 1982; Gale y Osheroff, 1992). Estudios en levaduras expresando diferentes niveles de topo I muestran una asociación directa entre los niveles de topo I y la integración ilegítima de ADN no-homólogo extracelular. Las secuencias que son puntos calientes para la integración de ADN se corresponden con las secuencias identificadas previamente como sitios de rotura preferidos por la topo I (Zhu y Schiestl, 1996). También se ha implicado a la topo II en algunas formas de recombinación ilegítima en humanos. Estudios recientes sugieren que el daño espontáneo en el ADN, como sitiosapurínicos, apirimidínicos y residuos de citosina desaminados podrían estimular las roturas mediadas por la topo II y consiguiente recombinación (Kingma y col., 1997; Larsen y col., 1998).

Hasta ahora no existen evidencias experimentales que relacionen este posible mecanismo de recombinación mediado por las topoisomerasas con la reparación del daño por radiación, por lo que esto sigue siendo sólo una hipótesis interesante.



## **1.8 REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD Y CANTIDAD DE LAS TOPOISOMERASAS A LO LARGO DEL CICLO CELULAR EUCARIÓTICO**

La topo II se expresa principalmente durante la fase de crecimiento tanto en extractos libres de células como *in vivo*, y tiene por tanto un carácter de ser un marcador específico de la proliferación celular. La cantidad de enzima se incrementa al inicio de la replicación del ADN y continúa incrementándose durante las fases S y G<sub>2</sub> hasta alcanzar sus valores máximos al final de G<sub>2</sub>-M, mientras que este aumento en la concentración de topo II antes de la mitosis es compensado con un importante descenso en los niveles de actividad de la enzima en la fase G<sub>1</sub> del ciclo, debido tanto a cambios en los niveles de transcripción del gen (Adachi y col., 1997) como a fluctuaciones en la estabilidad del ARNm a lo largo del ciclo (Goswami y col., 1996).

Por el contrario, la topo I ha sido detectada en distintas líneas celulares a niveles de actividad equiparables tanto en estado proliferativo como en estado quiescente (Duguet y col., 1983), o sea que los niveles de topo I se expresan de manera constitutiva, y permanecen constantes en las distintas fases del ciclo celular y su estabilidad no varía durante la mitosis (Heck y col., 1988) (Figura 8).

La importancia de la regulación de la topo II durante el ciclo celular estriba en conocer cuál es la fase más sensible para los inhibidores de esta enzima. Tras la estimulación de células BALB-c 3T3 con suero, las células proliferantes muestran una mayor sensibilidad al etopósido que las células quiescentes. El incremento en sensibilidad a la droga comienza durante la fase S y alcanza el máximo justo antes de la mitosis. Sin embargo, aunque el nivel máximo de topo II asociada a roturas en la cadena de ADN se produce durante G<sub>2</sub>, la citotoxicidad es máxima durante la fase S, sugiriendo que las interacciones con otros mecanismos conducen a la muerte celular (Chow y Ross, 1987). La modulación de la actividad topo II durante el ciclo celular involucra procesos de fosforilación. Esta afirmación se ha demostrado para caseína quinasa y para la proteína quinasa C. Estos cambios pueden ser cruciales en la activación de la actividad topoisomerasa. La fosforilación de la topo II produce un aumento de actividad de más de 10 veces cuando la célula progresa de G<sub>2</sub> a M (Cardenas y Gasser, 1993), como mientras que la desfosforilación la inactiva.

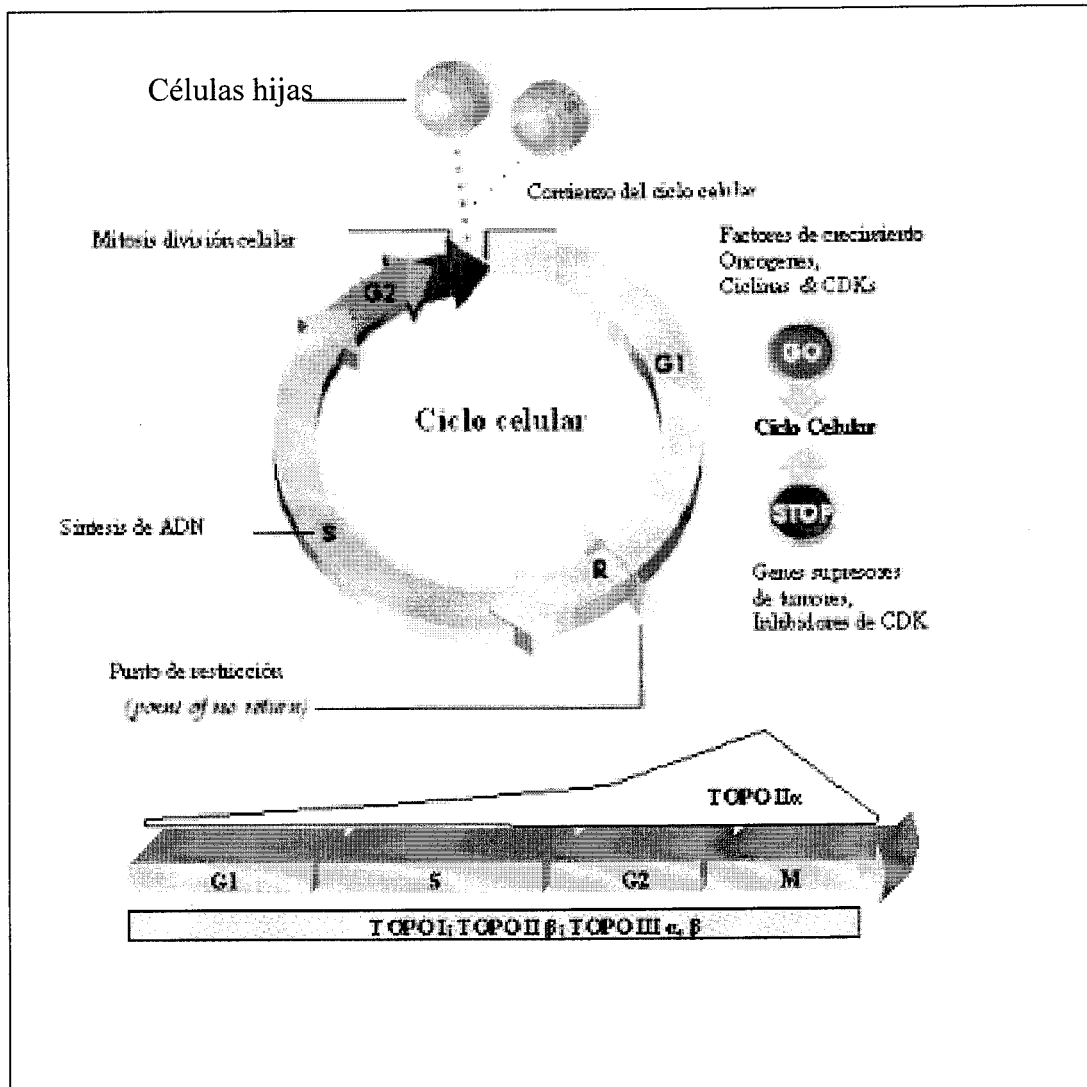


Figura 8. Regulación de la actividad de las topoisomerasas durante el ciclo celular eucariótico.

La topo I necesita estar fosforilada en el dominio amino terminal para ser completamente funcional (Staron y col., 1995), mientras que la fosforilación de la topo II en el extremo carboxilo terminal también provoca un aumento en la actividad de la enzima. El nivel de fosforilación de la topo II depende tanto del estado de proliferación celular como de la posición en el ciclo, y el aumento en la cantidad de topo II al final de S y principio de G<sub>2</sub>, junto con el aumento en su actividad enzimática tras la fosforilación máxima en G<sub>2</sub>/M (Heck y col., 1989), han conducido a asociar la degradación de topo II con el proceso de descondensación cromosómica en G<sub>1</sub> y a implicar a la topo II fosforilada en procesos tales como la condensación y segregación cromosómica durante mitosis y meiosis (Adlakha y Rao, 1986; Wood y Earnshaw, 1990; Adachi y col., 1991; Rose y Holm, 1993).

La actividad topoisomerasa puede ser también regulada mediante la unión transitoria de polímeros de ADP-ribosa. Así, la poli(ADP-ribosa) polimerasa (Ogata y col., 1981), es capaz de provocar una disminución en la actividad catalítica de la Topo I y II (Ferro y Olivera, 1984; Darby y col., 1985).

### **1.8.1 Topoisomerasa II y condensación cromosómica**

Tanto a nivel bioquímico como a nivel genético existen pruebas que demuestran que la topo II de eucariotas es necesaria para que los cromosomas metafásicos alcancen el estado final de condensación y, probablemente, para ciertas fases de descondensación (Buchenau y col., 1993; Ishida y col., 1994). De hecho, la formación de cromosomas mitóticos y la estabilidad de la topo II pueden estar íntimamente relacionadas ya que el ciclo de síntesis/degradación de la topo II coincide con el ciclo de condensación/descondensación de los cromosomas mitóticos (Uemura y col., 1987).

El descenso en la vida media de la topo II en células postmitóticas puede ser una consecuencia de la descondensación de los cromosomas mitóticos o alternativamente, la degradación gradual de la topo II puede contribuir en buena medida a la descondensación de los cromosomas mitóticos.

### **1.8.2 Topoisomerasa II eucariótica y segregación cromosómica**

Se ha observado que la inhibición de la actividad topo II igualmente impide la correcta separación de los cromosomas hijos en anafase (Buchenau y col., 1993). Este fallo en la correcta segregación de moléculas de ADN recién replicadas conduce a la formación de células endorreduplicadas y en último término a la muerte celular. La endorreduplicación consiste en dos rondas sucesivas de replicación del ADN sin intervenir la mitosis, es decir sin que se produzca la segregación de las cromátidas hermanas (Cortés y col., 1987; Sumner, 1998). La manifestación mitótica visible de este fenómeno es la presencia de diplocromosomas, formados por 4 cromátidas, en lugar de las dos cromátidas que se observan normalmente en los cromosomas metafásicos (Figura 9).

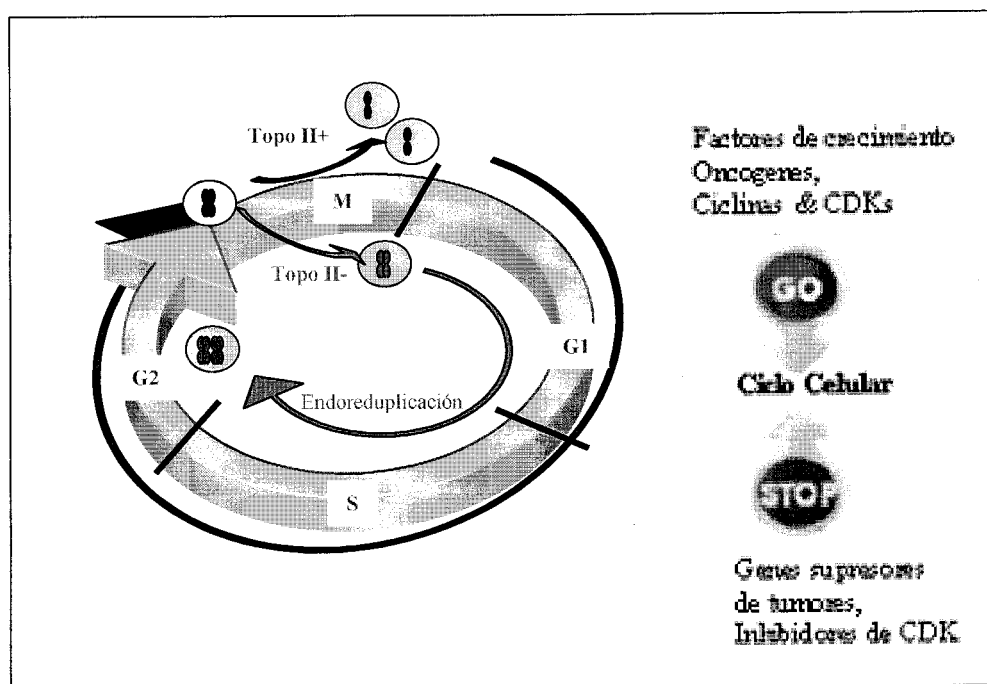


Figura 9. Producción de células endorreduplicadas como resultado de dos rondas de replicación del ADN (S) sin mitosis intermedia.

Se ha visto que un grupo de compuestos que bien por alterar el ensamblaje del citoesqueleto, como la colchicina o la concanavalina A (Rizzoni y Palitti, 1973; Sutou, 1981), o por provocar daño en el ADN (Sutou y Tokuyama, 1974; Kusyk y Hsu, 1979; Huang y col., 1983; Lüke-Huhle, 1983), dan lugar a la producción de células endorreduplicadas en diferente grado. Recientemente se han utilizado agentes que interfieren con la topo II con el propósito de analizar si esta enzima es necesaria para la segregación de los cromosomas hijos en mitosis. Como resultado de estos estudios se ha demostrado que los inhibidores de las topoisomerasas son capaces de inducir endoreduplicación (Ishida y col., 1994; Sumner, 1998, N Pastor 2003) ya que previenen el desencadenamiento de los cromosomas replicados, llevado a cabo por la topo II, con el subsiguiente fallo en cuanto a completar una mitosis normal.

## **LOS INHIBIDORES DE TOPOISOMERASAS Y SU UTILIZACIÓN .**

### **1.9 LOS INHIBIDORES DE TOPOISOMERASAS**

La capacidad de las topoisomerasas para pasar una hebra o una doble hebra de ADN libremente a través de una rotura puede cobrarse un alto precio ya que requiere que la enzima genere roturas en el material genético. En un esfuerzo para mantener la integridad genética durante esta reacción de rotura las topoisomerasas se unen covalentemente a los extremos generados en el ADN formando, el **“complejo de rotura”**. En condiciones normales estos complejos ADN-enzima (Figura.10) son breves intermediarios catalíticos presentes a concentraciones muy bajas y perfectamente tolerados por la célula. Sin embargo, un aumento significativo en la concentración fisiológica o en la vida media de estas roturas desatarían una serie de efectos deletéreos para la célula. Este hecho ha sido utilizado para desarrollar nuevas estrategias en terapia antitumoral con un abordaje experimental en el que nos encontramos a las topoisomerasas como el blanco principal de una serie de agentes antitumorales que, a diferencia de la mayoría de los agentes que tienen como blanco a enzimas celulares, no ejercen su acción terapéutica a través de la inhibición catalítica de la enzima, sino a través de un mecanismo que tiene como resultado la producción de daño en el ADN.

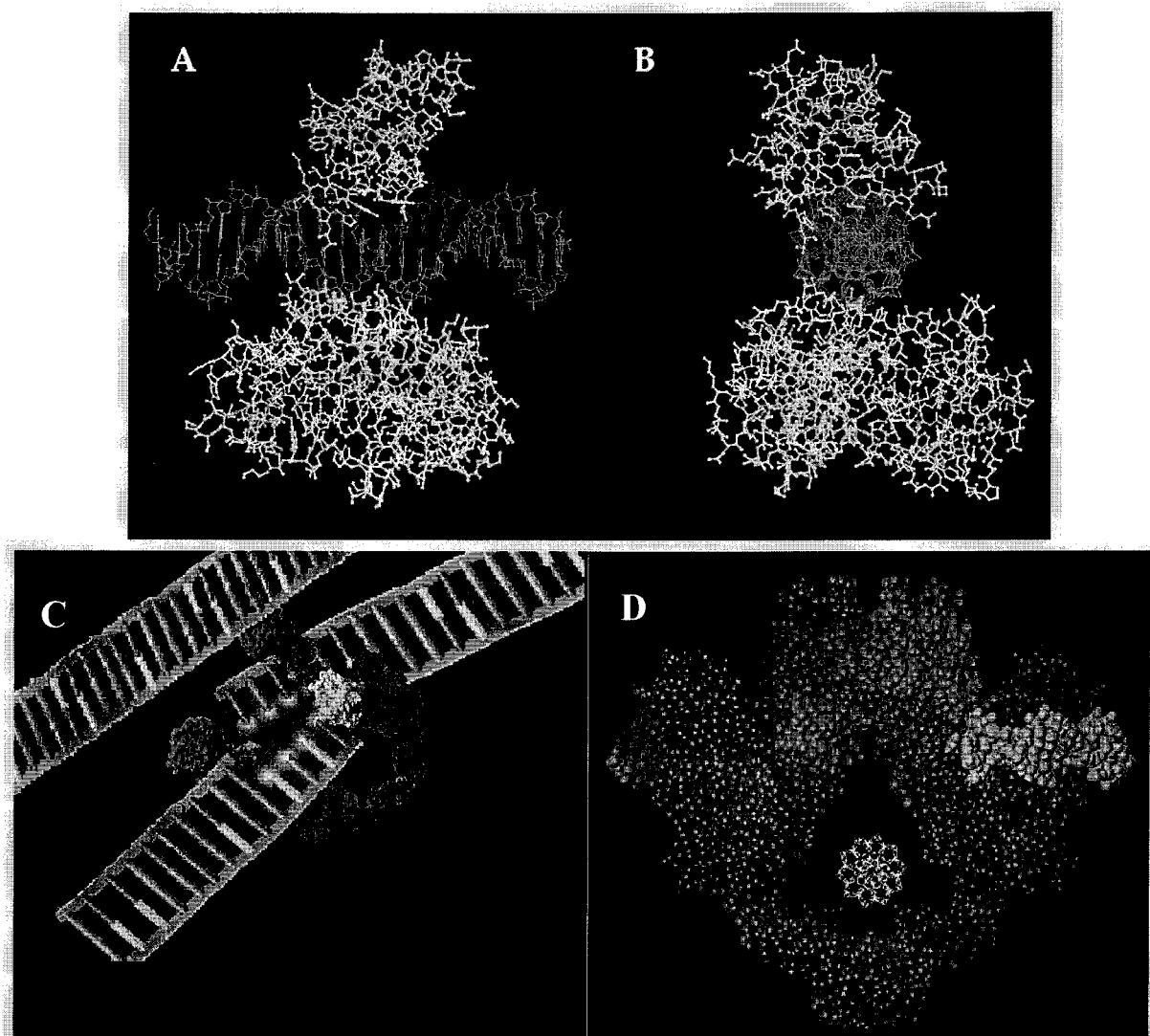


Figura 10. La estructura del complejo de rotura transitorio que forma el ADN-topo, vista de distintos ángulos (A, B) para la topo I, (C, D) para la topo II.

Estos agentes se conocen con el nombre de venenos de topoisomerasas y bloquean de forma específica y reversible el paso de ligación de las roturas llevado a cabo por estas enzimas atrapando al intermediario ADN-topo e incrementando por tanto la concentración de topoisomerasa unida covalentemente a extremos rotos de ADN. Esta acción convierte a las topoisomerasas en toxinas fisiológicas que introducen altos niveles de roturas transitorias asociadas a proteínas en el genoma de las células tratadas con estas drogas, llevando en último término a la muerte celular (Figura 11).

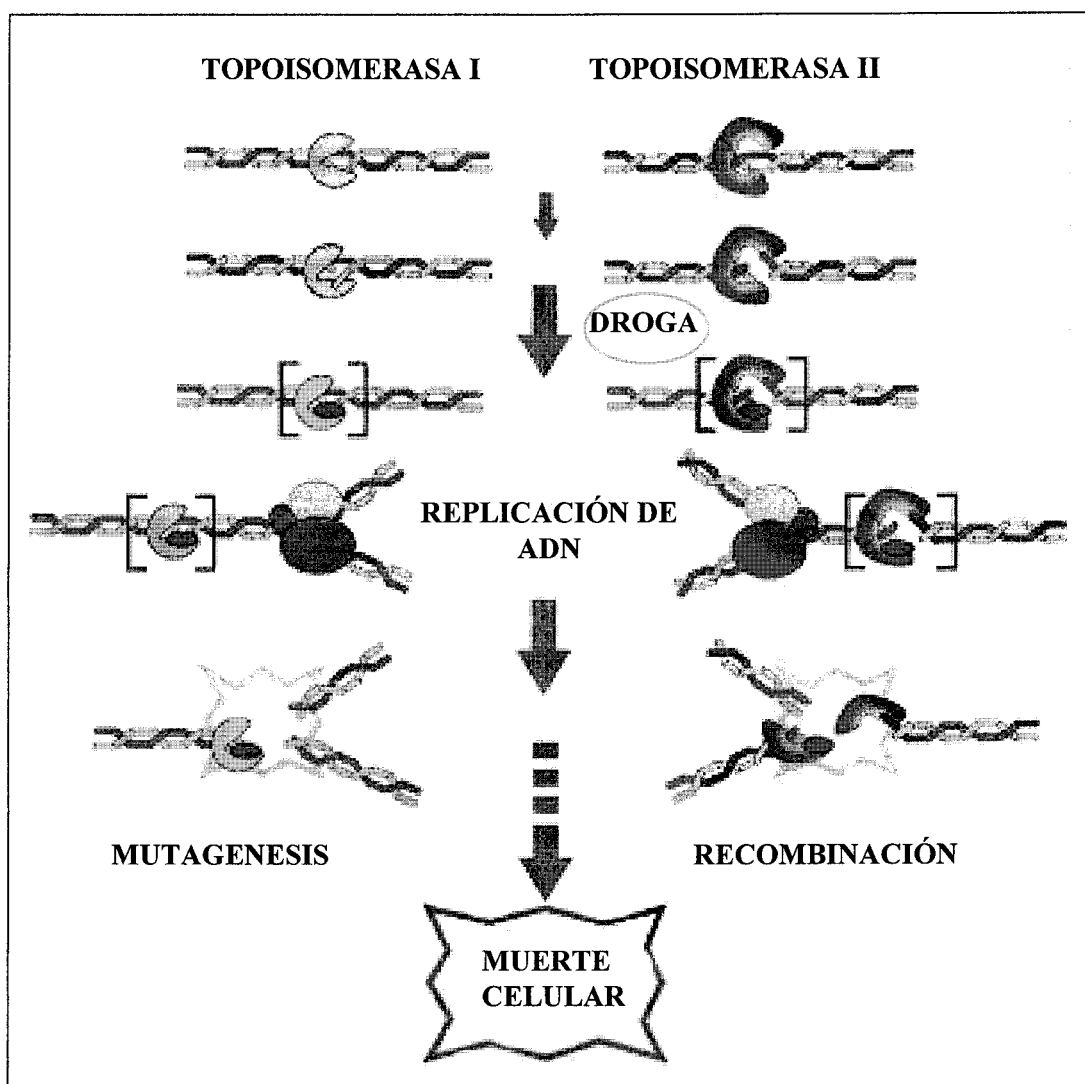


Figura 11 . Los mecanismos de acción de los venenos de topoisomerasa de ADN.

Los inhibidores de topoisomerasa se dividen en dos grupos:

**1-Venenos clásicos** de topoisomerasa: *son* drogas frecuentemente usadas en los tratamientos contra el cáncer en humanos. Provocan la muerte celular como consecuencia de la estabilización del complejo de rotura, haciendo que la estructura ternaria (III) droga-enzima-ADN interfiera con procesos vitales tales como la replicación, la transcripción e incluso la reparación, produciéndose por tanto roturas de doble cadena en el ADN, y por último la muerte celular. Dentro de este grupo tenemos por ejemplo: Mitoxantrona, Amsacrina, Etopósido, Genisteína, Doxorubicina, Ellipticina, CP-115,953, Ciprofloxacina, etc. (Figura 12).

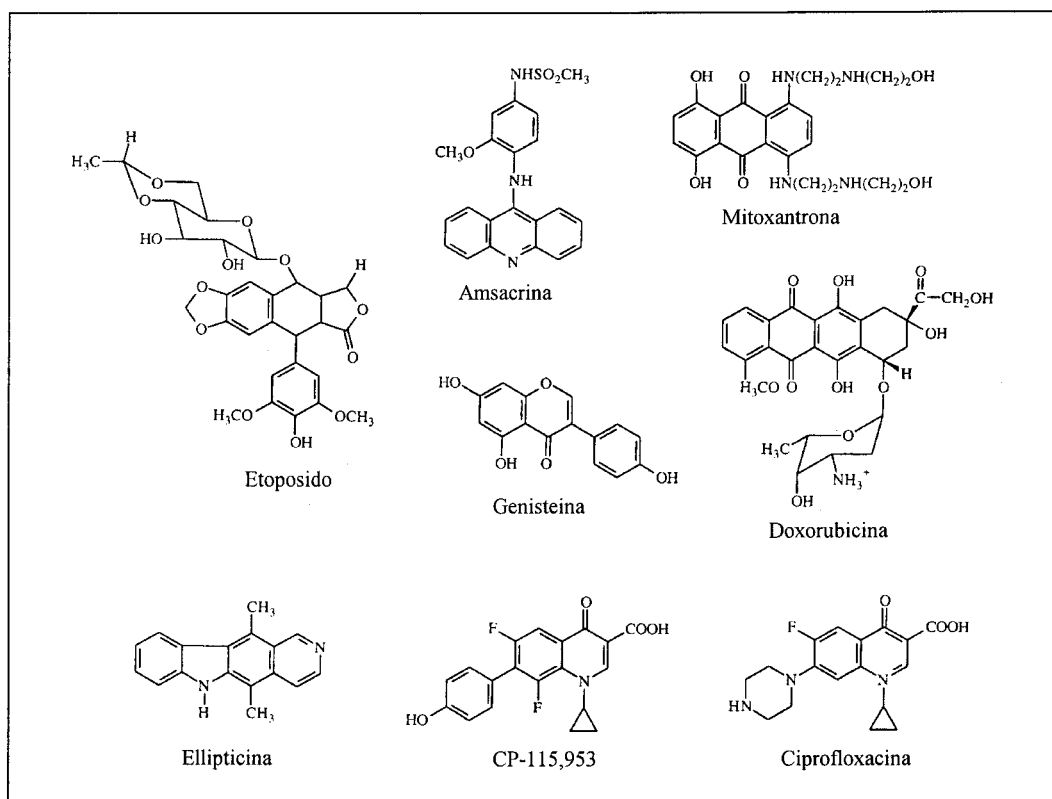


Figura 12. Estructura molecular de algunos venenos de topo II.



2-Venenos no clásicos llamados **inhibidores catalíticos**: este tipo de venenos, a diferencia de los anteriores ejercen su acción terapéutica a través de la inhibición catalítica de la enzima, además no estabilizan el complejo de rotura y por lo tanto no producen roturas en el ADN. Dentro de este grupo tenemos por ejemplo aclarubicina, fostriecina, merbarona, suramina, quinobenoxazina, bisdioxopiperazinas (ICRF y sus derivados ), cloroquina, y novobiocina (Figura 13). Todos estos son venenos selectivos ya que actúan inhibiendo la actividad catalítica de la enzima por diferentes mecanismos. Se postula que los venenos no clásicos eliminan a las células sin que sea necesario la producción directa de roturas de doble cadena.

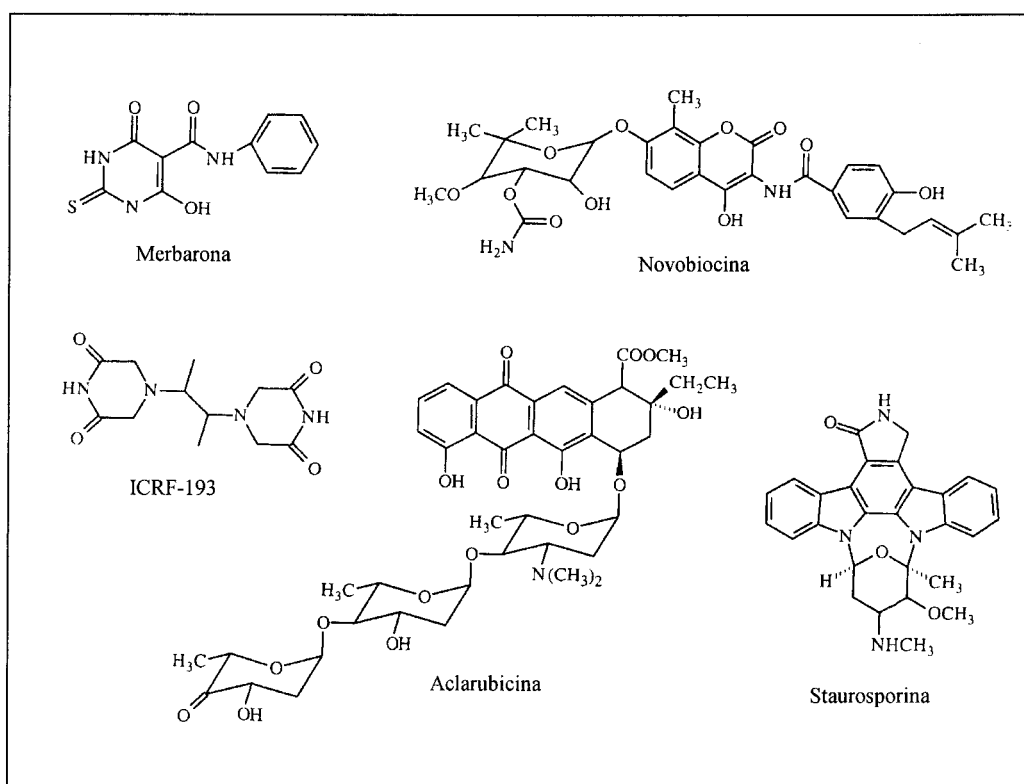


Figura 13. Estructura molecular de algunos inhibidores "catalíticos" de la topo II

### 1.9.1 Drogas que envenenan a las topoisomerasas de ADN de tipo I.

El único veneno de topo I bien caracterizado es la camptotecina (CPT). En 1966 Wall y col. describieron por primera vez la existencia de extractos procedentes del árbol *Camptotheca accuminata* con actividad antitumoral contra la leucemia y tumores sólidos. La CPT inhibe la síntesis de ADN y ARN en células tumorales e induce roturas de ADN de cadena simple asociadas a proteínas. Más adelante, con la intensa investigación de nuevos venenos de topoisomerasas como drogas más efectivas y selectivas como es el caso de los derivados hidrosolubles de la CPT, se han sintetizado el topotecan, la CPT-11, la 9-aminocamptotecina, el irinotecan (cuyo metabolito activo es el SN-38) etc., los cuales presentan en general una mayor actividad antitumoral que la CPT y un efecto tóxico menor.

### 1.9.2 Drogas que envenenan a las topoisomerasas de ADN de tipo II.

La topo II de mamífero ha sido también identificada como el blanco celular primario de una gran variedad de drogas diferentes estructuralmente, con capacidad antitumoral. Por ejemplo:

Los antibióticos del grupo de las antraciclínas como daunomicina y doxorubicina son agentes antitumorales muy potentes. Poseen estructuras anulares tetracíclicas (aglicón) unidas con un azúcar mediante un enlace glucosídico. Daunomicina y doxorubicina se diferencian estructuralmente, doxorubicina posee un grupo hidroxilo en posición 14 con respecto a daunomicina.

Tanto la daunomicina como la doxorubicina se intercalan en el ADN, afectando de esta manera a distintos procesos que intervienen en la síntesis del ADN y ARN. Al intercalarse en el ADN afectan a la acción de las topoisomerasas. Las antraciclínas, como venenos de topoisomerasa, lo que hacen es fijarse a la topoisomerasa en su sitio de unión al ADN estabilizando los complejos. El complejo daunomicina-ADN se estabiliza mediante puentes de hidrógeno. La mayoría de estos agentes pueden insertar su estructura planar entre dos bases adyacentes del ADN, pero al parecer esta capacidad de intercalación en el ADN no es indispensable para su capacidad antitumoral.

La doxorubicina y daunorubicina presentan el problema de ser extremadamente tóxicas, limitando esto su actividad como agentes únicos. El segundo problema con la doxorubicina es que el tratamiento a menudo conduce al desarrollo de resistencia multidroga y los tumores que sobreexpresan la P170 presentan resistencia cruzada a doxorubicina y a otras drogas de topo II.

Hay que considerar, en cualquier caso, que las roturas que son provocadas por la acción de la topoisomerasa II son selladas fuertemente por la propia enzima y revierten rápidamente con la eliminación de la droga sin provocar subsiguientes recombinaciones. El daño en el ADN aparece cuando el complejo de rotura se “estabiliza” e interfiere con procesos celulares tales como la replicación o la transcripción.

Las consecuencias celulares del envenenamiento de las topoisomerasas son:

1º El bloqueo de la enzima por un largo periodo de tiempo implica que queda fuera de su actividad una enzima celular fundamental

2º. El complejo de rotura puede ser una lesión letal per sé, o tras interactuar con otros factores celulares, conducir a la muerte celular.

La estabilización del complejo de rotura por venenos antitopoisomerasa es un evento reversible y el mecanismo por el cual un daño transitorio en el ADN finalmente termina provocando la muerte celular no está claro. De manera que, mientras que el objetivo celular primario de estas drogas anticancer ha sido identificado, se sabe muy poco sobre como es activado el camino que conduce a la muerte celular.

La inhibición de la división celular es un mecanismo muy común de respuesta al daño en el ADN tanto en células eucariotas como procariotas. También ha sido investigada la activación de genes específicos durante la respuesta celular a tratamientos con drogas antitopoisomerasa. A menudo la activación de ciertos genes no se encuentra restringida a venenos topo, ej. el promotor Gadd153 es un miembro de una familia de genes específicamente activado por parada del crecimiento y daño celular. La activación transcripcional inducida por la droga de estos genes celulares ocurre durante el periodo de rotura oligonucleosomal del ADN característica de la muerte celular programada .

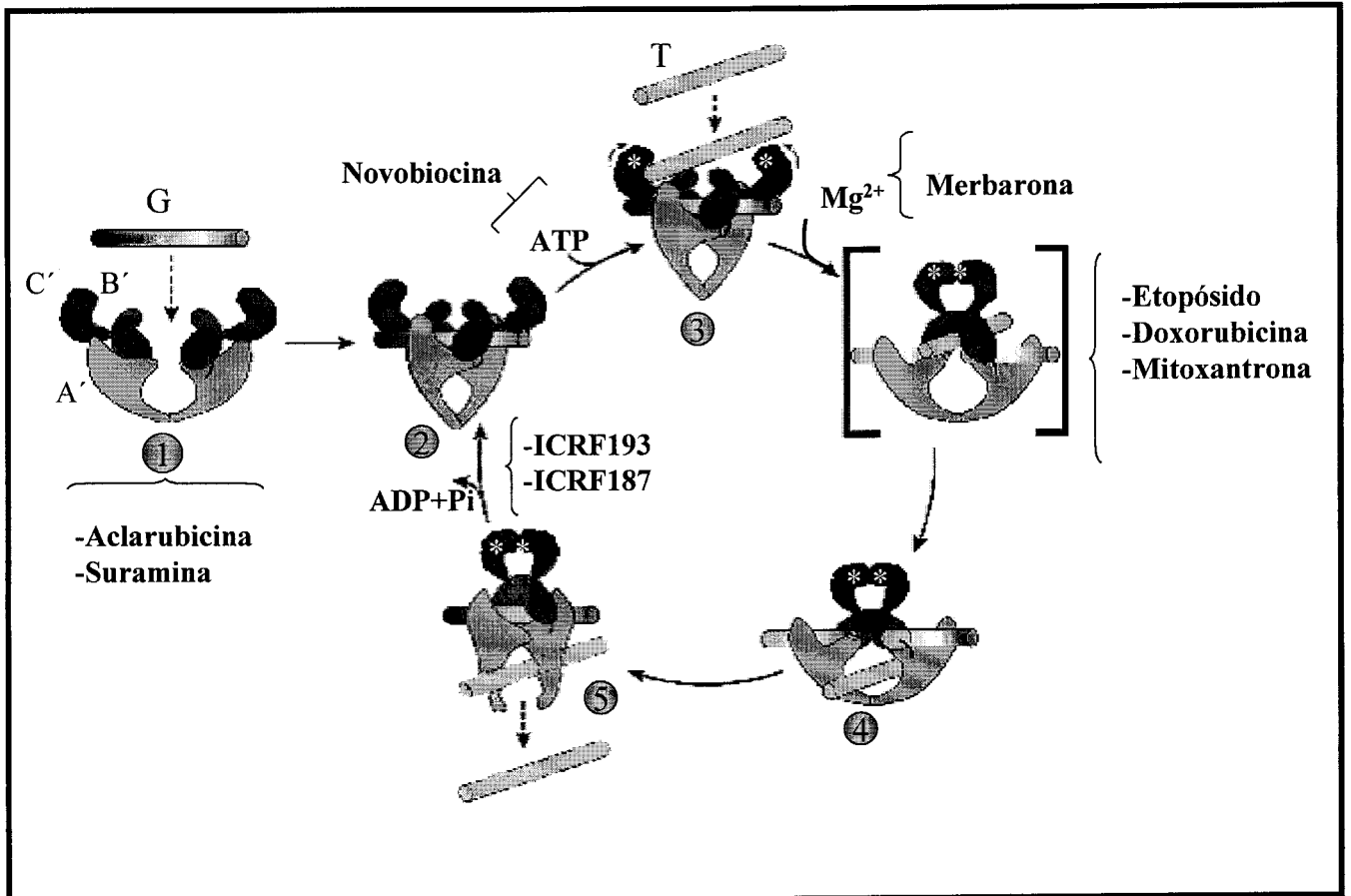


Figura 14: Distintos modos de acción de inhibidores catalíticos de topoisomasa II según las distintas etapas del ciclo catalítico de la enzima en las cuales actúan.

Por último, en comparación con otros agentes que rompen el ADN estos venenos antitopoisomasa II no inducen lesiones directamente sobre el ADN, sino que estabilizan un intermediario “complejo de rotura” de la enzima, de manera que el mecanismo de inducción de aberraciones cromosómicas por estas drogas no puede ser explicado simplemente por el clásico esquema en el cual las lesiones en el ADN inducidas por agentes S-dependientes o S-independientes son mal replicadas o mal reparadas, conduciendo así al daño cromosómico.

