

**PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA**  
**ESTUDIO DE GENES ASOCIADOS AL DAÑO AL ADN Y SU**  
**RELACION CON LA RADIOSENSIBILIDAD INTRINSECA**  
**EN CELULAS DE MELANOMA CON DISTINTO GRADO DE**  
**AGRESIVIDAD**

**Zuccato, Camila Florencia - 1036757**

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

**Dra. Irene Laura Ibañez, CNEA**

Tutor Adjunto:

**Dra. Hebe Alicia Durán, CNEA**

Co-Tutor:

**Dr. Prada, Federico, UADE**

**Marzo 18, 2016**



**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA**  
**FACULTAD DE INGENIERIA Y CIENCIAS EXACTAS**

## **Agradecimientos**

A mi familia, Mamá, Bruno, Eze, Tía Laura, por estar desde el primer día al último apoyándome, acompañándome y dándome fuerzas en todo momento. A mis perros, Mili, Ciclón y Mora, especialmente por su compañía incondicional en estos últimos días de escribir hasta la madrugada.

A Ire y Hebe, por dirigir este proyecto y enseñarme con tanta paciencia y cariño, contribuyendo de la mejor manera a mi formación profesional. Por tratarme siempre tan bien, y principalmente por brindar su tiempo y dedicación a este trabajo.

A Fran por su ayuda en mis experimentos y su predisposición para cualquier cosa que necesitara, pero principalmente por las risas y mates que compartimos en esos días de largos experimentos.

A Lara, Tati, Ceci, Luciano, Cintia, Candy y Vane por sus aportes profesionales a lo largo de todo este proyecto.

A la Dra. Molinari y la gente de CEBIRSA por las irradiaciones y al Jefe de Departamento e integrantes del departamento de Radiobiología de la Comisión Nacional de Energía Atómica por su apoyo y por permitirme el uso de sus laboratorios y equipamiento.

A Federico Prada, por su atención a todas mis consultas, comprendiendo cada inconveniente.

Personalmente, adquirí excelentes conocimientos y enriquecimiento profesional. Me llevo lindos recuerdos y maravillosas personas en mi corazón.

Camila Florencia Zuccato

## Resumen

La respuesta al daño al ADN inducido por radiaciones ionizantes involucra la detección del daño y la inducción de señales que conducen al arresto del ciclo celular, la reparación del daño y finalmente la sobrevida o la inducción de apoptosis. La ruptura de doble cadena de ADN (DSB) presenta una cinética de producción que se correlaciona con muerte celular. Un evento primario que ocurre en respuesta a las DSBs es la fosforilación de la histona H2AX, mediada principalmente por la proteína ATM. Además, el complejo proteico MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) reconoce el daño al ADN y está involucrado en reclutar ATM al sitio de daño. La proteína ATM también fosforila otras proteínas relacionadas con la reparación del ADN, como BRCA1, 53BP1 y MDC1. Por otro lado, la identificación de genes que se expresen diferencialmente entre una célula radiosensible y una radiorresistente es relevante para caracterizar la respuesta individual de tumores a la radioterapia y desarrollar estrategias tendientes a radiosensibilizar células radiorresistentes. En este sentido, la respuesta radiobiológica de células de melanoma es de sumo interés, dado que es un tumor altamente metastásico y refractario a los tratamientos convencionales de quimio y radioterapia.

En este proyecto, el objetivo fue evaluar la relación entre la radiorresistencia de células de melanoma, la malignidad y la expresión de genes asociados a la respuesta al daño al ADN en un modelo de líneas celulares con igual *background* genético, pero con diferentes fenotipos: A375-A7, melanótica y no invasiva y A375-G10, amelanótica y metastásica. Estas líneas fueron generadas en nuestro laboratorio por transfección estable de la enzima antioxidante catalasa y A375-PCDNA3 (transfectada con el plásmido sin el inserto de la catalasa) fue utilizada como control.

La radiosensibilidad de estas líneas fue determinada mediante el ensayo clonogénico luego de irradiar las células con una fuente gamma de  $^{137}\text{Cs}$ . Las curvas de sobrevida fueron ajustadas al modelo lineal cuadrático. Se demostró que A375-G10 es significativamente más radiorresistente que A375-A7 y A375-PCDNA3, siendo la fracción de sobrevida a 2 Gy (SF2) de  $0.89 \pm 0.05$ ,  $0.43 \pm 0.16$  y  $0.32 \pm 0.03$  y el parámetro  $\alpha$  de  $0$ ,  $0.20 \pm 0.05$  y  $0.45 \pm 0.05$ , respectivamente. Se evaluó el sensado del daño mediante la detección de H2AX fosforilada ( $\gamma$ -H2AX), demostrándose una menor inducción de focos de  $\gamma$ -H2AX en A375-G10. Se realizó el análisis bioinformático de *microarrays* de expresión de genoma completo (Affymetrix). Se definieron *a priori* conjuntos de genes asociados con la vía del ciclo celular,

la apoptosis y la señalización de MAPK, recolectados de KEGG (Kyoto Enciclopedia de genes y genomas) para evaluar las diferencias significativas en la co-expresión de genes entre células por GSEA (Gen Set Enrichment Analysis). Como resultado relevante de estos estudios, se demostró una disminución significativa en la co-expresión de genes relacionados con la respuesta al daño al ADN (ATM, TP53BP1 y MRE11A) en A375-G10 con respecto a A375-A7 y a los controles, consistente con la disminución de  $\gamma$ -H2AX. Asimismo, A375-G10 presentó grupos de genes subexpresados (*down*-regulados) en conjunto, que están involucrados en reparación de ADN, puntos de chequeo y control negativo del ciclo celular y en apoptosis.

En conclusión, el perfil de expresión génica de las células A375-G10 sugiere que estas células podrían evadir la apoptosis inducida por el daño al ADN con la consecuente progresión en el ciclo celular y la mayor radiorresistencia, lo que resultaría en inestabilidad genómica y aumento de la malignidad. Así, el perfil de expresión génica de las células A375-G10 podría asociarse a los mecanismos de radiorresistencia y a las características malignas de estas células.

## Abstract

The DNA damage response induced by ionizing radiation involves the detection of damage and activation of signal transduction pathways that lead to cell cycle arrest, DNA damage repair and finally survival or induction of apoptosis. The production of DNA double strand breaks (DSBs) presents a kinetics that correlates with cell death. A key early event in the DSBs response is the phosphorylation of H2AX histone, mediated mainly by ATM protein. In addition, the MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) protein complex recognizes DNA damage and is involved in ATM recruitment to damage site. ATM protein also phosphorylates other proteins related to DNA repair, as BRCA1, 53BP1 and MDC1. On the other hand, the identification of genes that are differentially expressed between a radiosensitive and a radioresistant cell is relevant to characterize the individual response of tumors to radiotherapy and to develop radiosensitizing strategies for radioresistant cells. In this sense, the radiobiological response of melanoma cells is of great interest, since it is highly metastatic and refractory to conventional chemotherapy and radiotherapy.

The aim of this project was to assess the connection between the radioresistance of melanoma cells, its malignancy and the expression of genes associated with DNA damage response in a cell line model with the same genetic background but different phenotypes: A375-A7, melanotic and non-invasive, and A375-G10, amelanotic and metastatic. These cell lines were developed in our laboratory by stable transfection with the antioxidant enzyme catalase and A375-PCDNA3 (transfected with the plasmid without catalase insert) was used as control.