### **1.9.3 Inhibidores catalíticos de la topoisomerasas II**

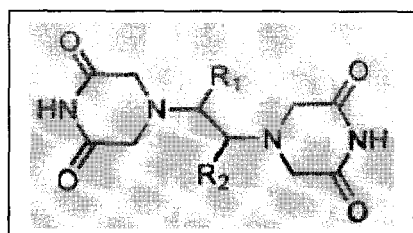
Como mencionamos antes a diferencia de los venenos clásicos de topo II, los venenos no clásicos no estabilizan el complejo de rotura. A este grupo se les conoce como inhibidores catalíticos y son de gran interés, ya que parecen eludir el fenotipo de resistencia a multidroga (Jensen y col., 1990; Beck and Danks, 1991; Chen and Beck, 1993) y además pueden actuar como antagonistas de los venenos de topo II (Andoh, 1998). Estos compuestos incluyen merbarona (Drake y col., 1989a), fostriecina (Boritzki y col., 1988), aclarubicina (Jensen y col., 1991), suramin (Bojanowski y col., 1992), quinobenoxazina (A-74932) (Permana y col., 1994), bisdioxopiperazinas (Tanabe y col., 1991; Ishida y col., 1991), cloroquina (Jensen y col., 1994) y novobiocina (Utsumi y col., 1990) (algunos de estos inhibidores se representan en la Figura 13). Los mecanismos de acción de estos compuestos se piensa que son diferentes de los venenos de topo II, y en muchos casos se sabe aún poco sobre los mecanismos de inhibición de la enzima y la citotoxicidad por ellos producida (Figura 14).

En este trabajo se han empleado los inhibidores catalíticos ICRF-193 (meso-2,3-bis(3,5-dioxopiperazinil)butano) perteneciente al grupo de las bisdioxopiperazinas, y Aclarubicina perteneciente a la familia de los antibióticos antraciclinas, los cuales describimos a continuación.

#### **1.9.3.1 Bis(2,6 dioxopiperazinas).**

Las Bis-dioxopiperazinas, inhibidores de la enzima topo II, fueron sintetizados originalmente por su potencial como agentes quelantes intracelulares. Entre sus propiedades bioquímicas se incluyen sus actividades antitumoral y cardioprotectora, además de su potente acción inhibidora (Pommier 1997). ICRF-193 es el más potente del grupo, con  $IC_{50}$  alrededor de  $2\mu M$ , en cambio ICRF-154 y el ICRF-159 presentan menor citotoxicidad con  $IC_{50}$  alrededor de  $300\mu M$ . ICRF-159 (raxozan), ICRF-154 y ICRF-193 son fuertes inhibidores de la enzima ADN topo II de mamíferos.

Las bis-dioxopiperazinas, desarrolladas originalmente en el Reino Unido, son llamadas en general ICRF por las siglas IMPERIAL CANCER RESEARCH FUND, y presentan muchos derivados que se diferencian según los radicales  $R_1$  y  $R_2$ , como se muestra en la Figura 15:



ICRF	$R_1$	$R_2$
ICRF-154	H	H.
ICRF-159	H	$\text{CH}_3$
ICRF-187	H	$\text{CH}_3$ (S)-(+)
ICRF-186	H	$\text{CH}_3$ (R)-(-)
ICRF-193	$\text{CH}_3$	$\text{CH}_3$
ICRF-201	$\text{C}_2\text{H}_5$	$\text{C}_2\text{H}_5$

Figura 15. La estructura de las bis-dioxopiperazinas.

Originalmente, estos compuestos mostraron actividad contra algunos tumores inducidos experimentalmente (Creighton y col., 1969) y en enfermos con leucemia aguda y linfosarcoma (Hellmann y col., 1969). Las observaciones iniciales del efecto antitumoral del ICRF-154 y -159 condujeron a un estudio sistemático de una familia de bis(dioxopiperazinas) en los laboratorios del *Imperial Cancer Research Fund*. La aclaración del modo real de acción de los compuestos tuvo que esperar hasta 1991 en que fue descubierto por Tanabe y col. (1991) su naturaleza como inhibidores de la topoisomerasa II (de mamíferos). Entre ellos, el ICRF-193 (figura 16) resultó ser el compuesto que presentaba una mayor eficacia como inhibidor, aunque presentaba una toxicidad demasiado alta para poder emplearse como agente antitumoral, debido a su excesivo carácter lipofílico (Pommier, 1997; Andoh, 1998).

Análisis más recientes han demostrado que, en presencia de ICRF-193, las células son capaces de atravesar varias rondas del ciclo de división celular, con su genoma replicado, pero no segregado, con el resultado de poliploidización (Ishida y col., 1994).

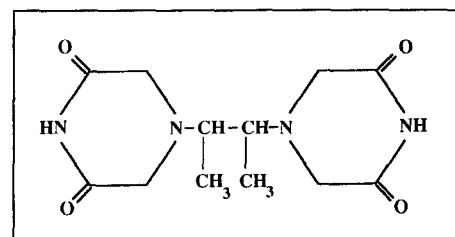


Figura 16. Estructura del ICRF-193.

Lo interesante de estos resultados es que son similares a aquellos observados en mutantes termosensibles *top2* de levaduras a temperatura no permisiva (Uemura y col., 1987). Con base a estas observaciones se ha propuesto que las 2,6-dioxopiperazinas pueden ser de

gran utilidad para estudiar las funciones biológicas de la Topo II en una gran variedad de organismos (Takasuga y col., 1995).

### 1.9.3.2 Aclarubicina

La aclarubicina (ACLA) pertenece a la familia de las antraciclinas (Figura 17), y se trata de una droga que tiene un mecanismo de acción dual que implica tanto una inhibición catalítica de la topo II como el envenenamiento de la topo I. Ello hace de la misma una interesante elección con el propósito de conocer la importancia relativa que tiene cada enzima topoisomerasa en el funcionamiento del ADN, así como las consecuencias deletéreas resultantes del mal funcionamiento de las mismas. Además, esta acción dual contrasta con otros agente que funcionan también de manera dual pero que lo hacen como venenos o como inhibidores catalíticos de topo I y II simultáneamente.

ACLA es un intercalante potente (inhibe la transcripción de ciertos genes implicados en la reparación de la lesiones del ADN o/y en la Regulación del ciclo celular), además es efectivo a la hora de inhibir la actividad de topo I en células tumorales. La citotoxicidad inducida con ACLA no es proliferación- dependiente como es el caso de los otros inhibidores duales como F11782.

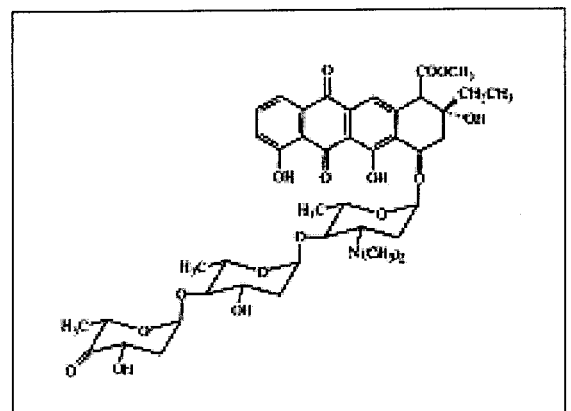


Figura 17. Estructura de la aclarubicina.

La aclarubicina pertenece a un clase de agentes antitumorales de amplia utilización en el tratamiento quimioterapéutico de leucemias y tumores sólidos ( Doroshow JH 1983). Aunque en principio los efectos citotóxicos de las antraciclinas se piensa que son debidos a la propiedad de esta sustancia de intercalarse en el ADN, tampoco se puede descartar su interacción con las topoisomerasas de ADN. (Gerwitz DA.1999) Además, han propuesto otros mecanismos de acción se como son la producción de radicales libres (Doroshow JH 1983 ; Powis G (1989), keizer HG y col., 1990) o una alteración en las funciones mitocondriales. Esta capacidad de las antraciclinas para generar radicales libres, o especies reactivas de oxígeno en células o tejidos, se ha demostrado utilizándose altas dosis de doxorubicina, un compuesto utilizado habitualmente en quimioterapia. Lo que parece estar bien establecido es que la elevada

cardiocitotoxicidad de esas drogas se relaciona con la generación de radicales libres (Nowa K D, 1996) .

En cuanto a la citotoxicidad y genotoxicidad de esta droga, desde un punto de vista académico se piensa que recaería principalmente sobre su capacidad para envenenar a la topo I dado que, la inhibición catalítica sobre la topo II no llevaría a la producción de las roturas en el ADN. Sin embargo, esta hipótesis se ha cuestionado recientemente en base a la aparición de diversas publicaciones que muestran la capacidad de inhibidores catalíticos de topo II como ICRF193 para producir tanto aberraciones cromosómicas como daño en el ADN.



## **EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LA RADIACIÓN IONIZANTE**

Dado que uno de los objetivos prioritarios de la presente tesis ha sido el estudio de la posible participación de la topo II en el mecanismo celular de la reparación del daño en el ADN provocado por la radiación ionizante, describiremos aquí de forma resumida las características de dicha radiación, así como las consecuencias de su interacción con el material genético. Entendemos por radiación todo agente físico que se propaga a través del espacio cediendo energía al medio que atraviesa. La radiación ionizante es aquella forma de radiación que posee la propiedad de arrancar electrones de los átomos de las sustancias que se encuentran en los medios que atraviesa, ionizándolas y alterando así las propiedades físico-químicas del medio atravesado. Existen dos tipos de radiaciones ionizantes: las electromagnéticas (dentro de éstas se incluyen los rayos-X) y las corpusculares. Los rayos-X liberan su energía en forma de fotones sin carga ni masa dando lugar a la formación de moléculas excitadas o ionizadas. Esta energía se transmite por colisión generalmente con electrones de otros átomos; tras la colisión, un electrón puede pasar a un orbital más alejado del núcleo ( excitación) o, más frecuentemente salir del átomo con alta velocidad y energía ( ionización).

### **1.10 LESIONES INDUCIDAS POR RADIACIÓN IONIZANTE.**

La radiación interactúa con átomos de los tejidos, liberando electrones y otras formas de radiación secundarias. La radiación secundaria es absorbida localmente en los tejidos produciendo una gran excitación localizada y separación de los enlaces moleculares, de forma que se forman productos químicos reactivos (radicales libres) inestables, que interfieren con las reacciones bioquímicas normales de las células tisulares. Los daños de los productos radioactivos pueden incluir efectos sobre macromoléculas irremplazables tales como proteínas, lípidos y moléculas del ADN, sin duda la biomolécula más importante que puede ser dañada por la radiación ionizante. La energía puede ser depositada directamente en el ADN (efecto directo), o bien indirectamente, ionizándose otras moléculas estrechamente asociadas al ADN, especialmente el agua, dando lugar a la formación de diferentes radicales libres que pueden dañar al ADN. Este efecto indirecto sobreviene a una distancia del ADN del orden de nanómetros, porque la distancia de difusión de los radicales está limitada por su actividad. Es difícil medir con precisión las diferentes contribuciones provocadas por los

efectos directo o indirecto dado que ambos efectos ocasionan daños similares en el ADN (Figura 18).

*Reacciones primarias*



*Reacciones secundarias*

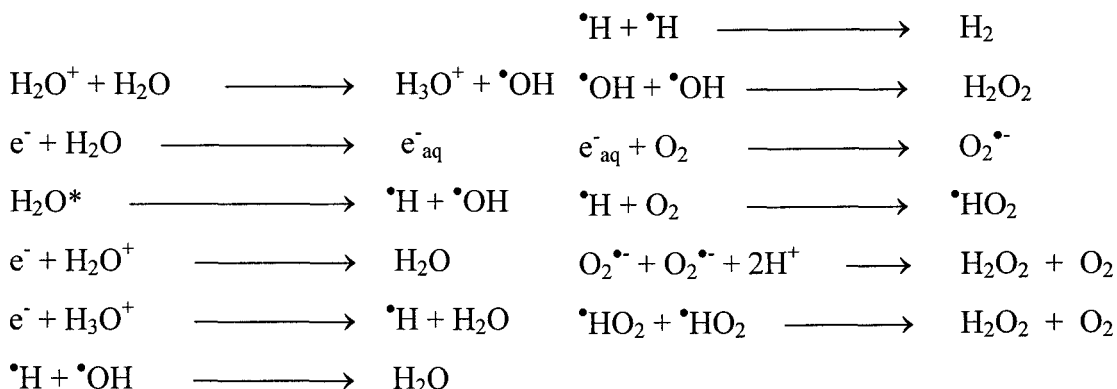


Tabla 2: Radiolisis del agua.

El efecto directo e indirecto de las radiaciones ionizantes: al incidir sobre una solución acuosa, un fotón o una partícula ionizante, pueden interaccionar directamente con una molécula de soluto, alterándola. Sería lo que llamamos acción directa. También puede suceder que reaccionen con los productos de radiolisis del agua y modifiquen la molécula; sería acción indirecta en este caso.

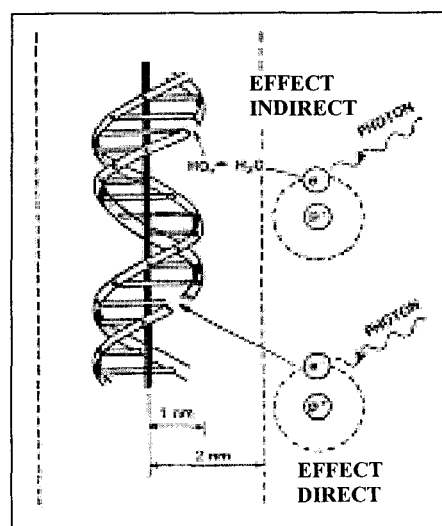


Figura 18. Efecto de Radiolisis del agua sobre ADN.

La hidrólisis del agua como consecuencia de la exposición a la radiación ionizante provoca la formación de radicales libres (especies químicas con un electrón desapareado) (Tabla 2), ocasionando por tanto lesiones en el ADN (Meneghini, 1988), que suelen terminar en roturas. Además, la radiación ionizante provoca directamente roturas de cadena (simple y/o doble), la mayoría de las cuáles se generan por roturas de los enlaces fosfodiéster del esqueleto azúcar-P de la molécula de ADN.

Las lesiones producidas por la radiación pueden encontrarse de forma aislada o junto a otras lesiones del mismo o distinto tipo, en este caso se denominan lesiones complejas, que son causadas por un ataque de múltiples radicales que producen sitios con lesiones agrupadas tras una exposición a rayos-X (Ward, 1998). Estas lesiones complejas representan para la célula un problema más serio que las simples, ya que pueden ser irreparables o requerir mecanismos de reparación más complejos (como la reparación por recombinación). Si estas lesiones no se reparan correctamente pueden ocasionar aberraciones cromosómicas, deleciones, amplificaciones, etc.....

De las lesiones producidas por la radiación ionizante, la rotura de doble cadena (R.D.C) es la principal responsable de la producción de aberraciones cromosómicas y muerte celular. (Frankenberg y col., Schwager y Frankenberg, 1990, Obe y col, 1992). La R.D.C se puede originar tanto por el ataque de un solo radical como por ataques múltiples. Siddiqi y Bothe (1987), propusieron que un solo radical puede iniciar la formación de una rotura de doble cadena de manera que el primer radical desoxirribosa formado por el ataque del radical hidroxilo (o por la ionización directa del azúcar) iniciaría una serie de reacciones para formar la segunda rotura. La mayoría de las roturas inducidas por la radiación ionizante se caracterizan por presentar extremos inusuales. Así, si bien la mayoría de los extremos 5' presentan un grupo fosfato, los extremos 3' no suelen presentar el grupo hidroxilo habitual (Menner y col., 1998).

## **1.11 RADIOSENSIBILIDAD EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS Y HUMANAS**

Es bien conocido que los individuos varían en sus sensibilidades a la radiación ionizante. Diversos estudios han demostrado una alta sensibilidad en algunos individuos sometidos a terapia contra el cáncer, aunque son pocos los que sufren daños severos en los tejidos normales tras un tratamiento con radioterapia. Ello ha permitido agrupar algunos pacientes radiosensibles; como ejemplo destacaremos de enfermos con ataxia telangiectasia (AT) y con el síndrome de Nijmegen. Hoy en día existen líneas celulares establecidas a partir de enfermos con estos síndromes y se ha observado que las líneas de AT son 2,7 veces más sensibles a las radiaciones ionizantes que las células normales, presentando además una alta frecuencia de aberraciones cromosómicas tras su irradiación. Pero lo más destacado no obstante, es la resistencia a la parada de síntesis de ADN que presentan las células AT tras una irradiación en la fase (S), cuya síntesis de ADN continúa sin que se produzca una detención del ciclo celular en dicha fase.

Aparte de las líneas humanas radiosensibles, las líneas mutantes de roedores son de particular importancia para el análisis de la compleja relación existente entre daño en el ADN y respuestas celulares tales como toxicidad, mutagénesis e inestabilidad cromosómica. Además son muy importantes para la clonación ya que son fáciles de cultivar y a diferencia de las líneas celulares humanas transformadas, ellas son buenas receptoras de ADN exógeno transfectado. El éxito alcanzado mediante la utilización de células mutantes de hámster en la clonación de varios genes humanos implicados en mecanismos de reparación por escisión (revisión por Weeda y Hoeijmakers, 1993), ha llevado a diferentes investigadores a aislar diferentes líneas celulares de roedores sensibles a rayos X (revisión por Collins, 1993; Zdzienicka, 1995). En la Tabla 3 se describen las características principales de algunas de estas líneas mutantes así como la sensibilidad que presentan a diferentes agentes que dañan el ADN. Hasta ahora se han identificado al menos 11 grupos de complementación, indicando de manera incuestionable la gran complejidad de las respuestas celulares a la radiación ionizante (Friedberg y col., 1995). Entre ellos, mutantes de tres grupos de complementación muestran un marcado defecto en la reparación de las R.D.Cs ( Kemp y col., 1984; Jeggo y col., 1991; Thacker y Wilkinson, 1991). Mutantes de estos tres grupos (cuyas líneas celulares representantes son XR-1, xrs1 a xrs7 [*XRCC5*], y V3) están entre las líneas celulares mutantes de roedores más sensibles a los rayos X. Otros grupos (tales como EM9 [*XRCC1*] e irs1 SF

[XRCC3]) se caracterizan por un defecto moderado en la reparación de las roturas de cadena simple y de doble cadena (Thompson y col., 1982; Fuller, y col., 1988; Thompson y col., 1990), mientras que mutantes en otro grupo presentan una tasa de reparación de roturas de cadena simple y de doble cadena un tanto reducida (BLM2) (Robson y col., 1989). Por otra parte, mutantes derivados de la línea celular de hámster Chino V79, como *irs1*, *irs2* e *irs3* son normales en cuanto a lo que se refiere a reparación de roturas de cadena simple y/o de doble cadena (Jones y col., 1988; Zdzienicka y col., 1989; Jones y col., 1990), pero al menos una de éstas (*irs1* [XRCC2]) presenta una fidelidad reducida en la reunión de roturas de doble cadena (Debenham y col., 1988). Los mutantes del grupo *irs2* (XRCC8) empleados en nuestro estudio se caracterizan por presentar una síntesis radioresistente de ADN comparable a la observada en células humanas AT (Zdzienicka y col., 1989).

Mutante	Líneas parentales	Características	Localización cromosómica	Gen
EM9 EM-C11	CHO(AA8) CHO9	reparación defectuosa de ssb y R.D.C sensibilidad a ag. alquilantes alto nivel basal de SCE	19q13.2-13.3	<i>XRCC1</i>
<i>irs1</i>	<b>V79</b>	hipersensibilidad a MMC reunión propensa a error	7q36.1	<i>XRCC2</i>
<i>irs1SF</i>	CHO(AA8)	reparación defectuosa de ssb hipersensibilidad a MMC	14q32.3	<i>XRCC3</i>
XR-1 M10	CHOK1 L5178Y	reparación defectuosa de R.D.C recombinación defectuosa V(D)J	5q13-14	<i>XRCC4</i>
<i>xrs5, 6</i> XR-V15B XR-V9B <i>sxi-2, 3</i>	CHOK1 <b>V79B</b> <b>V79B</b> <b>V79-4</b>	reparación defectuosa de R.D.C recombinación defectuosa V(D)J	2q35	<i>XRCC5</i> (Ku80)
<i>sxi-1</i>	V79-4	reparación defectuosa de R.D.C recombinación defectuosa V(D)J	22q13	<i>XRCC6</i> (Ku70)
V-3 <i>scid</i> <i>irs-20</i>	AA8 C.B.-17 CHO	reparación defectuosa de R.D.C recombinación defectuosa V(D)J	8q11	<i>XRCC7</i> <i>SCID / ADN-PKcs</i>
V-C4 V-E5 V-G8 <i>irs2</i>	<b>V79</b>   <b>V79</b>	reparación correcta de ssb y R.D.C Inestabilidad cromosómica síntesis de ADN radio-resistente defectos similares a AT	9	<i>XRCC8</i> A-T/NBS?
<i>irs3</i>	<b>V79</b>	reparación correcta de ssb y R.D.C síntesis de ADN radio-sensible		?
BLM2	CHOK1	reunión lenta de ssb y R.D.C escasa sensibilidad a los rayos-X		?
V-C8	<b>V79</b>	inestabilidad cromosómica síntesis de ADN radioresistente reunión lenta de R.D.C sensibilidad a diferentes mutágenos		?

Tabla 3. Líneas celulares mutantes de roedores sensibles a radiación ionizante y características principales.

## **MECANISMOS DE DEFENSA CELULAR FRENTE AL DAÑO EN EL ADN**

Las células, a lo largo de la evolución, han desarrollado distintos sistemas de defensa para protegerse del daño en el ADN que, o bien evitan su producción, o bien lo eliminan. La primera línea de defensa la componen enzimas detoxificantes y compuestos que neutralizan los agentes químicos reactivos (Friedberg, 1985) pero aun así, un segundo mecanismo de defensa lo constituyen las enzimas de reparación, cuya expresión puede ser constitutiva o inducida en determinadas condiciones (respuesta adaptativa por ejemplo).

### **1.12 LA REPARACIÓN DE LAS ROTURAS DE DOBLE CADENA.**

La reparación depende de la naturaleza del daño producido. Una clasificación simplista puede estar basada en la habilidad de las enzimas a la hora de usar las bases complementarias de la estructura del ADN y así facilitar la reparación en el sitio donde se ha producido el daño. De esta manera, el daño en una hebra del ADN (modificación de bases, rotura de cadena simple, etc), puede ser reparado o modificado usando la cadena no dañada como molde a la hora de la síntesis. Cuando el daño afecta por el contrario a ambas hebras de la molécula de ADN en proximidad estrecha (entrecruzamiento o rotura de doble cadena), en esta última situación la reparación es difícil y requiere diferentes procesos enzimáticos.

Los mecanismos involucrados en la reparación de las R.D.C y en la recombinación genética son los principales responsable de la formación de las aberraciones cromosómicas. Varios síndromes llamados deficientes en la reparación de las roturas de doble cadena, se asocian a un incremento drástico de la frecuencia de dichas roturas. Por ejemplo, síndromes en humanos como el de Nijmegen, la anemia de Fanconi, el síndrome de Bloom, el de Werner y la Ataxia telangiectasia (A.T.) se caracterizan por deficiencias en genes fundamentales que codifican proteínas asociadas a los mecanismos de reparación de las roturas de doble cadena.

Los mecanismos involucrados en la reparación de las RDC pueden agruparse formalmente en dos grupos: mecanismos dependiente de homología (HRR= homologous recombination repair) y mecanismos independiente de homología ( NHEJ= non-homologous end joining). Muchos de los conocimientos actuales sobre la HRR proceden de varias décadas

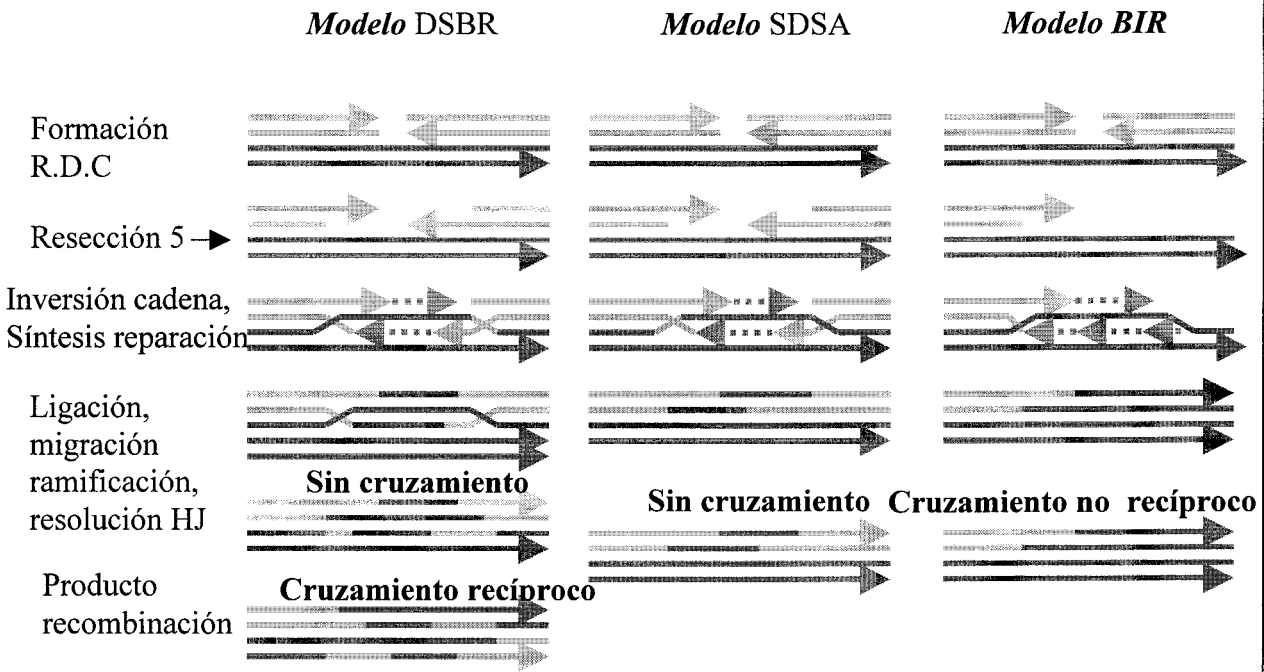
de investigaciones básicas realizados en fagos, bacterias, y levaduras, organismos en los que la HRR es muy eficiente. Por el contrario, durante cierto tiempo se ha considerado que en vertebrados la NHEJ es más eficiente que la HRR (Rothy Wilson, 1988). Sin embargo, recientemente se ha indicado que las células de mamíferos son también eficientes en HRR (Thompson, 1996; Liang *et al.*, 1998). Los diferentes mecanismos de reparación de las R.D.Cs se representan en la Figura 19.

### **1.12.1 La reparación por recombinación homóloga (HRR).**

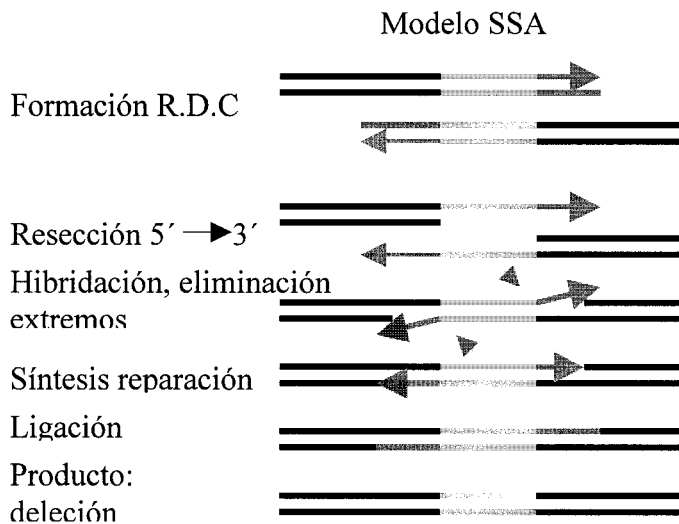
La reparación del daño en el ADN requiere homología entre las secuencias de ADN, tal como la existente entre las copias de cromosomas maternos duplicados (cromátidas hermanas, varios cientos de pb). Ya se conoce en levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) los procesos de recombinación homóloga (HRR). En este organismo eucariota se sabe que la HRR es el proceso más importante en la reparación de las RDC, este proceso de HRR puede ser conservativo o no conservativo. De ser conservativo la reparación de las RDC es precisa, al restituir la secuencia original de la rotura copiando la información de la cromátida o cromosoma homólogo. Se han descrito tres mecanismos básicos de reparación conservativa: DSBR= *double-strand break repair*; SDSA= *synthesis-dependent strand annealing* y BIR= *break-induced replication*.



REPARACIÓN POR RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA CONSERVATIVA



REPARACIÓN POR RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA NO CONSERVATIVA



REPARACIÓN DE LAS RDC POR RECOMBINACIÓN NO HOMÓLOGA (NHEJ)

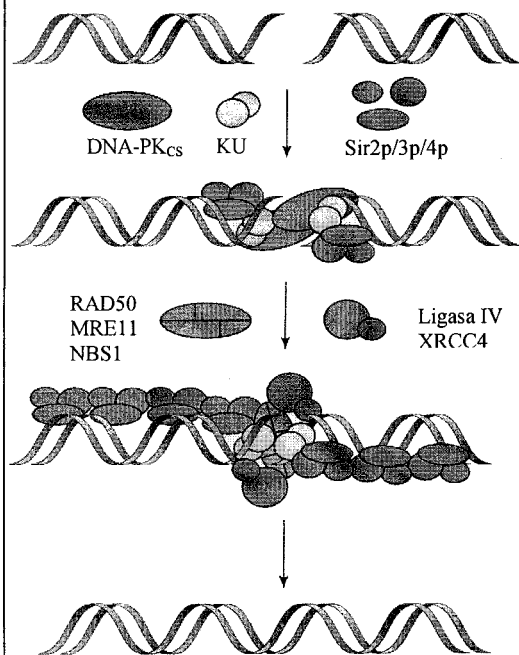


Figura 19. Mecanismos de defensa celular frente al daño en el ADN.

En contraste SSA (single-strand annealing), como HRR no conservativa (Figura 19) implica la pérdida del material genético ( Lin et al., 1984 ) (Carroll et al., 1986; Mayro y Carroll 1991). En este caso, la reparación de los cromosomas rotos es muy eficiente e implica la pérdida de una de las regiones de homología y la región intermedia entre las dos regiones homólogas repetidas ( ver Figura 19).

La reparación mediante HRR requiere una serie de enzimas reparadoras de las roturas de doble cadena y los genes responsables son: RAD (50, 51, 52, 53, 54, 55, 57), RE11, XRS2, (llamados frecuentemente grupo de genes RAD52). las mutaciones en estos genes hacen a las células de levadura defectivas en llevar acabo con normalidad los procesos de recombinación en mitosis y/o meiosis, y adquieren por lo general una mayor sensibilidad a la radiación ionizante.

### **1.12.2 La Recombinación ilegítima o recombinación no homóloga (*NHEJ*).**

*NHEJ* es un mecanismo de reparación independiente de homología, capaz de unir directamente extremos de R.D.C (figura 17). La independencia no es absoluta ya que este mecanismo se inicia sobre pequeñas regiones de homología de 1-10 pb. El mecanismo consiste en la ligación de los extremos compatibles. Sin embargo, La NHEJ es capaz de unir extremos no complementarios, independientemente de su secuencia y estructura. En tal caso, los extremos han de modificarse enzimáticamente lo que implica sustitución de pb, inserciones y/o deleciones (Pfiffer, 1998). Es un mecanismo frecuentemente usado por las células de mamíferos en el momento de unir las secuencias de doble cadena dañadas (revisado por Kanaar y col., 1998., Karran 2000). (Figura 19).

### **1.12.3 Recombinación V(D)J**

Recientemente se ha encontrado, en células de mamíferos ( hámster ) hipersensibles a la radiación ionizante y defectuosas en la reparación de la RDC que, sus deficiencias están relacionadas con algunas enzimas implicadas en la reparación de las roturas de doble cadena y que participan en procesos asociados a la recombinación V(D)J. Otras líneas de hámster encontradas mutantes Xrcc8 y AT muestran hipersensibilidad a radiación y a camptotecina

(veneno de topo I). Sin embargo, curiosamente no presentan la deficiencia de reunir roturas de cadena simple y doble, y además presentan procesos de recombinación V(D)J normales. Un gen que corrige el defecto en células AT fue encontrado, denominado ATM, se ha clonado. ATM codifica una proteína de 350kDa que presenta homología a través de su dominio C-terminal con la familia de proteínas PI-3K. Hoy se sabe que son cuatro por lo menos los productos de los genes (XRCC4- XRCC 7) comunes en la recombinación V(D)J y en la reparación de roturas de doble cadena inducidas por radiación (para revisión ver Jeggo, 1990, 1998; Zdzienicka, 1999). Se ha postulado que el complejo ADN-PK media la resolución de esas roturas de doble cadena a través del desensamblaje y remodelación de los complejos de recombinación V(D)J. Ellos permiten la resolución de los extremos libres de ADN y/o controlar los eventos posteriores mediante la fosforilación de distintos sustratos. Los productos de los genes responsables para XRCC5, 6 y 7 han sido identificados como Ku p80, Ku p70 y la subunidad catalítica de la proteína-quinasa dependiente de ADN (ADN-PKcs). Durante la recombinación V(D)J un complejo heterodimérico Ku p70/80 se asocia a los extremos libres de ADN. Posteriormente sigue su unión a ADN-PKcs (Yaneva y col., 1997; Hammarsten y Chu, 1998), y el complejo resultante aparentemente forma una proteína-quinasa activada..

**OBJETIVOS**

---

## Objetivos

Teniendo en cuenta el mecanismo molecular de las topoisomerasas de ADN, así como su cada vez mejor conocida participación en procesos fundamentales de la fisiología del ADN que requieren cambios topológicos de la molécula, estas enzimas moleculares han atraído la atención de numerosos investigadores, tanto interesados en aspectos básicos como de posibles aplicación en la terapia antitumoral.

Los objetivos presentados en el presente trabajo de tesis doctoral obedecen a algunos de estos aspectos, en temas concretos que han venido siendo objeto de debate científico, incluso con resultados contradictorios publicados en los últimos cinco años, y que hemos tratado de resolver definitivamente en uno u otro sentido con nuestros diseños experimentales.

De una manera resumida, la relación de los objetivos fundamentales que nos hemos propuesto abordar son los siguientes :

- 1- Dada la controversia existente hasta ahora, nuestro primer objetivo ha sido la demostración del verdadero carácter de la bisdioxopiperazina ICRF-193 en cuanto a su acción como “veneno “ de topo II ó inhibidor catalítico con un mecanismo particular. Dentro de este primer objetivo, se ha estudiado tanto la citotoxicidad como el posible efecto genotóxico del compuesto.
- 2- El segundo objetivo se ha centrado en valorar la citotoxicidad y genotoxicidad, en este caso de un agente intercalante del ADN, como es la antraciclina de acción dual llamada aclarubicina. Dicha acción dual implica tanto una inhibición catalítica de la topo II como el envenenamiento ( estabilización de “complejos de rotura “ ) de la topo I. Esta dualidad nos ofrecía un ejemplo particularmente interesante para estudiar aspectos fundamentales de la función de ambas topoisomerasas I y II, al tiempo que resulta también de interés por la amplia utilización en clínica de la aclarubicina como agente antitumoral.

3- Valoración de la citotoxicidad producida por el tratamiento combinado de radiación ionizante e inhibidores catalíticos. Actualmente, el uso clínico de inhibidores de topoisomerasas como antitumorales es escaso. Una interesante característica de la mayoría de los inhibidores catalíticos de topoisomerasa es no obstante su capacidad para modular los efectos citotóxicos de otros agentes anticancerígenos. En este sentido, podrían ser utilizados como coadyuvantes en el tratamiento de determinados tipos de cánceres. Actualmente, el tratamiento que emplea radiación y drogas (quimioradioterapia) esta teniendo notables éxitos.

En la ultima parte de esta tesis y como otro gran objetivo de la misma, nos hemos propuesto investigar si diferentes combinaciones de ICRF-193 o ACLA podrían constituir una eficaz estrategia a la hora de potenciar los efectos citotóxicos y genotóxicos inducidos por radiación ionizante.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

## 2-MATERIALES Y METODOS

### 2.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo

Como material de trabajo hemos empleado dos líneas celulares de fibroblasto de hámster chino: la línea parental V79, obtenida a partir de La Colección Americana de Tipos Celulares (ATCC) y su mutante radiosensible *irs2*. Dicha variante radiosensible fue seleccionada en los laboratorios dirigidos por el Dr. J.Thacker (U.S.A), quién amablemente nos la ha suministrado (J. Thacker y col., 1990). Las características más sobresalientes del mutante son: una reparación normal de roturas de cadena simple y doble a pesar de su acusada radiosensibilidad, que contrasta con cierta inestabilidad cromosómica y síntesis de ADN radioresistente. Por tanto, presenta características similares a las células del síndrome humano ataxia telangiectasia (AT) (J. Thacker y col., 1990).

En cuanto a sus condiciones de cultivo, ambas líneas crecen en monocapa y las células se cultivan en frascos de cultivo con medio esencial mínimo (MEM) suplementado con suero fetal bovino al 10%, L-glutamina 2 mM, y los antibióticos penicilina (50 U/ml) y estreptomycinina (50 µg/ml). Los cultivos crecen a 37 °C en oscuridad en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub> en el aire. La duración del ciclo celular es de aproximadamente 12h. Todos los experimentos descritos en este trabajo se realizaron al menos tres veces con el fin de validar la consistencia y reproducibilidad de los resultados obtenidos.