Radiosensitivity was determined by clonogenic assay after irradiating these cells with a  $^{137}\text{Cs}$  gamma source. Survival curves were fitted to the linear-quadratic model and surviving fraction at 2 Gy (SF2) was calculated. Results showed that A375-G10 cells were significantly more radioresistant than both A375-A7 and control cells, demonstrated by SF2 and  $\alpha$  parameter of survival curves: SF2=0.32±0.03, 0.43±0.16 and 0.89±0.05 and  $\alpha$ =0.45±0.05, 0.20±0.05 and 0 for A375-PCDNA3, A375-A7 and A375-G10 respectively. DNA damage sensing was assessed by the detection of phosphorylated H2AX histone ( $\gamma$ -H2AX). A lower induction of  $\gamma$ -H2AX foci were found in A375-G10 compared with A375-A7 and control. Bioinformatic analysis of whole genome expression *microarrays* data (Affymetrix) from these cells was performed. A priori defined gene sets associated with cell cycle, apoptosis and

MAPK signaling pathway were collected from KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) to evaluate significant differences in gene set expression among cells by GSEA (Gene Set Enrichment Analysis). A375-G10 showed significant decrease in the coexpression of genes related to DNA damage response (ATM, TP53BP1 and MRE11A) compared with A375-A7 and controls. Moreover, A375-G10 exhibited down-regulated gene sets that are involved in DNA repair, checkpoint and negative regulation of cell cycle and apoptosis.

In conclusion, this expression profile suggests that A375-G10 could escape from DNA damage-induced apoptosis with the consequent progression in the cell cycle, resulting in genomic instability and increase of malignancy. Thus, A375-G10 gene expression profile could be involved in radioresistance mechanisms and malignant features of these cells.

## Contenidos

### 1. Introducción

#### 1.1 El melanoma

##### 1.1.1 Epidemiología del Melanoma

##### 1.1.2 Histogénesis del Melanoma

##### 1.1.3 Metástasis

#### 1.2 Radiación Ionizante

##### 1.2.1 Efectos Biológicos de las Radiaciones Ionizantes

##### 1.2.2 Respuesta al Daño al ADN

#### 1.3 Tecnología de *Microarrays* en Cáncer

#### 1.4 Objetivos

### 2. Estado del Arte

#### 2.1 Caracterización del Modelo de Melanoma Utilizado

#### 2.2 Terapias Convencionales para el Melanoma

##### 2.2.1 Interacción entre las Vías de Invasión y Resistencia a las Terapias en Cáncer

##### 2.2.2 Radiorresistencia de las Células de Melanoma

#### 2.3 Histona H2AX y Radiosensibilidad

#### 2.4 Vías Involucradas en la Respuesta al Daño al ADN

#### 2.5 Perfiles de Expresión Génica Estudiados en Melanoma

### 3. Hipótesis

### 4. Metodología

#### 4.1 Modelo Experimental

##### 4.1.1 Línea Celular y Condiciones de Cultivo

#### 4.2 Estudios *In Silico*

4.2.1 Implementación de Herramientas Bioinformáticas para la Construcción de Redes de Genes Modulados en Procesos de Respuesta a Radiación y Malignidad

4.2.2 Evaluación del Perfil de Expresión Conjunta de Grupos de Genes Definidos a Priori a Partir del Análisis de los Datos de *Microarrays* de Expresión del Modelo de Melanoma Derivado de A375

#### 4.3 Estudios *In Vitro*

4.3.1 Experimentos de Irradiación

4.3.2 Ensayo Clonogénico

4.3.3 Inmuncitofluorescencia y Cuantificación de  $\gamma$ -H2AX

4.3.4 *Western Blot*

4.3.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real

#### 4.4 Análisis Estadístico

### 5. Resultados y Discusión

#### 5.1 Estudios *In Silico*

5.1.1 Análisis bioinformático

5.1.2 Evaluación de los Perfiles de Expresión Génica en la Vía de Apoptosis

5.1.3 Evaluación de los Perfiles de Expresión Génica en la Vía de Señalización de p53

5.1.4 Evaluación de los Perfiles de Expresión Génica en la Vía del Ciclo Celular

5.1.4 Evaluación de Expresión Integrando las Vías de Apoptosis, p53, Ciclo Celular y Respuesta al Daño al ADN

#### 5.2 Estudios *In Vitro*

5.2.1 Evaluación de las Respuestas Celulares a la Radiación Gamma: Curva de Sobrevida

5.2.2 Cuantificación de Focos de  $\gamma$ -H2AX como Determinación de DSBs en el ADN

5.2.3 Evaluación de  $\gamma$ -H2AX por *Western Blot*

5.2.4 Evaluación del Gen MRE11 por PCR Cuantitativa

### 6. Conclusión

### 7. Referencias

### 8. Anexo



## 1. Introducción

### 1.1 El Melanoma

Melanoma es el nombre genérico de los tumores melánicos o pigmentados, su nombre deriva del griego melas: “negro” y oma: “tumor”. Es un tipo de cáncer que surge de la transformación maligna de melanocitos epidérmicos, las células pigmentadas de la piel (Smalley, 2010). La mayoría de los melanomas se localizan en la piel y menos frecuentemente en mucosas. Dado que los melanocitos derivan de la cresta neural, pueden observarse melanomas en otras localizaciones como retina y meninges.

#### 1.1.1 Epidemiología del Melanoma

Las tasas de incidencia estandarizadas por edad (ASRw) de melanoma son de 3,1 y 2,6 cada 100.000 personas por año en hombres y mujeres, respectivamente, resultando mayor frecuencia en hombres y personas caucásicas que habitan regiones con climas soleados (Ferlay, Parkin *et al.* 2010). En algunos países desarrollados es el primer o segundo tumor en adultos jóvenes. De hecho, la tasa de mortalidad más alta de este tipo de cáncer se observó en Australia (40-60/100.000), en EE.UU (10-20/100.000) y en Europa (10-15/100.000) (Jemal, Siegel *et al.* 2008). En un estudio sobre los casos reportados de melanoma específicamente en Latinoamérica se encontró que los valores de ASRw del melanoma varían ampliamente desde 1,1 a 6,5 cada 100.000 personas por año en ambos sexos, para todas las edades y regiones. Además, se observó que la ASRw media es de 4,6 y 4,3 por cada 100,000 personas por año para mujeres y hombres, respectivamente con una distribución por sexo de: 46% en hombres y 54% en mujeres (Sortino-Rachou, Curado *et al.* 2011). En Argentina, los datos de ocurrencia de melanoma son escasos. Un trabajo de Loria y col. comunicó que el número de defunciones y la tasa de mortalidad aumentaron gradualmente, llegando para el período 2000-2004 a un promedio de 2.471 muertes/año (con una tasa de 1,3 defunciones /100.000 personas) con variaciones entre jurisdicciones, donde la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y el Chaco presentaron las tasas más altas del país (3,3 y 1,6/100.000 respectivamente para los hombres y 1,9 y 1,2/100.000 para las mujeres) (Loria, González *et al.* 2010).

En la Tabla I se muestra el número de casos de melanoma y ASRw para todas las edades en función del sexo y la región geográfica (Curado *et al*, 2007). En particular el patrón de incidencia por edad muestra tasas notablemente más altas entre las personas mayores, especialmente hombres de 70 años de edad o mayores.

A diferencia de otros tipos de cáncer cutáneo, el melanoma es un tumor que muestra una marcada tendencia a producir metástasis. Por lo tanto, aunque sólo representa el 5% de los tumores malignos de piel, es responsable del 75-80% de las muertes causadas por este tipo de tumores. Además, en estadios avanzados es altamente resistente a los tratamientos convencionales, tanto de quimioterapia como de radioterapia. Por lo tanto, hay un gran interés, tanto en el desarrollo de nuevas terapias antitumorales como en el estudio de esta enfermedad para una mejor comprensión de los mecanismos responsables del fenotipo maligno (Riley, 2003).

<b>Tabla I.</b> Tasas de incidencia estandarizadas por edad del melanoma cada 100.000 personas en base al género y población de los registros de cáncer para todas las edades.								
Regiones	Casos	Masculino ASRW	95% CI	Casos	Femenino ASRW	95% CI	Tasa M/S	Grupo por edades
Argentina, Bahía Blanca	27	3,3	2,0 - 4,6	29	2,9	1,8 - 4,1	1,1	55 - 59
Brasil, Goiania	69	4,4	3,3 - 5,5	93	4,5	3,6 - 5,5	1	50 - 54
Brasil, San Pablo	1.392	6,5	6,1 - 6,9	1.687	5,7	5,4 - 6,0	1,1	60 - 64
Brasil, Brasilia	102	4,2	3,3 - 5,2	122	4,3	3,4 - 5,1	1	50 - 54
Brasil, Cuiabá	16	2,6	1,3 - 4,0	15	1,9	0,9 - 3,0	1,4	50 - 54
Chile, Valdivia	16	1,8	0,9 - 2,7	32	3,5	2,3 - 4,7	0,5	50 - 54
Colombia, Cali	124	3,5	2,8 - 4,1	135	2,9	2,4 - 3,5	1,2	55 - 59
Costa Rica	188	2,4	2,0 - 2,8	173	2,1	1,8 - 2,4	1,1	55 - 59
Ecuador, Quito	73	2,5	1,9 - 3,1	96	2,9	2,3 - 3,5	0,9	55 - 59
Francia, Isla Martinica	18	1,4	0,7 - 2,1	19	1,1	0,6 - 1,6	1,3	60 - 64
Perú, Trujillo	16	1,8	0,9 - 2,8	23	2,1	1,2 - 2,9	0,9	60 - 64
<b>Total</b>	<b>2.041</b>	<b>4,6</b>	<b>4,3 - 4,7</b>	<b>2.424</b>	<b>4,3</b>	<b>4,2 - 4,4</b>	<b>1,1</b>	<b>60 - 64</b>

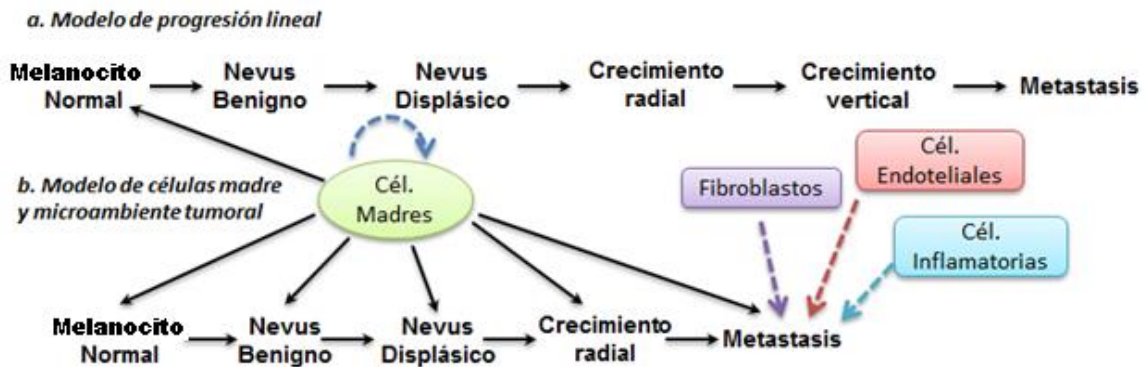
ASRW: Tasa de incidencia estandarizada por edad, IC del 95%: intervalo de confianza del 95%.  
 Fuente: Cancer Incidence in Five Continents volume IX (CI5 - IX)

### ***1.1.2 Histogénesis del Melanoma***

Como mencionamos inicialmente, el melanoma deriva de la transformación maligna de los melanocitos. Estas células derivan de la cresta neural y durante el desarrollo embrionario se diferencian hacia melanoblastos y migran hacia la piel. Tras alcanzar la dermis migran a la epidermis o al folículo piloso y se diferencian hacia melanocitos epidérmicos o foliculares, o se quedan en la dermis y se diferencian hacia nevomelanocitos (Erickson y Reedy, 1998). Así, cuando el melanoma se origina en la piel, se lo denomina melanoma cutáneo (también se puede presentar en las membranas mucosas) y cuando se presenta en el ojo se llama melanoma ocular uveal.

El melanoma tiene un comportamiento biológico que determina el pronóstico ya que presenta dos fases de crecimiento, una radial (intraepidérmico) y otra vertical (intradérmico). En la fase de crecimiento radial, que puede durar meses o años, la tumoración está limitada a la epidermis sin presentar capacidad de producir metástasis, en esta situación la extirpación quirúrgica es curativa. En la fase de crecimiento vertical, la tumoración invade la dermis con la capacidad de producir metástasis linfáticas o sanguíneas. Esta teoría da origen al modelo tradicional o de progresión lineal del melanoma en el cual éste se iniciaría en la epidermis con la proliferación de melanocitos en la unión dermo-epidérmica y de forma gradual presentaría un crecimiento intraepidérmico para afectar la epidermis. En la fase de crecimiento vertical, se rompería la unión dermo-epidérmica invadiendo la dermis papilar, reticular y tejido graso subcutáneo (Uong y Zon, 2010). A este modelo se le suma uno nuevo basado en células madre tumorales de melanoma y el microambiente que apoya la teoría de que las células madre de melanoma darían lugar directamente a las lesiones clínicas sin progresar por los elementos intermedios. Además, en los estadios más tardíos, el microambiente tumoral compuesto de los fibroblastos que lo rodean junto con las células endoteliales e inflamatorias contribuirían y darían soporte a las metástasis (Fig. 1) (Hoerter *et al*, 2012).

Por lo tanto, teniendo en cuenta que una de las características del melanoma es su gran capacidad metastásica, el estudio de los mecanismos que regulan los procesos de migración y metástasis en melanoma es fundamental para el desarrollo de nuevas estrategias que apunten al tratamiento de uno de los procesos responsable de la mortalidad de los pacientes con cáncer.



**Fig. 1.** a. Modelo de progresión lineal del melanoma: el desarrollo del melanoma se observaría como un proceso gradual en el cual los melanocitos maduros normales adquirirían mutaciones que los haría progresar desde los nevos benignos, nevusdisplásicos, crecimiento radial y crecimiento vertical del melanoma que daría lugar a la producción de metástasis. b. Modelo basado en células madre de melanoma y el microambiente: las células madre de melanoma darían lugar directamente a las lesiones clínicas sin progresar por los estadios intermedios y en el cual el microambiente tumoral junto con las células endoteliales e inflamatorias contribuirían y darían soporte a las metástasis (Hoerter *et al*, 2012).

### 1.1.3 Metástasis

El paso inequívoco de que una neoplasia sea maligna, es la diseminación de las células cancerosas del tumor primario a un órgano distante. Este proceso conocido como metástasis, es la causa más frecuente de muerte en los pacientes con cáncer.

Los pasos necesarios para que ocurra la metástasis son: la migración y la invasión de células tumorales a los tejidos adyacentes, la intravasación tanto en los vasos sanguíneos como linfáticos, la supervivencia en estos sitios, seguido de la extravasación y el crecimiento en diferentes tejidos de órganos. Para lograr estos pasos, las células invasivas adquieren un fenotipo migratorio asociado con el aumento de la expresión de genes que participan en la motilidad celular y remodelación de la matriz extracelular (MEC). Los mecanismos de migración utilizados son similares a los que ocurren en células normales, no neoplásicas, durante procesos fisiológicos como la morfogénesis embrionaria, la reparación de heridas (*woundhealing*) y el tráfico de células inmunes. Sin embargo, a diferencia de los procesos fisiológicos, la migración de las células tumorales parece estar marcada por un predominio de señales promigratorias, con ausencia de señales de detención. Este desbalance de señales

permitiría a las células tumorales volverse continuamente migratorias e invasivas, permitiendo la expansión del tumor, más allá de los límites de su tejido. Por lo tanto, entender los mecanismos que llevan a la motilidad, migración e invasión celular en cáncer y conocer las moléculas involucradas en este proceso es crucial para un mejor conocimiento del proceso metastásico y de los posibles blancos para la terapia anti-metastásica (Friedl y Wolf, 2003; Wang *et al*, 2004; Yamaguchi *et al*, 2005).