## **2.2 Modulación de la actividad topoisomerasa II por ICRF-193 y Aclarubicina**

### **2.2.1 Extracción de proteínas nucleares.**

Células V79 e *irs2* se incubaron durante 3 horas con diferentes concentraciones de los inhibidores ICRF-193 (0.5-10  $\mu$ M) o aclarubicina (ACLA) (0.05-2  $\mu$ g/ml) y luego se recogieron con un rascador y se llevaron a tubos de centrifuga de 10 ml para su centrifugación a 1200 rpm durante 6 minutos a 4°C. Posteriormente, las células tratadas así como sus respectivos controles no tratados se procesaron para obtener extractos de proteínas nucleares. El procedimiento utilizado básicamente es el descrito por Heartlein y col. (1987). Las células recogidas se lavaron con PBS 1X tras lo cual  $1 \times 10^7$  células fueron resuspendidas en 1 ml de tampón A (Sacarosa 0.32 M, Tris-ClH 0.01 M pH 7.5, Cl<sub>2</sub>Mg 0.05 M, Tritón X-100 al 1%), se agitaron enérgicamente para lisar las membranas y se obtuvo un pellet de núcleos mediante centrifugación a 2000 rpm durante 5 min a 4 °C. A continuación se eliminó el sobrenadante y se lavaron los núcleos en 1 ml de tampón B (tampón Sörensen 5 mM p H 7. 5,  $\beta$ -mercaptoetanol 1 mM, Ditiotreitól (DTT) 0.5 mM, Fenilmetilsulfonilfluoride (PMSF) 0.1 mM). Los núcleos se volvieron a centrifugar al igual que antes, se resuspendieron en 50  $\mu$ l de tampón B más 50  $\mu$ l de tampón C (EDTA 4 mM) y se incubaron a 0 °C durante 15 min. A continuación los núcleos se lisaron mediante la adición de 100  $\mu$ l de tampón de lisis D (Tris-ClH 20 mM pH 7.5, ClNa 2 M,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM, PMSF 1 mM) y se realizó una nueva incubación a 0 °C durante 15 min. Tras añadir 50  $\mu$ l del tampón E (Polietilenglicol (PEG-6000) al 18%, Tris-ClH 50 mM

pH 7.5, ClNa 1 M,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM, PMSF 1 mM) se llevó a cabo otra incubación a 0 °C durante 40 min. La suspensión celular fue entonces centrifugada a 12.500 rpm durante 30 min a 4 °C, quedando las proteínas nucleares en el sobrenadante. La concentración total de proteína nuclear se determinó en un espectrofotómetro Beckman DU-64 mediante el método de Bio-Rad (Bio-Rad Protein Assay). Para ello, se incubaron durante 15 min y a temperatura ambiente 10  $\mu$ l del extracto nuclear con 40  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y 950  $\mu$ l del colorante diluido (dilución 0.2:1 en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>). Como estándar se utilizó albúmina de suero bovino (ASB), con la que se elaboraron las correspondientes rectas de calibración. Los extractos se mantuvieron a -80 °C para el análisis de las actividades topoisomerasas durante un tiempo máximo de un mes.

### **2.2.2 Actividad topoisomerasa II en extractos nucleares**

La actividad catalítica topoisomerasa II existente en los extractos nucleares se ensayó tanto *in vivo* como *in vitro* mediante la utilización de kits comerciales (TopoGen, Columbus, OH, USA) que se basan en la capacidad específica de la topo II en presencia de ATP para desencadenar ADN de doble cadena de cinetoplasto encadenado (Figura.1). 100ng de extracto nuclear proteico procedente de cada línea se ensayó en presencia de diferentes concentraciones de ICRF-193 (0.5, 0.1, 1, 2.5, 5 $\mu$ M) o de ACLA (0.05, 0.1, 1, 2  $\mu$ g/ml). La mezcla de reacción para detectar la actividad de topo II consistió en: 0.4  $\mu$ g de ADN encadenado de cinetoplasto (ADN mitocondrial) de tripanosoma (*Crithidia fasciculata*), 2  $\mu$ l de tampón de reacción 10X para topo II (suministrado en el kit), ATP 10 mM, 100 ng de nuestro extracto proteico nuclear y H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> hasta un volumen total de 20  $\mu$ l, que se incubó a 37 °C durante 40 min.

Pasando el tiempo de la incubación, se detuvo la reacción con tampón de parada consistente en Sodio Dodecil Sulfato (SDS) al 10% (suministrado en el kit) más 2µl de proteinasa K a una concentración 20µM. Los productos de la reacción se resolvieron en geles de agarosa al 1% en el tampón de electroforesis TAE 1X (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub> 10 mM pH 8, EDTA 1mM, ácido acético glacial 0.12 % V/V) con una condiciones de electroforesis de 50V y 600 mA durante 3 h. Los geles se tiñeron con bromuro de Etidio preparado a una concentración de 3µg/ml durante 10 min, se destiñeron con agua destilada durante 20 min y finalmente se fotografiaron bajo la luz U.V.

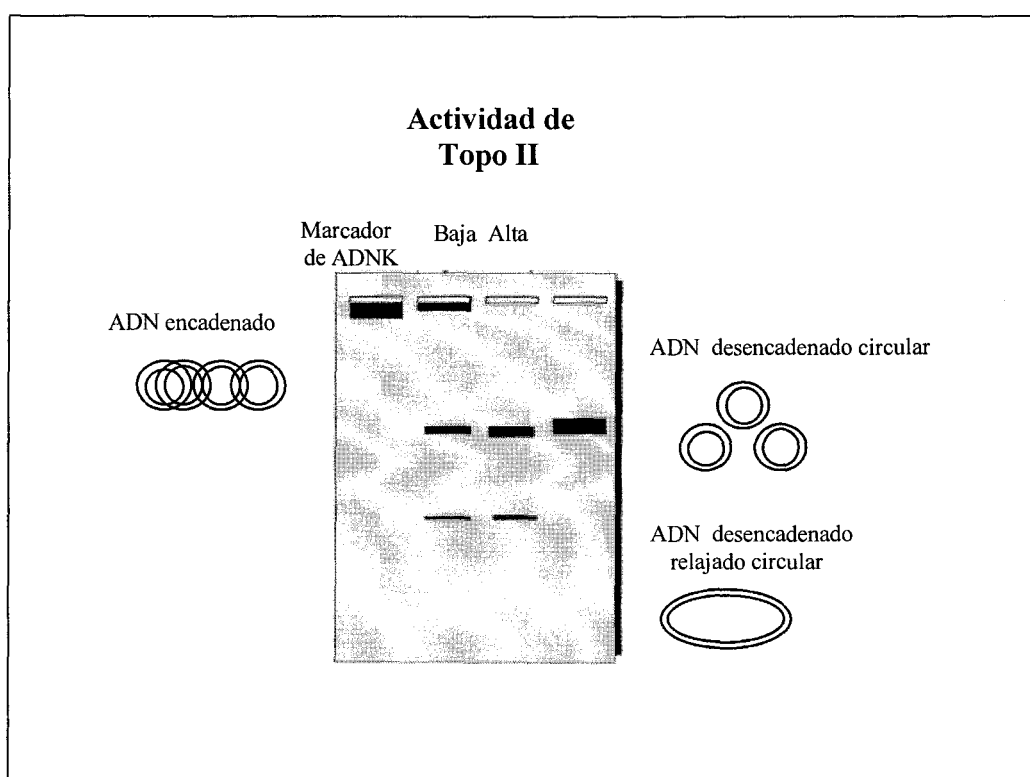


Fig 1. Representación esquemática de los niveles de inhibición de la actividad catalítica de la enzima topo II y las principales bandas correspondiente a estructuras de ADN resultante de esta inhibición.

## **2.3 Estudio sobre la citotoxicidad y genotoxicidad de los inhibidores catalíticos de topoisomerasa II ICRF-193 y Aclarubicina**

### **2.3.1 Estudio de la viabilidad celular mediante el Ensayo de la Sulforrodamina B**

Siguiendo las recomendaciones del Instituto Nacional del Cancer (USA), el análisis de la citotoxicidad de los inhibidores catalíticos de topo II ICRF-193 y Aclarubicina se realizó mediante el ensayo de la sulforrodamina B (SRB) (Skehan y col., 1990; Y.P. Keepers y col., 1991). Este ensayo evalúa al mismo tiempo un amplio rango de concentraciones para cada uno de los inhibidores de topoisomerasa ensayados, permitiéndonos visualizar de manera rápida la incidencia que tiene cada una de las concentraciones analizadas sobre la mortandad celular. El fundamento del ensayo consiste en determinar la viabilidad celular midiendo la absorbancia del contenido proteico total de la célula y dado que este colorante sólo es capaz de penetrar en células vivas, nos permite por tanto seleccionarlas frente a la población de células muertas.

### **2-3.2 Preparación de las drogas.**

En nuestro caso las drogas son los inhibidores catalíticos de topoisomerasa ICRF-193 (Biomol, Hamburg) y ACLA (Sigma, USA) que se disolvieron inicialmente en dimetilsulfóxido (DMSO) o etanol respectivamente, siguiendo en cada caso las indicaciones de la casa comercial. Se prepararon soluciones madres de ICRF-193 y ACLA a concentraciones de 1 mM o de 5 mg/ml respectivamente. Las diluciones posteriores se realizaron en medio esencial mínimo a partir de las soluciones madres. Las concentraciones

experimentales utilizadas con ICRF193 fueron: 0.005, 0.01, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5 y 10  $\mu\text{M}$ .

Para el tratamiento con ACLA utilizamos las siguientes concentraciones: 0,005, 0,01, 0,03, 0.05, 0.09, 0.1, 0.2 y 0.3  $\mu\text{g/ml}$ .

### **2.3.2.1 Metodología del ensayo SRB**

En la figura 2 se esquematiza el procedimiento experimental utilizado para el análisis de la viabilidad celular. Brevemente, se sembraron  $5 \times 10^3$  células en un volumen de 100  $\mu\text{l}$  de medio por pocillo y se utilizaron placas de 96 pocillos (Nunc) para ambas líneas (V-79 e *irs2*). En condiciones de esterilidad, se sembraron las células homogenizando dicha solución mediante el movimiento de la placa cada vez que se realizaba la siembra de los pocillos, posteriormente se dejaron crecer a 37°C durante 24 h. Pasado este tiempo, procedimos al tratamiento con los inhibidores de topoisomerasa para cada una de las concentraciones seleccionadas. Los tratamientos se realizaron de menor a mayor concentración y procurando que las placas no estuvieran fuera del incubador más de 20min. Después de 48 h de tratamiento se procedió a fijar las placas. Para ello se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de ácido Tricloroacético (TCA) frío al 50 % en agua destilada, se guardaron las placas en frío durante 1h y una vez transcurrido este tiempo se eliminó la mezcla lavando las placas 5 veces con agua destilada. Finalmente se dejaron secar bien al aire. Después de este punto, se pueden dejar en frío hasta el momento de la tinción.

Para la tinción de las células se añadió 100  $\mu\text{l}$  de SRB (0,4% en ácido acético glacial al 1%) a cada pocillo durante 30 minutos a temperatura ambiente, luego se lavó 5 veces con ácido acético al 1% y se dejó secar. Finalmente para solubilizar las proteínas teñidas, se añadió

100 µl de buffer tris 10 mM a cada pocillo, se agitaron las placas de 5 a 10 minutos y se analizaron los resultados midiendo las densidades ópticas en cada pocillo a una longitud de onda de 492 nm utilizándose para ello un espectrofotómetro automático para placas (lector ELISA, Labsystems Multieskan MS) (Fig.2).

El análisis cuantitativo de los resultados se realizó utilizando el programa informático Sigma-plot.

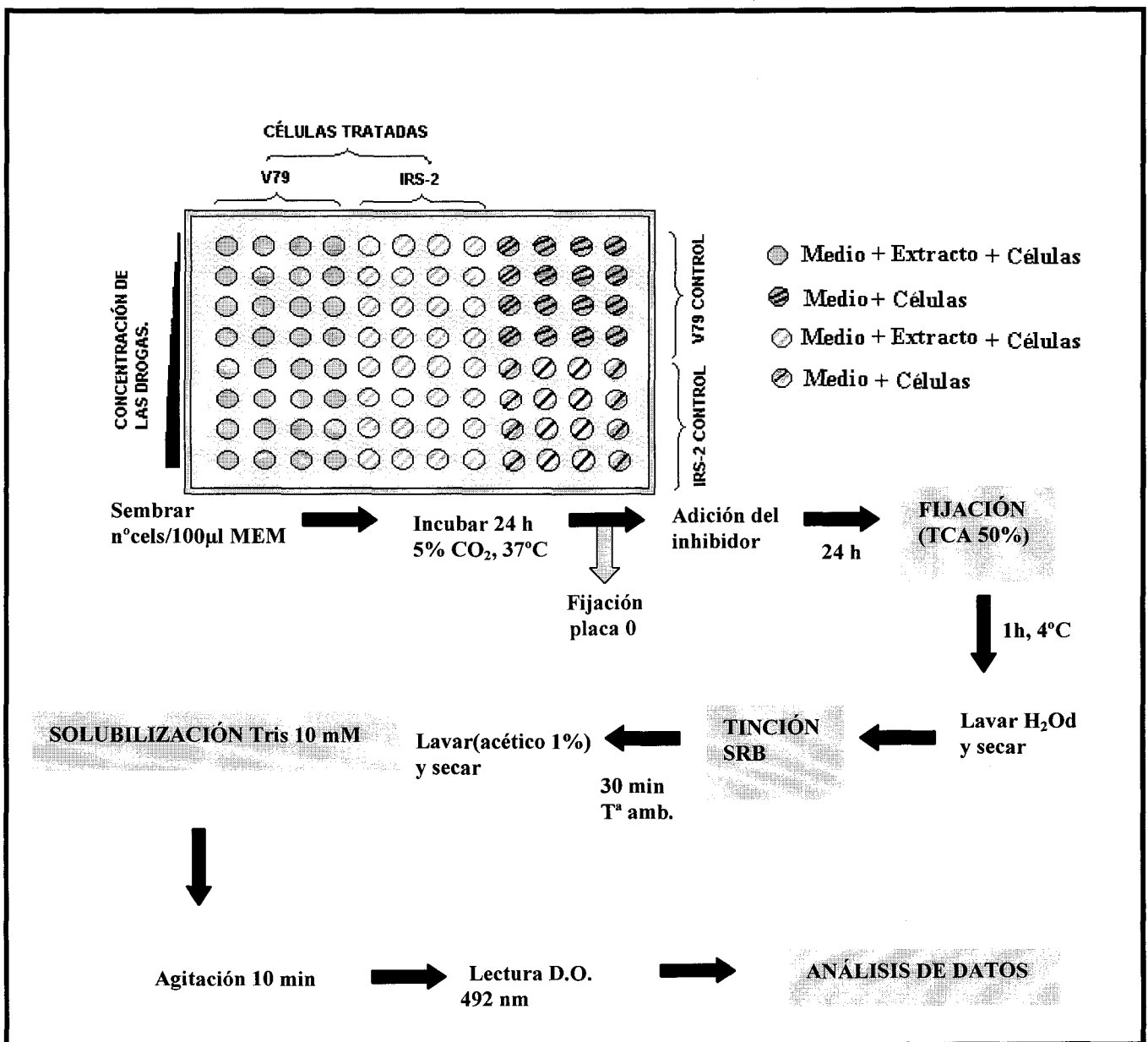


Figura 2 . Esquema de distintas etapas de la técnica Sulforodamina B (SRB).

#### **2.4 Cuantificación del daño en el ADN mediante electroforesis de células aisladas en gel de agarosa (SCGE) o “ensayo cometa”**

La electroforesis de ADN de células individuales en agarosa (Single Cell Gel Electrophoresis) o “ensayo del cometa” es un método rápido, sensible y fácilmente reproducible para cuantificar el daño genotóxico inducido por distintos agentes mutagénicos en células eucariotas (Fairbairn y col., 1995; M.W. Heartlein y cil.,1987). La ventaja principal de este método es que no se necesita un número alto de células para realizarlo y es además un ensayo muy útil para trabajar con células quiescentes de diferentes tejidos, ya que no requiere células proliferativas para poder observar el daño.

Desde que la técnica fue descrita por primera vez por Östling y Johanson en 1984, han surgido muchas modificaciones y actualmente el protocolo más utilizado es el descrito por Singh y colaboradores en 1988 en el que las células son sometidas a unas condiciones muy alcalinas de lisis y electroforesis de manera que este ensayo nos permite detectar las roturas de doble cadena, de cadena simple, así como los sitios lábiles a álcali. De esta forma, en las células controles (sin daño) visualizaremos al microscopio de fluorescencia los núcleos redondos y en las células con el ADN dañado, aparecerá una migración de los fragmentos de ADN produciendo lo que se conoce como la cola del cometa (figura 3). Esta migración del ADN hacía el ánodo, y en definitiva la cola del cometa, está en función del tamaño de los fragmentos de ADN y del número de estos.

Para estudiar el posible daño genético inducido por estos inhibidores, las células se mantuvieron en presencia de ICRF-193 a unas concentraciones finales de 1, 2.5, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ,

durante un período de 3 h. Para el tratamiento con ACLA las concentraciones utilizadas fueron de 1 y 2  $\mu\text{g/ml}$  elegidas por su capacidad de inhibir la actividad catalítica de la topoiI. Como controles de daño en el ADN se utilizaron células sin tratar (control negativo) o células sometidas a 5 Gy de radiación (control positivo). A partir de este momento se procedió a realizar el ensayo del cometa.

#### **2.4.1 Metodología del ensayo “cometa”(Figura 4)**

Las células se recogieron con un rascador y se resuspendieron en un volumen de PBS quedando a una concentración de  $10^6$  células/ml. En todo momento se cuidó especialmente el mantener las células en hielo una vez cumplidos los tiempos de tratamiento. Todas las soluciones empleadas en el ensayo se mantuvieron frías con el fin de que el daño producido no se reparase. El protocolo del cometa que realizamos en este trabajo ha sido básicamente el descrito por Singh y col. (1988) con algunas modificaciones.

Para la realización del ensayo preparamos la primera capa de agarosa al menos un día antes de llevar a cabo el experimento. Ésta consistió en agarosa normal al 1% (FMC) en  $\text{H}_2\text{O}_d$  que se calentó al baño maría hasta alcanzar aproximadamente los 55 °C, dentro de la cual se introdujeron portaobjetos en vertical, con un extremo esmerilado para evitar el desprendimiento de dicha capa. Éstos se dejaron secar y se guardaron a 4 °C hasta su uso. Para la preparación de la segunda capa se utilizó agarosa de bajo punto de fusión (Bio-Rad) al 0.7% en PBS y se mantuvo a una temperatura de 37 °C para su uso. Sobre la primera capa de agarosa, se añadieron 5  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular después de homogeneizar bien y 85  $\mu\text{l}$  de agarosa de bajo punto de fusión, se colocó un cubreobjetos con cuidado y se dejó



gelificar unos 5 min a 4 °C.

Transcurrido este tiempo, se retira el cubreobjetos cuidadosamente y se coloca una tercera capa con 80 µl de agarosa de bajo punto de fusión a 37 °C . Después de poner otro cubreobjetos, los portaobjetos se colocaron de nuevo a 4 °C durante 5 min.

Tras la solidificación de la tercera capa de agarosa, los portaobjetos se sumergieron en una solución de lisis de membranas, previamente refrigerada, de pH 13. Esta solución está formada por un tampón de lisis autoclavado (ClNa 2.5 M, EDTA 100 mM, Tris-ClH 10 mM, N-Laurosilsarcosinato 0.77% p/v, NaOH 0.25 M, pH 10) al que se añadió 10% (v/v) de DMSO y 1% (v/v) de Tritón X-100 (Fluka) en el momento de utilizarla. Los portaobjetos se mantuvieron en esta solución a 4 °C y en oscuridad durante 1h.

Tras la lisis celular, los portas se colocaron sobre una cubeta horizontal de electroforesis que se llenó con tampón electroforético recién preparado y frío (EDTA 1 mM, NaOH 300 mM, pH 12. Los portaobjetos se dejaron en el tampón durante 20 min para permitir el desenrollamiento del ADN antes de la electroforesis, que se realizó a 4 °C durante 20 min a 1.6 V/ cm y 300 mA.

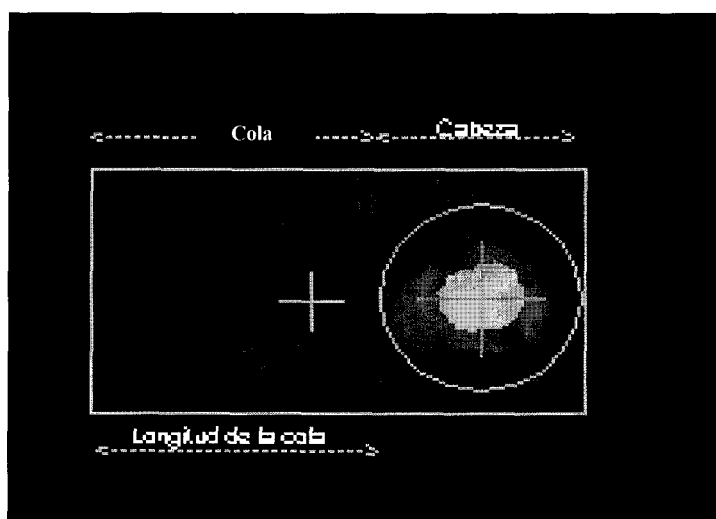
Una vez terminada la electroforesis, los portaobjetos se lavaron varias veces con tampón de neutralización frío (Tris-ClH 0.4 M, pH 7.5) durante 5 min para eliminar las sales y detergentes que podrían interferir con la tinción posterior. Para la tinción se añadió 50 µl de DAPI (5 µg/ml) preparado en Vectashield (medio de montaje que preserva la fluorescencia; laboratorios Vector, Burlingame, USA) a una concentración de 5 (µg/ml).

Las muestras se observaron al microscopio de fluorescencia (OLYMPUS Vanox AHBT3) y se captaron (usando el objetivo de 20X) imágenes de 50 células escogidas

aleatoriamente en cada tratamiento, que se analizaron posteriormente mediante el programa CASys (Synoptics, Ltd, image processing systems, UK).

Como parámetro para analizar el nivel de daño en el ADN se empleó el momento de los cometas, definido como el producto del porcentaje de ADN presente en la cola por la longitud de la misma (Singh y col., 1988) (Figura 3).

### **Ensayo cometa**



**Figura 3.-** Parámetro empleado para la detección de genotoxicidad: **MOMENTO DE LA COLA**, es el porcentaje de ADN presente en la cola por la longitud de la misma.

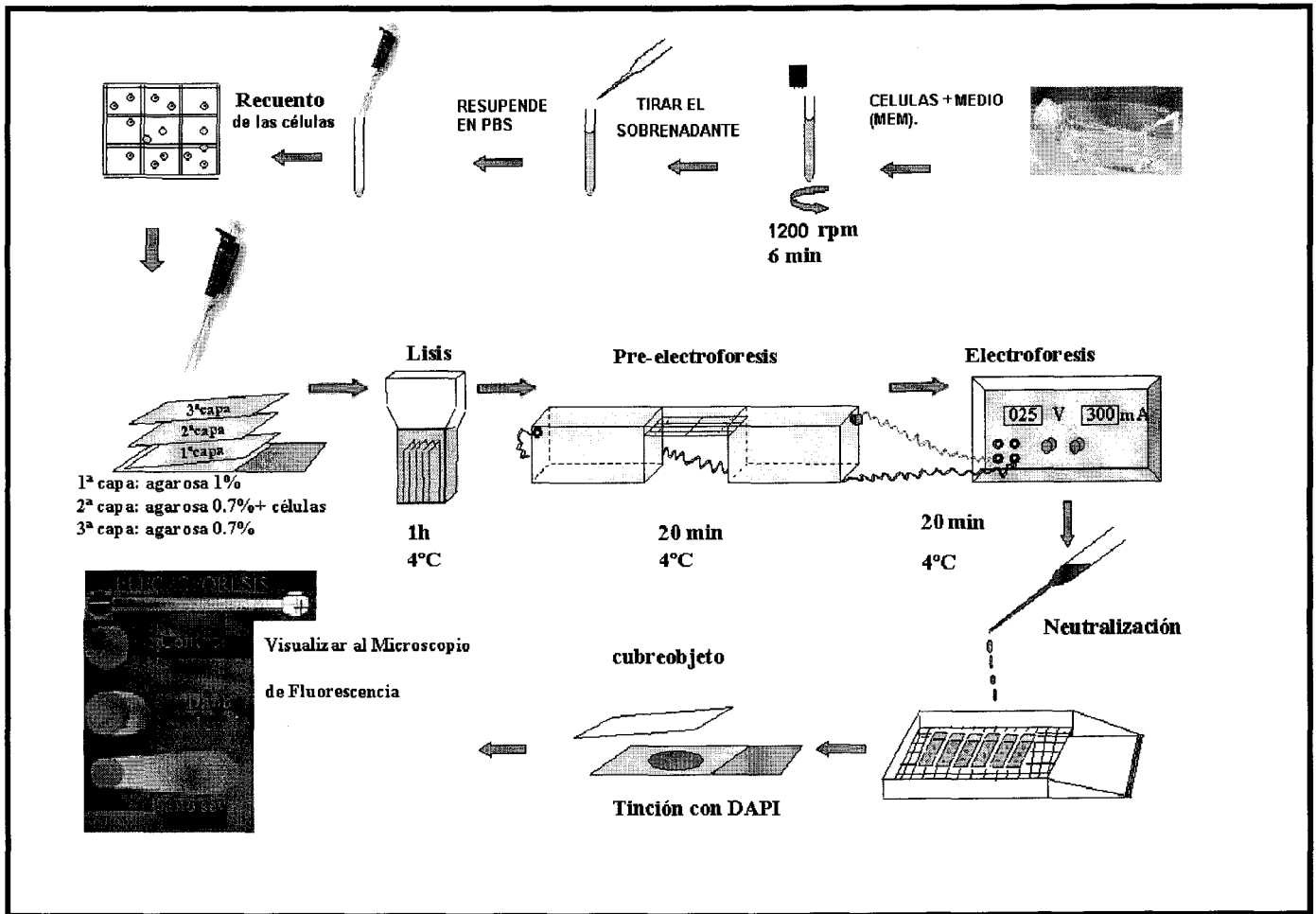


Figura 4. Esquema de distintas etapas del ensayo cometa. N:B las etapas: lisis, pre-electroforesis y electroforesis se procesan en la oscuridad total.

#### **2.4 Cuantificación del daño en el ADN mediante electroforesis de campo pulsante**

El análisis genotóxico para el caso del inhibidor catalítico ICRF-193 fue ampliado también con un estudio sobre su capacidad para producir específicamente roturas de cadena doble en el ADN (DSB). En este sentido pretendíamos evaluar la existencia o no de posibles relaciones entre la acción genotóxica de este inhibidor de topo II y su capacidad para producir muerte celular, dado que es bien conocido, que las roturas de cadena doble en el ADN son las lesiones que tienen una mayor importancia específica tanto en la muerte celular como en la producción de aberraciones cromosómicas. Por otra parte, también nos propusimos realizar una valoración de su comportamiento como posible veneno de topoisomerasa, dada la controversia científica existente en ese sentido (Singh, M.T y col., 1988). Para su análisis, elegimos la técnica electroforética de campo pulsante dado que ésta posibilita la identificación y el estudio de las DSB con una mejor resolución que el ensayo cometa anteriormente descrito. La modalidad de electroforesis de campo pulsante utilizada fue la CHEF (Contour Clamped Homogeneous Electric Field) que utiliza un sistema de 24 electrodos orientados de manera hexagonal y emplea un campo eléctrico homogéneo que se orienta alternativamente con un ángulo de 120°. Este sistema, desarrollado por Chu y cols. en 1986 permite la resolución de fragmentos de ADN de hasta 2 Mpb,(ver figura 5).

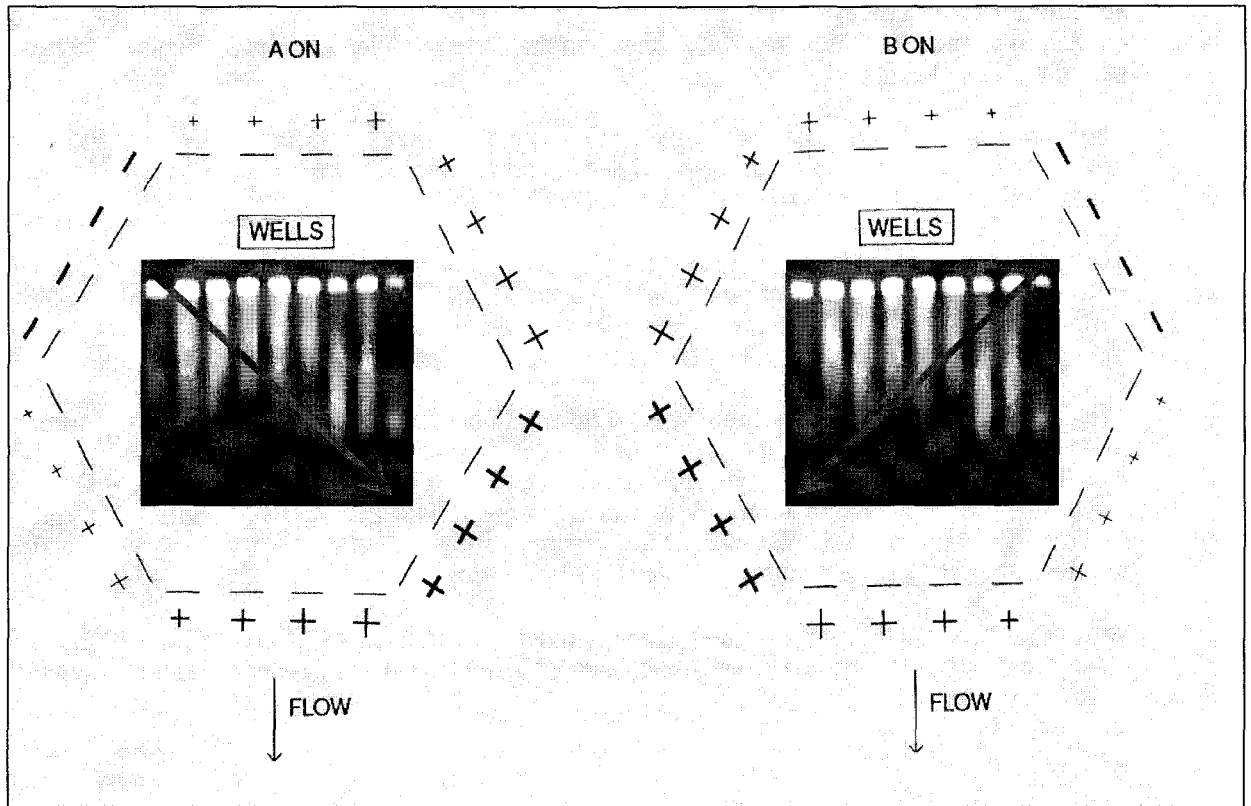


Figura 5, La modalidad de electroforesis de campo pulsante. —> Orientación de la corriente, cambiando alternativamente, AON, BON. —> La dirección de los fragmentos de ADN.

Para el análisis de las DSB inducidas por ICRF-193 las células, tanto de la línea parental como del mutante, fueron sometidas a un tratamiento con ICRF-193 durante 3 horas a las concentraciones de 1, 2.5, 5 y 10  $\mu\text{M}$ . Dichas dosis fueron elegidas en base a su capacidad para inhibir en mayor o menor grado la actividad catalítica de la topoisomerasa II. En paralelo también se llevó para ambas líneas tanto un control negativo (células sin tratar) como un control positivo. En este caso, las células fueron tratadas con 2  $\mu\text{M}$  de m-AMSA, un típico veneno de topoisomerasa de tipo II capaz de inducir eficazmente DSB. Cuando estudiamos su comportamiento como un potencial veneno de topoisomerasa II, las

células tratadas con m-AMSA o con ICRF-193 fueron sometidas simultáneamente a 10  $\mu$ M de afidicolina. El tratamiento con este inhibidor de la síntesis replicativa de ADN comenzaba 5 minutos antes de la adición de los inhibidores de topo II y se mantuvo durante las 3 horas de tratamiento con los inhibidores. Una vez finalizados los tratamientos, las células se incluyeron en agarosa y se procedió a su electroforesis.

El método utilizado para el procesamiento de las muestras fue básicamente el descrito por Elia y Bradley (1992), con algunas modificaciones. Así, después del tratamiento con el inhibidor las células se recogieron utilizando un rascador celular, se lavaron en PBS y se determinó el número de células por ml. Las células se resuspendieron en agarosa de bajo punto de fusión al 0.8 % en PBS (Bio-Rad), quedando a una concentración final de  $4 \times 10^6$  células por ml. Los moldes utilizados para formar los bloques de agarosa (Bio-Rad, de 250  $\mu$ l) se rellenaron con la suspensión celular y se mantuvo el molde a 4 °C durante 30 min para conseguir que la agarosa solidificara. Transcurrido este tiempo, las muestras incluidas en agarosa se sumergieron en una solución de lisis (EDTA 0.5 M pH 8, N-Laurosilsarcosinato 2% p/v, proteinasa K 0.5 mg/ml) donde se mantuvieron de 18 a 24 h a 37 °C.

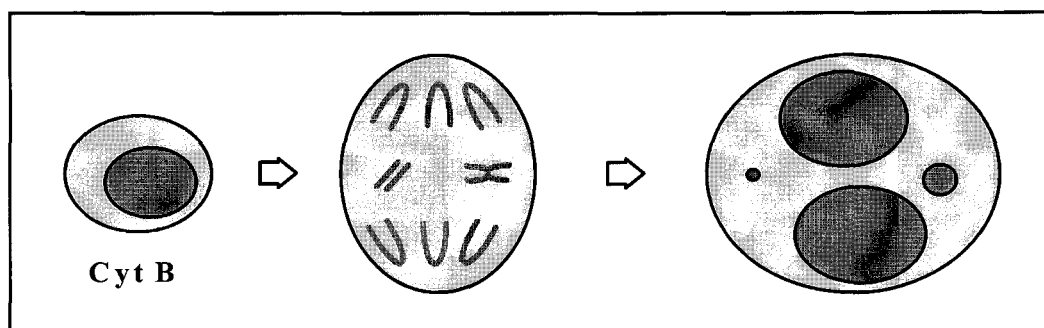
Una vez finalizada la lisis celular, se procedió a la preparación del gel de agarosa donde las muestras tenían que ser incluidas. El gel se preparó con agarosa normal al 0.8 % en TBE 0.5X (Tris-ClH 0.05M, borato 0.05M, EDTA 0.1mM, pH 8.4) y se cargaron las diferentes muestras en los pocillos, aproximadamente 200.000 células por pocillo, que correspondía a 1 $\mu$ g de ADN.

La electroforesis de campo pulsante se llevó a cabo con un sistema CHEF-DRII (Bio-Rad), usando el tampón TBE 0.5X, manteniendo su temperatura a 14 °C y empleando unas condiciones de 45 V durante 96 h, con cambio del pulso de corriente cada 60 min. Como

marcador de peso molecular se utilizó células incluidas en agarosa de *Saccharomyces cerevisiae* que permite una resolución de fragmentos de ADN de 0,2 a 2,2 Mpb. Los geles se tiñeron con Bromuro de Etidio a una concentración de 3 µg/ml durante 15 min, se destiñeron en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> de 30 a 60 minutos y finalmente se fotografiaron (Polaroid) bajo iluminación con luz u.v. de longitud de onda corta. Las imágenes también se guardaron en formato PC y se analizaron densitométricamente con el programa PCBAS versión 2.08. El daño en el ADN fue analizado como el porcentaje de ADN que sale fuera del pocillo durante la electroforesis con respecto al total. Finalmente se llevó a cabo un análisis estadístico de los datos utilizando el programa Sigma-plot. 8.0.

## **2.6 Cuantificación del daño cromosómico inducido por ICRF-193 o Aclarubicina mediante el análisis de su capacidad para inducir micronúcleos.**

Los micronúcleos son fragmentos de cromosomas o cromosomas enteros que no se incorporan al núcleo de las células hijas durante la mitosis, como resultado de una rotura cromosómica (clastogénesis) o defectos en el huso mitótico (aneugénesis). Presentan las mismas propiedades que el núcleo principal, y están envueltos por una membrana nuclear, aunque son de un tamaño mucho menor (figura 6).



**Figura 6 . Origen de los micronúcleos.** Los micronúcleos se originan a partir de cromosomas enteros o de fragmentos de cromosomas que no se incorporan al núcleo de las células hijas durante la mitosis. Las células que son tratadas con citocalasina B, y han dividido su núcleo una sola vez, aparecen como binucleadas. Los micronúcleos se cuentan solamente en estas células, evitándose así la estimación incorrecta del daño que supondría incluir en el recuento los linfocitos que no se han dividido (mononucleados).

El análisis de los micronúcleos en células en cultivo es un método frecuentemente aplicado como indicador biológico muy sensible del daño cromosómico inducido por la radiación ionizante o diferentes agentes químicos, ya que la metodología es simple y permite una valoración rápida de un gran número de células.

Solamente las células que se han dividido pueden expresar los micronúcleos, por lo que esta técnica daría lugar a una estimación errónea del daño si no se identifican claramente las células que han sufrido un ciclo de división (ver figura 6). Incluir células que se han dividido más de una vez puede resultar también en una estimación incorrecta del daño (Fenech, y col., 1993). En este sentido, el método de bloqueo en citocinesis introducido por Fenech y Morley en 1985 ha mejorado notablemente la fiabilidad de la técnica.

Para identificar las células que se han dividido una sola vez se bloquea la citocinesis con citocalasina B (Cyt-B). Esta droga, aislada del hongo *Helminthosporium dematoideum*,



impide la polimerización de la actina necesaria para la separación de las células hijas tras la telofase (Carter y col., 1967), de manera que las células se muestran como binucleadas, lo que las hace fácilmente identificables con relación al resto de la población celular (figura 6).

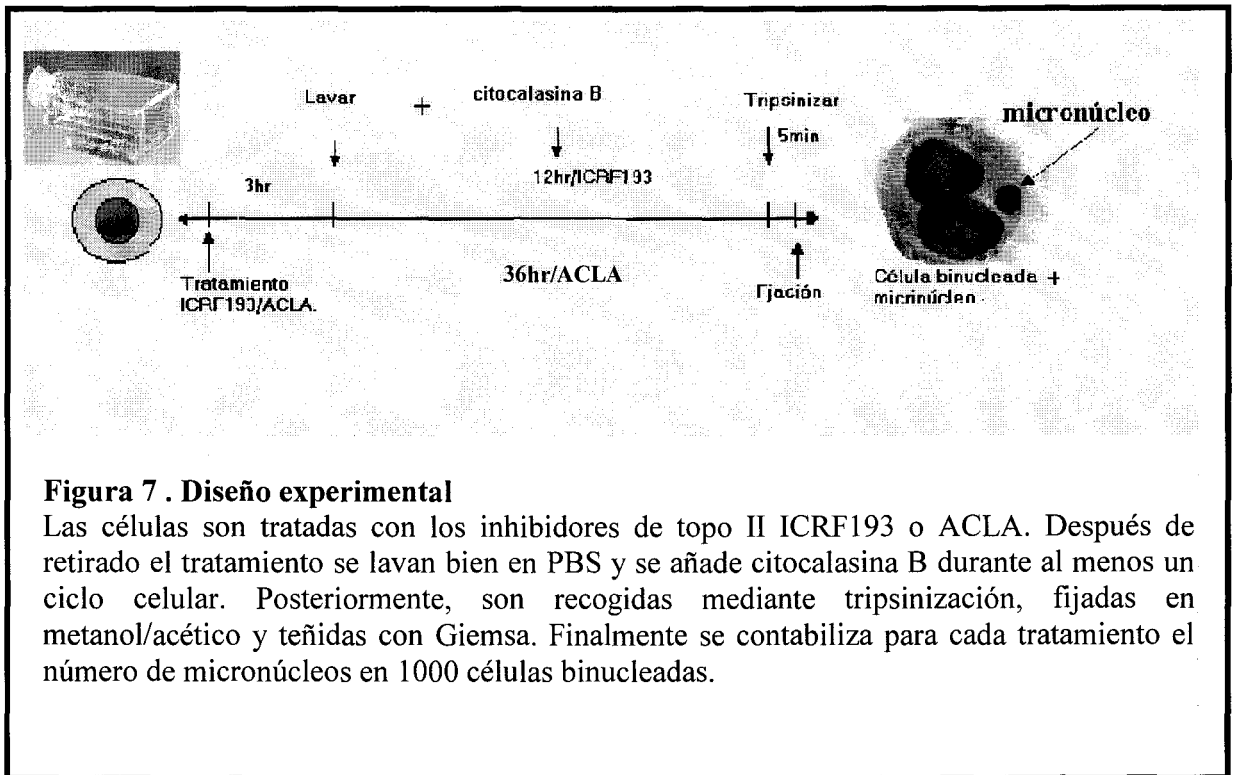
En el diseño experimental seguido para la valoración del daño cromosómico inducido por ICRF-193 o ACLA, las células V79 o irs-2, se sometieron durante 3 horas a diferentes concentraciones de los inhibidores de Topoisomerasa II. Para el ICRF-193 las concentraciones empleadas fueron 0.1, 0.25, 0.5, 1 y 2  $\mu$ M y de 0.1, 0.5, 1, 1.5 y 2  $\mu$ g/ml en el caso del inhibidor ACLA.