Con respecto al melanoma, el mayor riesgo de metástasis se da en la fase de crecimiento vertical, que es cuando se da el daño dérmico. Las metástasis del melanoma se presentan por vía linfática y sanguínea y los lugares donde más frecuentemente el melanoma metastatiza son: piel, tejido celular subcutáneo, ganglios, pulmón, hígado y cerebro (Gaviria, J. y Niño, C. 2005). Se considera que la supervivencia es de 6 a 10 meses cuando aparecen metástasis a distancia (Stanley, P. 2003). Las metástasis a distancia se pueden presentar sin compromiso de los ganglios linfáticos regionales, debido a la diseminación hematogena. El riesgo de metástasis está directamente influenciado por la profundidad del tumor (Gaviria, J. y Niño, C. 2005).

## ***1.2 Radiación Ionizante***

Las radiaciones ionizantes son aquellas que al interactuar con la materia tienen la energía suficiente para desprender electrones de átomos o moléculas, produciendo por lo tanto una ionización. Los electrones ocupan orbitales de energías definidas en la estructura de los átomos, moléculas o iones. Para producir la ionización, es necesario suministrar una cantidad de energía que represente la energía de enlace del electrón. La energía de enlace del electrón más exterior que corresponde al primer potencial de ionización es del orden de 10 eV. La absorción de una energía menor a la requerida para producir una ionización puede conducir a una excitación, que implica el pasaje de un electrón a una órbita más externa. Los átomos o moléculas ionizadas o excitadas tienen un exceso de energía interna, que puede ser suficiente para producir la disociación de la molécula.

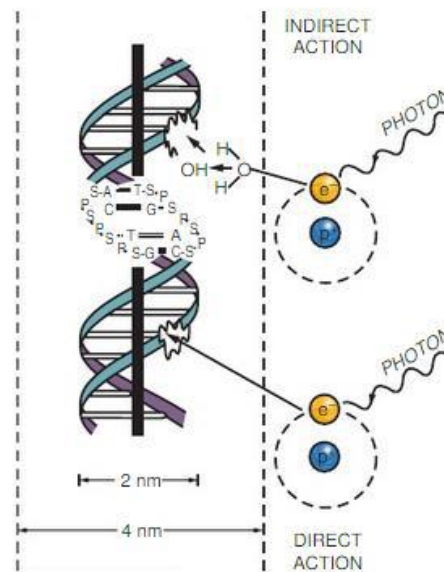
Las ionizaciones y excitaciones se generan como resultado de la interacción de la radiación con los electrones que se encuentran cerca de sus trayectorias. Las radiaciones ionizantes por su naturaleza de interacción con el medio se pueden clasificar en radiaciones

directamente ionizantes (partículas con carga eléctrica) y radiaciones indirectamente ionizantes (eléctricamente neutras). Las partículas cargadas pueden ser electrones, protones, deuterones, iones pesados, etc. y las radiaciones indirectamente ionizantes son los fotones y neutrones. Estas últimas producen ionización a través de las partículas cargadas que ponen en movimiento al atravesar el medio, siendo electrones secundarios en el caso de los fotones y protones secundarios en el caso de los neutrones (Tubiana, M. 1990).

### ***1.2.1 Efectos Biológicos de las Radiaciones Ionizantes***

Los efectos biológicos de la irradiación son el producto final de una larga serie de fenómenos que se dan por el paso de la radiación a través del medio. Las perturbaciones físicas generadas por la radiación conducen a reacciones físico-químicas, luego reacciones químicas y, finalmente, el efecto biológico. Este efecto se da inicialmente por el daño a las biomoléculas esenciales para la vida, como los ácidos nucleicos. El efecto biológico puede producirse aún cuando el número de eventos de ionización y excitación y la energía que representan sean muy bajos. Sin embargo, es suficiente para dar como resultado la producción de lesiones que conducen a la muerte celular.

En una primera aproximación una célula puede ser considerada como una solución acuosa. La radiación puede tener un efecto directo en las moléculas de soluto produciendo lesiones en ellas o una acción indirecta debido a la interacción entre las moléculas de soluto y los productos de la radiólisis del agua. En el efecto directo las moléculas excitadas y ionizadas tienen un exceso de energía y son inestables. Este exceso de energía puede ser disipada, ya sea por emisión de fotones (fluorescencia) con retorno al estado inicial o por ruptura de un enlace covalente generando la escisión de la molécula en dos radicales libres. La escisión es más probable después de una ionización que después de una excitación debido a que la cantidad de energía recibida es mayor en el primer caso. En el efecto indirecto el resultado es la interacción entre los productos de la radiólisis del agua y las moléculas contenidas en la solución acuosa. Estos radicales generados por la radiólisis del agua difunden en la solución y reaccionan con las moléculas de soluto, produciendo modificaciones químicas (Fig. 2) (Tubiana, M. 1990).



**Fig.2.** Efectos directos e indirectos de los rayos X y  $\gamma$ . En el efecto directo se muestra interacción entre una molécula de ADN y un conjunto de electrones en movimiento después de la absorción de un fotón. En el efecto indirecto un electrón puesto en marcha después de la absorción de un fotón interactúa con una molécula de agua. Se produce un radical, por ejemplo  $\text{OH}\cdot$ , que a su vez produce una lesión en la molécula de ADN. Se estima que los radicales libres producidos en un cilindro de radio de 2 nm con su eje a lo largo de la molécula de ADN, pueden atacar este último. El efecto indirecto es dominante para las radiaciones de baja LET (Transferencia lineal de energía).

El tipo y la magnitud del daño dependen del tipo de radiación, de su energía, de la dosis absorbida, de la zona afectada y del tiempo de exposición.

El efecto de la radiación dependerá del lugar en donde se produzca la interacción: en el núcleo celular, en donde se encuentra el material genético de la célula; o en el citoplasma celular, en el que se hallan la mayoría de las organelas celulares y se realizan las actividades metabólicas de la célula.

El principal blanco biológico de las radiaciones ionizantes es el ADN. En el caso de producirse daño sobre moléculas como carbohidratos, lípidos o proteínas, que resulten en su alteración, sólo se ocasionarán efectos transitorios ya que dichas moléculas dañadas podrán volver a ser sintetizadas en el metabolismo normal.

Las lesiones en el ADN producidas por la radiación ionizante incluyen rupturas de cadena (simple y doble), alteración de bases, destrucción de azúcares, *cross-linking* formación de dímeros. Las rupturas de cadena son las más frecuentes. Las rupturas de simple cadena son producidas principalmente por efecto indirecto del radical OH• y son fácilmente reparables. Por otra parte las rupturas de doble cadena (DSBs) pueden traer consecuencias permanentes ya que son difíciles de reparar, pudiendo generar aberraciones cromosómicas como deleciones, inserciones y translocaciones. Cuando la radiación incide sobre una o unas pocas moléculas de ADN y la lesión se repara completamente no tiene consecuencias. Por el contrario, si la lesión no se repara en su totalidad entonces las consecuencias pueden ser graves.