### **2.6.1 Obtención de células binucleadas, fijación, tinción y modo de hacer las preparaciones**

Después del tratamiento con inhibidores, se lavaron los frascos y se añadió citocalasina B durante 12 h para ICRF193 y 36 h para ACLA. Por último, se procedió a la fijación, tinción y puesta en definitivo de las preparaciones.

Inmediatamente después del tratamiento con los inhibidores se añadió al medio citocalasina B para bloquear la citocinesis y observar los micronúcleos en células binucleadas. La citocalasina B, como ya se ha comentado anteriormente, tiene la propiedad de inhibir la polimerización de la actina bloqueando por tanto la citocinesis, con lo que se induce la aparición de células binucleadas. Esta droga se preparó como una solución concentrada en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma) a una concentración de 2 mg/ml, que se mantuvo a -80°C. En el momento de su utilización, se diluyó en PBS y se administró a los cultivos a una concentración final de 3  $\mu$ g/ml. Las células permanecieron en citocalasina B 12 h por el caso de las tratadas con ICRF193 o 36 h cuando el inhibidor utilizado fue ACLA.

Posteriormente, se procedió a la tripsinización de las células utilizándose 3 ml de tripsina por frasco de cultivo, incubación durante 5 minutos a 37°C y neutralización con 7ml de medio. Las células se resuspendieron muy bien para evitar la formación de grumos, se recogieron en tubos de plástico de 10 ml de fondo cónico y se centrifugaron a 1200 rpm durante 6 minutos. A continuación se eliminó el sobrenadante y el precipitado celular se resuspendió con suavidad en una solución fijadora de metanol:ácido acético glacial recién preparada (3:1 v/v), en la que se mantuvieron a 4°C al menos 10 min., tras los cuales se volvieron a centrifugar y se realizó una segunda fijación. El precipitado de la última centrifugación se resuspendió en el volumen adecuado de fijador, se tomaron algunas gotas de la suspensión de células fijadas con una pipeta Pasteur y se vertieron sobre portaobjetos de cristal humedecidos (4°C). Las preparaciones se dejaron secar en cajas de madera sobre una placa calefactora a 37°C durante al menos 24 horas. La tinción se realizó con Giemsa (Merck) al 3% en tampón fosfato Sörensen ( $\text{PO}_4\text{KH}_2$  60 mM,  $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$  60 mM, pH 6.8) durante 4-6 min. Una vez realizada la tinción, las preparaciones se dejaron secar a 37°C y se pusieron en definitivo, dándoles 2 pasos en Xilol (Panreac) antes de colocar los cubreobjetos con el medio de montaje DPX (Fluka). Para ambas líneas mantuvimos frascos de células no tratadas (controles) que se procesaron de forma paralela al resto de los frascos de células tratadas (ver figura 7).



**Figura 7. Diseño experimental**

Las células son tratadas con los inhibidores de topo II ICRF193 o ACLA. Después de retirado el tratamiento se lavan bien en PBS y se añade citocalasina B durante al menos un ciclo celular. Posteriormente, son recogidas mediante tripsinización, fijadas en metanol/acético y teñidas con Giemsa. Finalmente se contabiliza para cada tratamiento el número de micronúcleos en 1000 células binucleadas.

## 2.7 Modulación de la supervivencia celular y del daño en el ADN inducido por radiación ionizante mediante el empleo de inhibidores catalíticos de topoisomerasa II

### 2.7.1 Irradiación y formación de colonias

El ensayo de formación de colonias o ensayo clonogénico es un test clásico para evaluar el crecimiento celular después de un determinado tratamiento. Este ensayo tiene una amplia aplicación en muchas áreas de investigación incluida el área oncológica, donde

es utilizado con el propósito de valorar el poder proliferativo de líneas cancerosas después de ser sometidas a radiación y/o a la acción de diferentes sustancias químicas. Para evaluar la proliferación celular, las líneas celulares después de ser tratadas son sembradas en placas de cultivo y tras un determinado periodo de incubación, las células son fijadas, teñidas y el número de colonias (definido como un grupo de células vecinas que se piensa han crecido a partir de una célula madre) es contabilizado.

En primer lugar realizamos un estudio dosimétrico tanto en la línea parental como en el mutante radiosensible en el que utilizamos un amplio rango de dosis (1, 2, 3, 4, 5, 8, 10 y 20 Gy) con el propósito de elegir aquella que provocase un porcentaje de muerte celular similar en ambas líneas y susceptible de ser modulado. Para ello, células en crecimiento exponencial fueron recolectadas mediante tripsinización, resuspendidas en medio completo y sembradas a las concentraciones adecuadas en placas de cultivo. Después de 2 horas de incubación, tiempo necesario para que las células se adhieran individualmente al fondo de la placa de cultivo, éstas se irradiaron utilizando un equipo de rayos X modelo Philips MU 15F operado a 100 kilovoltios y a una tasa de dosis de 1Gy/min. Posteriormente se incubaron durante 7-10 días en medio completo y las colonias con 50 o más células fueron contadas como células supervivientes. Los datos de supervivencia celular se ajustaron siguiendo el modelo lineal cuadrático  $\{ \ln SF = -(\alpha D + \beta D^2) \}$ , el cual tiene dos componentes de muerte celular: uno de ellos es proporcional a la dosis ( $\alpha D$ ) y el otro es proporcional al cuadrado de la dosis ( $\beta D^2$ ). Los parámetros  $\alpha$  y  $\beta$  se determinaron mediante un análisis de regresión no lineal utilizando el programa estadístico Sigma-plot 7.0. Tres experimentos independientes se realizaron para cada línea celular y en triplicado para cada una de las dosis de radiación ensayadas.

El esquema experimental desarrollado para estudiar el efecto que una inhibición de la actividad topoisomerasa II tenía sobre supervivencia celular de células V79 o *irs2* irradiadas con RX fue el siguiente: Células de la línea parental así como del mutante radiosensible fueron sometidas a un tratamiento de tres horas con ICRF-193 (1, 2.5, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ) o con ACLA a las concentraciones de 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 y 1  $\mu\text{g/ml}$ . En los tratamientos combinados, treinta minutos antes de finalizar los tratamiento con los inhibidores de topoisomerasa, las células se irradiaron con la dosis de 5 Gy de rayos-X para la línea parental V79 o 1 Gy en el caso el mutante radiosensible *irs2*. Finalmente se procedió a retirar el tratamiento con los inhibidores y las células se incubaron de 10 a 15 días en medio completo antes de realizar el análisis de las colonias de la manera anteriormente comentada.

### **2.7.2 Irradiación y daño en el ADN**

Nuestro objetivo en este caso consistió en ver de qué manera el nivel de daño en el ADN producido por radiación ionizante se veía afectado en aquellas células V79 e *irs-2* en las que la actividad topoisomerasa II se encontraba inhibida en el momento de ser irradiadas. Para ello, se realizaron las comparaciones respectivas con aquellas otras células irradiadas pero que no habían sido tratadas con inhibidores de topoisomerasa II.

En el diseño experimental las células se trataron durante tres horas con ICRF-193 (1, 5 y 10 $\mu\text{M}$ ) o con Aclarubicina a las concentraciones de 1 y 2  $\mu\text{g/ml}$ . 30 minutos antes de finalizar los tratamientos con los inhibidores se irradiaron con 5 Gy de rayos X para ambas

líneas celulares. Finalizado el tratamiento con los inhibidores tanto las células tratadas como las controles se procesaron para el análisis del daño en el ADN mediante el Ensayo Cometa según se ha descrito en el apartado 3.2.1.

## ANEXOS :

### Anexo I

#### 1- Medio de cultivo:

Tripsina se preparó de la forma siguiente:

- De la solución salina A

NaCl	0.8 %
KCl	0.04 %
Glucosa	0.1 %
NaHCO <sub>3</sub>	0.035%
Rojo fenol	0.001%
H <sub>2</sub> O	500ml.

- De la solución B:

0.5% de tripsina 1:250 +0.25% de EDTA tetrasódico.

-Se mezcló 100ml de la solución B con 900ml de la solución A luego se pasó la mezcla por filtro de un milipor de 22µM utilizando la bomba peristáltica ,al final se congeló a-20 y se dejó hasta su uso.

#### 2-MEM:

Medio esencial *mínimo*:

Fabricado en U.K por uso *in vitro* solamente, viene en botes de 500ml, suplementado con 10% de suero fetal más 100 unidades de penicilina por 1% de L-glutamina.

#### 3-SÖRENSEN, PH=6.8.

Es un tampón fosfato, se preparó de la siguiente forma:

- Solución A:

9.08g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> .

- Solución B:

9.37g/l de NaHPO<sub>4</sub>

Una vez disueltos, se mezclaron 956.2 ml de A más 934.8 ml de la solución B. Luego se ajustó el pH a 6,8 llevándolo con KCl y se guardó en una botella oscura.

## Anexo II:

### **4- Soluciones de lisis( S.L):**

1-4 Solución de lisis (*Cometa*).

- NaCl 2.5M.
- EDTA 100mM.
- Trizma base 9mM.
- N-Laurosilsarcosinato 0.77% p/v. Disueltos en 1 de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> ajustando el pH a 10, se esterilizó y se colocó en frío.

Esta solución suplementada 10% (v/v) de DMSO y 1% (v/v) de Triton X-100 (Fluka) en el momento de utilizarla.

2-4- Solución de lisis por el electroforesis del campo pulsante (*PFGE*).

- 40 ml EDTA 0.5M.
- 1ml Proteinaza K .
- 0.8gr Sarcosil
- pH=8.

Se mezcló con agitador magnético pasándolo luego por un filtro con una jeringa y al final se congeló a -20.

3-4 Solución de lisis por la *extracción de proteínas*.

- Tris 5mM.
- EDTA 50mM.
- Triton X-100 al 0.5%. a pH=8 , se congeló a -20°C.

### **5-Solución de PBS (libre de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>) a pH=7,4.**

#### -Solución A:

Se disolvió PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>Na 1.92 g/100ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, si viene hidratado si no 1,50g en 50ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>

#### -Solución B:

PO<sub>4</sub>HNa<sub>2</sub> 2.84g/100ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. Se mezcló 19ml de A más 81ml de B +100 H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>,se ajustó el PH a 7,4 llevarlo con HCl.

Se añadió 800ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> quedando 1 l de solución 0.02M.luego se añadió 17,53g ClNa al 0.3M/litro de solución quedando 2X.

Se guardó a 4°C, dura 2<sup>a</sup> 3 meses.



### **Anexo III.**

#### **6- Soluciones de electroforesis :**

##### ***1 6-Ensayo cometa:***

EDTA 0.555g.  
NaOH 10g.  
H<sub>2</sub>O 1.5L.

Se mezclaron bien con ayuda del agitador magnético, el pH sale siempre con estas condiciones > 12, la solución se preparó el mismo día que vaya ser usada y se colocó a 4°C.

#### **7- Electroforesis del campo pulsante(PFGE).**

##### ***1-7-Tampón TBE 10X:***

Trizma base 108 g  
Ácido bórico 55 g  
EDTA 7,44g

Se completó hasta 1L con H<sub>2</sub>O, y de esta solución se hizo TBE 1X.

#### **8-Extracción de proteínas:**

##### ***1-8-TAE 50X:***

Trizma base 242g.  
Ácido glacial 27,1ml  
EDTA 0,5M 100ml, pH=8, se completó hasta 1L con H<sub>2</sub>O.

#### **9-Solución de neutralización:( *Ensayo del cometa*).**

Trizma base 0.4M  
H<sub>2</sub>O 1l.

Se ajustó el pH= A 7,5 con KCl y se esterilizó dejándolo a temperatura ambiente.

## **Anexo IV.**

### **10-Bromuro de Etidio:**

*Solución madre:* 5 µg/ml guardada a temperatura ambiente

*Solución intermedia:* 20g/ml.

Se preparan 5ml a partir de 20 µl de solución madre más 5ml de agua destilada, dura varios meses.

*Solución de uso:* 4µg/ml.

Para 1ml de solución de uso se tomó 20 µl de solución intermedia más 800µl H<sub>2</sub>O, dura sólo 2-3 días a temperatura ambiente.

### **11- DAPI (diamino-fenilindol).**

La concentración madre es de 1mg/ml, se preparó en vectashield a una concentración de 5µg/ml, alícuotado en eppendorf y guardado a -4°C.

### **12-Preparación del veneno topo II m-AMSA.**

La solución madre: 10<sup>3</sup> M.

La solución de trabajo: 10<sup>4</sup> M

Se diluyó 200µl de sol madre en 2ml de medio esencial mínimo, luego se añadió en los frascos las concentraciones correspondientes m-AMA al volumen de los frascos.

### **13- Citocalasina B.**

La citocalasina B debe estar presente en los cultivos durante un ciclo celular aproximadamente, a un concentración 3µg/ml para fibroblastos de hámster.

- La solución madre de cyt B: 2mg/ml en DMSO

- La solución de trabajo: 0.3mg/ml

Se diluyó 150µl de sol madre en 1ml de PBS y se añadió 100µl a cada frasco con 10ml de medio esencial mínimo.

## **RESULTADOS**

---

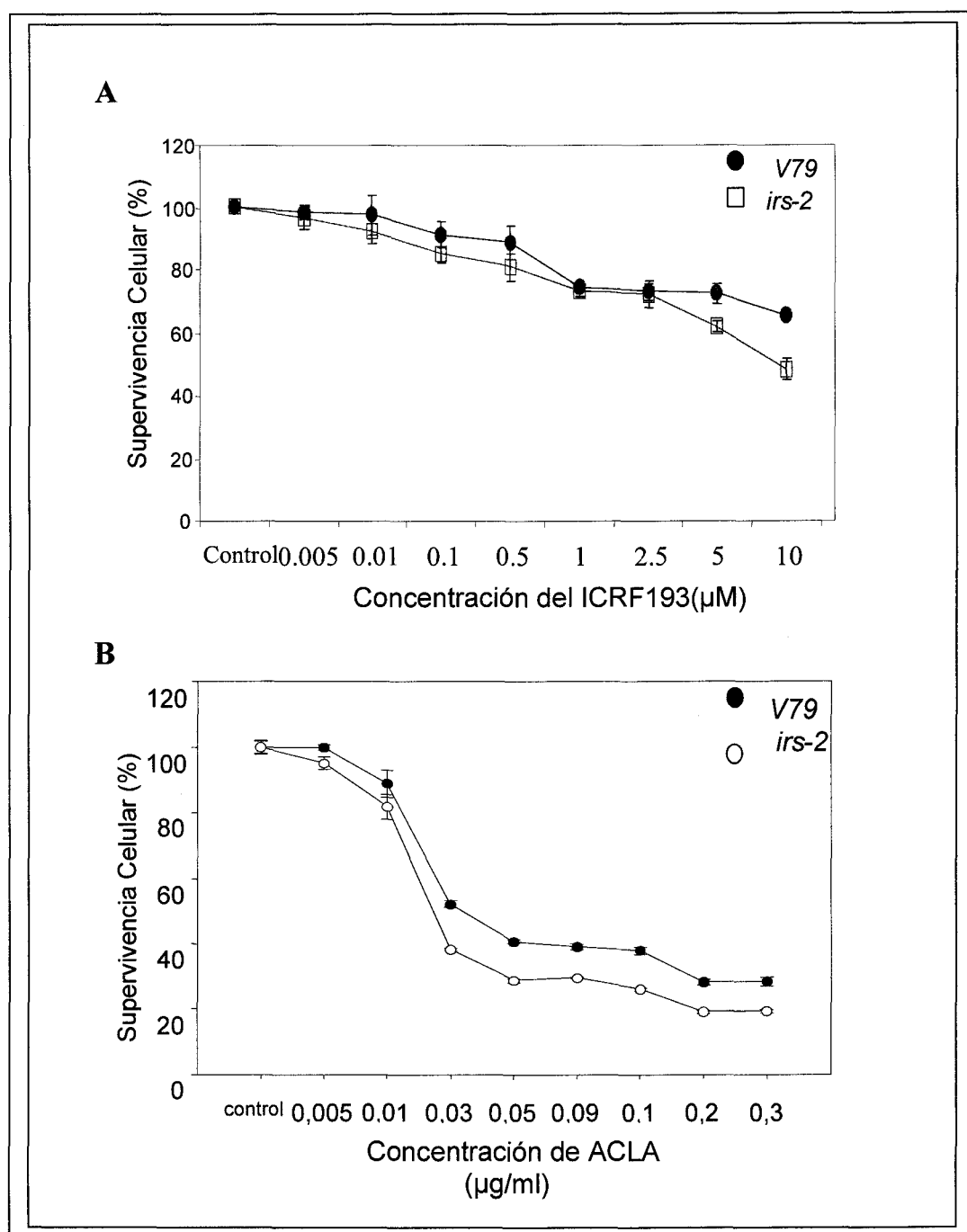
### 3-RESULTADOS

#### 3.1 ACERCA DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS INHIBIDORES DE TOPO II ICRF-193 Y ACLARUBICINA

##### 3.1.1 Análisis de los efectos que producen sobre la viabilidad celular los inhibidores de topo II ICRF-193 y ACLA

En la Figura 1 A se presentan nuestros datos experimentales sobre los efectos citotóxicos producidos por diferentes concentraciones de ICRF-193, tanto en la línea parental V79 como en su mutante radiosensible *irs2*. Dicha capacidad citotóxica fue analizada mediante el ensayo de sulforrodanina B según el procedimiento descrito en el apartado correspondiente en Material y Métodos. Los resultados presentados en la Figura.1 A muestran una disminución significativa en la viabilidad celular a partir de 0.01  $\mu\text{M}$  de ICRF-193. De una manera general, se aprecia una disminución similar en la viabilidad celular tanto para el mutante *irs2* como para la línea parental para todas aquellas concentraciones del inhibidor ensayadas inferiores a 2.5  $\mu\text{M}$ . Sin embargo para las dos concentraciones más altas estudiadas, esto es, 5 y 10  $\mu\text{M}$  de ICRF-193 observamos con claridad una mayor sensibilidad en el mutante radiosensible, hecho que se pone de manifiesto como un incremento en la pérdida de viabilidad celular en el mutante con respecto a la línea parental V79.

Por otra parte, el tratamiento de las células con diferentes concentraciones del inhibidor ACLA provocó una disminución muy significativa en la viabilidad celular a partir de la concentración de 0,01  $\mu\text{g/ml}$  de manera dosis-dependiente (Figura 1B). Como puede observarse en la Figura 1 B, para las concentraciones más altas ensayadas la viabilidad celular para ambas líneas celulares analizadas se vio reducida a valores comprendidos entre el 20 y 30%. Además, cabe destacar una clara diferencia en la sensibilidad a dicho inhibidor para la línea mutante *irs2* con respecto a la línea parental V79 para cada una de las concentraciones del inhibidor ensayadas. Esa diferencia en sensibilidad resultó ser estadísticamente significativa después de aplicar el test t-Student, para una  $p < 0,01$  (Figura 1 B).



**Figura 1.** Efectividad de los inhibidores catalíticos de la enzima topoisomerasa II (A) ICRF-193 y (B) ACLA, ambos producen una disminución en la supervivencia de las líneas celulares V79 y *irs2*. Se observa en el caso de *irs2* una hipersensibilidad para las dosis altas ( 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) del ICRF-193 y una hipersensibilidad por ACLA para las dos líneas a partir de 0.03 $\mu$ g/ml.

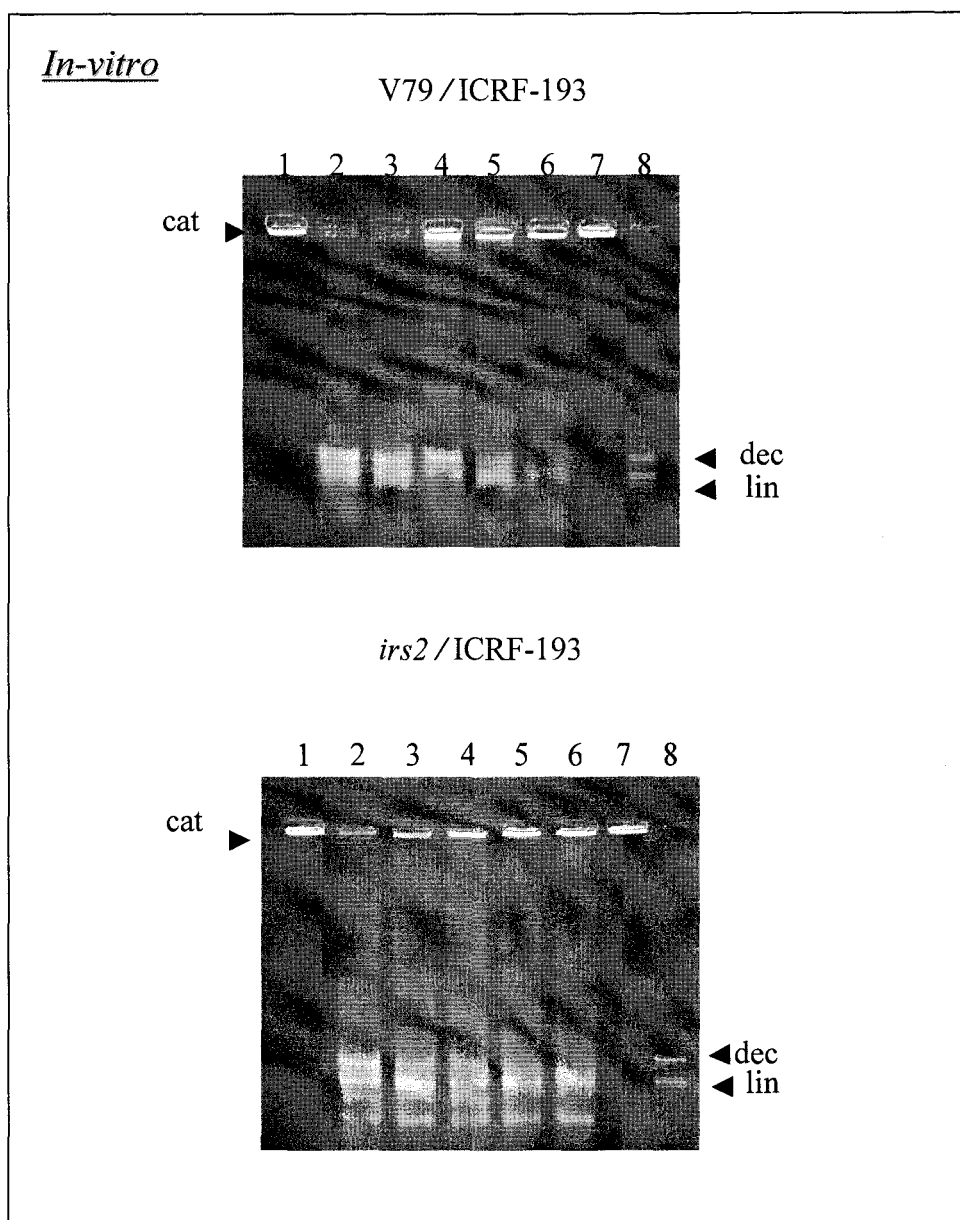
### 3.2 EFECTO DE LOS INHIBIDORES ICRF-193 Y ACLARUBICINA SOBRE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA TOPO II

La actividad catalítica topo II se valoró mediante un ensayo molecular que utiliza ADN bicatenario encadenado de cinetoplasto (kDNA) (VER MATERIAL Y MÉTODOS). La inhibición de la actividad topo II se analiza como una pérdida de la enzima topoisomerasa II en su capacidad para desencadenar dicho ADN encadenado en presencia de diferentes concentraciones de los inhibidores ICRF-193 o ACLA empleados en este estudio. Los resultados de inhibición de la actividad topoisomerasa II por ICRF-193 se muestran en las figuras 2 y 3 y los correspondientes a ACLA en las figuras 4 y 5. Las figuras 2 y 4 muestran los resultados obtenidos *in vitro*, mientras las figuras 3 y 5 corresponden a nuestros resultados de inhibición de topoII realizados *in vivo*. Como puede observarse después de realizar las respectivas comparaciones para cada uno de los inhibidores, en general no existen diferencias con respecto a los resultados de inhibición de la actividad topo II obtenidos *in vitro*; es decir, cuando extractos nucleares de células que habían crecido sin recibir tratamiento alguno se incubaron con distintas concentraciones del inhibidor, e *in vivo*, en este caso, cuando el inhibidor se adiciona al medio de cultivo donde las células estaban creciendo y posteriormente se extraían las proteínas nucleares.

Cuando analizamos la actividad topo II con el inhibidor ICRF-193 (Figuras 2 y 3) puede apreciarse como en ausencia de la droga (columna 2) la actividad topo II presente en los extractos nucleares tanto de V79 como de *irs2* es capaz de desencadenar eficientemente el ADN de doble cadena encadenado de cinetoplasto. También a partir de ambas figuras puede observarse como a medida que aumenta la concentración de ICRF-193 se produce un aumento paralelo en la inhibición de la actividad catalítica topo II para ambas líneas celulares (columnas 3-7). Sutiles diferencias pueden observarse en cuanto al patrón de inhibición que presentan ambas líneas celulares. En este sentido, la concentración más baja de ICRF-193 capaz de inhibir la actividad catalítica topo II fue de 1  $\mu\text{M}$  para la línea parental y de 0.5  $\mu\text{M}$  en el caso del mutante *irs2* cuando el ensayo se realizó *in vitro* (comparar columnas 2 y 3 en figura 2). Sin embargo, cuando el ensayo de actividad topo II se realizó *in vivo* la concentración más baja capaz de inhibir la actividad topo II fue para ambas líneas de 1  $\mu\text{M}$ . También para

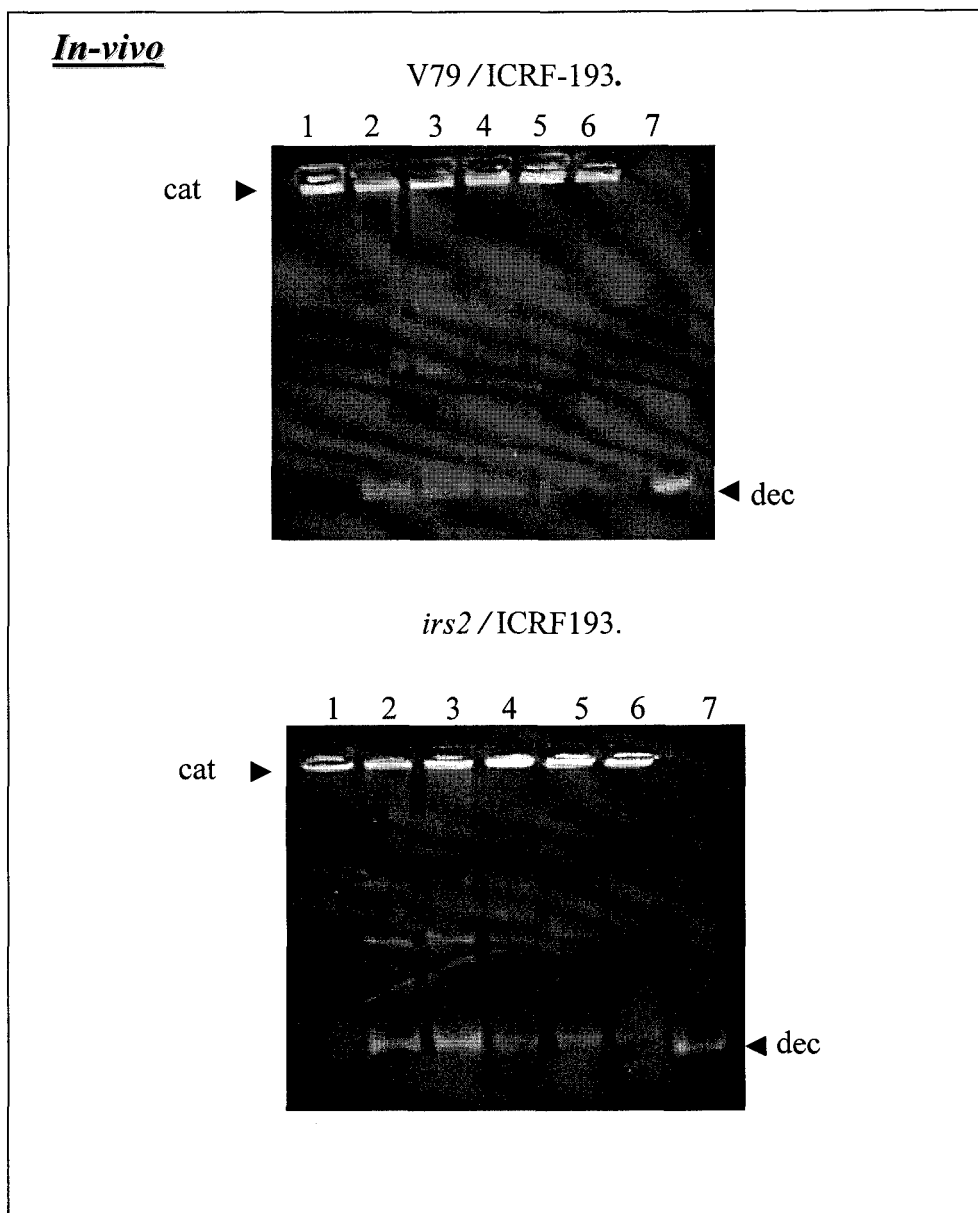
ambas líneas celulares, se consiguió una inhibición total de la enzima cuando la concentración del inhibidor era de 10  $\mu$ M.

Los resultados presentados en las Figuras 4 y 5 (columnas 2 a 7) muestran como la inhibición de la actividad topo II en presencia del inhibidor ACLA aumenta de forma paralela a medida que lo hace la concentración del inhibidor presente en el extracto celular, observándose por lo tanto un comportamiento dosis-dependiente para ambas líneas celulares. Nos gustaría señalar que todas las concentraciones de ACLA ensayadas tuvieron capacidad para inhibir en mayor o menor grado la actividad catalítica topo II. Además, la concentración de 2  $\mu$ g/ml mostró un efecto inhibitorio casi total de la actividad catalítica de la enzima topoisomerasa II.

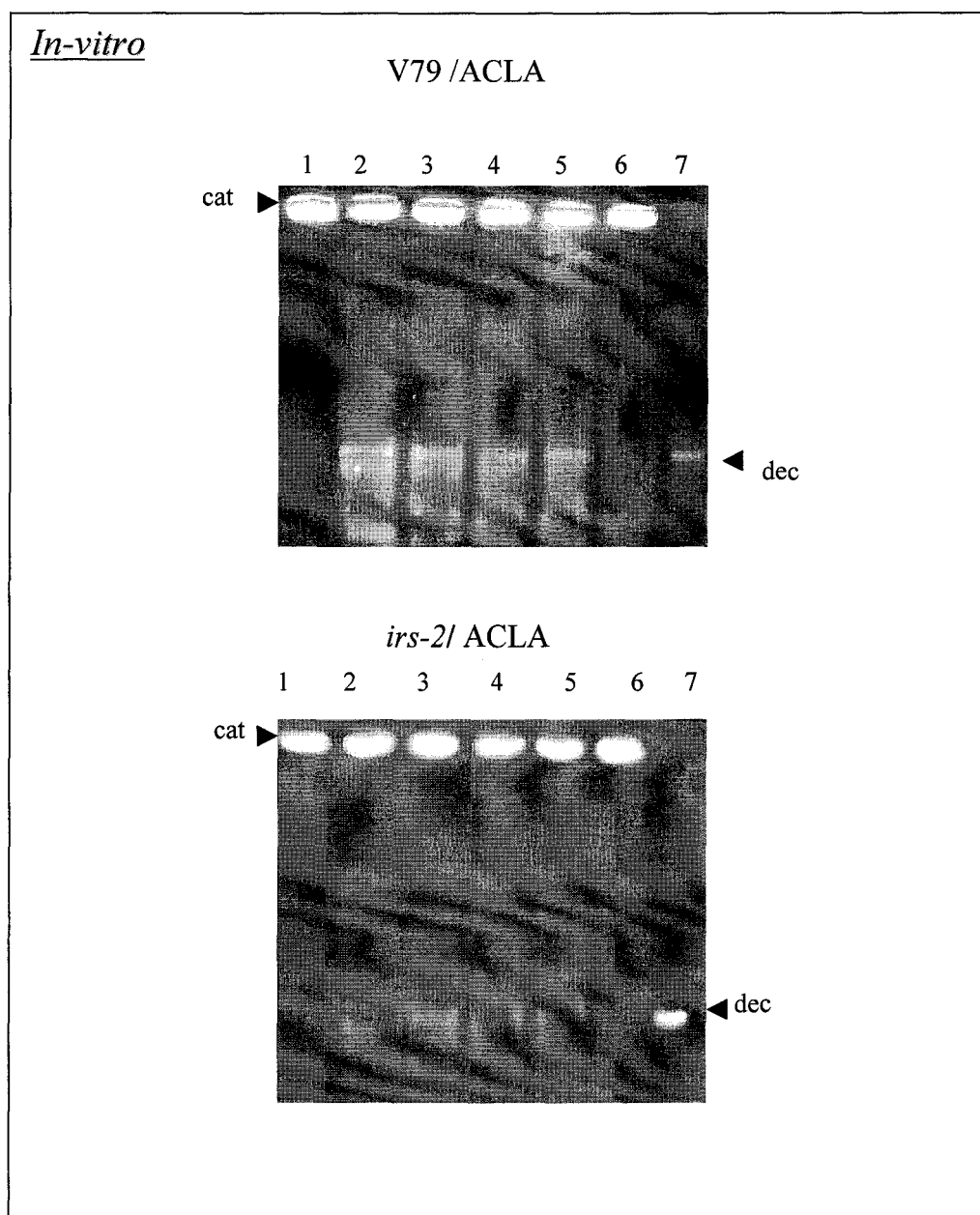


**Figura 2.** Efecto del ICRF-193 La actividad catalítica de la topoisomerasa II de la línea V79 y su mutante *irs-2*. 1-ADN-encadenado, 2- respectivamente, control V79 y *irs2*, 3- 0.5  $\mu$ M de ICRF-193, 4- 1  $\mu$ M de ICRF193, 5- 2.5  $\mu$ M de ICRF193, 6- 5  $\mu$ M de ICRF193 , 7-10  $\mu$ M de ICRF-193, 8- ADN Desencadenado: dec- ADN-desencadenado de cinetoplasto (Kit) ); lin-ADN lineal.

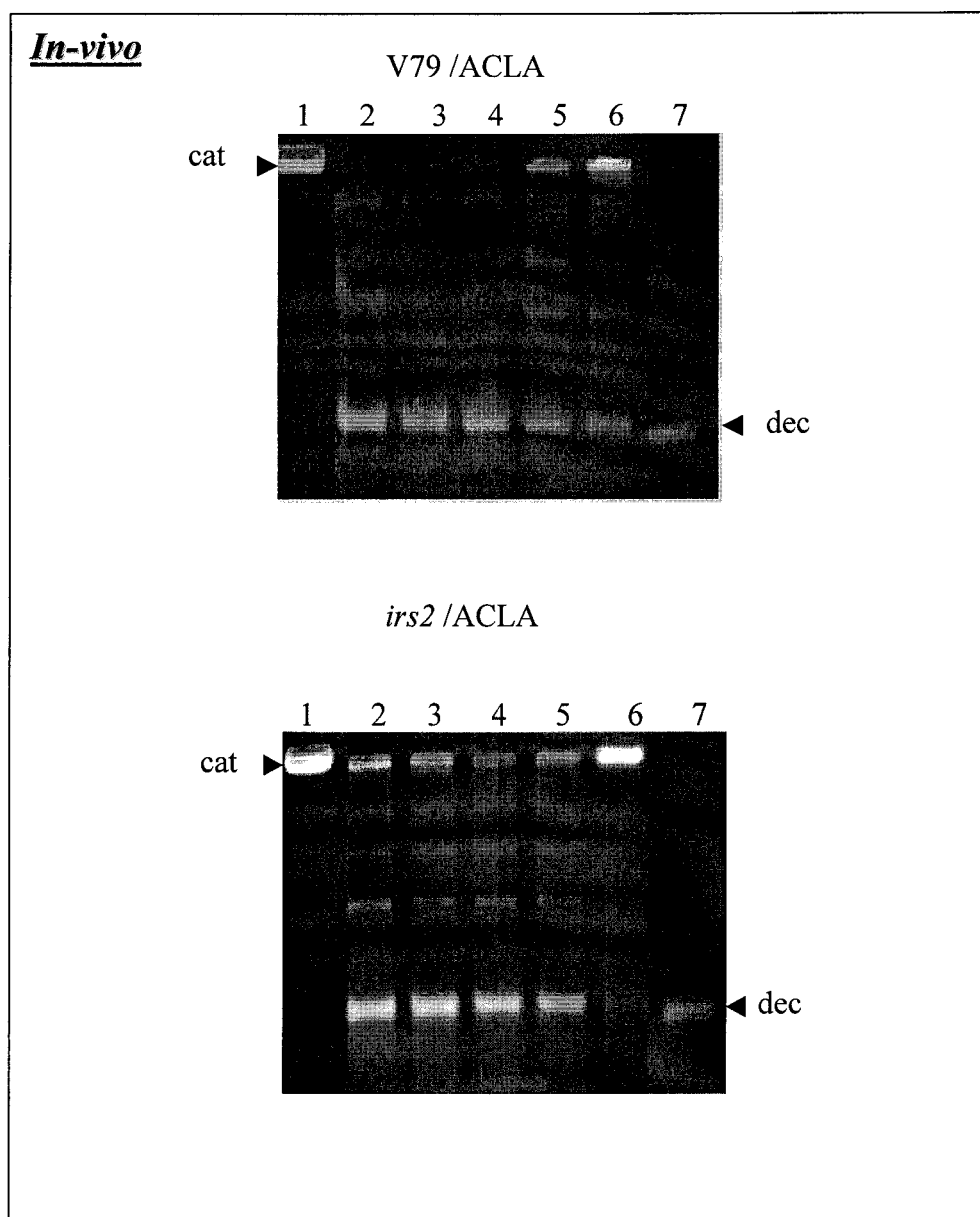




**Figura. 3.** Ensayo *in vivo* de la actividad catalítica de topo II de las líneas V79 y *irs2*, ICRF-193 mostró la capacidad de inhibir la actividad catalítica de la enzima topo II. 1- ADN-encadenado, 2- respectivamente, control V79 y *irs-2*, 3- 0.5  $\mu\text{M}$  de ICRF-193, 4- 1  $\mu\text{M}$  de ICRF193, 5- 2.5  $\mu\text{M}$  de ICRF-193, 6- 5  $\mu\text{M}$  de ICRF-193, 7- ADN Desencadenado: dec- ADN-desencadenado de cinetoplasto (Kit)



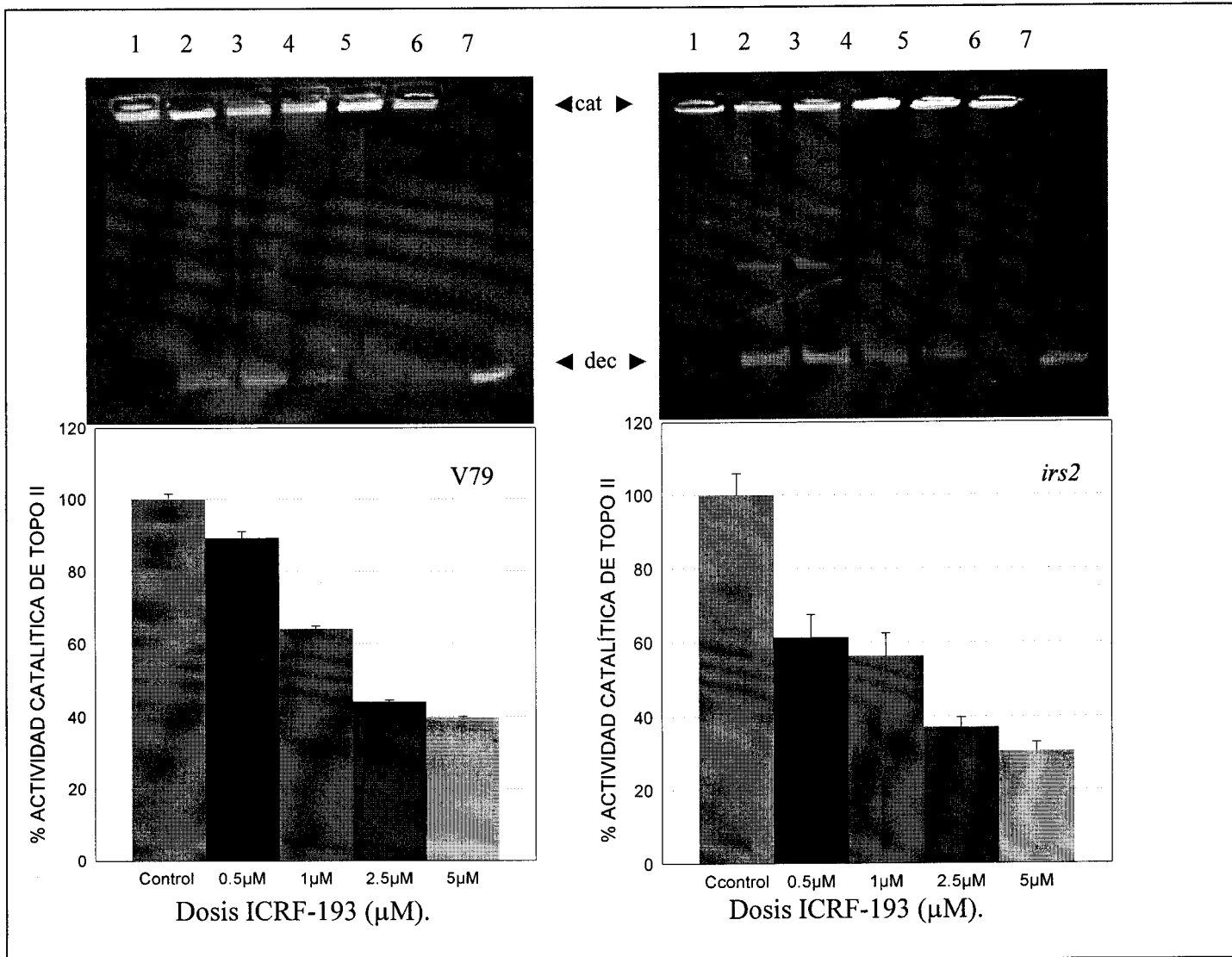
**Figura 4 .-** La actividad catalítica de la topoisomerasa II de la línea V79 y *irs2* inhibida por ACLA *in vitro*. 1- ADN-encadenado, 2- respectivamente, control V79 y *irs2*, 3- (0,05 µg/ml), 4- 0.1 µg/ml, 5- 1 µg/ml , 6- 2 µg/ml ., 7- ADN Desencadenado: dec- ADN- desencadenado de cinetoplasto (Kit) .



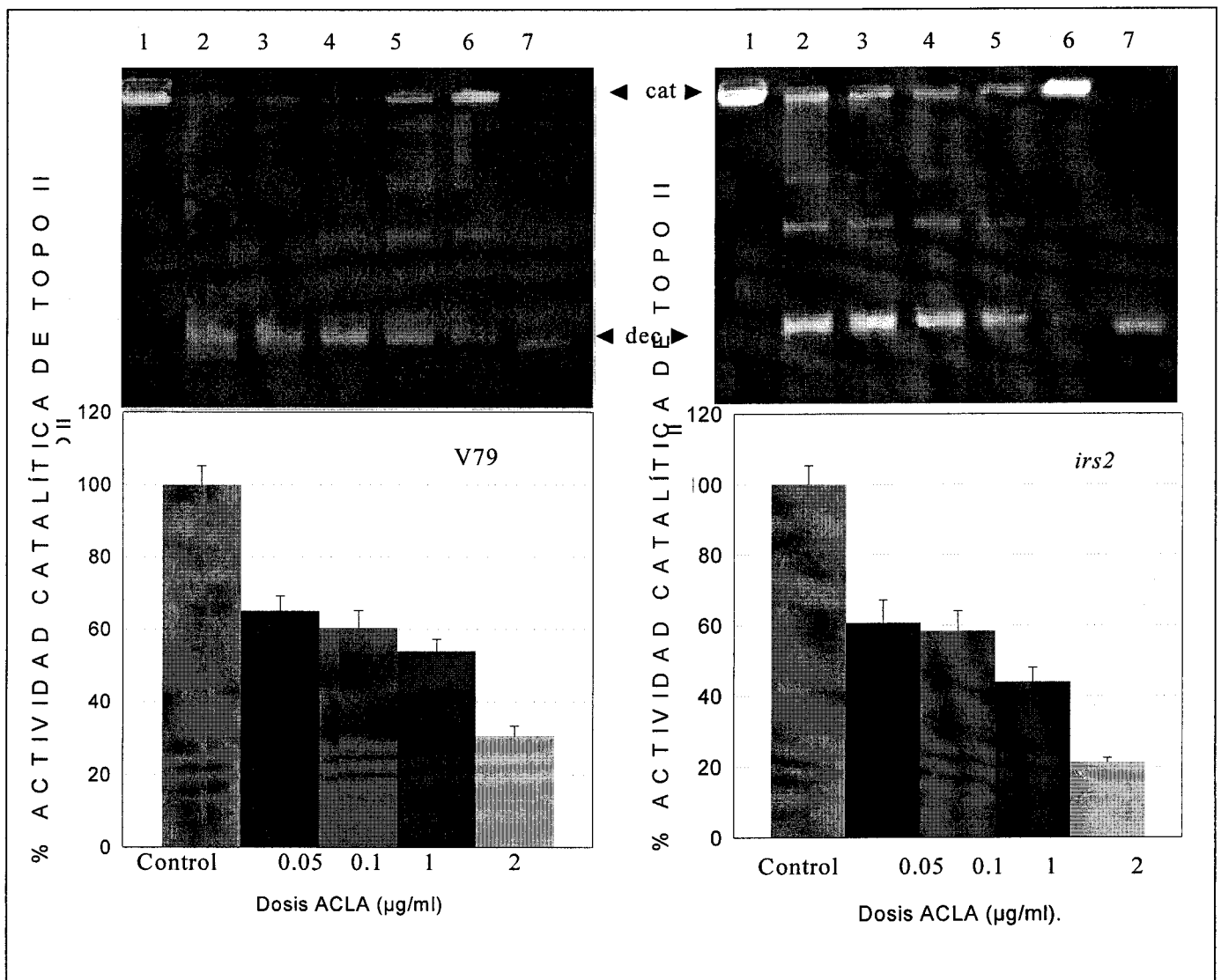
**Figura. 5 .** La actividad catalítica de la topoisomerasa II de la línea V79 y *irs2* inhibida por ACLA *in vivo*. 1- ADN-encadenado, 2- respectivamente, control V79 y *irs2* , 3- 0,05 µg/ml, 4- 0.1 µg/ml, 5- 1 µg/ml, 6- 2 µg/ml , 7- ADN Desencadenado: dec- (ADN- desencadenado de cinetoplasto (Kit) ).

En las Figuras 6 y 7, se presentan los resultados después de proceder al análisis densitométrico de los geles de actividad de la topoisomerasa correspondientes a los ensayos realizados, *in vivo*, para la inhibición producida por ACLA e ICRF-193. La cuantificación se realizó con el programa “Imagen J” utilizado por el National Institute of Health (USA). Los valores correspondientes a los porcentajes de inhibición de la actividad de la topoisomerasa II muestran una inhibición dosis-dependiente con respecto al tratamiento con ICRF-193 o ACLA, y además sin la existencia de diferencias apreciables en el patrón general de inhibición para ambas líneas celulares.

En la Figura 6, se muestra con claridad el patrón de dosis-dependencia de la inhibición producida por ICRF-193 y cómo los porcentajes de inhibición se aproximan al 60% para la concentración 5  $\mu$ M. Este patrón de inhibición dosis-dependiente también se observa con claridad para el caso del inhibidor ACLA (Figura.7). Puede apreciarse en la figura cómo dosis tan bajas como 0.05  $\mu$ g/ml son capaces de producir una inhibición de alrededor de un 40% con respecto a sus controles. De acuerdo con estos resultados, diferentes intervalos de dosis fueron seleccionados para aquellos experimentos diseñados con el propósito de conocer los efectos citotóxicos de ambos inhibidores en nuestras líneas celulares.



**Figura. 6.** Cuantificación de los geles de la actividad catalítica de la topo II. Dicha estimación se realizó con el programa Imagen J, y los datos fueron tratados estadísticamente con el programa SigmaPlot 8.0 y representados en la gráfica. Como se puede apreciar, las dosis escogidas de ICRF-193 resultan efectivas, ejerciendo una inhibición gradual en paralelo al aumento de la dosis.



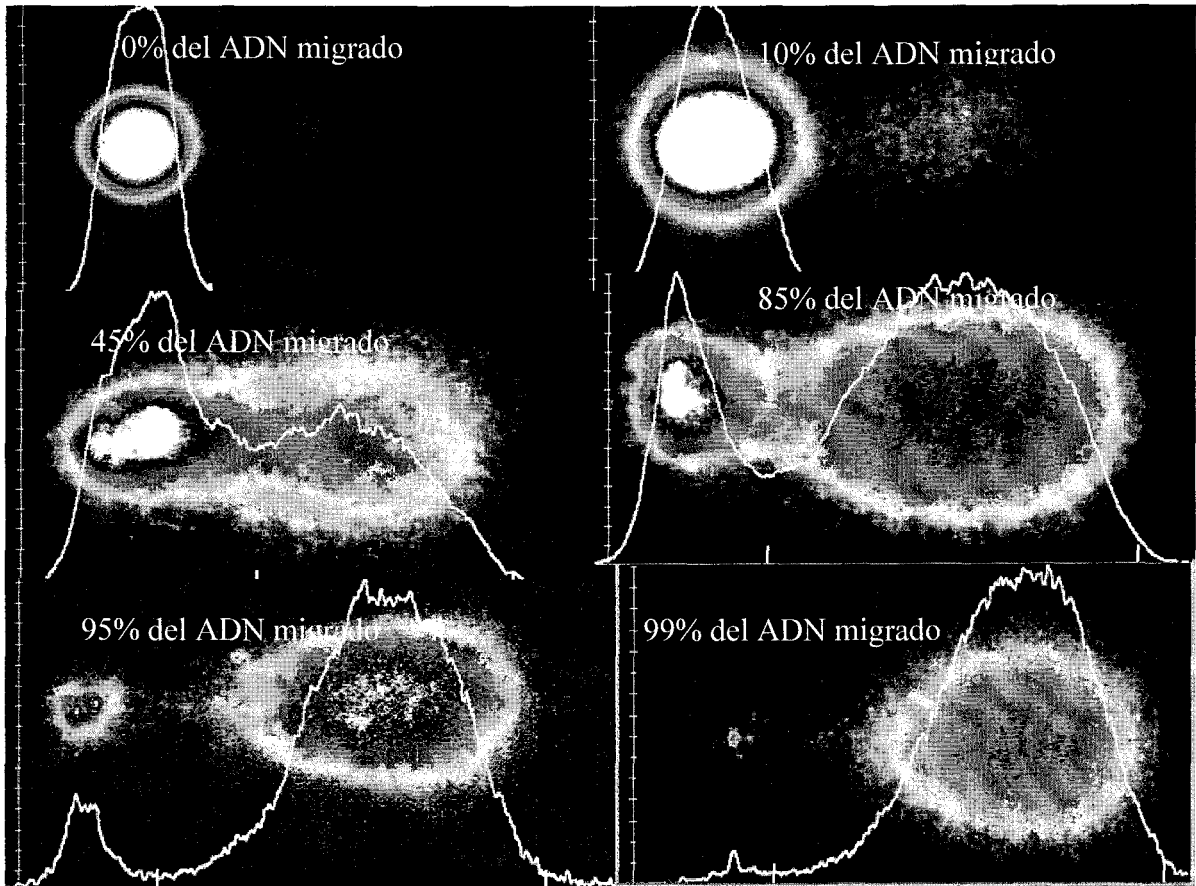
**Figura 7.** Cuantificación de los geles de la actividad catalítica de la topo II. Se realizó con el programa Imagen J, de modo que los datos fueron tratados estadísticamente con el programa SigmaPlot 8.0 y representados en la gráfica. Como se puede observar, las dosis escogidas de ACLA fueron efectivas, ejerciendo una inhibición gradual desde las dosis más bajas hasta una inhibición clara para la dosis 2 µg/ml,

### **3.3 ACERCA DE LA ACCIÓN GENOTÓXICA DEL ICRF-193 Y LA ACLARUBICINA**

#### **3.3.1 Resultados utilizando el Ensayo Cometa para la cuantificación del daño producido en el ADN**

Como técnica microelectroforética este ensayo rápido, sensible y reproducible, permite visualizar el daño en el ADN tras el tratamiento con diferentes mutágenos en células aisladas y posibilita hacer una valoración cuantitativa de dicho daño (Östling y Johanson, 1984; Fairbairn y cols., 1995). Las condiciones electroforéticas empleadas en nuestro caso, dada la elevada alcalinidad, sólo permiten una cuantificación general del daño a nivel de ADN en donde se incluyen tanto roturas de cadena simple como dobles así como sitios lábiles al álcali (ver material y métodos pagina 57, 2.4.1).

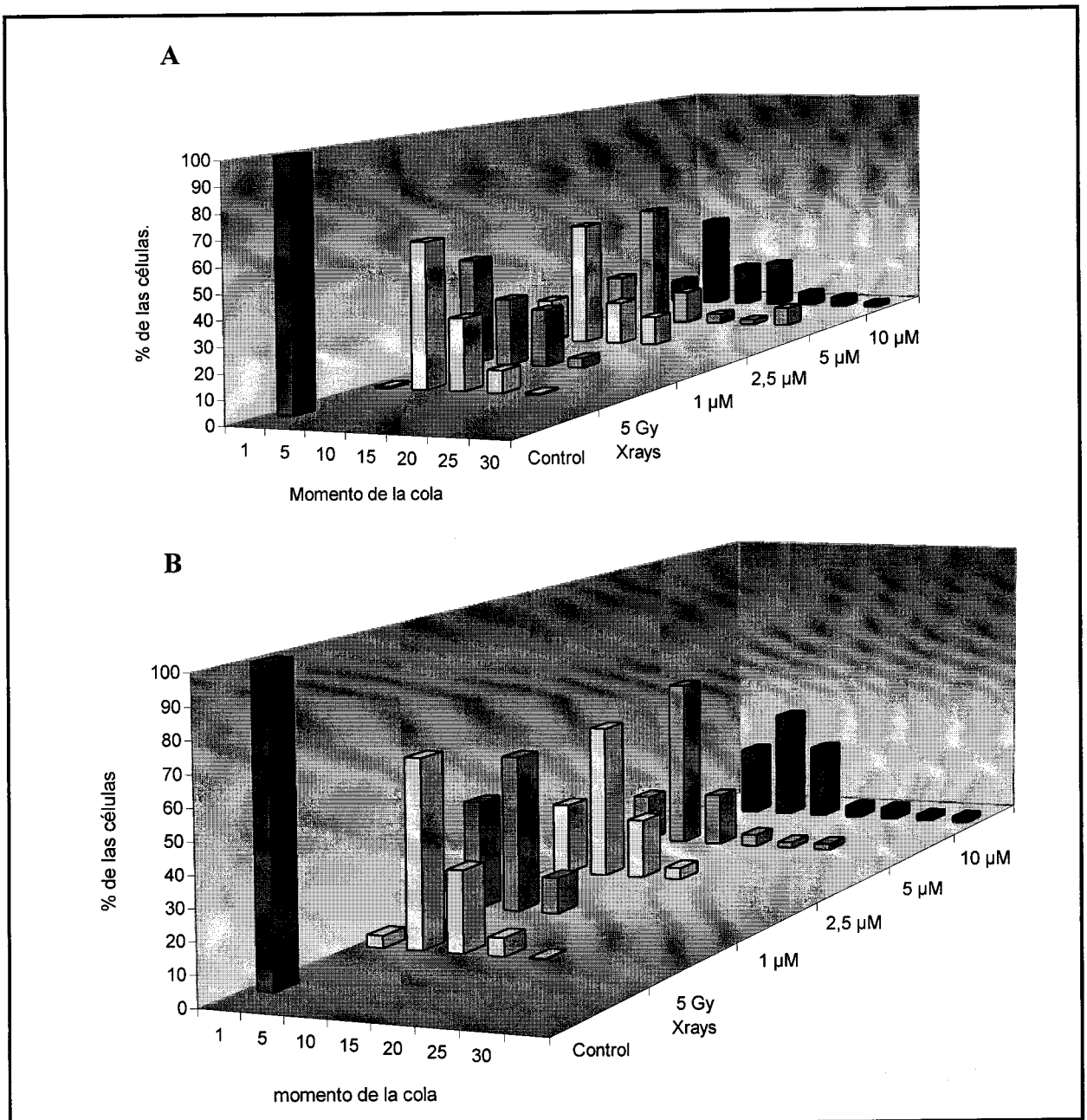
El efecto que produce una corriente eléctrica continua sobre el ADN dañado en una célula consiste en una separación de los fragmentos más pequeños (ADN dañado) de aquellos otros de mayor tamaño (ADN no dañado), la imagen resultante tiene el aspecto de un cometa (figura 8 ). El cometa estaría constituido por una cabeza, mas o menos densa, integrada por ADN no dañado y una cola más o menos larga (según la intensidad del daño), constituida por fragmentos de ADN mono y bicatenarios que se desplazan hacia el ánodo como consecuencia de sus cargas negativas (Figura 1). El parámetro empleado para la cuantificación del daño inducido en el ADN fue el momento de la cola (ver material y métodos pagina 59, Figura 3)



**Figura 8. Aspecto de los núcleos tras el ensayo del cometa.** Tras la lisis celular y la electroforesis los núcleos control tienen un aspecto redondeado, mientras que los dañados adquieren la forma de un cometa, ya que los fragmentos de ADN migran hacia el ánodo.

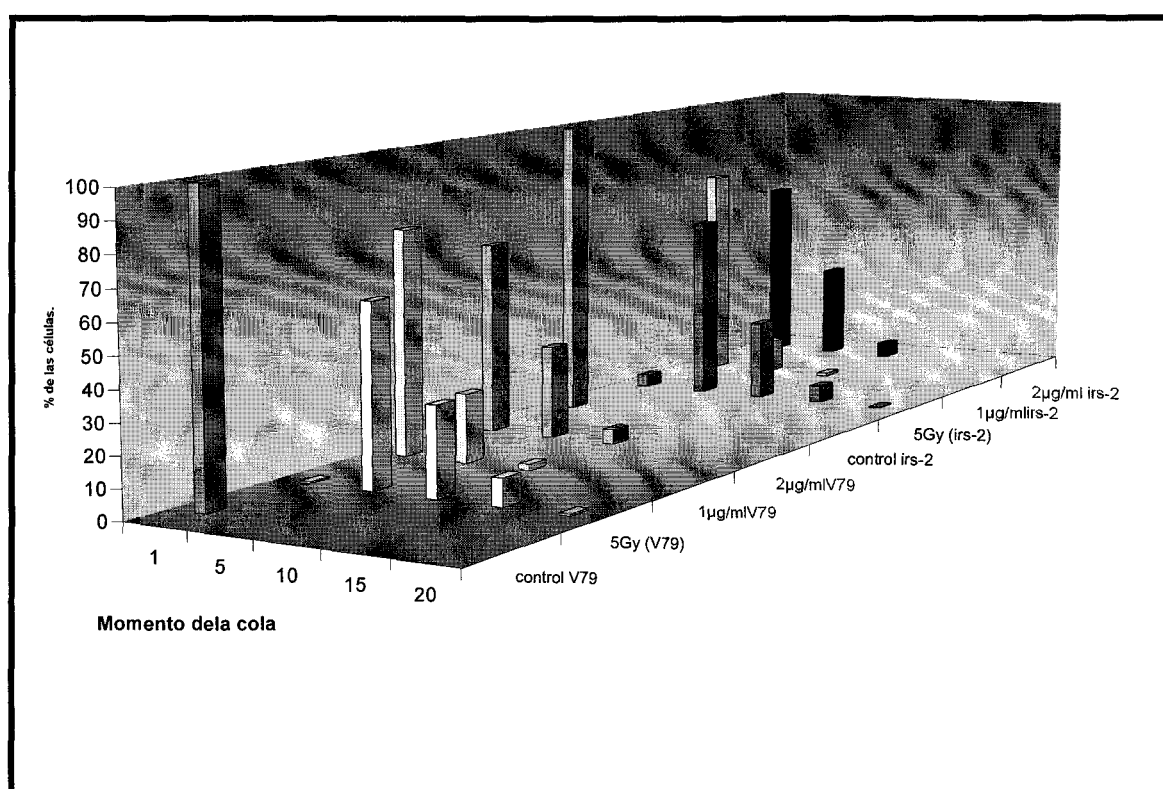


Las Figuras 9 y 10 muestran los resultados obtenidos tras realizar el ensayo del cometa en células V79 e *irs2*, tratadas durante tres horas con diferentes concentraciones de los inhibidores ICRF-193 o Aclarubicina respectivamente. Las células fueron procesadas inmediatamente después para el análisis del daño en el ADN, a tiempo 0h, en condiciones de ausencia de reparación. En la Figura 9 puede observarse un claro incremento de los momentos de las colas de los cometas (parámetro que proporciona una medida de la fragmentación del ADN) tanto en células V79 (Figura 9A) como en su mutante *irs2* (Figura 9B) después del tratamiento con ICRF-193 a concentraciones comprendidas entre 1 y 10  $\mu\text{M}$ . Como control positivo hemos utilizado el daño producido por una dosis de 5 Gy de radiación ionizante (rayos-X). Esta dosis de radiación ha sido comparada con las distintas concentraciones de ICRF-193 con el propósito de realizar equivalencias con respecto al daño producido en el material genético. Los resultados muestran niveles inferiores en la inducción de daño en el ADN para las concentraciones de 1 y 2.5  $\mu\text{M}$  de ICRF-193 con respecto al producido por 5 Gy de rayos X. En cambio, las concentraciones de 5 y 10  $\mu\text{M}$  de ICRF-193 producen resultados niveles superiores de daño en el ADN. En la Figura 9 también vemos con claridad como el mutante radiosensible *irs2* no muestra mayor sensibilidad al daño en el ADN inducido por ICRF-193 que su correspondiente línea parental V79, tal como se pone de manifiesto por presentar valores similares de los momentos de la cola para cada una de las dosis ensayadas (comparar Figuras 9A y B).



**Figura 9.** Efectividad de diferentes dosis del inhibidor “catalítico” de topoisomerasa II ICRF-193, en la inducción de daño tanto en V79(A) y en su mutante *irs2* (B). Observaciones realizadas con el ensayo del cometa.

Del mismo modo se analizó la capacidad del inhibidor ACLA para producir daño en el ADN. Nuestros resultados muestran que 3 horas de tratamiento con esta antraciclina fue efectivo para inducir daño en el ADN (Figura 10), aunque los valores del momento de la cola no superaron aquellos niveles obtenidos para el control positivo correspondiente a una dosis de 5 Gy de rayos X. En la figura podemos observar cómo los momentos de la cola obtenidos para la concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ACLA fueron menores que aquellos observados en el control positivo. Sin embargo, se alcanzaron valores similares



**Fig.10.** Efectividad de las dosis 1 y 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ACLA, sobre la inducción de daño inicial en el material genético en V79 y su mutante *irs2*. El efecto de una dosis de 5 Gy de rayos-X se utilizó como control positivo.

cuando la concentración utilizada de ACLA fue de 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Nuestros resultados están en buena correspondencia con aquellos otros obtenidos por Gieseler y cols en 1999, acerca de la capacidad de este inhibidor para inducir daño en el ADN en células mieloides humanas utilizando el ensayo cometa para el análisis del daño. Por otra parte, no hemos observado ninguna diferencia significativa entre la línea parental V79 y su mutante radiosensible *irs2* en relación con la producción de daño en el ADN. En relación a ello,

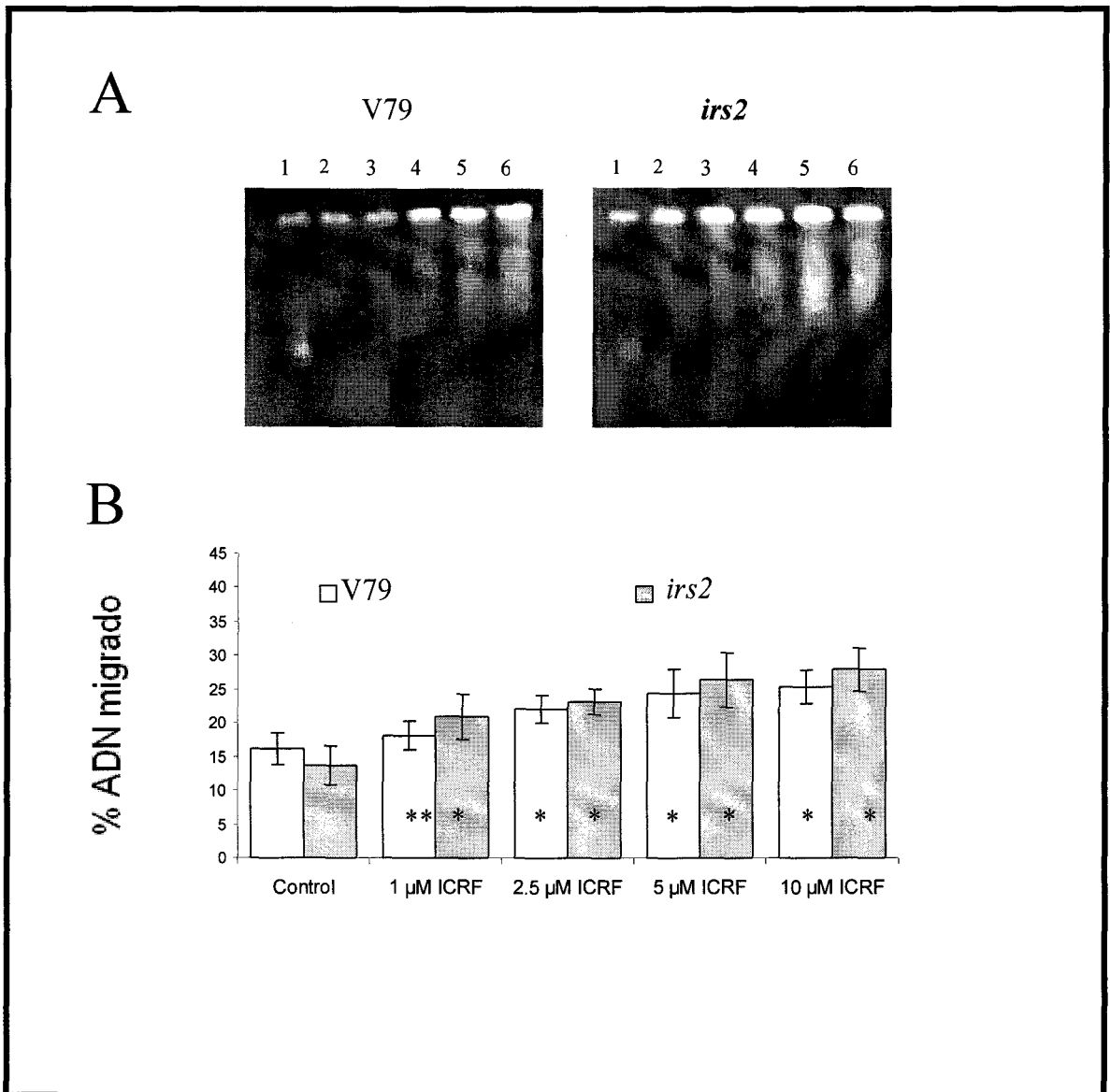
puede observarse como ambas líneas celulares muestran un perfil muy similar en la distribución de los momentos de la cola para las concentraciones de ACLA ensayadas (Figuras 10).

### **3.3.2 Resultados utilizando Electroforesis de Campo Pulsante (PFGE) para la cuantificación de roturas de doble cadena inducidas en el ADN por ICRF-193 y valoración de este inhibidor como “veneno de topoisomerasa II”.**

Como hemos comentado en la introducción de esta Tesis existen datos que apuntan a que el ICRF-193 en su modo de acción no actuaría como un puro inhibidor catalítico como se pensaba hasta hace poco (T. Andoh y col., 1998) y, como consecuencia esto llevaría a la producción de daño en el ADN. Los resultados presentados anteriormente utilizando el Ensayo Cometa, demuestran claramente a nivel molecular la producción de daño en el ADN por el ICRF-193, hecho que por otra parte, había sido previamente señalado por otros autores (J. Roca y col., 1994). Los resultados que presentamos a continuación fueron realizados con el principal propósito experimental de conocer con la mayor precisión posible, si este inhibidor catalítico de topo II ICRF-193 era capaz o no de producir DSB en el ADN. Este parámetro molecular de daño en el ADN fue elegido en base a la gran importancia que tiene este tipo de lesión en relación con los procesos de muerte celular mitótica (M. Mareková y col., 2003). Por tanto, quisimos estudiar dicho parámetro para posteriormente ver si era posible o no establecer algún tipo de relación entre producción de DSB y muerte celular mitótica. Un segundo objetivo que complementa a este primero consistió en conocer si el mutante radiosensible *irs2*, presentaba una mayor sensibilidad a este inhibidor, de manera similar a aquella que presenta cuando se utilizan venenos de topoisomerasa II. (L.F. Liu y col., 1989)

La capacidad del inhibidor de topoisomerasa II ICRF-193 para producir daño en el ADN fue confirmada mediante Electroforesis de Campo Pulsante, técnica molecular que bajo las condiciones utilizadas en este estudio, específicamente nos permite detectar de manera específica roturas de doble cadena en el ADN. Los resultados presentados en la Figura 11 muestran la cantidad total de ADN que migra de los pocillos durante la electroforesis después de tres horas de tratamiento con diferentes concentraciones de

ICRF-193 tanto en V79 como en la línea radiosensible *irs2*. Los resultados muestran con claridad una producción de roturas de doble cadena dependiente de la concentración utilizada de inhibidor. Este efecto se puede observar para ambas líneas celulares y se visualiza como una mayor cantidad de ADN que sale fuera de los pocillos a medida que la concentración del inhibidor aumenta. En la figura 11 B se ha realizado una representación esquemática de los correspondientes porcentajes de ADN que migran fuera de los pocillos de electroforesis con respecto al total de ADN en cada pocillo. Dicho análisis densitométrico (ver material y métodos Pagina 61, 2.4) nos permite ver con claridad cómo la extensión del daño (número de DSB producidas) provocado por ICRF-193 en la línea parental es consistentemente inferior a aquel originado en la línea mutante para cada una de las dosis ensayadas.



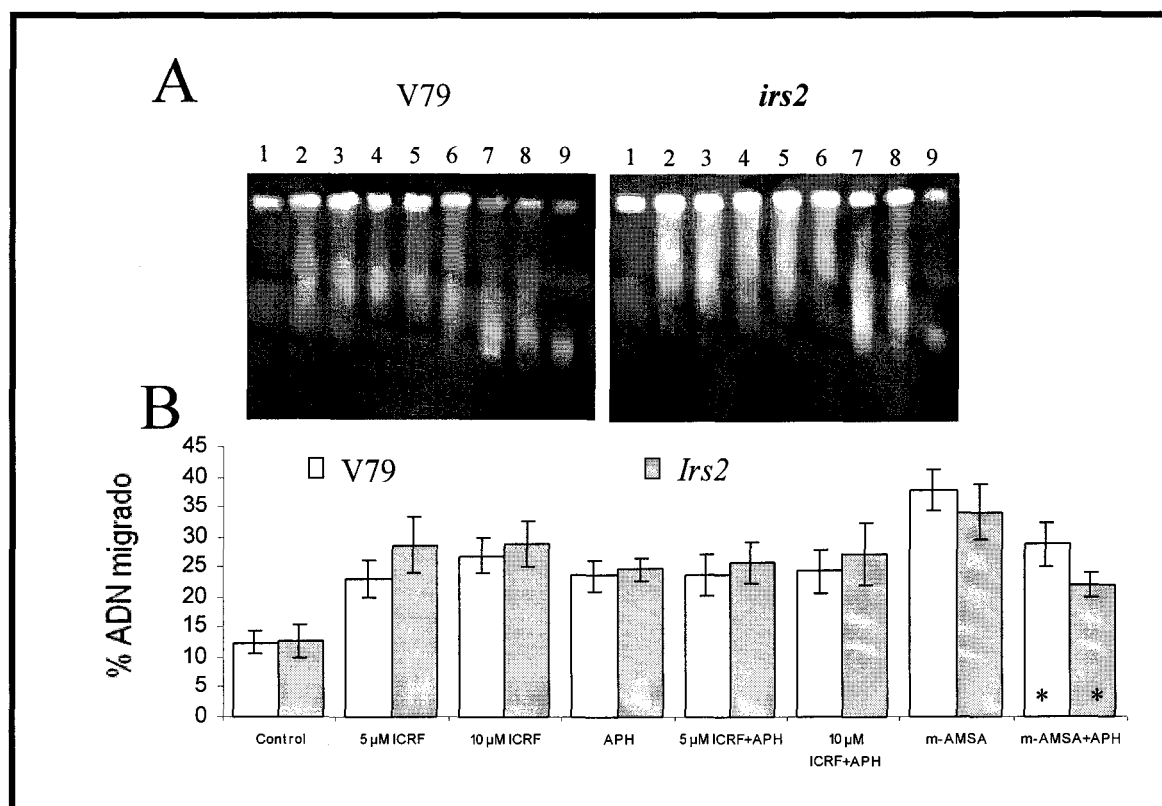
**Figura. 11**

Cuantificación de las roturas de doble cadena en el gel de electroforesis de campo pulsante, en las líneas celulares V79 □ y *irs2* ■, expuestas previamente a dosis (0.1, 2.5, 5 y 10  $\mu$ M del ICRF-193). (A) representa geles PFGE después de tres experimentos independientes. Calle 1: *S. cerevisiae* DNA marcador; calle 2: control no tratado; calle 3–6: células expuestas a dosis 1, 2.5, 5 y 10  $\mu$ M del ICRF-193. (B) Análisis de PFGE de las roturas inducidas por el ICRF-193. Los resultados fueron representados por porcentajes de ADN migrado de los pocillos, que es proporcional a la cantidad de R.D.C. Cada columna representa la media de tres experimentos independientes. (\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.002$ , de acuerdo con el *t*-test Student).

Todos estos resultados en su conjunto podrían ser interpretados como pruebas experimentales de que la unión del ICRF-193 a la topoisomerasa II causaría un envenenamiento de la enzima similar a aquel observado cuando venenos típicos de topoisomerasa II como el m-AMSA son utilizados (L.F. Liu y col., 1989; Y. Chen 1994). Para la valoración de este inhibidor como veneno de topoisomerasa desarrollamos la siguiente hipótesis experimental: *En el caso de que el ICRF-193 funcione como un veneno de topoisomerasa entonces esperaríamos una disminución en la producción de RDC cuando el inhibidor fuera aplicado a las células simultáneamente con un inhibidor de síntesis replicativa de ADN. La razón de ello es que la capacidad que tienen los venenos de topoisomerasa para producir daño en el ADN está relacionada con colisiones con horquillas de replicación en movimiento*(Cortés y col., 1993).