Todos los organismos vivos presentan mutaciones espontáneas, la radiación produce un aumento en la frecuencia de mutaciones, pudiendo llegar a saturar los mecanismos de reparación. Así, las lesiones causadas por la radiación en el ADN se clasifican según su impacto en la supervivencia de la célula de forma cualitativa, pudiendo ser *lesiones subletales*, que pueden ser reparadas por mecanismos enzimáticos y por sí solas no conllevan a la muerte celular. Las *lesiones letales*, donde los daños producidos no pueden ser reparados, son lesiones irreversibles y conducen a la muerte celular. Las *lesiones potencialmente letales* son daños cuya probabilidad de reparación va a depender de las condiciones metabólicas de dicha célula, posteriores a la irradiación (Tubiana, M. 1990).

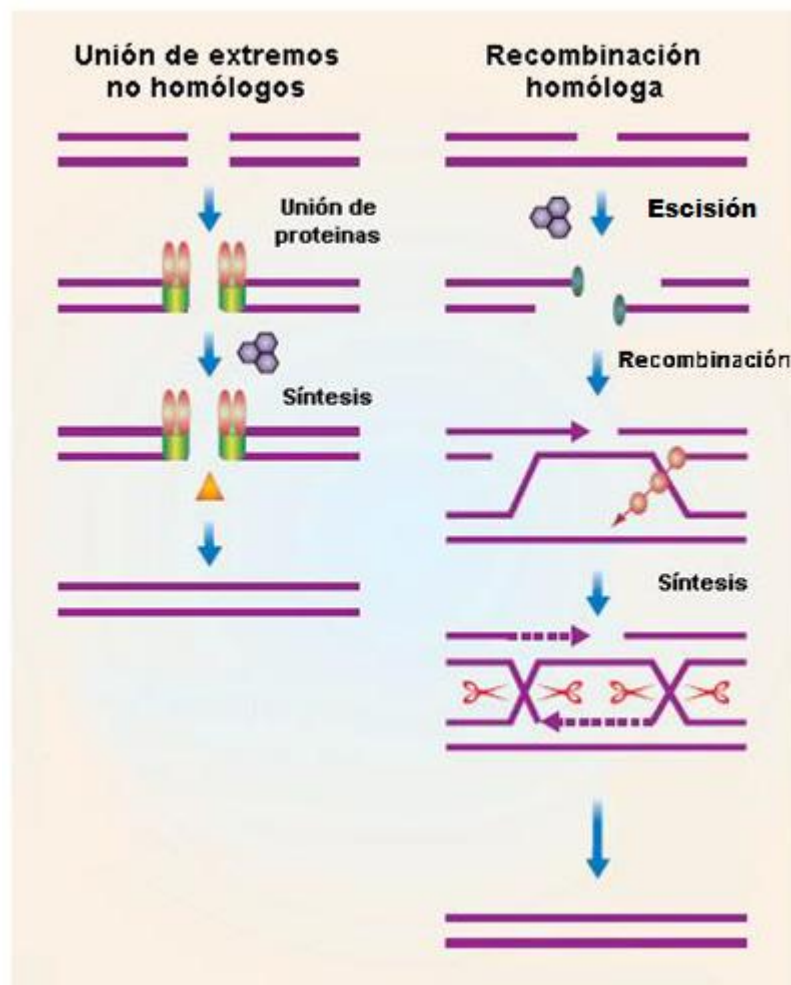
Es importante resaltar que el concepto de muerte celular más relevante en el efecto de la irradiación es la pérdida de la capacidad reproductiva de las células, aunque su aspecto y sus funciones metabólicas sigan estables durante cierto tiempo. De esta forma se dice que dicha pérdida de capacidad reproductiva equivale a muerte celular (Tubiana, M. 1990).

### ***1.2.2 Respuesta al Daño al ADN***

Como se mencionó anteriormente, las DSBs son las más dañinas para la célula, ya que pueden provocar aberraciones cromosómicas, si no logran ser reparadas eficientemente y por lo tanto, mitosis anormales y muerte reproductiva. Existen dos mecanismos que reparan las DSBs (Fig.3):



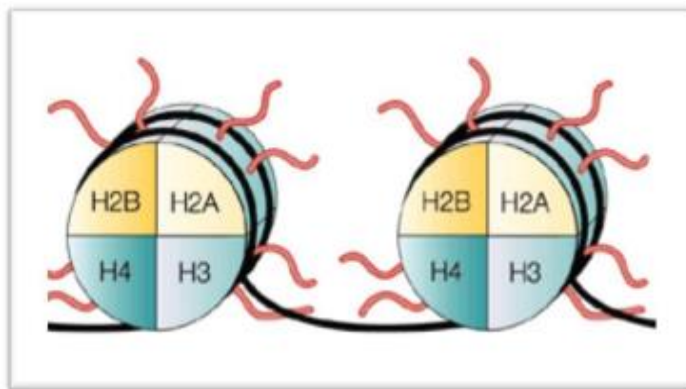
- *Reparación por recombinación homóloga:* Este mecanismo utiliza una estrategia de recombinación similar a la que opera en el intercambio de cromátidas que se da en la meiosis, uniendo regiones homólogas de los cromosomas paternos y maternos. Consiste en la escisión enzimática de un segmento de cada cadena dañada seguido de la síntesis de una hebra nueva de ADN por un mecanismo que toma como molde la hebra complementaria del cromosoma homólogo.
- *Reparación por unión de extremos no homólogos:* A diferencia del mecanismo por recombinación homóloga, esta reparación no utiliza una cadena molde. En este proceso se reincorporan los dos extremos rotos directamente y conduce a pequeñas deleciones de secuencias de ADN.



**Fig. 3.** Mecanismos de reparación de DSBs. Modificado de Khanna y Jackson, 2001.

En presencia de DSBs, la célula desencadena una respuesta coordinada, la respuesta a daño en el ADN (*DNA damage response* o DDR), cuyo principal objetivo es la reparación del daño y el mantenimiento de la integridad genómica (Harper *et al.* 2007). La maquinaria de la DDR detecta la lesión y pone en marcha mecanismos de reparación. Dependiendo de la naturaleza y de la gravedad de las lesiones, la DDR, además de activar la reparación, puede detener el ciclo celular, activar programas de transcripción e incluso desencadenar la muerte celular programada de la célula (apoptosis). La inmensa mayoría de pequeñas lesiones, como las modificaciones puntuales de las bases que se producen constantemente, son reparadas sin ningún trastorno para la célula. No obstante, las DSBs son las lesiones estructurales que desafían más gravemente la integridad del ADN y pueden disparar una señal que implicará la parada del ciclo celular por activación de los puntos de control del ciclo celular (o *checkpoints*) (Martinez Pastor, B. 2010).

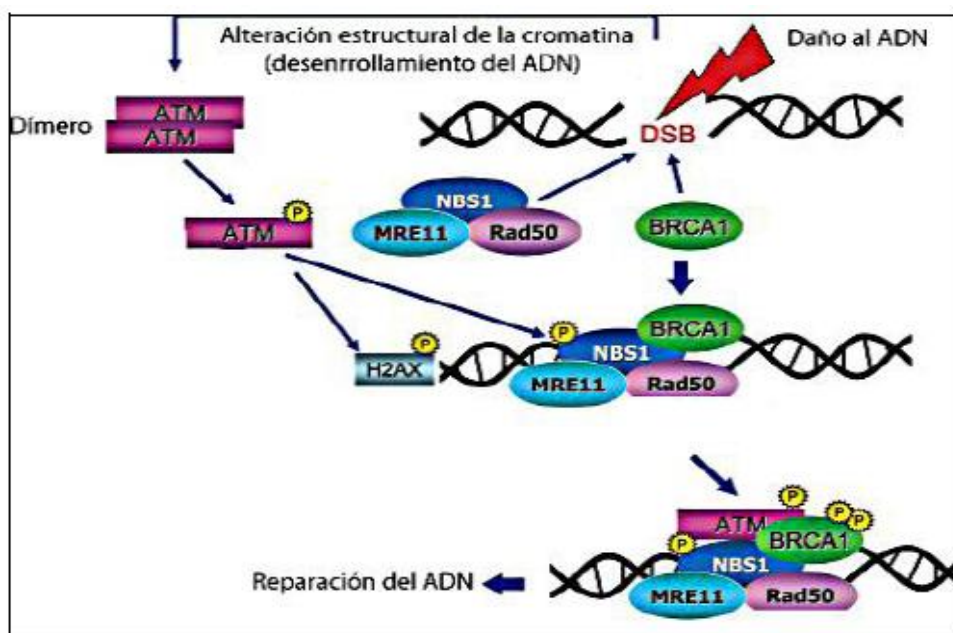
Existen varias moléculas involucradas en la señalización y reparación del daño al ADN. La histona H2AX pertenece a la familia de las histonas H2A. Es una variante que se expresa constitutivamente y es incorporada al azar dentro de los nucleosomas (Fig. 4).