Para examinar este posible mecanismo de envenenamiento realizamos una serie de experimentos en los que las células V79 e *irs2* fueron tratadas durante 3 horas con ICRF-193 y se compararon con aquellas tratadas con ICRF-193 y el inhibidor de síntesis replicativa de ADN afidilcolina. Además como control positivo utilizamos el veneno clásico de topo II m-AMSA. Finalmente realizamos las correspondientes mediciones después de someter las células en las diferentes condiciones experimentales a PFGE para la cuantificación de la producción de RDC. Nuestros resultados presentados en la Figura 23A y B muestran como la cantidad de ADN que migra fuera de los pocillos (que representa una medida de la producción de RDC) fue claramente superior en las células (tanto de la línea parental como mutantes) tratadas exclusivamente con m-AMSA que en las tratadas con el inhibidor mas afidilcolina al mismo tiempo. Estos resultados están de acuerdo con lo esperado para un veneno de topo II y que por otra parte se corresponden bien con observaciones previas realizadas utilizando células CHO (F. Cortés y col., 1993). Sin embargo nuestros resultados no mostraron ninguna reducción significativa en la cantidad de ADN que migra fuera de los pocillos cuando el inhibidor ICRF-193 fue administrado junto con afidilcolina (Figura 23 A y B) con respecto a aquellas células que fueron tratadas exclusivamente con el inhibidor. En resumen, estos resultados indican con claridad que la producción de

RDC inducida por ICRF-193 es independiente de las colisiones que se producen entre horquillas de replicación en movimiento y el complejo enzima-inhibidor.



**Figura 23.** Influencia de la inhibición de la síntesis de ADN con afidicolina (APH) sobre la inducción de las roturas de doble cadena por el ICRF-193 o *m*-AMSA en las células V79 □ y *Irs2* ■ (A) geles de PFGE. Calle 1: control células no tratadas; Calle 2 y 3: células expuestas a 5 y 10 μM del ICRF-193 sólo; Calle 4: células tratadas con 10 μM APH sólo; Calle 5 y 6: células expuestas a 5 μM o 10 μM ICRF-193 y simultáneamente con APH; Calle 7: células expuestas a 2 μM de *m*-AMSA; Calle 8: células con 2 μM de *m*-AMSA más APH; Calle 9: DNA marcador *S. cerevisiae*. (B) Análisis de PFGE cuantificando el efecto de APH en la generación de las roturas de doble cadena por el ICRF193, o bien con *m*-AMSA. Los resultados se expresan con el porcentaje del ADN migrado. Cada columna representa la media de tres experimentos independientes.

La comparación fue realizada entre las muestras tratadas con APH + ICRF-193 y APH + *m*-AMSA y respectivamente con sus correspondientes de los inhibidores solos. La estadística fue evaluada por el test-Student. La presencia de APH no influye la inducción de RDC por el ICRF-193 ( $P > 0.2$ ). En cambio la generación de las RDC por *m*-AMSA fue observada afectada con este inhibidor cuando esta administrado con la APH ( $*P < 0.001$ ).



### 3.3.3 Resultados utilizando el ensayo de micronúcleos en células binucleadas para realizar un análisis a nivel cromosómico del daño en el ADN provocado por los inhibidores ICRF-193 y Aclarubicina

El estudio de las posibles diferencias entre línea parental V79 y la mutante *irs2*, en su comportamiento frente a la recuperación del daño en el ADN inducido por los inhibidores ICRF-193 y ACLA, fue llevado a cabo mediante la utilización de un test citogenético, que permite valorar el daño a nivel cromosómico a través del recuento del número de micronúcleos presentes en células binucleadas (ver material y métodos pagina66 , 2.6.1 y Figura 15).

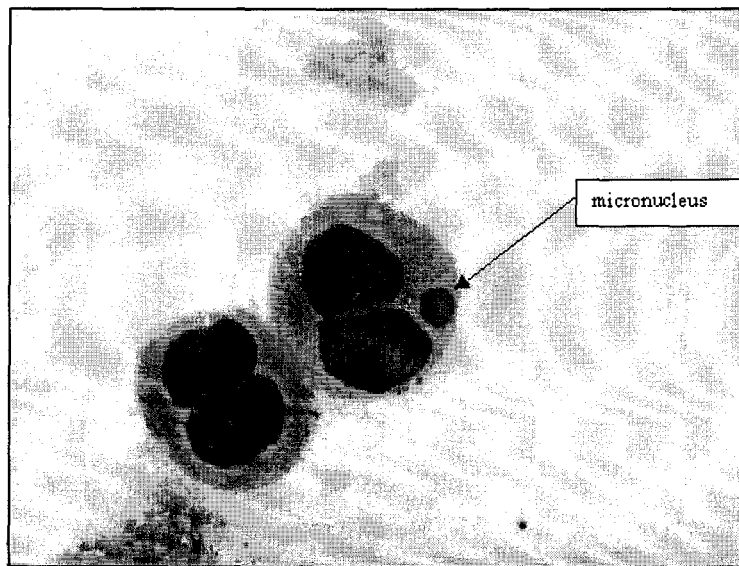


Figura 15 . Se observa en la parte inferior izquierda una célula binucleada citológicamente normal. En la parte superior derecha, una célula binucleada (anormal) con un micronúcleo.

En este ensayo, los distintos niveles de daño genético que permanecen (daño residual) en la población de células binucleadas, después que los sistemas de reparación celular han procesado el daño inicial producido por el tratamiento con los inhibidores, se manifiestan por la presencia de un mayor o menor porcentaje de micronúcleos en dicha población (Figura 16). Su presencia indica la existencia de fragmentos cromosómicos ubicados fuera del núcleo principal que no han podido ser reparados y que probablemente, en pocos ciclos celulares se perderán con el consiguiente perjuicio para la célula.

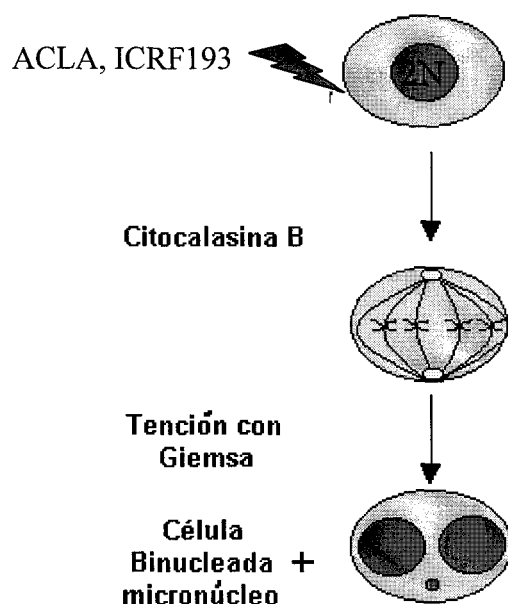


Figura. 16, Las distintas etapas de la formación de los micronúcleos en células binucleadas, tras el tratamiento con los inhibidores de topo II, ACLA y ICRF-193.

En la Figura 17 se recogen nuestros resultados experimentales después de tratar durante 3 horas las células V79 y su mutante radiosensible *irs2* con diferentes concentraciones del inhibidor de topo II ICRF-193. Posteriormente dichas células se incubaron con citocalasina B durante 12 horas, para finalmente proceder a la fijación y recuento de micronúcleos en células binucleadas. Se observa con claridad un efecto dosis-dependiente observado en ambas líneas celulares en forma de un aumento en el número de micronúcleos en paralelo al aumento en la concentración del inhibidor utilizada. También podemos ver con claridad cómo el número de micronúcleos observado en la línea mutante es significativamente mayor que en la parental para todas y cada una de las concentraciones de inhibidor ensayadas. Estos resultados ponen de manifiesto las diferentes capacidades que tienen ambas líneas celulares para procesar el daño genético producido por este inhibidor. Además, estos resultados se corresponden bien con aquellas otras observaciones ( Figuras 9 y 11) que muestran también una mayor sensibilidad del mutante *irs2* al daño inicial producido por este inhibidor.

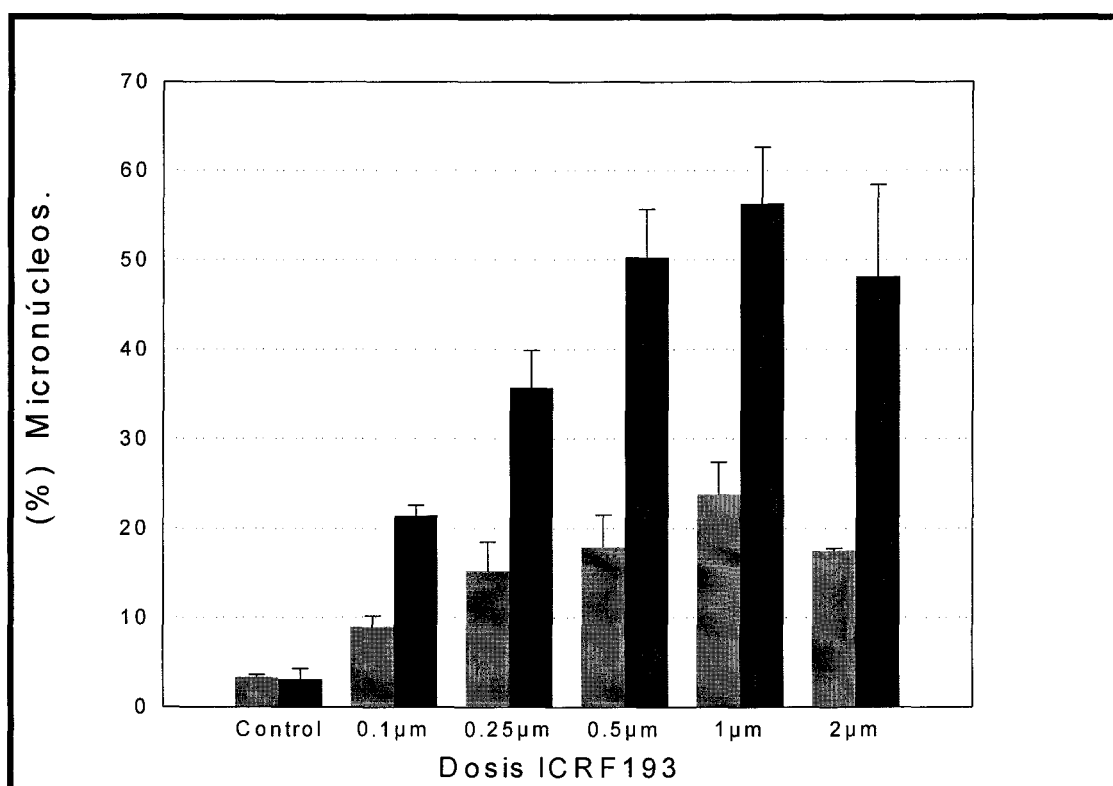


Figura 17 La efectividad de distintas dosis del ICRF-193 de inducir los micronúcleos en células binucleadas, *irs2* ■ V79 ▨.

Con respecto al inhibidor Aclarubicina, el diseño experimental seguido para el análisis del daño cromosómico fue similar al utilizado con ICRF-193 salvo que el tiempo que las células estuvieron en citocalasina B se prolongó por un periodo de 36 horas.

La razón es una incompatibilidad de las concentraciones del inhibidor utilizadas con el progreso de las células a través de mitosis que llevó a que observásemos un profundo retraso en el avance hacia mitosis de la población de células afectadas. Ello, hace necesario prolongar el tiempo de recuperación de éstas en presencia de citocalasina B, con el principal propósito de evitar la subestimación del porcentaje de células binucleadas con micronúcleos (ver figura 18).

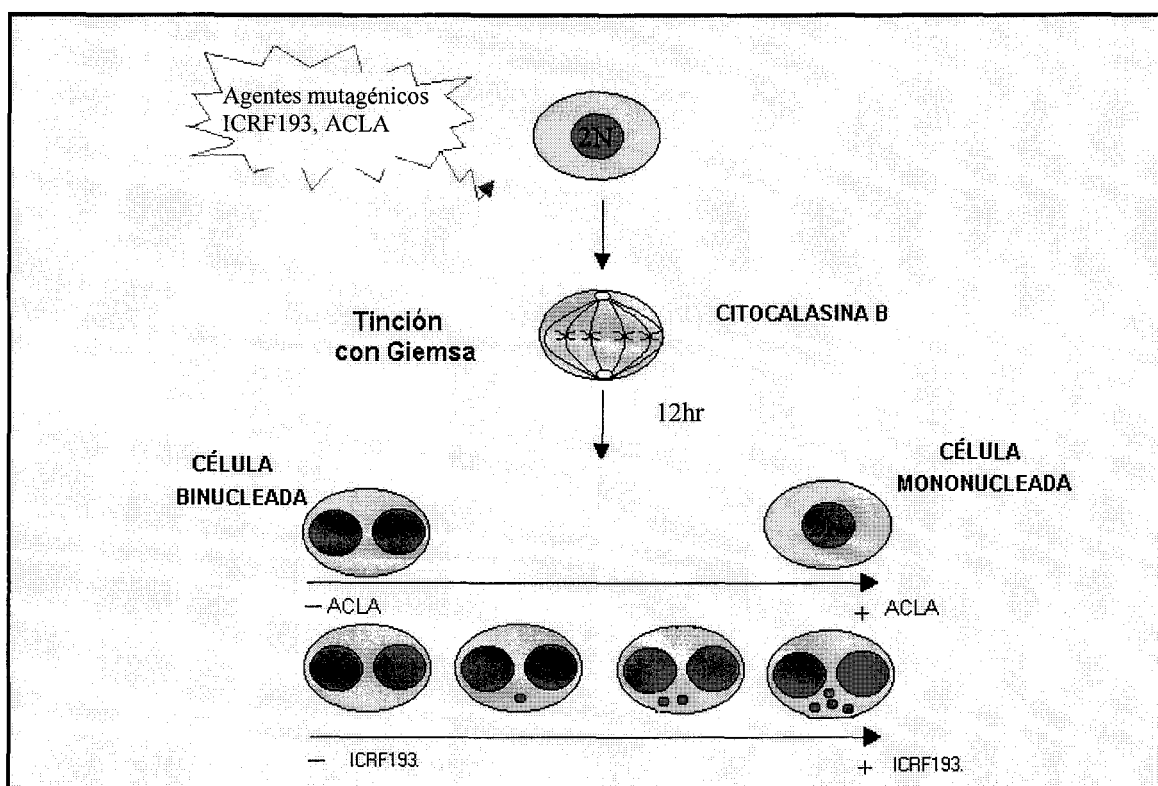


Figura 18. Mientras que las dosis del ICRF-193 se mostraron compatibles con el test de los micronúcleos de modo que la frecuencia de micronúcleos es dosis-dependientes, en cambio en el caso de ACLA las células veían muy afectada la capacidad de proliferación para las dosis elegidas .

En la Figura 19 se representan nuestros resultados experimentales y puede observarse cómo para todas las concentraciones de ACLA utilizadas en un rango de concentraciones de 0.05 a 0.25  $\mu\text{g/ml}$ , las células *irs2* mostraron un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de micronúcleos en células binucleadas con respecto a sus respectivos valores en el línea parental. Estas observaciones de alguna manera contrastan con aquellos otros datos experimentales que muestran una sensibilidad similar entre ambas variantes celulares en el daño en el DNA inducido por este inhibidor (ver Figura 10). Estas observaciones apoyan la existencia de claras diferencias entre ambas líneas en cómo ellas procesan el daño en el ADN inducido por ACLA, procesamiento que por otro lado parece similar a aquel producido por radiación ionizante, dado que éste también requiere un prolongado tiempo de recuperación.

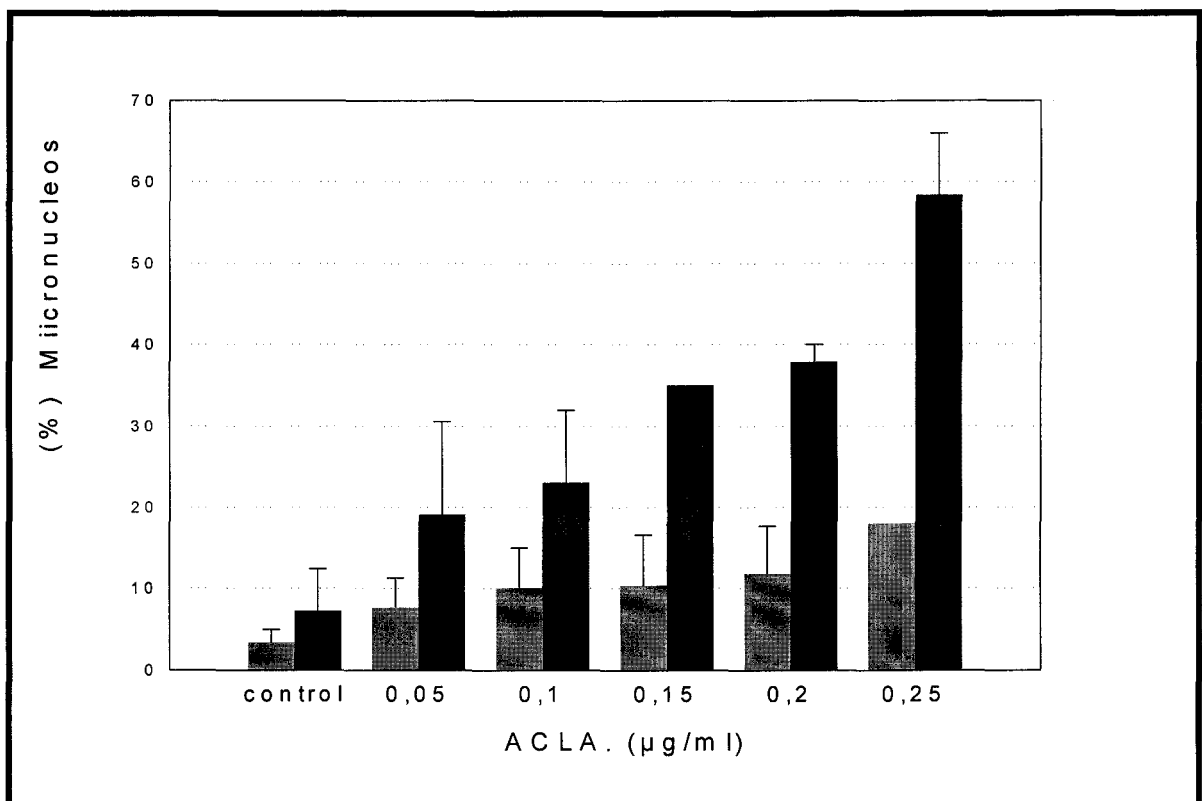


Figura 19 Efectividad de distintas dosis del ACLA de inducir los micronúcleos en células binucleadas, *irs2* ■, V79 ▨

### 3.4 UTILIZACIÓN DE INHIBIDORES CATALÍTICOS DE TOPOISOMERASA II COMO POTENCIADORES DEL DAÑO INDUCIDO POR RADIACIÓN IONIZANTE

#### 3.4.1 ICRF-193 y Aclarubicina como potenciadores del daño en el ADN inducido por radiación ionizante

En este apartado nos propusimos estudiar la incidencia que tenía una inhibición de la actividad topo II sobre la producción de daño en el ADN inducido por radiación ionizante. En la Figura 8 se recogen los resultados de producción de daño en el ADN mediante el ensayo cometa en células V79 e *irs2* después de someter las mismas a 5 Gy o 10 Gy de radiación ionizante. Nuestros resultados en ambas líneas celulares muestran claras diferencias ( $p < 0,001$ ) con relación al daño en el ADN observado en los controles no tratados, siendo la cantidad del daño inducido por 10 Gy de rayos X superior en ambas líneas con respecto al producido por 5 Gy de radiación ionizante (ver Figura 20). Una característica que no muestra la figura pero que se comprobó experimentalmente (datos no mostrados) es que por debajo de 5 Gy de rayos X no se observaban diferencias significativas con respecto a los controles no tratados en la cantidad de daño producido en el ADN. Ello indica por tanto, el nivel mínimo de daño cuantificable mediante este ensayo molecular. Un hecho importante que podemos ver en la Figura 8 es que los niveles de daño producidos por 5 Gy o 10 Gy de rayos X fueron similares entre la línea parental y el mutante radiosensible *irs2*. Finalmente, seleccionamos la dosis de 5 Gy como la idónea para los tratamientos combinados con los inhibidores de topo II en base a que, los niveles de daño producidos eran bajos y por otro lado no existían diferencias significativas entre ambas líneas .

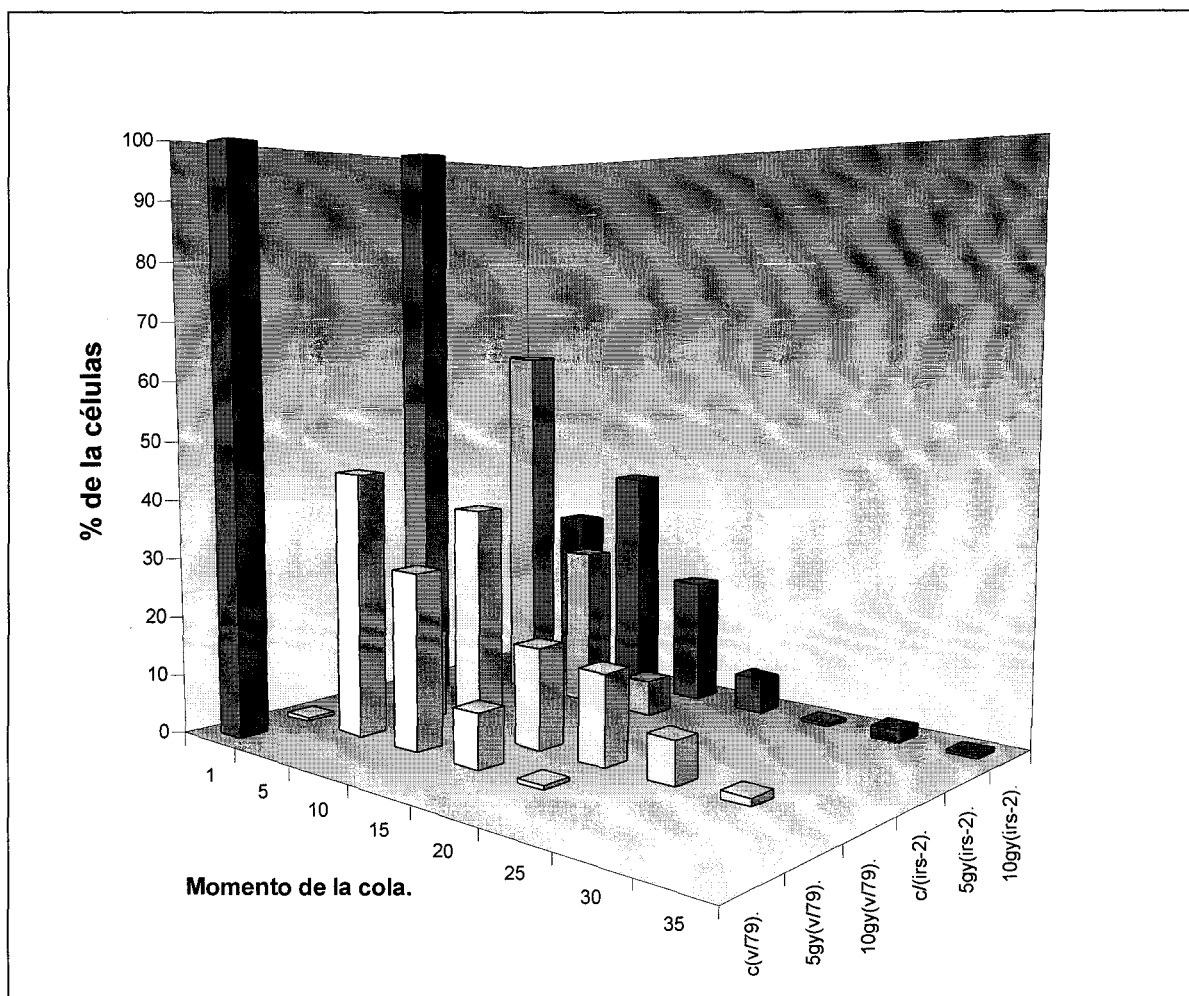


Figura 20. Inducción del daño en el ADN en células V79 e *irs2* después de ser irradiadas con las dosis 5 Gy y 10 Gy. Cuantificación mediante el ensayo cometa

En las Figuras 21 y 22 se presentan, respectivamente, los resultados correspondientes al efecto que produce una inhibición de la actividad topoisomerasa II por ICRF-193 o ACLA con relación a la producción de daño inducido en el ADN por 5 Gy de radiación ionizante. Para ello, las células V79 e *irs2* fueron tratadas con concentraciones de inhibidores seleccionadas por su capacidad para inhibir la actividad topo II y que al mismo tiempo permitieran niveles razonables de viabilidad celular (ver Figura 1). Las concentraciones utilizadas fueron 1, 5 y 10  $\mu\text{M}$  para el ICRF-193 y 1 y 2  $\mu\text{g/ml}$  en el caso del inhibidor Aclarubicina. (ver también Figuras 9 y 10 ).

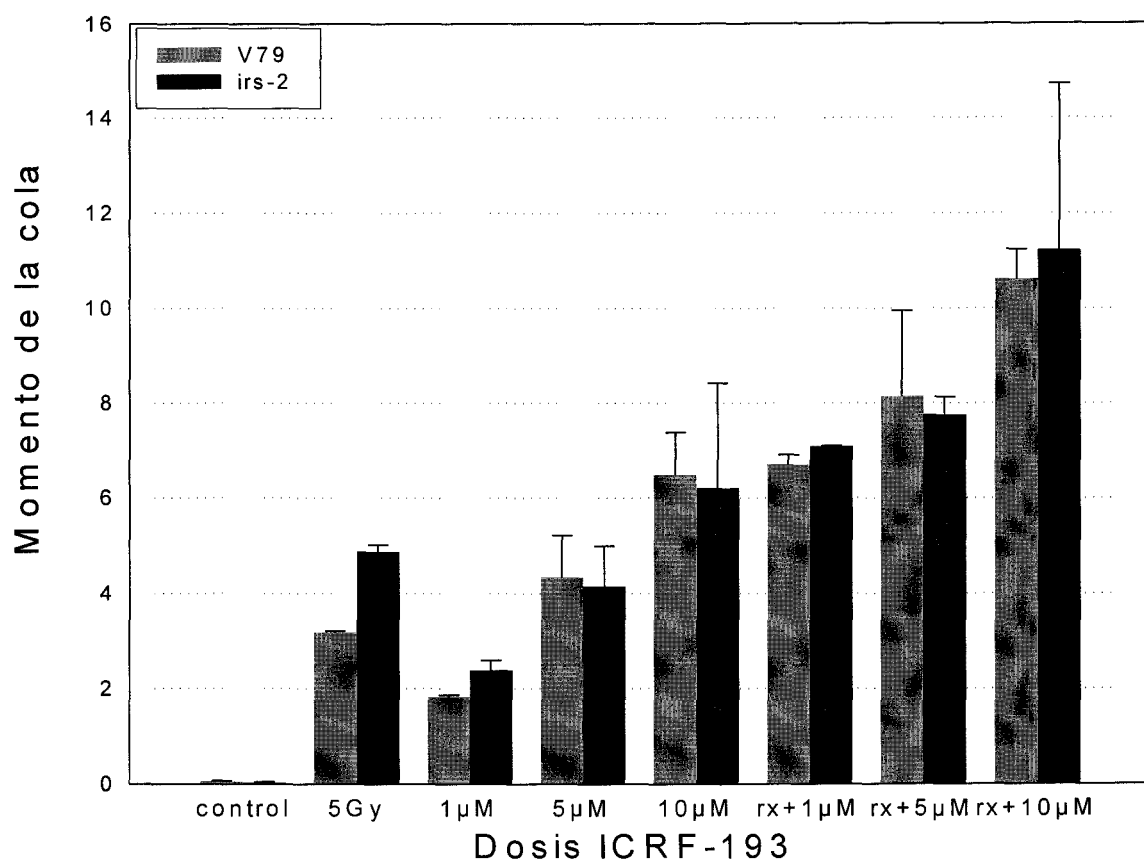


Figura21. Potenciación del efecto mediante la combinación de distintas dosis 1, 5, y 10  $\mu\text{M}$  del ICRF-193 con la dosis 5 Gy de rayos-X. El efecto combinado resultó estadísticamente significativo  $p < 0.005$ , con característica de aditividad que es la suma de los dos agentes genotóxico.



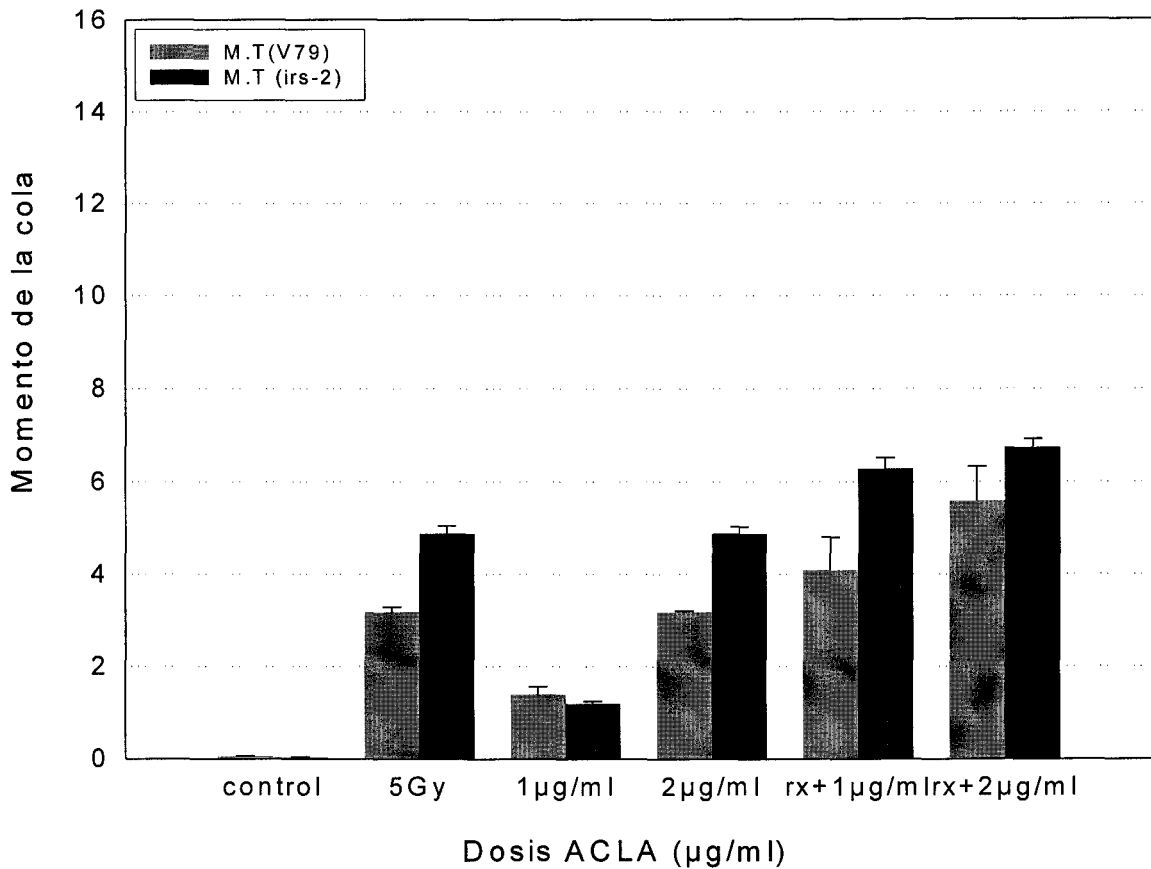


Figura. 22 .Potenciación del efecto mediante la combinación de distintas dosis (1 y 2 µg/ml) de ACLA con la dosis 5 Gy de los rayos-X. En cambio el efecto combinado resultó estadísticamente significativo  $p < 0.005$ .

Como una medida del grado de potenciación se utilizó el factor de potenciación (FP), que se define como la razón del efecto de un tratamiento combinado ( $E_{RX + Inhibidor}$ ) frente a la suma de los efectos del inductor (RX) y del potenciador aplicados por separado (Inhibidor) como ha sido descrito por Hansson y cols., (1984). Esto puede expresarse según la siguiente ecuación:

$$FP = \frac{E_{RX + inhibidor}}{E_{RX} + E_{inhibidor}}$$

Según se desprende de la fórmula, un factor de potenciación de uno corresponde a ausencia de potenciación. Por otro lado, según esta clasificación la potenciación del daño en el ADN se ha dividido en dos clases, dependiendo de si los valores son de menos de 1,5 veces o si son más de 1,5 veces superiores a la suma del efecto del mutágeno (RX) y el inhibidor por separado. Según esta clasificación la interacción RX-inhibidor se considera sinérgica cuando la potenciación que produce es mayor de 1,5 veces la suma de sus efectos separadamente.

Si analizamos la Figura 12 en la que se recogen los datos referentes a los tratamientos combinados ICRF-193/RX podemos apreciar para la línea parental V79 una potenciación clara para la concentración de inhibidor mas baja analizada con un FP = 1,56 que se corresponde con un efecto sinérgico, ausencia de potenciación para la concentración más alta de inhibidor utilizada (FP= 1) y un efecto potenciador aditivo (FP=1,2) para la dosis intermedia. Por otro lado, una ausencia de potenciación se observó con respecto al mutante radiosensible *irs2* en todos los tratamientos combinados. De la misma manera, una ausencia de efecto potenciador del daño inducido por rayos X fue observada para ambas líneas celulares en aquellas células que tenían su actividad topoisomerasa II deprimida por la acción del inhibidor Aclarubicina (ver Figura 21).

En la Figura 22 se presentan nuestros resultados experimentales correspondientes a la evaluación de las roturas de doble cadena inducidas por radiación ionizante en células con o sin su actividad topo II deprimida por un tratamiento con el inhibidor ICRF-193. Las concentraciones del inhibidor utilizadas fueron 1 y 2.5  $\mu\text{M}$  de ICRF-193 dado que como hemos observado con el ensayo cometa las dosis más bajas parecen ser las más efectivas a la hora de potenciar en su caso el daño inducido por RX. Por otra parte las dosis de rayos X utilizadas fueron de 15 Gy para la línea V79 y 10 Gy para el mutante radiosensible, más altas que en el caso del ensayo cometa pero necesarias por razones de sensibilidad del ensayo utilizado para la cuantificación de las RDC. El análisis de los datos experimentales pone de manifiesto una similitud en los resultados obtenidos con los dos ensayos moleculares (ensayo cometa y PFGE) en cuanto a la valoración de la capacidad de este inhibidor para potenciar el daño inducido en el ADN por radiación ionizante. En este sentido, en la Figura 22 puede observarse una ausencia de

potenciación de las RDC en los tratamientos combinados para la línea radiosensible *irs2*. Con respecto a la línea parental y al igual que ocurría cuando analizamos el daño en el ADN con el ensayo cometa, pudimos ver potenciación exclusivamente para la dosis más baja de inhibidor utilizada, aunque a diferencia del ensayo cometa el factor de potenciación encontrado era solo aditivo (FP=1,27).

### 3.4.2 Respuesta celular de las líneas V79 e *irs-2* frente al daño inducido por radiación ionizante

Ambas líneas celulares fueron irradiadas con diferentes dosis de rayos X, posteriormente sembradas en placas de cultivo y después de siete a diez días de incubación, fueron fijadas, teñidas y el número de colonias (definido como un grupo de células vecinas que se piensa han crecido a partir de una célula madre) contabilizado. Finalmente se realizaron las correspondientes curvas de supervivencia que se presentan en la Figura 23 para ambas líneas celulares que fueron ajustadas según el *Modelo Lineal Cuadrático*  $\ln SF = -(\alpha D + \beta D^2)$ , por ser el más aceptado en la actualidad. Este modelo contempla la importancia que tiene en la muerte celular el componente irreparable de daño celular inducido por radiación y aquel otro que produce un daño celular reparable. En función de ello, la curva de supervivencia viene determinada por dos componentes; uno lineal ( $\alpha D$ ) directamente proporcional a la dosis de radiación, relacionado con el daño irreparable (daño letal), y otro proporcional al cuadrado de la dosis ( $\beta D^2$ ) relacionado con el daño reparable (daño subletal).