**Fig. 4.** Estructura de nucleosomas conteniendo la variante histona H2A. (Paul A. Marks, *et al.* 2001)

La H2AX contiene una secuencia serina-glutamina-ácido glutámico-leucina en el extremo C-terminal, la cual es la principal responsable de su función. Esta secuencia es blanco de las quinasas ATM (del inglés, *ataxia-telangiectasia mutated*), ATR (del inglés, *ataxia telangiectasia and Rad3-related*) y ADN-PK (del inglés, *DNA-dependent protein*

*kinase*), que fosforilan el residuo conservado de serina en la posición 139 como respuesta al daño en el ADN. La fosforilación de la variante de histona nucleosómica H2AX, denominada  $\gamma$ -H2AX, está involucrada en la detección y reparación del daño al ADN. La presencia de la carga negativa extra aportada por el grupo fosfato, genera una descondensación localizada de la cromatina, que proporciona un mayor acceso a los diversos factores y complejos enzimáticos de las vías de reparación (Fig.5).



**Fig. 5.** Fosforilación de H2AX inducida por una ruptura de doble cadena (DSB) (Bracalente, 2007).

La integridad del genoma se encuentra constantemente monitoreada durante el ciclo celular por proteínas que detectan y señalizan el daño producido en el ADN. Estas señales son amplificadas y transmitidas hacia otras proteínas involucradas en el arresto del ciclo celular, reparación de las lesiones o apoptosis. Esta sofisticada red de interacciones constituye la DDR. La generación de aberraciones cromosómicas puede producir defectos en el desarrollo, enfermedades neurodegenerativas, inmunodeficiencia y predisposición al cáncer. En la DDR, se producen modificaciones epigenéticas en el contexto de la cromatina que remodelan su estructura o actúan como señales específicas. La fosforilación de la Ser-139 de la variante de histona H2AX mediada por ATM, ATR y ADN-PK es una de las primeras modificaciones que

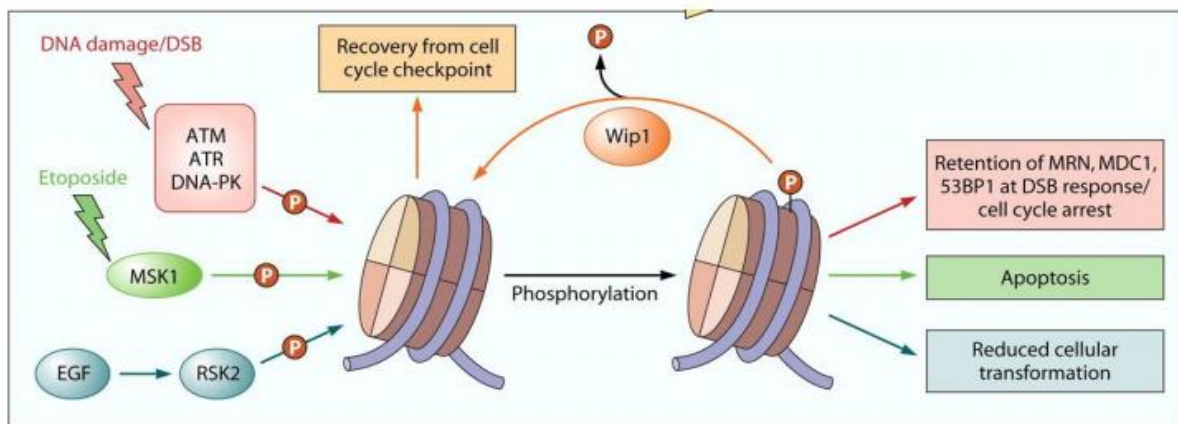
sufren las histonas en respuesta al daño. Estas proteínas a su vez integran las vías de control del ciclo celular y de la reparación del ADN. La detección de  $\gamma$ -H2AX mediante inmunomarcación ha sido desarrollada principalmente en núcleos en interfase, lo que permite la visualización de focos en los sitios de daño. La  $\gamma$ -H2AX es considerada un marcador específico para la evaluación de lesiones del ADN de células sometidas a agentes clastogénicos (Basso Alfonso S. *et al.* 2012). Los focos de  $\gamma$ -H2AX pueden ser visualizados en menos de 3 minutos después de que la célula ha sido irradiada, y su cantidad aumenta rápidamente hasta un máximo a los 30 minutos post-irradiación. Los focos de  $\gamma$ -H2AX son proporcionales a la dosis de radiación, siendo el número de focos proporcional al número de DSBs (Rogakou *et al.* 1999).

Una vez reparado el ADN, es necesario reestablecer la estructura de la cromatina, por lo tanto es indispensable la remoción de  $\gamma$ -H2AX que desestabiliza la estructura con su grupo fosfato. Este restablecimiento de la organización de la cromatina se puede producir mediante la sustitución de la  $\gamma$ -H2AX por una histona sin fosforilar o por desfosforilación directa de la histona presente en el nucleosoma. Por lo tanto, mediante inmunomarcación de los focos de  $\gamma$ -H2AX, es posible detectar la inducción de DSBs y su reparación. Se ha establecido una relación proporcional entre el número de focos de  $\gamma$ -H2AX y las DSBs, de esta forma los focos de  $\gamma$ -H2AX son reconocidos como marcadores cuantitativos de este tipo de daño en el ADN (Rothkamm y Lobrich 2003; Ismail 2007; Kinner 2008). La detección, mediante distintas técnicas, de  $\gamma$ -H2AX permite identificar focos nucleares y determinar su número y frecuencia, detectar el daño genómico y su reparación y determinar la radiosensibilidad celular. La estimación de  $\gamma$ -H2AX es una medida sensible de la extensión del daño al ADN tras la exposición de la célula a cualquier agente genotóxico (como radiación o agentes quimioterápicos) (Xuan Huang *et al.* 2006). La desfosforilación de la histona se ha correlacionado con la reparación de las DSBs. Es importante destacar que la formación local de  $\gamma$ -H2AX permite la detección microscópica de los distintos focos que representan una DSB. El potencial que presenta este método para detectar un foco dentro del núcleo hace que actualmente sea el más sensible para evaluar DSBs (Ismail I.H. *et al.* 2007)

Respecto a su actividad funcional podemos asumir que la fosforilación de H2AX es funcionalmente importante al conocer que la lesión responsable de la inducción de muerte celular en el ADN son las DSBs (James E. Cleaver. 2011).

Entre los efectos de la radiación destacan, por su importancia biológica, las DSBs en el ADN. Si éstas quedan sin reparar conducen a mutaciones, aberraciones cromosómicas, transformación/muerte celular. Así, la relación entre las DSBs, su reparación y la acción y detección de la histona H2AX fosforilada adquiere gran importancia.