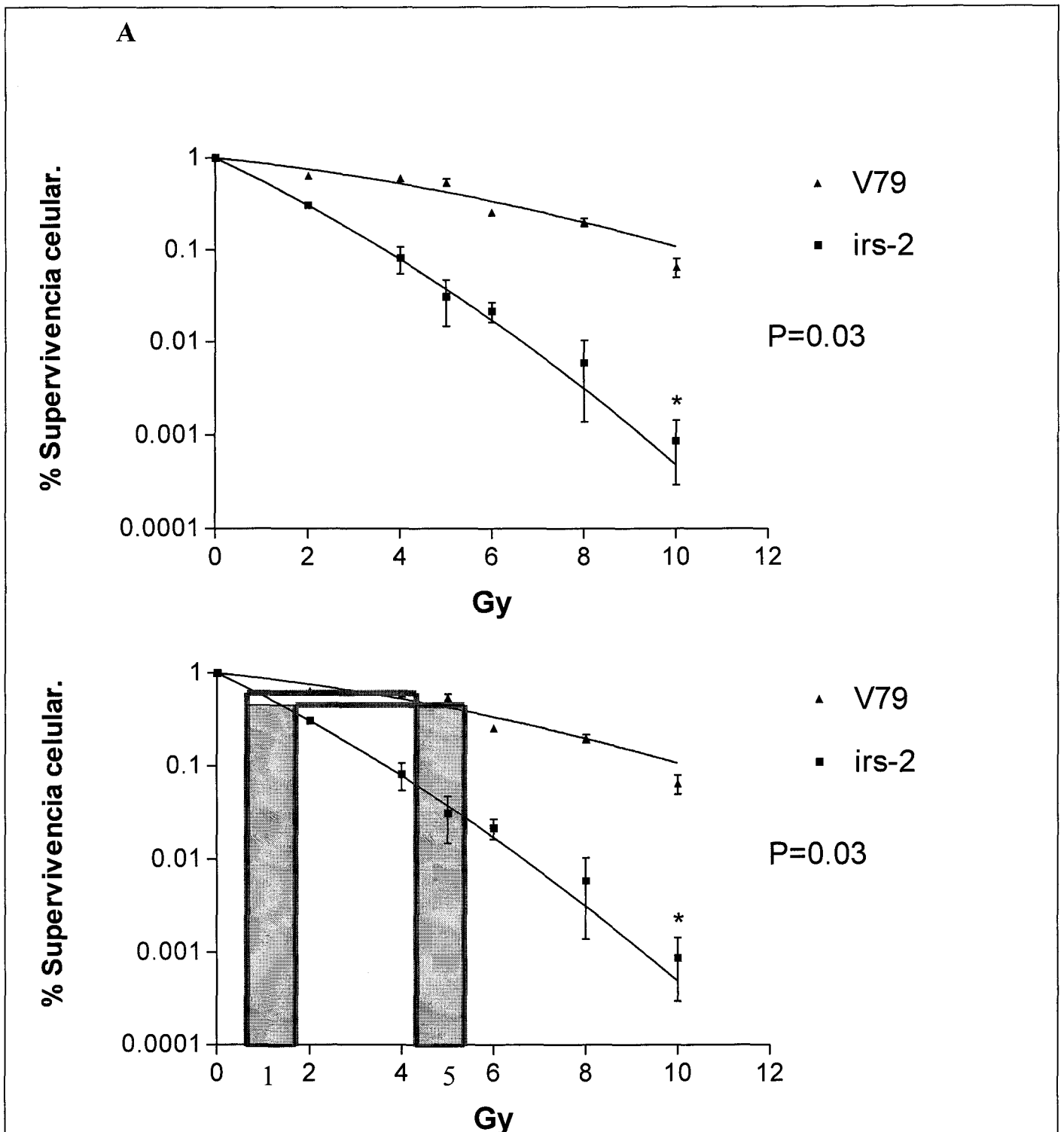



Figura 23. A, Supervivencia de la línea V/79 y su mutante *irs-2* tratadas con varias dosis de radiación ionizante (rayos-X). Para las dos curvas se hizo un ajuste según el modelo lineal cuadrático, respetando la fórmula:  $f = \exp(-(\alpha D + \beta D^2))$ , de modo que la diferencia entre ambas es significativa  $p=0.03$ , con una eficiencia en placa de 0.6.

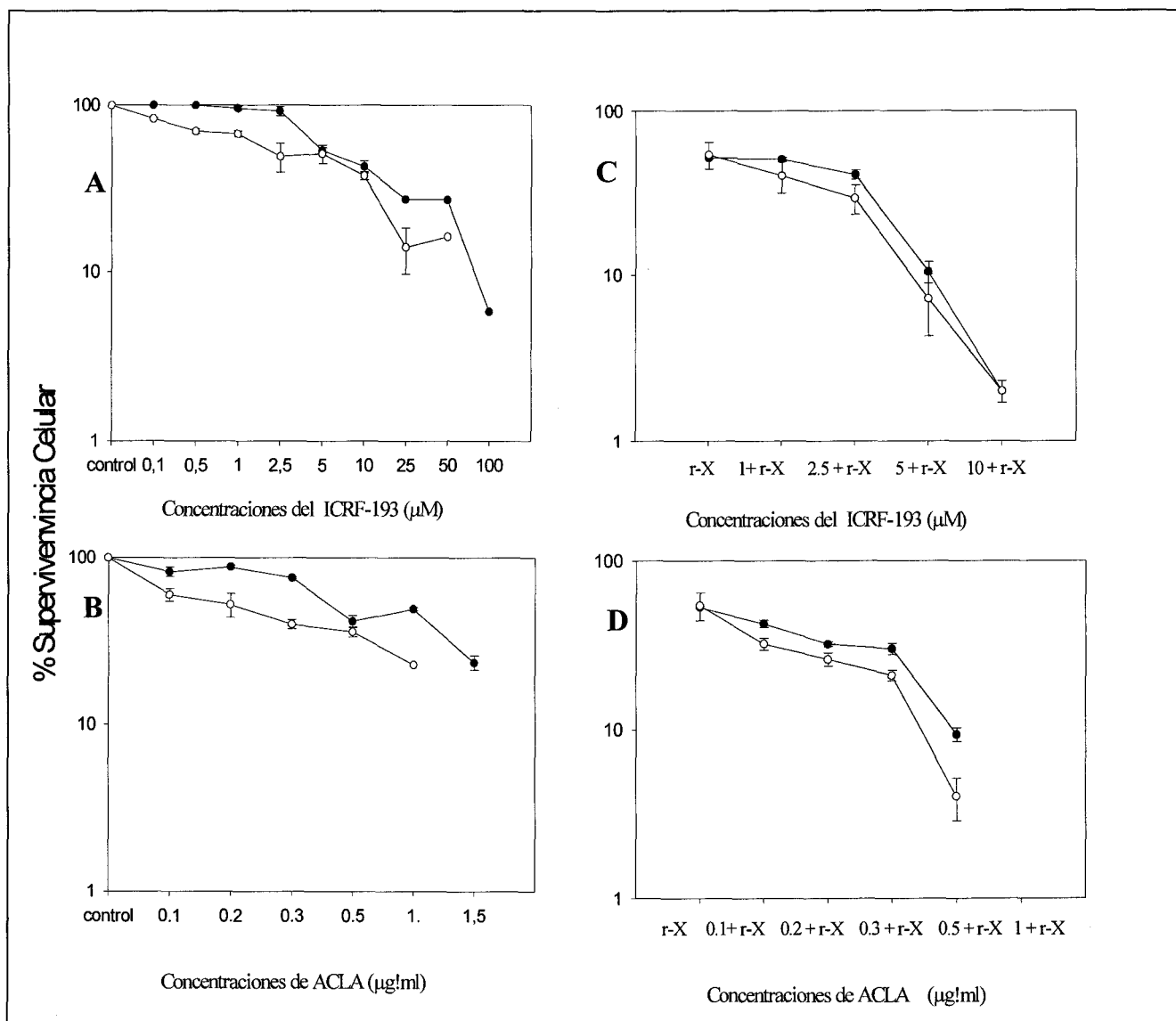
B,  Espacio de correlación entre la dosis 5 Gy para V79 y 1 Gy para *irs2*

En la Figura 23 se presenta la respuesta de la línea parental V79 y su mutante *irs2* a radiación ionizante. Puede observarse de manera clara al comparar los correspondientes perfiles de las curvas de supervivencia que la línea *irs2* es más sensible a la radiación ionizante que su parental V79, evidenciado por poseer un mayor cociente de efectividad. Si observamos la Figura 23 B, la hipersensibilidad a radiación ionizante que presenta la línea *irs2*, se pone de manifiesto mediante una reducción a la mitad de la supervivencia celular como resultado de la irradiación de las células con 1 Gy de rayos X. Sin embargo, para alcanzarse una reducción similar en la línea parental es necesario suministrar a las células V79 una dosis de radiación 5 veces superior. Precisamente, estas dosis de rayos X (1 Gy para *irs2* frente a 5 Gy para V79) que llevan a valores de supervivencia celular similares en ambas líneas celulares fueron las elegidas para valorar el efecto que una inhibición en la actividad topoisomerasa II tendría sobre la supervivencia de las células sometidas a irradiación (Figura 23B). Otro aspecto importante que podemos destacar es que para la línea V79 se obtienen valores próximos a cero en la supervivencia celular con una dosis de 20 Gy de rayos X, mientras que para alcanzar dichos valores en la línea mutante sólo son necesarios de 4-5 Gy de radiación ionizante. Estos valores hacen ver una vez más la alta sensibilidad que presenta la variante celular *irs2* a la radiación ionizante.

### **3.4.3 Inhibición de la actividad catalítica topo II por ICRF-193 o ACLA y modulación de la respuesta celular frente al daño inducido por radiación ionizante**

En la Figura 24 A y B se presentan los resultados correspondientes a la capacidad de las células V79 e *irs2* para crecer y multiplicarse después de ser sometidas a diferentes concentraciones de los inhibidores de topoisomerasa II ICRF-193 o ACLA respectivamente. Puede observar de manera general para ambas figuras un efecto negativo sobre la capacidad proliferativa celular, paralelo a un aumento en la concentración de inhibidor utilizada. En este sentido, existe una buena correspondencia con los resultados obtenidos de viabilidad celular cuando utilizamos el ensayo de sulforrodamina B. Cabe señalar que para ambos inhibidores y para cada una de las concentraciones analizadas, siempre la pérdida en la capacidad para formar colonias fue significativamente mayor para el mutante radiosensible *irs2* que para la línea parental

con un grado de confianza del 95% ( $p < 0,05$ ) después de realizar las correspondientes comparaciones mediante el estadístico  $t$ -Students ( ver Figura 23 Ay B).



**Figura 24.** Efectividad de distintas concentraciones del ICRF193 (A) y ACLA (B), en cuanto a la disminuir de la supervivencia celular en la línea V79 ● y su mutante *irs2* ○. la disminución en la capacidad para formar colonias fue significativamente mayor para el mutante radiosensible que para la línea parental con un  $p < 0,05$ . El efecto combinado de la radiación ionizante y distintas concentraciones del ICRF193 (C) y ACLA (D) separadamente, resultó estadísticamente significativo respecto al tratamiento con los rayos-X sólo, con  $p < 0,01$ , mientras que la pérdida en la capacidad para formar colonias fue significativamente mayor para el mutante radiosensible *irs2* que para la línea parental con un grado de confianza del 95% ( $p < 0,05$  respectivamente en (C) y (D)).

Por otro lado, y con el propósito de analizar el posible efecto negativo que una inhibición de la actividad topoisomerasa II tendría sobre la supervivencia celular inducida por radiación ionizante, media hora antes de finalizar los tratamientos con los inhibidores, las células se irradiaron con 5 Gy o 1 Gy de rayos X para la línea parental y mutante respectivamente.

En la Figura 24 se encuentran representados los resultados correspondientes a la modulación por ICRF-193 (figura 24 C) o por ACLA (Figura 24 D) de la supervivencia celular tras el tratamiento de las células V79 e *irs2* con radiación ionizante. Puede observarse con claridad para ambas líneas una disminución en los valores de supervivencia celular para las células que fueron irradiadas cuando su actividad topoisomerasa II se encontraba inhibida con respecto a aquellas otras irradiadas en ausencia de inhibición. En la figura 24, puede apreciarse también cómo la disminución en los valores de supervivencia celular de las células irradiadas alcanzados para ambas líneas celulares es mayor a medida que se produce un aumento en la concentración del inhibidor. Los valores de significación obtenidos con relación a esta pérdida en la capacidad para formar colonias después de realizar las correspondientes comparaciones mediante el estadístico *t*-students fueron significativos con ( $p < 0.01$ ), respectivamente en Figura 24 C y D.

Por otro lado, también podemos observar en la Figura 24A y B que para ambos inhibidores y para cada una de las concentraciones analizadas, siempre la pérdida en la capacidad para formar colonias fue significativamente mayor para el mutante radiosensible *irs2* que para la línea parental con un grado de confianza del 95% ( $p < 0,05$ ) (ver figura 23 A y B).

En resumen, nuestros resultados muestran con claridad la posibilidad de potenciar la muerte celular mitótica mediante la modulación de los niveles de actividad topoisomerasa II antes de proceder a la irradiación de las células.

**DISCUSIÓN**

---



## **4-DISCUSIÓN**

### **4.1 APORTACIONES AL ESTUDIO SOBRE LA CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD DEL ICRF-193**

Muchas son las drogas antineoplásicas conocidas, los cuales presentan una amplia variedad de mecanismos de acción. Sin embargo, su utilidad en el tratamiento antitumoral se ve limitada debido a que producen de manera indiscriminada en muchos casos extensos niveles de daño en el ADN que suele traducirse en una acusada citotoxicidad también por las células normales. Por ello, existe un estado de permanente expectativa en el desarrollo de nuevas drogas que presenten alternativas válidas de tratamiento. Dentro de este grupo de drogas se encuentran los inhibidores catalíticos de topoisomerasa II, por ser agentes que tienen como blanco la enzima topoisomerasa II de ADN, clave en los procesos de replicación, transcripción y segregación cromosómica, y que al parecer actúan por mecanismos de acción novedosos produciendo una inhibición “limpia” de la enzima de manera catalítica sin producción de daño en el ADN. Entre estos se ha venido considerado la bisdioxopiperazina ICRF-193.

Hasta hace poco, se pensaba que las actividades genotóxicas de los inhibidores de topo II dependían de forma exclusiva de su capacidad para estabilizar los complejos, covalentes de rotura que se producen en el ADN (Y. Chen y col., (1994); A.H. Corbett y col.,(1993). Por ejemplo agentes capaces de formar estos complejos como la amsacrina, doxorubicina, etopósido, etc., se sabe que son genotóxicos dada su probada capacidad para inducir tanto aberraciones cromosómicas como intercambios entre cromátidas hermanas

F. Cortés y col (1993); L.E. Dillehay, y col., (1987) Esos inhibidores actúan principalmente acumulando en el ADN complejos de rotura estabilizados por la droga y el fracaso para resolver dichos complejos antes de que se produzca la replicación del ADN lleva en primer término a la producción de RDC, aberraciones cromosómicas y finalmente a la muerte de la célula. De hecho, diferentes estudios han podido establecer

una estrecha correspondencia entre capacidad para formar complejos de rotura y citotoxicidad (B.H. Long y col., (1985); J. Markovits, y col., (1987)

Por otro lado, todavía se conoce poco acerca del mecanismo(s) mediante el que los inhibidores catalíticos de topoisomerasas ejercen su acción genotóxica. La mayoría de los estudios realizados hasta la fecha se han centrado en descubrir a qué nivel ellos producen la inhibición catalítica de la enzima, como bien se documenta en la excelente revisión de T. Andoh e Ishida (1998), sin embargo, es muy escasa la investigación que se ha realizado sobre el conocimiento de los efectos celulares de tales inhibidores (M. Chen y W.T. Beck, (1995); R. Ishida y col., (1991). La bis-dioxopiperazina ICRF-193 es uno de los inhibidores de topo II considerado como catalíticamente puro basado en resultados que muestran por un lado, su capacidad para inhibir la actividad topo II sin producir la estabilización de los complejos de rotura y por otro, su incapacidad para producir roturas de cadena en el ADN D.J. Clarke, y col., (1993). Sin embargo, resultados experimentales recientes muestran datos que sugieren que este compuesto podría actuar como un nuevo veneno de topoisomerasa II L.H. Jensen y col., 2000; K.C. Huang y cols.,(2001) han mostrado la capacidad que tiene el ICRF-193 para producir roturas en las cadenas de ADN cuando utilizaron un agente desnaturalizante caotrópico para la detección del daño. En este contexto, nos pareció de particular interés caracterizar los efectos celulares del ICRF-193, este novedoso inhibidor de topo II el cual es incapaz de estabilizar los complejos de rotura y cuyo mecanismo de acción ha sido recientemente dilucidado J. Roca y col., (1994). Para ello se llevaron a cabo una serie de experimentos con el fin de comprobar el posible efecto citotóxico y genotóxico del ICRF-193 (N. Hajji y cols., 2003), en lo que se refiere a estos parámetros, nuestros resultados muestran un claro efecto negativo del ICRF-193 en el crecimiento celular medido mediante el ensayo de sulforrodamina B (ver figura 1A, en resultados). Por otra parte si comparamos la efectividad relativa del ICRF-193 en las líneas celulares V79 (parental) e *irs2* (mutante radiosensible) se observa una mayor sensibilidad aunque solo para las dosis más altas ensayadas. Este resultado es, en nuestra opinión, particularmente interesante, ya que los venenos de topo II presentan un mayor nivel de daño en células radiosensibles.

Los resultados experimentales alcanzados en la presente tesis con relación a la capacidad del ICRF-193 para producir daño en el ADN muestran su efectividad en la inducción de roturas en las cadenas del ADN detectada mediante dos técnicas

electroforéticas diferentes; electroforesis en gel de células individuales o “ensayo cometa” ( ver figura 9, en resultados) y electroforesis de campo pulsante(ver figura 11, en resultados). Además, el daño inducido por este inhibidor presentaba una relación de dosis-dependencia, siendo siempre mayor el nivel de daño detectado en el mutante *irs2* para cada una de las dosis analizadas(ver figuras 11, en resultados). Es sabido como hemos mencionado, que líneas celulares radiosensibles muestran hipersensibilidad a inhibidores venenos de topo II como el etopósido, los cuales estabilizan los complejos de rotura y como consecuencia generan roturas de cadena doble que se consideran las lesiones más letales inducidas por radiación ionizante (Kanaar y cols., 1998). Por lo tanto, es de esperar que líneas celulares de roedores sensibles a radiación ionizante, la cual genera tanto SSB como RDC, sean sensibles igualmente a los inhibidores de topoisomerasas, siendo este fenómeno lo que se conoce en general como sensibilidad cruzada ( Evans y col., 1989; Davies y col., 1990; Caldecott y col., 1990, 1993). De acuerdo con dichas expectativas se ha visto que diferentes líneas celulares radiosensibles de roedores incluyendo BLM-2, XR-1, *xrs 1*, ADR y L5178-S, muestran sensibilidad cruzada a drogas que inhiben la acción de la topo II (Robson y col., 1987; Evans y col., 1989; Davies y col., 1990). Los venenos de topo II permiten que dicha enzima corte el ADN de forma normal pero inhiben la reacción en un paso intermediario, previniendo la ligación del ADN, y persistiendo así el ya conocido complejo de rotura y las discontinuidades de las cadenas.

En general, es interesante señalar que los mutantes radiosensibles muestran igual o mayor sensibilidad a los venenos de topo II que a los rayos X. Parece que existe una relación directa entre el nivel nuclear de la topo II y la sensibilidad celular a los venenos de topoisomerasa II (Davies y col., 1988). Sin embargo, cambios en los niveles de topoisomerasas no parecen alterar la sensibilidad a los rayos X *per se*.

En nuestra opinión, una razón subyacente para esta asociación frecuente entre sensibilidad a los rayos X y a los inhibidores de topo II podría implicar uno de varios mecanismos. Entre los más probables podríamos proponer que la topo II jugase un papel en la reparación del daño inducido en el ADN por los rayos X o por otros agentes que provoquen roturas en el mismo. Diferentes mecanismos relacionados con el metabolismo del ADN que impliquen corte, re-síntesis y ligación del material genético requerirán la acción de las topoisomerasas de ADN para controlar y modificar el grado

de superenrollamiento. Sin embargo, todavía no existen evidencias de una participación directa de dichas enzimas en alguna forma de reparación del ADN. Otro posible mecanismo sugiere la existencia de una vía común de reparación para las roturas de cadena generadas en el ADN tanto por los venenos de topoisomerasas como por los rayos X (Hickson y col., 1990). En particular, parece que determinadas líneas celulares defectuosas en la reparación del ADN acumulan una sub-población de roturas de cadena las cuales persisten por un periodo anormalmente largo después del tratamiento con inhibidores de topo II. Estas roturas de cadena podrían ser generadas por la acción de la topo II y permanecer sin reparar debido a defectos en la reunión de las roturas de cadena en estos mutantes. Por otra parte, otra posible explicación sería que dichas roturas de cadena podrían incrementarse por un mecanismo independiente de la topo II, como pudiera ser por la formación de radicales libres, un efecto conocido del VP-16 y de otros inhibidores de topo II. Obviamente, esto sigue siendo una cuestión abierta, y se necesitan más resultados para averiguar cuál de las hipótesis propuestas podría ser la correcta. En nuestro caso particular, *irs 2* ha mostrado solo una moderada hipersensibilidad a ICRF-193 en su capacidad para generar RDC con respecto a la línea parental V79. Esta moderada sensibilidad podría pensarse que sea debida parte a que la línea muestra una síntesis de ADN radiorresistente lo cual en principio podría llevar a que se produjeran una gran acumulación de lesiones en el ADN aunque posteriormente muchas de ellas pudieran repararse, ya que al parecer la línea muestra una cinética de reparación de RDC normal. Nuestros datos tienen una buena correspondencia con aquellos obtenidos por N.J Jones y col., en 1993 utilizando otros inhibidores de topo II. Desafortunadamente, hasta ahora, no existe ningún otro resultado experimental utilizando esta línea radiosensible que nos permita hacer comparaciones sobre la inducción de roturas de doble cadena inducidas por ICRF-193.

Un aspecto importante es que los resultados anteriormente comentados sobre genotoxicidad del ICRF-193, en su conjunto, parecen coincidir bien con nuestros resultados de viabilidad celular obtenidos mediante el ensayo SRB para ambas líneas celulares (ver figura 1A, resultados). En este sentido, nosotros pensamos que el daño en el ADN inducido por ICRF-193 en ambas líneas celulares podría estar relacionado con la citotoxicidad que presenta la droga o bien, de una forma más directa, dicha inducción de roturas en las cadenas de ADN constituirían uno de los primeros eventos que posteriormente lleven a la citotoxicidad de este inhibidor de topo II. Por otro lado, estos

resultados son contradictorios con otros anteriores en los que diferentes autores muestran la incapacidad del ICRF-193 para inducir roturas en las cadenas del ADN. (D.A Conney y col., 1985; J.M Fortune y col., 1998). En nuestro favor, nos gustaría argumentar que dichos datos negativos se corresponden con resultados a partir de ensayos *in vitro* usando el enzima purificado y un ADN aislado, principalmente procedente de un plásmido superenrollado o ADN de cinetoplasto y hasta la fecha, muy pocos datos son los que se han publicado utilizando técnicas como el ensayo cometa o PFGE para evaluar la capacidad de los inhibidores de topo II para generar daño en el ADN de células de mamíferos.

Centrándonos en el ICRF-193, nosotros hemos obtenido recientemente datos sobre la capacidad de este inhibidor de topo II para producir roturas en las cadenas del ADN (N. Pastor y col., 2002). Con anterioridad, sólo G. Boos y H. Stopper en el año 2000 han publicado resultados experimentales que muestran una débil inducción de daño en el ADN por ICRF-193 utilizando el ensayo cometa para su evaluación. Por otra parte, resultados negativos utilizando PFGE para la detección de daño en el ADN han sido publicados por P. Muñoz y col., en 1998. La base de la discrepancia entre nuestros resultados positivos y aquellos negativos obtenidos por otros autores no está del todo clara, pero en nuestra opinión podría ser el resultados de diferencias en las condiciones de tratamiento o sensibilidad de las técnicas utilizadas. En este sentido, E.C Woudstra y col., en 1996, examinaron los niveles de daño en el ADN detectado en dos líneas celulares mediante la utilización de una amplia variedad de métodos, y los resultados alcanzados les llevaron a sugerir que diferentes ensayos podían llevar a diferentes conclusiones. En este sentido, es conocido por la comunidad científica que la capacidad del ensayo cometa para detectar diferentes tipos de lesiones en el ADN se ve influenciada por las condiciones experimentales del ensayo. Así, esos resultados negativos previamente aportados por diferentes autores podrían indicar que las condiciones que ellos utilizaron no fueron lo bastante sensibles como para detectar daño en el ADN. Además, recientemente se ha sugerido que las mismas lesiones en el ADN pueden ser reconocidas de manera distinta por distintos tipos celulares, lo que viene a añadir un mayor grado de complejidad si cabe a esta cuestión (P.L Olive, 1998). Por tanto, la heterogeneidad en el tipo de daño producido en el ADN puede ser también un importante problema a la hora de evaluar los niveles de daño del mismo.

En contraste con lo anteriormente discutido, nos llama la atención la unanimidad que encontramos en los resultados experimentales cuando analizamos los efectos que sobre la producción de aberraciones cromosómicas tiene este inhibidor de topo II. En este sentido, cabe destacar los resultados de G. Boss y H. Stopper del año 2000, quienes observaron una débil inducción por ICRF-193 de daño en el ADN en contraposición a la potente capacidad de dicho compuesto para inducir micronúcleos. Nuestros resultados positivos presentados en la figura 17, sobre la capacidad del ICRF-193 para inducir micronúcleos apoyan claramente los de estos autores y señalan al ICRF-193 como un agente clastogénico bastante activo cuyo efecto es dosis- dependiente, tanto en V79 como en *irs 2*, siendo esta última línea celular más sensible al tratamiento. Estos resultados, por otra parte, están de acuerdo con otros previos llevados a cabo en nuestro laboratorio en los que quedó claramente establecida la capacidad del ICRF-193 para provocar roturas en los cromosomas de fibroblastos de hámster Chino de las líneas AA8 y EM9 (N. Pastor y col., 2002). Estos resultados por otra parte, están de acuerdo con los de Ikushima y col. 1998, los cuales igualmente observaron una elevada frecuencia de aberraciones de tipo cromatídico y cromosómico tras el tratamiento con ICRF-193 en la línea celular V79. Además, recientemente se ha demostrado en oocitos de ratón que la inhibición de la actividad topo II por ICRF-193 durante la segunda división meiótica tiene como resultado la producción de aberraciones cromosómicas y aneuploidías (H. Tateno y Y. Kamiguchi, 2002). Como resumen, todos estos resultados descritos anteriormente sugieren una correlación directa entre la clastogenicidad producida por el ICRF-193 y nuestros resultados experimentales acerca de la capacidad de este inhibidor de topo II de inducir roturas en las cadenas de ADN.

## 4.2 ¿ES REALMENTE EL ICRF-193 UN INHIBIDOR CATALÍTICO DE TOPOISOMERASA II?

El mecanismo molecular de acción del ICRF-193 sobre la topoisomerasa II ha sido recientemente descubierto. Este inhibidor actúa sobre la actividad enzimática nuclear sin la formación de ningún complejo de rotura (K.Tanabe y col. 1991) inhibiendo catalíticamente la ADN topoisomerasa II de mamífero de una manera particular. Esto es, estabilizando en forma de un complejo pos-transicional, la estructura en abrazadera que forma la topo II en su conformación cerrada sobre el ADN mediante la inhibición de la actividad ATPásica intrínseca de la misma y de esta manera secuestrando al enzima de su turnover normal en la célula, lo que no le permitiría volver a su conformación abierta (J. Roca y col. 1994) (ver figura 5, introducción).

Con respecto a cómo el ICRF-193 podría provocar la muerte de las células, actualmente existen diferentes opiniones al respecto. Aunque nuestros resultados experimentales indican que este inhibidor es capaz de romper el ADN y por ello podría ser considerado como veneno clásico de topo II, en nuestra opinión, parece poco probable que el ICRF-193 actúe como un veneno de topoisomerasa mediante la estabilización de los complejos de roturas. A favor de ello, presentamos nuestros resultados obtenidos mediante PFGE que muestran cómo el daño en el ADN producido en células V79 e *irs 2* por ICRF-193 no disminuye cuando el tratamiento con el inhibidor se da en presencia de un inhibidor de síntesis de ADN afidilcolina, como sería lo esperado para un veneno de topoisomerasa (F. Cortés y col., 1993). Esta reducción en el nivel de daño en el ADN sí la pudimos observar cuando utilizamos un típico veneno de topo II (en nuestro caso m-AMSA) en el tratamiento combinado con respecto a aquellas células que fueron tratadas exclusivamente con el veneno. Por tanto, este experimento ha demostrado de manera concluyente que los efectos deletéreos que tiene el ICRF-193 sobre el ADN genómico son producidos de una manera independiente de las colisiones que se producen entre la horquilla de replicación en movimiento y los complejos de rotura estabilizados enzima-inhibidor. Una posible explicación para ello, en base a las evidencias experimentales aportadas en esta tesis, podría ser que la estabilización en su forma cerrada de la estructura en abrazadera del enzima podría impedir el normal funcionamiento de eventos que tienen que ver con el metabolismo del

ADN, lo más probable a través de la interferencia que produce esa estructura voluminosa que representa la enzima abrazada al ADN en su conformación cerrada, con la maquinaria de replicación o transcripción del ADN o incluso con los mecanismos de reparación o de condensación y descondensación de la cromatina (L. H Jensen y col. 2000).

En conclusión, aunque el mecanismo o los mecanismos responsables de la genotoxicidad y citotoxicidad del ICRF-193 aún distan de ser totalmente esclarecidos, los resultados aportados en la presente tesis suponen una fuerte argumentación a favor de que este inhibidor de topo II es capaz de producir daño en el ADN de células de mamíferos ( G. Boss y H. Stopper, 1998; T. Ikushima y col., 1998; N. Pastor y cols., 2000; H. Tateno y Y. Kamiguchi, 2002). Asimismo, aunque el mecanismo particular de este daño a nivel molecular se mantiene por el momento desconocido, nuestros datos sugieren que dicho daño podría ser el responsable, al menos en parte, de la citotoxicidad producida por este inhibidor. Nos gustaría por último señalar que en esta tesis se demuestra por vez primera, que la producción de RDC por ICRF-193 es independiente al proceso de replicación del ADN.



### 4.3 APORTACIONES AL ESTUDIO SOBRE LA CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD DEL INHIBIDOR DUAL DE TOPOISOMERASA I Y II ACLARUBICINA

La antraciclina Aclarubicina es uno de los inhibidores catalíticos de topoisomerasa II con una utilización generalizada en el tratamiento de leucemias agudas, linfomas y diferentes tipos de tumores sólidos. A nivel molecular actúa de manera indirecta sobre la topoisomerasa II evitando su unión a la molécula de ADN gracias a que su intercalación tiene como consecuencia una profunda modificación topológica de la doble hebra de ADN (B.P Jensen y col. 1993). Está ampliamente aceptado por la comunidad científica que los inhibidores catalíticos de topoisomerasas, de manera general, son capaces de neutralizar tanto el daño en el ADN como la citotoxicidad inducida por los venenos de topoisomerasa II como el etopósido o la amsacrina (B.P Jensen y M. Sehested, 1997). Se piensa que la profunda distorsión en la molécula de ADN que resulta de su intercalación tiene como consecuencia una disminución de la accesibilidad del veneno a su lugar de reconocimiento en el ADN, que en último término lleva a una disminución en el número de complejos ADN-topoisomerasa II generados. Por otro lado, no tenemos que olvidar que la aclarubicina es un inhibidor dual de topoisomerasa que, en su modo de acción como un veneno de topoisomerasa I, participa también de la capacidad para estabilizar los complejos de rotura ADN-topoisomerasa I produciendo como consecuencia roturas en las cadenas del ADN (L.F. Liu, 1989). De hecho, la propiedad anticancerígena de esta antraciclina se asocia a este último mecanismo de acción del compuesto, de manera similar a como actuarían otros venenos de topoisomerasa I como la camptotecina (Y. M Hsiang y col. 1985; Y. H. Hsiang y L. F. Liu, 1988; S.J Froelich-Ammon y N. Osheroff, 1995).

En la presente Tesis nosotros hemos investigado en primer lugar, la capacidad de diferentes concentraciones de Aclarubicina para inhibir la actividad catalítica de la topoisomerasa II. Una vez seleccionadas concentraciones catalíticamente inhibitorias realizamos un estudio comparado sobre la capacidad genotóxica y citotóxica de las mismas utilizando dos líneas de fibroblastos de pulmón de hamster Chino con diferente radiosensibilidad: una con sensibilidad normal a radiación ionizante V79, que presenta una cinética de reparación normal de las roturas en las cadenas de ADN y la otra el mutante radiosensible *irs 2*, con características de reparación aparentemente normales pero que

muestra una síntesis de ADN radioresistente ( A. R Collins A.R. 1993; M. Z Zdzienicka M.Z. 1995). Esta variante radiosensible tiene perdida la capacidad para detener la replicación tras someter sus células a radiación ionizante, lo que le lleva a proceder a dicha síntesis con una acumulación de lesiones en las cadenas del ADN aún sin reparar de manera similar a lo que les ocurre a las células humanas que participan de la enfermedad autosómica recesiva Ataxia telangiectasia (A.T). El interés de esta comparación viene de la observación de que las células procedentes de líneas radiosensibles de mamíferos por lo general suelen mostrar también hipersensibilidad a venenos de topoisomerasas (J Thacker y Ganesh, 1990; S. M Davies y col. 1990; R. L Warters y col. 1991; F. Cortés y col. 1993; Jones y col. 1993).

El mutante *irs 2* fue aislado a partir de células V79 de hamster Chino sobre la base de su hipersensibilidad ( 2- 3 veces superior) a la inactivación celular producida por rayos X, y muestra características fenotípicas similares a las del síndrome recesivo autosómico humano AT y en ambos casos presentan una síntesis de ADN radioresistente. En esta enfermedad, los individuos homocigóticos afectados tienen una propensión a desarrollar determinados tipos de cánceres con una tasa del orden de 100 veces superior que los no afectados. Además, los individuos heterocigotos para el gen de Ataxia telangiectasia (ATM), quienes vienen a representar un 1 % de la población general, también son más propensos que los no afectados a contraer cáncer, principalmente cáncer de mama en mujeres (M.S Meyn. 1999). Diferentes estudios realizados presentan resultados en los que se muestra que el mutante *irs 2*, perteneciente al grupo de complementación XRCC, además de a rayos X también posee una altísima sensibilidad al veneno de topo I camptotecina (J Thacker y Ganesh, 1990; N. J Jones y col. 1993) mientras que por el contrario, posee escasa o nula sensibilidad con relación a diferentes inhibidores de topo II (N. J Jones y col. 1993). Resulta también interesante que al igual que las células AT e *irs 2*, células con el síndrome de rotura cromosómica de Nijmegen (NBS) también posean al igual que estas una sensibilidad dos veces superior a radiación ionizante y aproximadamente una sensibilidad tres veces superior al veneno de topo I camptotecina ( M. Kraakman y col.1999).

Con respecto a la naturaleza de la hipersensibilidad que presenta *irs 2*, hasta ahora no se ha alcanzado ninguna conclusión definitiva, ya que la línea presenta el mismo nivel de actividad topo I que el que se puede encontrar en la línea parental V79,

y además no se aprecia ninguna diferencia entre ambas líneas con respecto al número de roturas inducidas por camptotecina o a la tasa de eliminación de las mismas después de la retirada de la droga y tras recuperación (N. J Jones y col. 1993). Esta ausencia de correlación entre cualquier parámetro analizado y la sensibilidad que presenta el mutante a camptotecina no es bien entendida. No obstante, recientemente se han aislado nuevos mutantes de hamster Chino basados en que todos ellos poseen una sensibilidad superior que el parental a camptotecina y todos se han incluido dentro del grupo *irs 2* y pertenecientes al grupo de complementación XRCC8, en base a la importancia jugada por este gen en la reparación del ADN, en su conjunto dentro del ciclo celular así como en los mecanismos de respuesta frente al daño. ( M. A Johnson y col. 2000).

Nuestros resultados, con respecto a cualquier diferencia entre el mutante *irs 2* y la línea parental en cuanto a su actividad catalítica basal topo II o en su respuesta a Aclarubicina en términos de inhibición enzimática, muestran una imagen bastante similar para ambas líneas celulares ( ver figura 4 y 5 ). Esta observación, por otro lado, se corresponde bien con la ausencia de diferencias en actividad topo I entre V79 e *irs 2* previamente descrita por N. J Jones y col (1993) y en nuestra opinión parecen apoyar la idea de que cualquiera que sean las diferencias en su sensibilidad a los inhibidores de topo I y II entre ambas líneas, de ninguna manera ello puede ser adscrito a alguna anormalidad enzimática.

A pesar de lo comentado anteriormente, nosotros hemos encontrado, tras realizar el ensayo con sulforrodamina B, una superior citotoxicidad a Aclarubicina en el mutante *irs 2* en comparación con aquella mostrada por las células parentales V79 (ver figura 1B). A los mismos resultados llegamos tras la realización de los respectivos ensayos clonogénicos en presencia de este inhibidor dual de topoisomerasa (ver figura 24B). Cuando estas observaciones en relación al efecto diferencial observado en la citotoxicidad mostrada a Aclarubicina entre el mutante *irs 2* y la línea parental V79, fueron comparadas con nuestros resultados correspondientes a la producción de roturas en las cadenas de ADN inducidas por Aclarubicina , tras evaluar el daño justo después del tratamiento utilizando para ello el ensayo cometa, no encontramos diferencias significativas en cuanto a la cantidad total de daño producido por el inhibidor en ambas líneas celulares (ver figura 10). Sin embargo, en aquellos otros experimentos en los que dejamos que las células tuvieran un prolongado periodo de recuperación después de ser

tratadas con Aclarubicina, los resultados fueron totalmente distintos. De hecho, la evaluación del daño en el ADN a través del estudio del porcentaje de micronúcleos en células binucleadas mostró con claridad que el tratamiento con esta antraciclina era más efectivo en el caso del mutante *irs 2* comparado con su parental V79 (ver figura 19). Este último resultado parece estar en buena correspondencia con nuestros resultados experimentales que mostraban también diferencias en la citotoxicidad producida por el inhibidor en ambas líneas celulares.

Resultados que muestran una producción de daño en el ADN por esta antraciclina también mediante la utilización del ensayo cometa han sido presentados con anterioridad por F. Gieseler y col. en 1999. Cabe destacar, que solo entre el 25 al 40 % de las células expuestas a Aclarubicina (durante tres horas) mostraron daño en el ADN que podía ser visualizado, y dichos autores concluyeron que las roturas en el ADN inducidas por Aclarubicina lo más probables que fueran producidas durante la fase S, tal vez en conexión con la actividad asociada a la relajación de los superenrollamientos que se producen por delante de la horquilla de replicación (F. Geiseler y col. 1999). Nosotros también hemos observado que, independientemente de la concentración de Aclarubicina utilizada, un porcentaje de aproximadamente 60-70 % de las células no presentaban ningún daño en el ADN después de tres horas de tratamiento con el inhibidor de topoisomerasa, lo cual podría apoyar que el daño no afecta de forma independiente a la fase del ciclo celular.

Con respecto al destino de las lesiones en el ADN inducidas por Aclarubicina, nuestros resultados son sólo parcialmente coincidentes con aquellos publicados por N.J Jones y col. (1993) quienes tras la utilización del inhibidor del topo I camptotecina en las líneas celulares V79 e *irs 2*, no observaron diferencias entre ambas líneas ni en el número de roturas en el ADN producidas ni en la tasa de eliminación de éstas tras retirar la droga y dejar posteriormente recuperar. A diferencia de esta última conclusión nosotros hemos encontrado claras diferencias en la capacidad de recuperación del daño inducido por Aclarubicina entre ambas líneas celulares.

En términos generales, nuestros resultados dan apoyo experimental a la hipótesis de que la radiosensibilidad se encuentra estrechamente relacionada con la sensibilidad a venenos de topoisomerasa, y que la capacidad de envenenamiento de la topo I que

manifiesta el inhibidor dual de topoisomerasa I y II Aclarubicina sea muy probablemente la responsable de las roturas en el ADN inducidas por esta droga quimioterapéutica antitumoral.

#### **4.4 INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD TOPO II COMO ESTRATEGIA PARA POTENCIAR LOS EFECTOS LETALES INDUCIDOS POR RADIACIÓN IONIZANTE**

Las topoisomerasas de ADN son enzimas que se encargan de llevar a cabo los cambios topológicos que sufre el ADN en procesos celulares tan importante como la replicación, la transcripción, la segregación, la recombinación, etc. Dichos cambios topológicos los efectúan las topoisomerasas a través de roturas y reuniones del ADN que han de tener lugar de forma concertada para que el funcionamiento sea correcto.

El interés general por el estudio de las topoisomerasas ha aumentado tras el descubrimiento de que dichas enzimas son el blanco de una serie de drogas antitumorales de reconocida eficacia. Se acepta hoy día de forma unánime que los inhibidores, más propiamente llamados “venenos” de topoisomerasas, como la CPT o el m-AMSA, actúan a nivel molecular mediante la estabilización de complejos de rotura, uniéndose al mismo y abortando la reacción en este paso, de manera que se impide la posterior reacción de sellado de las cadenas rotas que quedan unidas covalentemente a la enzima. Esta inusual forma de daño en el ADN parece ser responsable de la capacidad citotóxica de los venenos de topoisomerasas así como de su eficacia en la inducción de SCEs y aberraciones cromosómicas (Y Pommier y col.,(1988); Zhang y col., (1990). En lo que se refiere a la inducción de muerte celular, que es lo que interesa desde el punto de vista de la terapia antitumoral, existen pruebas suficientes de que la colisión de la horquilla de replicación del ADN en movimiento con los complejos de rotura estabilizados por la droga (ADN-topoisomerasa-veneno) convierten dichos complejos, que normalmente son lesiones reversibles, en lesiones letales (Hsiang y col., (1989), Holm y col., (1989).

Es conocido que agentes capaces de inhibir las topoisomerasas I o II están entre las drogas antineoplásicas más efectivas utilizadas en la terapia contra el cáncer. El

éxito clínico que ha tenido el empleo de venenos de topoisomerasa I, principalmente camptotecina, en el tratamiento de un amplio rango de cánceres (Takimoto y col., 1998) dice mucho acerca de la importancia que tiene la enzima topoisomerasa I como blanco en terapia antitumoral. Del mismo modo, las epipodofilotoxinas que interactúan con la topoisomerasa II, principalmente etopósido y tenipósido, muestran también una gran efectividad antitumoral frente a una gran variedad de neoplasias; entre ellas, malignidades que afectan a células germinales, cáncer de pulmón, linfomas distintos a los de Hodgkin, leucemias, sarcoma de Kaposi y sarcomas de tejidos blandos (Hande K.R., 1998). Todo ello, demuestra sin lugar a dudas, la importancia también de la enzima topoisomerasa II como blanco en terapia antitumoral.

Matar selectivamente a las células tumorales con efecto nulo o mínimo sobre las células proliferantes normales es un objetivo prioritario en la quimioterapia del cáncer. Desgraciadamente, en muchas ocasiones, el éxito es muy difícil de alcanzar principalmente debido a que para erradicar un determinado tumor es necesario suministrar dosis tan altas de drogas que pueden traer consigo efectos indeseables para el organismo. Por ello, resulta muy interesante, desde el punto de vista clínico, desarrollar protocolos que permitan incrementar la muerte celular mediante la combinación de determinadas drogas sin que sea necesario emplear dosis altas de las mismas. En este sentido, el uso de los venenos clásicos de topoisomerasas en combinación con radioterapia o quimioterapia se ha considerado de gran interés para posibles aplicaciones clínicas (J Carmichael y I. D Hickson, 1991; W.J Slichenmyer y col., 1993).

Se han encontrado diversos venenos de topoisomerasas como la CPT, el topotecán y la beta-lapachona que potencian la citotoxicidad de agentes que dañan el ADN como el metil-metano sulfonato (MMS) (R.J Boorstein y A.B Pardee, 1984), neocarcinostatina (Q.J Li y A.B Pardee, 1992) y los rayos X (M.R Mattern y col., 1991; Boothman y col., 1992; Kim y col., 1992). Recientemente se está estudiando una nueva generación de verdaderos inhibidores catalíticos de topoisomerasa II, como suramin (Y. Funayama y col., 1993; R. López y col., 1994; S. Lelièvre y col., 1995), aclarubicina (B.S Sørensen y col., 1992), merbarona (Drake y col., 1989a), e ICRF-193 (M. Hamatake y col., 1997), los cuales no estabilizan los complejos de rotura y *a priori* no producirían lesiones en el ADN. Ellos nos proporcionan si comparamos con los venenos

de topoisomerasas, un prometedor campo para llevar a cabo nuestros estudios acerca del posible papel que podrían desempeñar estos inhibidores como potenciadores del daño genotóxico y citotóxico producido por agentes capaces de producir daño en el ADN como radiación ionizante. Hasta ahora, se ha desarrollado solo una incipiente investigación siguiendo esa dirección, aunque caben destacar los trabajos llevados a cabo por el grupo del Dr. Barret utilizando el nuevo inhibidor dual de topoisomerasa I y II F11782 (Barret y col., 2000a y b; Barret y col., 2002 a y b). Estos investigadores han llevado a cabo combinaciones de este inhibidor con distintas drogas anticáncer como etopósido, cisplatino, mitomicina C o doxorubicina encontrando una clara potenciación de las mismas. Dichos estudios fueron realizados utilizándose dos líneas tumorales humanas, la GCT27 procedente de cáncer de teratoma testicular y la A549 derivada de cáncer de pulmón. En esta misma línea de trabajo, otro de los objetivos que nos planteamos en esta tesis doctoral fue estudiar el efecto modulador que pudiese tener tienen tratamientos con ICRF-193 o Aclarubicina como potenciadores del daño a nivel del ADN y de la muerte celular mitótica inducida por rayos X.

Nuestros resultados representados en la Figura 24, demuestran con claridad que la combinación de ICRF-193 o Aclarubicina con rayos X lleva a una marcada potenciación de la muerte celular inducida por radiación tanto en la línea parental V79 como en el mutante radiosensible *irs 2*. Las concentraciones de los inhibidores se seleccionaron por su capacidad para inhibir en mayor o menor medida la actividad topoisomerasa II (ver figuras 1A y B) y los datos experimentales muestran con claridad una disminución en los valores de supervivencia celular para todas las combinaciones ensayadas, siendo siempre dichos valores de supervivencia menores para el caso del mutante radiosensible. Estos resultados concuerdan bien con aquellos otros comentados anteriormente procedentes del grupo de Barret y ponen de manifiesto las grandes posibilidades que tienen los tratamientos combinados que utilizan inhibidores de topoisomerasa II para potenciar la citotoxicidad de agentes que dañan el ADN, principalmente cisplatino o mitomicina C, donde estos autores encontraron los valores más altos de potenciación, o en nuestro caso rayos X. Sin embargo, otros trabajos muestran que la combinación de ciertos inhibidores de topoisomerasa tales como etopósido, topotecan o SN38, con paclitaxel (PTX) pueden resultar en efectos antagónicos cuando se emplean células A549 y NSCLC (non-small cell lung cancer cell line) (Kaufmann y col., 1996; Kano y col., 1998; de Jonge y col., 1998; Ma y col.,

1998; Perez y Buckwalter, 1998) o bien pueden tener efectos potenciadores de la muerte celular cuando se emplean otras líneas celulares ( Chou y col., 1994). Todo ello sugiere la cautela necesaria que hay que tener a la hora de realizar generalizaciones con respecto a los resultados obtenidos a partir de diferentes combinaciones de inhibidores y agentes que dañan el ADN dadas las acciones tan distintas que pueden tener en diferentes líneas celulares.

Por otra parte, es sabido que muchas drogas interactúan con la radiación ionizante y elevan su citotoxicidad a través de una serie de mecanismos distintos. Esos incluyen por ejemplo un efecto potenciador en el daño inicial inducido por radiación o en otros casos mediante una inhibición o interferencia con algunos de los mecanismos responsables de la reparación del ADN. Si bien, la molécula de ADN es el blanco celular crítico para el daño inducido por radiación y como resultado de la exposición de las células a radiación ionizante se producen una gran variedad de lesiones diferentes, no es menos cierto que las principales lesiones letales son las roturas de doble cadena y las aberraciones cromosómicas (Radford I.R., 1986). Probablemente, la combinación de ciertos agentes químicos con el ADN hacen que éste se muestre más susceptible al daño producido por radiación y como consecuencia se incrementa la muerte celular. Como ejemplo, tenemos la incorporación en el ADN de desoxirribonucleótidos halogenados como la 5-bromodesoxiuridina (BrdU) o la 5-yododesoxiuridina (IdU) que una vez han reemplazado a la timidina en el ADN, producen una radiosensibilización del mismo, incrementándose tanto el nivel del daño en el ADN producido por radiación como la frecuencia de aberraciones cromosómicas (Kinsella y col., 1987). Un efecto potenciador del daño inicial producido por la irradiación con rayos X, sería difícil de asumir como una explicación de la disminución producida en la supervivencia celular en aquellas células V79 e *irs 2* irradiadas en condiciones en las que la actividad topo II se encontraba deprimida. La razón de ello se fundamenta en los resultados presentados sobre la valoración del daño inicial mediante el ensayo cometa ( ver figura 21 y 22, en resultados) o campo pulsante (ver figura 22, en resultados) que muestran de manera general para ambos inhibidores una ausencia de potenciación de los niveles de daño inicial en el ADN para los tratamientos combinados RX-ICRF-193 o RX-Aclarubicina.

En nuestra opinión, nos inclinamos más bien a pensar que una posible explicación de la disminución en la supervivencia celular obtenida en los tratamientos



combinados sería que la inhibición de la actividad catalítica topo II produciría un incremento en el número de lesiones no reparables producidas como consecuencia de la reanudación de los procesos de replicación del ADN tras la parada producida en los mismos por la exposición de las células a rayos X, en condiciones en que la actividad topo II celular estaría deprimida y se generarían como consecuencia lesiones no reparables quizás resultado de la imposibilidad de contar con un número suficiente de moléculas de enzima activas capaces de resolver adecuadamente aquellos problemas topológicos que se originan por delante de las horquillas de replicación en movimiento. A favor de esta hipótesis estarían nuestros resultados citogenéticos que muestran una producción dosis-dependiente de micronúcleos en V79 e *irs 2* de manera paralela al aumento en la concentración del inhibidor ICRF-193 o Aclarubicina (ver figuras 17 y 19). De manera que, una progresiva disminución en la actividad catalítica topo II celular, a medida que aumenta la concentración de inhibidor utilizada, resultaría en una acumulación de lesiones no reparables que son puestas de manifiesto como un aumento en la frecuencia de micronúcleos. Además, los valores más altos de muerte celular observados para la línea *irs-2* podrían explicarse gracias a su característica de síntesis ADN radorresistente ya comentada, que evitaría la parada de la replicación del ADN tras radiación, lo que en último término probablemente llevaría a la generación de un número mayor de lesiones no reparables.

Finalmente, nos gustaría añadir que sería aconsejable que los resultados proporcionados por los experimentos comentados en este último apartado de la discusión, pudieran ser contrastados utilizándose para ello otras líneas celulares, preferiblemente tumorales, con el propósito de evaluar con mayor profundidad el potencial en cuanto a una posible aplicación terapéutica de tales combinaciones inhibidor-RX. De cualquier manera, pensamos que los resultados presentados en esta tesis acerca de las combinaciones ICRF-193 o Aclarubicina con Rayos X resultan prometedores para su empleo en terapia antitumoral y, abren las puertas a que nuevas combinaciones de dichos inhibidores con otros agentes capaces de dañar el ADN puedan también resultar efectivas.

**CONCLUSIONES**

---

## **5-CONCLUSIONES**

**1-Ambas líneas, parental y mutante (V79/*irs2*) son sensibles al inhibidor de topoisomerasa II ICRF-193. Dicha bisdiopiperazina produce daño en el ADN, por tanto no puede considerarse como un inhibidor catalítico puro de topoisomerasa II.**

**2-La probabilidad, en su caso, de que ocurran colisiones entre horquillas de replicación en movimiento y los posibles complejos de rotura estabilizados por ICRF-193, es mínima.**

**3-En términos de la inhibición de la actividad catalítica basal de topo II, no se aprecia ninguna diferencia entre la línea mutante *irs 2* y la línea parental V 79 en su respuesta a ambos inhibidores, ICRF-193 y aclarubicina.**

**4-Se observa una mayor citotoxicidad frente a la aclarubicina en el mutante *irs 2*, en comparación con la mostrada por las células de la línea parental V79.**

**5-Cuando el daño es inicial, ya sea provocado por el tratamiento con los inhibidores de topoisomerasa como el provocado por el tratamiento con la radiación ionizante, no se aprecia una diferencia clara entre ambas líneas con respecto al número de roturas inducidas, mientras que cuando el daño es residual, la línea mutante *irs2* mostró hipersensibilidad frente a la parental V79.**

**6-La capacidad de envenenamiento de la topoisomerasa I que manifiesta el inhibidor dual de topoisomerasa I y II, aclarubicina, es probablemente la responsable de las roturas en el ADN inducidas por esta droga quimioterapéutica antitumoral.**

**7-En presencia de los inhibidores (ACLA e ICRF-193), existe una clara dificultad en cuanto a la reparación del daño en el ADN provocado por los rayos X, o lo que es lo mismo, la inhibición de la topoisomerasa II prolonga el tiempo necesario para reparar dicho daño.**

**8-La topoisomerasa II parece jugar, sin lugar a dudas, un papel ya sea directo o indirecto, en los procesos celulares de reparación del daño en el ADN provocado por la radiación ionizante.**

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

## 6-Bibliografía.

A.H. Corbett, N. Osheroff, (1993) When good enzymes go bad: conversion of topoisomerase II to a cellular toxin by antineoplastic drugs, *Chem. Res. Toxicol.* 6 585–597.

A.R. Collins, Mutant rodent cell lines sensitive to ultraviolet light, ionising radiation and cross-linking agents: (1993) a comprehensive survey of genetic and biochemical characteristics, *Mutat. Res.* 293 99-118.

B.H. Long, S.T. Musial, M.G. Brattain, (1985) Single- and double-strand ADN breakage and repair in human lung adenocarcinoma cells exposed to etoposide and teniposide, *Cancer Res.* 45 3106–3112.

Barret JM, Hill B, Olive PL (2000a) Characterization of ADN-strand breakage induced in V79 cells by F 11782, a catalytic inhibitor of topoisomerases. *Br J Cancer* 83:1740.

Barret JM, Montaudon D, Etiévant C, Perrin D, Kruczynski A, Robert J, Hill BT (2000b) Detection of ADN-strand breaks in cells treated with F 11782, a catalytic inhibitor of topoisomerases I and II. *Anticancer Res* 20:4557.

Boorstein, R.J. y Pardee, A.B. (1984) Beta-lapachone greatly enhances MMS lethality to human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118, 828-834.

Brain B. Hasinoff, Theodore T, Kuschak, Andrew M, Cerighton, Cheryl, Fattman, William P Allan, Padmakumasi Thampatty and Jack. (1997) Characterization of chienes hamster ovary cell line with acquired resistance to the bisdioxopiperazine daxrazoxane (ICRF 178) catalytic inhibitor of topoisomerasa II. Por C.Yalowich. *biochemical pharmacology*, vol 53, pp.1843-1853.

Caldecott, K.; Banks, G. y Jeggo, P. (1990) ADN double-strand break repair pathways and cellular tolerance to inhibitors of topoisomerase II. *Cancer Res.* 50, 5778-5783.

Caldecott, K.; Banks, G. y Jeggo, P. (1993) The induction and reversal of topoisomerase II cleavable complexes formed by nuclear extract from the CHO ADN repair mutant, xrs1. *Mutat. Res.* 293, 259-267.

Capranico G, De Isabella T, Tinelli S, Bigioni S, Zunino F. (1993) Similar sequence specificity of Mitoxantrone and VM-26 stimulation of in vitro ADN cleavage by mammalian ADN topoisomerase II. *Biochemistry*; 32:3032-3048.

Capranico G, Kohn KW, Pommier Y. (1990) Local sequence requirements for ADN cleavage by mammalian topoisomerase II in the presence of doxorubicin. *Nucleic Acids Res*; 18:6611-6619.

Capranico G, Palumbo M, Tinelli S, Zunino F. Unique sequence specificity by topoisomerase II ADN cleavage stimulation and ADN binding mode of streptonigrin. *J Biol Chem* 1994; 40: 25, 004-25, 009.

Capranico G, Tinelli S, Austin CA, Fisher ML, Zunino F. (1992) Different patterns of gene expression of topoisomerase isoforms in differentiated tissues during murine development. *Biochim Biophys Acta*; 1132:43.

Capranico G, Tinelli S, Zunino F, Kohn KW, Pommier Y. (1993) Effects of base mutations on topoisomerase II ADN cleavage stimulated by mAMSA in short ADN oligomers. *Biochemistry*; 32: 145-152.

Carmichael, J. y Hickson, I.D. (1991) Keynote address: mechanisms of cellular resistance to cytotoxic drugs and X-irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 20, 197-202.

Caron PR, Wang JC. (1993) ADN topoisomerase as target of therapeutics: a structural overview. In : Andoh T, Ikeda H, Oguro M, eds. *Molecular biology of ADN Topoisomerase and Its Application to Chemiotherapy*. Boca Raton, FL: CRC.:1-18.

Carter, S.B. (1967) Effects of cytochalasins on mammalian cells. *Nature*. (213,261-264.

Chou TC, Motzer RJ, Tong Y, Bosl GJ (1994) Computerized quantitation of synergism and antagonism of Taxol, topotecan, and cisplatin against human teratocarcinoma cell growth: a rational approach to clinical protocol design. *J Natl Cancer Inst* 86:1517.

D.A Boothman,.; Wang, M.; Schea, R.A.; Burrows, H.L.; Strickfaden, S. y Owens, J.K. (1992) Posttreatment exposure to camptothecin enhances the lethal effects of x-rays on radioresistant human malignant melanoma cells. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 24, 939-948.

D.A. Cooney, J.M. Covey, G.J. Kang, M. Dalal, J.B.McMahon, D.G. Johns, (1985) Initial mechanistic studies with merbarone (NSC 336628), *Biochem. Pharmacol.* 34 3395–3398.

D.J. Clarke, R.T. Johnson, C.S. Downes, (1993) Topoisomerase II inhibition prevents anaphase chromatid segregation in mammalian cells independently of the generation of ADN strand breaks, *J. Cell Sci.* 105 563–569.

Davies, J.M.S.; Lowry, C.V. y Davies, K.J.A. (1995) Transient adaptation to oxidative stress in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 317, 1-6.

Davies, J.M.S.; Lowry, C.V. y Davies, K.J.A. (1995) Transient adaptation to oxidative stress in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 317, 1-6.

Davies, S.M.; Davies, S.L.; Hall, A.G. y Hickson, I.D. (1990) Isolation and partial characterisation of a mammalian cell mutant hypersensitive to topoisomerase II inhibitors and X-rays. *Mutat. Res.* 235, 111-118.

Davies, S.M.; Robson, C.N.; Davies, S.L. y Hickson, I.D. (1988) Nuclear topoisomerase II levels correlate with the sensitivity of mammalian cells to intercalating agents and epipodophyllotoxins. *J. Biol. Chem.* 263, 17724-17729.

Drake FH, Hofmann GA, Bartus HF, Mattern MR, Crooke ST, Mirabelli CK. (1989) Biochemical and pharmacological properties of p170 and p180 forms of topoisomerase II. *Biochemistry*; 28:8154-8160.

Drake, F.H.; Hofmann, G.A.; Mong, S.M.; Bartus, J.O.; Hertzberg, R.P.; Johnson, R.K.; Mattern, M.R. y Mirabelli, C.K. (1989a) In vitro and intracellular inhibition of topoisomerase II by the antitumor agent merbarone. *Cancer Res.* 49, 2578-2583.

E.C. Woudstra, J.M. Roesink, M. Rosemann, J.F. Brunsting, C. Driessen, T. Orta, A.W. Honings, J.H. Peacock, H.H. Kampinga, (1996) Chromatin structure and cellular radiosensitivity: a comparison of two human tumour cell lines, *Int. J. Radiat. Biol.* 70 693-703.

Elia M.C. and Bradley M.O. Influence of chromatin structure on the induction of double strand breaks by ionising radiation. *Cancer Res.* 52 1580-6.

Evans, H.H.; Ricanati, M.; Horng, M.F. y Mencl, J. (1989) Relationship between topoisomerase II and radiosensitivity in mouse L5178Y lymphoma strains. *Mutat. Res.* 217, 53-63.

F. Cortés, J. Piñero, F. Palitti, (1993) Cytogenetic effects of inhibition of topoisomerase I or II activities in the CHO mutant EM9 and its parental line AA8, *Mutat. Res.* 288 281-289.

F. Cortés, J. Piñero, T. Ortiz, (1993) Importance of replication fork progression for the induction of chromosome damage and SCE by inhibitors of DNA topoisomerases, *Mutat. Res.* 30371-76.

F. Gieseler, E. Bauer, V. Nuessler, M. Clark, S. Valsamas, (1999) Molecular effects of topoisomerase II inhibitors in AML cell lines: correlation of apoptosis with topoisomerase II activity but not with ADN damage, *Leukemia* 13 1859-1863.

Felipe Cortés, Immaculada Domínguez and Björ Sandstrom. (1994) Exogenous Catalase introduced in CHO Cell by electroporation does not protect against chromosome damage induced by ionizing radiation. *Cell biology international*, vol 18.nº, 10.



French, M, Morley, AA. (1985) Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res.* 147,29-36.

French, M. (1993) the cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human population. *Environ. Health. Perspect.* 101.101-107.

G. Boos, H. Stopper, Genotoxicity of several clinically used topoisomerase II inhibitors, *Toxicol. Lett.* 116 (2000) 7–16.

H. Tateno, Y. Kamiguchi, (2002) Abnormal chromosome migration and chromosome aberrations in mouse oocytes during meiosis II in the presence of topoisomerase II inhibitor ICRF-193, *Mutat. Res.* 502 1–9.

Hamatake, M.; Andoh, T. y Ishida, R. (1997) Effects of ICRF-193, a catalytic inhibitor of ADN topoisomerase II, on sister chromatid exchange. *Anticancer Drugs* 8, 637-642.

Hande KR (1998) Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochim Biophys Acta* 1400:173.

Hickson, I.D.; Davies, S.L.; Davies, S.M. y Robson, C.N. (1990) ADN repair in radiation sensitive mutants of mammalian cells: possible involvement of ADN topoisomerases. *Int. J. Radiat. Biol.* 58, 561-568.

Hsieh C.H, Griffith J.D. (1988 ) The terminus of SV40 ADN replication and transcription contains a sharp sequence-directed curve. *Cell*; 52:535-544.

J. Markovits, Y. Pommier, D. Kerrigan, J. Covey, E.J. Tilchen, K.W. Kohn, (1987) Topoisomerase II mediated ADN breaks and cytotoxicity in relation to cell proliferation and the cell cycle in NIH 3T3 fibroblast and L1210 leukemia cells, *Cancer Res.* 47 2050–2055.

J. Roca, R. Ishida, J.M. Berger, T. Andoh, J.C. Wang, (1994) Antitumor bis-dioxopiperazines inhibit yeast ADN topoisomerase II by trapping the enzyme in the form of a closed protein clamp, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 1781–1785.

- J. Thacker, A.N. Ganesh, (1990) ADN break repair radioresistance of ADN synthesis and camptothecin sensitivity in the radiationsensitive *irs* mutants: comparisons to ataxia-telangiectasia cells, *Mutat. Res.* 235 49–58.
- J.H Kim,.; Kim, S.H.; Kolozsvary, A. y Khil, M.S. (1992) Potentiation of radiation response in human carcinoma cells in vitro and murine fibrosarcoma in vivo by topotecan, an inhibitor of ADN topoisomerase I. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 22, 515-518.
- J.M. Fortune, N. Osheroff, (1998) Merbarone inhibits the catalytic activity of human topoisomerase II alpha by blocking ADN cleavage, *J. Biol. Chem.* 273 17643–17650.
- Jenkins JR, Ayton P, Jones T, Davies SL, Simmons DL, Harris AL, Sheer D, Hickson ID. (1992) Isolation of CADN clones encoding the beta isozyme of human ADN topoisomerase II and localisation of gene to chromosome 3p24. *Nucleic Acids Res;* 20:5587-5592.
- K.C. Huang, H. Gao, E.F. Yamasaki, D.R. Grabowski, S. Liu, L.L. Shen, K.K. Chan, R. Ganapathi, R.M. Snapka, (2001) Topoisomerase II poisoning by ICRF-193, *J. Biol. Chem.* 276 44488–44494.
- Kanaar, R.; Hoeijmakers J.H.J. y van Gent D.C. (1998) Molecular mechanisms of ADN double-strand break repair. *Trends in Cell Biology* 8, 483-489.
- Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Mori K, Suzuki K, Adachi K-I (1998) In vitro schedule-dependent interaction between paclitaxel and SN-38 (the active metabolite of irinotecan) in human carcinoma cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 42:91.
- Kaufmann SH, Peereboom D, Buckwalter CA, Svinger PA, Grochow LB, Donehower RC, Rowinsky EK (1996) Cytotoxic effects of topotecan combined with various anticancer agents in human cancer cell lines. *J Natl Cancer Inst* 88:734.
- L.E. Dillehay, S.C. Denstman, J.R. Williams, (1987) Cell cycle dependence of sister chromatid exchange induction by ADN topoisomerase II inhibitors in Chinese hamster V79 cells, *Cancer Res.* 47 206–209.

L.F. Liu, (1989) DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs, *Annu. Rev. Biochem.* 8 351–375.

L.H. Jensen, K.C. Nitiss, A. Rose, J.W. Dong, J.F. Zhou, T. Hu, N. Osheroff, P.B. Jensen, M. Sehested, J.L. Nitiss, (2000) A novel mechanism of cell killing by anti-topoisomerase II bis-dioxopiperazines, *J. Biol. Chem.* 275 2137–2146.

Lelievre, S.; Benchokroun, Y. y Larsen, A.K. (1995) Altered topoisomerase I and II activities in suramin-resistant lung fibrosarcoma cells. *Mol. Pharmacol.* 47, 898-906.

Li, J.Q. y Pardee, A.B. (1992) Enhanced lethality to human breast cancer cells of neocarzinostatin by camptothecin and beta-lapachone, a novel ADN topoisomerase I modulator with a different mode of action from camptothecin. Proceedings of the Annual Meeting of American Association for Cancer Research 33, A2585 (Abs).

Lopez, R.; Peters, G.J.; Smitskamp-Wilms, E.; Virizuela, J.A.; van Ark-Otte, J.; Pinedo, H.M. y Giaccone, G. (1994) In vitro sequence-dependent synergistic effect of suramin and camptothecin. *Eur. J. Cancer* 30, 1670-1674.

M. Chen, W.T. Beck, (1995) Differences in inhibition of chromosome separation and G2 arrest by ADN topoisomerase II inhibitors merbarone and VM-26, *Cancer Res.* 55 1509–1516.

M. KraakmanvanderZwet, W.J.I., Overkamp, A.A. Friedl, B. Klein, G.W.C.T, Verhaegh, N.G.T. Jaspers, A.T. Midro, F. EckardtSchupp, P.H.M. Lohman, M.Z, Zdzienicka, (1999) Immortalization and characterization of Nijmegen Breakage Syndrome fibroblasts, *Mutat. Res. ADN Repair* 434 17-27.

M. Mareková<sup>1</sup>, J. Vávrová, D. Vokurková, J. Psutka. (2003) HL-60 Modulation of ionizing Radiation-Induced Apoptosis and Cell Cycle Arrest by All-Trans Retinoic acid in Promyelocytic Leukemia Cells *Physiol. Res.* 52: 599-606.

M.A. Johnson, P.E. Bryant, N.J. Jones, (2000) Isolation of camptothecin-sensitive Chinese hamster cell mutants: phenotypic heterogeneity within the ataxia telangiectasia-like XRCC8 (*irs2*) complementation group, *Mutagenesis* 15 -367-374.

M.R Mattern,.; Hofmann, G.A.; McCabe, F.L. y Johnson, R.K. (1991) Synergistic cell killing by ionizing radiation and topoisomerase I inhibitor topotecan (SK&F 104864). *Cancer Res.* 51, 5813-5816.

M.S Meyn. (1999) Ataxia-telangiectasia cancer and the pathobiology of the *ATM* gen, *Clin. Genet.* 55, 289-304.

M.W. Heartlein, H. Tsuji, S.A. Latt, (1987) 5-Bromo-deoxyuridine-dependent increase in sister chromatid exchange formation in Bloom's syndrome is associated with reduction in topoisomerase II activity, *Exp. Cell Res.* 169 245– 254.

M.Z. Zdzienicka, (1995) Mammalian mutants defective in the response to ionising radiation-induced ADN damage, *Mutat. Res.* 336 203-213.

Ma J, Maliepaard M, Nooter K, Boersma AWM, Verweij J, Stoter G, Schellens JHM (1998) Synergistic cytotoxicity of cisplatin and topotecan or SN-38 in a panel of eight solid-tumor cell lines in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol* 41:307.

Michael C. Elia , John G, Deluca and Mattahews O, Bradley Pharnac, Ther. (1999) Significance and Mesurment of ADN double Strand Breaks in Mammalian cells . *Vol.* 51, pp. 291-327.

Michael Lisby, Uffe H. Mortensen and Rodney Rothstein (2003) Colocalization of multiple ADN double-strand breaks at a single Rad52 repair centre. *nature cell biology* doi:10.1038/ncb997 vol 5, 6 pp 572 – 577.

N. Hajji, N. Pastor, S. Mateos, I. Domínguez, F. Cortés, (2003) ADN strand breaks induced by the anti-topoisomerase II bis-dioxopiperazine ICRF-193 Mutation Research 530 35–46.

N. Pastor, I. Domínguez, S. Mateos, F. Cortés, (2002) A comparative study of genotoxic effects of anti-topoisomerase II drugs ICRF-193 and bufalin in Chinese hamster ovary cells, *Mutat. Res.* 515 171–180.

N.J. Jones, S. Ellard, R. Waters, E.M. Parry, (1993) Cellular and chromosomal hypersensitivity to ADN crosslinking agents and topoisomerase inhibitors in the radiosensitive Chinese hamster *irs* mutants: phenotypic similarities to ataxia telangiectasia and fanconi's nemia cells, *Carcinogenesis* 14 2487– 2494.

Negri C, Scovassi AI, Braghetti A, Guano F, Astaldi Ricotti GC. (1993) ADN topoisomerase II beta: Stability and distribution in different animal cells in comparison to topoisomerase I and II-alpha. *Exp Cell Res*; 206:128-133.

Östling, O. y Johanson, JK. (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123.291-298.

P. Skehan, P. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J.T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney, M.R. Boyd, (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening, *J. Natl. Cancer Inst.* 82 1113–1118.

P.B. Jensen, B.S. Sørensen, M. Sehested, E.J.F. Demant, E. Kjeldsen, E. Friche, H.H. Hansen, (1993) Different modes of anthracycline interaction with topo II separate structures critical for ADN-cleavage, and for overcoming topo II-related drug resistance, *Biochem. Pharmacol.* 45 2025-2035.

P.B. Jensen, M. Sehested, (1997) ADN topoisomerase II rescue by catalytic inhibitors, *Biochem. Pharmacol.* 54 755-759.

P.L. Olive, (1998) The role of ADN single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation, *Radiat. Res.* 150 (Suppl.) S42–S51.

Perez EA, Buckwalter CA (1998) Sequence-dependent cytotoxicity of etoposide and paclitaxel in human breast and lung cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 41:448.

Petrov P, Darke F, Loranger A, Huang W, Hancock. (1993) Rlocalization of ADN topoisomerase II Chines hamster fibroblasts by confocal and electron microscopy. *Exp Cell Res*;204:73-81.

Pfeiffer, P, Goedecke, W. y Obe, G. (2000) Mechanisms of ADN double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* 15, 289-302.

Pommier Y, Capranico G, Kohn KW. (1992) Local ADN sequence requirements for topoisomerase II-induced ADN cleavage produced by amasacrine and teniposide. *P Am Assoc Cancer Res*; 32:335.

Pommier Y, Capranico G, OrrA,Kohn KW. (1991) Local base séquence preferences for ADN cleavage by mammalian topoisomerase II in the presence of amasacrine and teniposide. *Nucleic Acids Res*;19:597-5980.

Pommier Y, Kohn KW, Capranico G, Jaxel C. (1993) Base sequence selectivity of topoisomerase inhiditor suggests a common model for drug action .In: Andoh T, Ikeda H, Oguro M, eds. *Molecular biology of ADN Topoisomerase and Its Application to chemotherapy*. Boca raton, FL:CRC.:215-215-227.

R. Ishida, T. Miki, T. Narita, R. Yui, S. Sato, K.R. Utsumi, K. Tanabe, T. Andoh, (1991) Inhibition of intracellular topoisomerase II by antitumor bis(2,6-dioxopiperazine) derivatives: mode of cell growth inhibition distinct from that of cleavablecomplex-forming type inhibitors, *Cancer Res.* 51 4909–4916.

R.L. Warters, B.W. Lyons, T.M. Li, D.J. Chen, (1991) Topoisomerase II activity in ADN double-strand break repair deficient Chinese hamster ovary cell line, *Mutat. Res.* 254 167-174.

Robson, C.N.; Hoban, P.R.; Harris, A.L. y Hickson, I.D. (1987) Cross-sensitivity to topoisomerase II inhibitors in cytotoxic drug-hypersensitive Chinese hamster ovary cell lines. *Cancer Res.* 47, 1560-1565.

S.J. Froelich-Ammon, N. Osheroff, (1995) Topoisomerase poisons-harnessing the dark side of enzyme mechanism, *J. Biol. Chem.* 270 21429-21432.

S.M. Davies, S.L. Davies, A.G. Hall, I.D. Hickson, Isolation and partial characterization of a mammalian cell mutant hypersensitive to topoisomerase II inhibitors and X-rays, *Mutat. Res.* 235 (1990) 111-118.

Sander M, Hsieh T-S. ( 1985) *Drosophila* topoisomerase II double strand-ADN cleavage: analysis of ADN sequence homology at the cleavage site. *Nucleic Acids Res* 13:1057-1072.

Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, (1988) A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175-184-191.

Slichenmyer, W.J.; Rowinsky, E.K.; Donehower, R.C. y Kaufmann, S.H. (1993) The current status of camptothecin analogues as antitumor agents. *J. Natl. Cancer Inst.* 85, 271-291.

Sørensen, B.S.; Sinding, J.; Andersen, A.H.; Alsner, J.; Jensen, P.B. y Westergaard, O. (1992) Mode of action of topoisomerase II-targeting agents at a specific ADN sequence. Uncoupling the ADN binding, cleavage and religation events. *J. Mol. Biol.* 228, 778-786.

T. Andoh, R. Ishida, (1998) Catalytic inhibitors of DNA topoisomerase II, *Biochim. Biophys. Acta* 1400 155-171.

Takimoto CH, Wright J, Arbutk SG (1998) Clinical applications of the camptothecins. *Biochim Biophys Acta* 1400:107.

Tan KB, Dorman TE, Falls KM, Chung TDY, Mirabelli CK, Crooke ST, Mao I. (1992) Topoisomerase II-alpha and topoisomerase II-beta genes: characterization and mapping to human chromosome 17 and 3, respectively. *Cancer Res*;52:231-234.

Tanabe, K, Ikegami, Y.; Ishida, R. y Andoh, T. (1991) Inhibition of topoisomerase II by antitumor agents bis(2,6-dioxopiperazine) derivatives. *Cancer Res.* 51, 4903-908.

Tsai-Pflugfelder M, Liu LF, Liu AA, Tewey KM, Whang-Peng J, Knutsen T, Huebner K, Croce CM, Wang JC. (1988) Cloning and sequencing of cDNA encoding human DNA topoisomerase II and localization of the gene to chromosome region 17q21-22. *Proc Natl. Acad Sci USA*; 85:7177-7181.

Tsukamoto, Y. e Ikeda, H. (1998) Double-strand break repair mediated by DNA end-joining. *Genes Cells* 3, 135-144.

Tsutsui K, Tsutsui K, Okada S, Watanabe M, Shohmori T, Seki S, Inoue Y. (1993) Molecular cloning of partial cDNA for rat DNA topoisomerase II isoforms and their differential expression in brain development. *J Biol Chem*; 268:19,076-19,083.

Van Dyck k, Stasiak.AZ, Stasiak A, West SC : (1999) Binding of double strand breaks in DNA by human RAD 52 protein. *Nature*, 391: 401-404.

Y Funayama,.; Nishio, K.; Takeda, Y.; Kubota, N.; Ohira, T.; Ohmori, T.; Ohta, S.; Ogasawara, H.; Hasegawa, S. y Saijo, N.(1993) Suramin inhibits the phosphorylation and catalytic activity of DNA topoisomerase II in human lung cancer cells. *Anticancer Res.* 13, 1981-1988.

Y. Chen, F.L. Liu, (1994) DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34 191-218.



Y. Chen, F.L. Liu, DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34 (1994) 191–218.

Y.H. Hsiang, L.F. Liu, (1988) Identification of mammalian ADN topoisomerase I as an intracellular target of the anticancer drug camptothecin, *Cancer Res.* 48 1722-1726.

Y.H. Hsiang, R. Hertzberg, S. Hecht, L.F. Liu, (1985) Camptothecin induces proteinlinked ADN breaks via mammalian ADN topoisomerase I, *J. Biol. Chem.* 260 14873-14878.

Y.P. Keepers, P.E. Pizao, G.J. Peters, J. Van Ark Otte, B. Winograd, H.M. Pinedo, (1991) Comparison of the sulforhodamine B protein and the tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing, *Eur. J. Cancer* 27 897–900.

Zechiedrich EL, Osheroff N. (1990) Eukaryotic topoisomerase recognize nucleic acid topology By preferentially interacting with ADN crossover. *EMBO J*; 9:4555-4562.

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

es de

D NABIL HAJI

CARACTERIZACION DE

ADN: MODULACION DE LA ENZIMA

TOPoisomerasa II de

SOBRESALIENTE CUM LAUDE

El Vostre, 20

Octubre de 2004

Junel de l'1 de

El Presente,



Revisada