La  $\gamma$ -H2AX es un punto de atracción para muchos componentes de la respuesta frente a DSBs del ADN (James E. Cleaver. 2011). Por ejemplo, media la translocación de p53 al foco radioinducido (Xuan Huang *et al.* 2006). H2AX protege la integridad del genoma frente a la carcinogénesis y su defosforilación se asocia a una mayor supervivencia celular (Fig.6).



**Fig. 6.** Fosforilación de la histona H2AX humana. (Banerjee T., Chakravarti C. 2011)

H2AX se fosforila no sólo en respuesta a lesiones en el ADN causadas por factores genotóxicos externos, sino que también existe una fosforilación intrínseca que depende del ciclo celular, tipo celular y la inducción de apoptosis (Xuan Huang *et al.* 2006).

### ***1.3 Tecnología de Microarrays en Cáncer***

Existe una enorme cantidad de información sobre la aplicación de las tecnologías moleculares de la era post-genoma humano para el estudio de los distintos tipos de cáncer. La perspectiva de que los laboratorios de genómica cuenten de rutina con tecnologías de alto rendimiento abre la posibilidad de la caracterización sistemática de los eventos genéticos completos que dan lugar a una célula cancerosa. Tradicionalmente, las estrategias de tratamientos a aplicar y la predicción sobre la posible evolución clínica se basan en datos histológicos y clínicos y más puntualmente en la detección de marcadores bioquímicos o moleculares específicos. En algunos casos, estos marcadores permiten predecir el grado de malignidad del tumor y por lo tanto la posible evolución clínica, como así también desarrollar posibles tratamientos selectivos. Sin embargo, si bien existe una gran cantidad de información del estudio de genes individuales, estos avances no han sido suficientes para lograr la cura de la enfermedad. Consecuentemente, una de las prioridades en la investigación en cáncer sigue siendo identificar los múltiples eventos asociados a la transformación celular a fin de generar terapias específicas, selectivas y dirigidas a cada tipo de tumor de acuerdo a su perfil bioquímico-molecular. Los avances de la biología molecular moderna a partir del conocimiento del genoma humano permiten evaluar los cambios en la expresión génica de miles de genes a la vez a través de, por ejemplo, la tecnología de *microarrays*. Esta metodología es una muy buena herramienta que contribuye a la identificación de múltiples eventos moleculares al mismo tiempo, facilitando la identificación de nuevos marcadores diagnósticos y el desarrollo de modelos de predicción de evolución de la enfermedad, como así también el diseño de estrategias terapéuticas específicas. Asimismo, los resultados obtenidos de estos ensayos aportan nueva información para ser analizada dentro de las bases de datos de *microarrays* mediante la aplicación de herramientas bioinformáticas (Khosravi Shahi, P. y Perez Manga, G. 2006; Ramirez J. *et al.* 2003; Gonzalez A. D. 2002).

Los tumores de origen esporádico, que comprenden la mayoría de los tumores, incluido el melanoma, surgen de la adquisición de alteraciones somáticas, genéticas y epigenéticas. En la última década, la disponibilidad de un mapa completo del genoma humano, asociada a los significativos avances tecnológicos, ha revolucionado la búsqueda de alteraciones somáticas en los genomas de los tumores. Dentro de un mismo tipo de tumor existen muchos genes infrecuentemente mutados y otros pocos más frecuentemente mutados, resultando en una

heterogeneidad genética importante. De todas formas, cuando estos genes alterados se ubican dentro de procesos biológicos o vías de señales bioquímicas o moleculares, esta complejidad se reduce significativamente y las vías compartidas que se encuentran afectadas en gran variedad de tumores pueden ser dilucidadas (Bell D.W. 2010). Así, se espera que los catálogos de alteraciones genéticas resultantes apunten a identificar genes candidatos en cáncer para ser validados con el fin de determinar si pueden presentar un rol causal en la tumorigénesis, esperando que estos nuevos conocimientos aporten mejoras en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer.

Entre las tecnologías de alto rendimiento, la tecnología de *microarrays* es utilizada para analizar anormalidades: a nivel genómico, tales como evaluación de pérdidas, ganancias o amplificaciones génicas y a nivel de expresión génica, pudiendo detectarse niveles de expresión, eventos de *splicing* alternativo y alteraciones del procesamiento del mRNA. También permite evaluar SNPs (del inglés, *single nucleotide polymorphisms*) e identificar cambios en la metilación del ADN (Cowell J.K. y Hawthorn L. 2007). En la última década, la tecnología de *microarrays* de expresión ha mostrado prometedoras mejoras en las estrategias actuales de pronóstico y en el tratamiento del cáncer (Hoek K. S. 2007). Quizás, el uso más avanzado de los *microarrays* de expresión con fines pronósticos en la clínica es el caso de pacientes con cáncer de mama. Actualmente, la FDA (del inglés, US Food and Drug Administration) ha aprobado una firma pronóstica de 70 genes (MammaPrint) (Van't Veer L.J. *et al.* 2002) para ser evaluada en un estudio clínico prospectivo y randomizado comparándola con criterios clínico-patológicos para seleccionar pacientes para quimioterapia adyuvante (Schramm S.J. *et al.* 2012).

#### **1.4 Objetivos**

Si bien en los últimos años se ha avanzado mucho en el estudio del melanoma, los mecanismos moleculares subyacentes a la adquisición del fenotipo invasor y resistente todavía no han logrado ser completamente descifrados. En este proyecto se pretende evaluar la radiosensibilidad intrínseca de un modelo de clones estables de melanoma humano derivados de la misma línea celular amelanótica (A375) que presentan distinto fenotipo, uno diferenciado y con capacidad de pigmentación y otro, invasivo y metastásico, a fin de aportar posibles mecanismos de radiorresistencia y su asociación con la progresión maligna. Este

modelo ha sido evaluado previamente en el laboratorio utilizando datos de tecnologías de alto rendimiento como los *microarrays* de expresión.

Para abordar el objetivo general de este proyecto, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Definir grupos de genes involucrados en procesos asociados a la progresión tumoral y a la resistencia a radiaciones ionizantes utilizando herramientas bioinformáticas estándar y algoritmos *ad hoc*. Evaluar el perfil de expresión conjunta de los grupos de genes definidos *a priori* en los datos de *microarrays* de expresión obtenidos en nuestro laboratorio a partir de las células de melanoma humano con distinto grado de agresividad del modelo mencionado. Con esto se propone definir grupos de genes asociados a radiorresistencia, a fin de desarrollar una primera aproximación al estudio de la asociación entre la radiorresistencia y la agresividad en estas células de melanoma.
- Evaluar la radiosensibilidad intrínseca del modelo de melanoma mencionado en respuesta a radiación ionizante gamma mediante la evaluación de la proliferación celular, la obtención de curvas de supervivencia y su ajuste a los modelos matemáticos correspondientes (lineal-cuadrático o exponencial), la detección de proteínas involucradas en la respuesta al daño al ADN y la evaluación de la inducción de apoptosis.

A partir de estos estudios, se seleccionarán los genes más relevantes con potencial pronóstico de agresividad tumoral y radiorresistencia que surjan del análisis anterior para ser validados mediante técnicas convencionales de biología molecular y celular en el modelo de melanoma ya mencionado. A futuro se pretende extender estos estudios a otras líneas celulares de melanoma humano como por ejemplo, SB2 y Mel-J, con el fin de confirmar nuestros resultados.



A través de la realización de este proyecto se busca detectar grupos de genes modulados en su expresión que permitan profundizar los estudios de las vías moleculares asociadas a invasión y resistencia, cada una de las cuales interviene en la progresión tumoral, y de esta manera nos permita evaluar su interconexión en melanoma.

## 2. Estado del Arte

### 2.1 Caracterización del Modelo de Melanoma Utilizado

En este trabajo se evaluará un modelo de clones estables de melanoma humano derivados de la misma línea celular amelanótica (A375) que presentan distinto fenotipo, uno diferenciado y con capacidad de pigmentación (A375-A7) y otro, invasivo y metastásico (A375-G10) (Bracalente C. *et al.* 2016a; Bracalente C. *et al.* 2016b).

Este modelo de melanoma fue generado en el marco de la tesis doctoral de la Dra. Candelaria Bracalente, a partir de la sobreexpresión del gen de la catalasa humana, una enzima antioxidante que disipa el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en agua y oxígeno.

Brevemente, la caracterización *in vitro*, *in vivo* e *in silico* de este modelo permitió diferenciar ambos clones a nivel fenotípico y genotípico entre sí y respecto de los controles (células A375 transfectadas con el plásmido sin inserto, A375-PCDNA3, y A375 no transfectadas) (Bracalente C. *et al.* 2016a; Bracalente C. *et al.* 2016b). El clon A375-G10, aunque mostró ser menos proliferativo y tumorigénico, de acuerdo con trabajos previos que demuestran el efecto antitumoral de tratamientos con catalasa (Hyoudou *et al.*, 2009; Ibanez *et al.*, 2011; Nishikawa y Hashida, 2006) lo cual se asociaría a los bajos niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> observados, presentó un incremento de la migración celular, de la expresión de cofilina y CAP1 asociada con tumores agresivos. Además este clon presentó capacidad metastásica *in vivo* y su perfil de expresión génica se asoció a firmas pronósticas bibliográficas de melanomas invasivos y con un grado mayor de agresividad (Bracalente C. *et al.* 2016a; Bracalente C. *et al.* 2016b). En cambio, si bien el clon A375-A7 mostró una tumorigenicidad semejante al control, a pesar de su menor capacidad proliferativa *in vitro* y sus bajos niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, los tumores inducidos por este clon mostraron características asociadas a la diferenciación celular debido a que presentaron pigmentación y a nivel histológico se observaron depósitos de melanina, lo cual coincide con el fenotipo diferenciado y menos agresivo descrito en este clon. Además, la diferenciación celular observada en el clon A375-A7 *in vitro* fue corroborada *in vivo* al determinar que los tumores inducidos por este clon presentaban mayor expresión de TYRP1. Si bien existen pocos estudios en cuanto a la expresión de esta proteína en la progresión del melanoma, Fang *et al.* la describieron presente en melanomas de crecimiento radial y ausente en los de crecimiento vertical (Fang *et al.*,

2001), sugiriendo que la pérdida de expresión de TYRP1 estaría vinculada a la adquisición de un fenotipo más invasivo. Esta hipótesis coincide con el trabajo de Ghanem *et al* en el cual se describe la desaparición selectiva de esta proteína en melanomas más agresivos y metastásicos (Ghanem y Fabrice, 2011). La participación de TYRP1 en la vía de síntesis de melanina podría explicar la pigmentación observada en los tumores generados por el clon A375-A7 que se corresponden con el mayor contenido de melanina observado *in vitro*. Estos resultados en conjunto con la morfología similar a melanocitos, la ausencia de capacidad invasiva y el perfil de expresión de genes asociados a melanomas más diferenciados y de baja agresividad confirman el mayor grado de diferenciación de este clon que estaría asociado a un fenotipo menos agresivo (Bracalente C. *et al.* 2016a; Bracalente C. *et al.* 2016b).

## **2.2 Terapias Convencionales para el Melanoma**

El tratamiento del melanoma en estadios iniciales se realiza mediante la resección quirúrgica obteniendo una muy buena respuesta, mientras que el tratamiento sistémico del melanoma se utiliza en los estadios avanzados o como terapia adyuvante en pacientes con un significativo riesgo de recaída (Batus M. *et al.* 2013).

Los agentes quimioterapéuticos más utilizados en melanoma aplicados como monodroga son dacarbazina, temozolomida, paclitaxel u otras drogas con incluso menor respuesta como carboplatino y vinblastina. Sin embargo, con ninguna de estas drogas se ha obtenido una buena tasa de respuesta. Los esquemas de poliquimioterapia o quimioinmunoterapia, que incluyen, por ejemplo, al interferón alfa, se usan como terapia adyuvante de primera línea en pacientes con riesgo de recaída. Si bien estos esquemas terapéuticos han tenido mejor respuesta, presentan comprensiblemente mayor toxicidad que la aplicación de agentes únicos, por eso se recomiendan sólo en aquellos casos en los que es necesaria una rápida respuesta objetiva (Asociación Médica Argentina, *et al.* 2011). Por lo tanto, si bien no hay un tratamiento estándar para los pacientes portadores de melanoma avanzado, la dacarbazina es el agente citotóxico más utilizado en primera línea, teniendo un perfil de toxicidad aceptable y se considera de referencia para esta enfermedad aunque presente respuesta completa sólo en el 5% de los casos y su efecto sea de corta duración (Tentori L. *et al.* 2013). La inmunoterapia basada en el bloqueo de CTLA-4 (regulador negativo de la respuesta inmune mediada por linfocitos T), y las drogas dirigidas contra blancos moleculares, como el BRAF mutado

(BRAF V600E), han mejorado, actualmente, el pronóstico de los pacientes con enfermedad avanzada (Robert C. *et al.* 2013). Sin embargo, no se ha logrado obtener un beneficio a largo plazo incluso con las nuevas drogas recientemente aprobadas (Tentori L. *et al.* 2013). Por lo tanto, el manejo del melanoma metastásico continúa siendo un desafío y en este marco el estudio de genes pronósticos de resistencia a la terapia se vuelve fundamental para contribuir al desarrollo de nuevas estrategias que permitan una mejor respuesta de los pacientes.

Otro agente terapéutico para el manejo del melanoma avanzado es la radiación ionizante aunque este tipo de cáncer haya sido históricamente considerado resistente a la radioterapia. Sin embargo, actualmente, el papel de esta terapia en la paliación de los síntomas asociados al melanoma es muy importante y tiene un rol fundamental en el manejo de las metástasis en cerebro y hueso (Rastrelli M. *et al.* 2014). En general, se necesitan dosis altas de radiación ya que los estudios *in vitro* revelaron un alto nivel de reparación del daño en melanoma ante dosis convencionales por fracción (Forschner A. *et al.* 2013). El uso de la radioterapia en melanomas primarios se reserva para aquellos casos en los que no es posible o no es razonable realizar la cirugía con intento curativo o cuando los márgenes no son adecuados y no es posible una nueva cirugía. También se considera la radioterapia adyuvante en melanomas del tipo desmoplásico – neurotrofo que tienen alta tendencia de recaída local (Dummer R. *et al.* 2009). De esta manera, es importante estudiar mecanismos asociados a la radiorresistencia en melanoma para poder detectar posibles nuevos blancos terapéuticos y desarrollar nuevos protocolos de manejo radioterapéutico que permitan mejorar la respuesta de los pacientes.

### ***2.2.1 Interacción entre las Vías de Invasión y Resistencia a las Terapias en Cáncer***

Tradicionalmente, se consideraba que las vías de señales que regulan la invasión y la resistencia a los agentes terapéuticos en cáncer pertenecían a distintos procesos y funcionaban por separado (Alexander S. y Field P. 2012). De esta manera, se le dio peso a que la diseminación metastásica resultaba principalmente de la adquisición de un fenotipo invasivo migratorio controlado por el microambiente tumoral, mientras que la resistencia a los agentes terapéuticos era regulada por alteraciones genéticas moleculares y un mal funcionamiento de las vías asociadas a la reparación del ADN como consecuencia de la selección clonal y la presión del microambiente (Fidler I. J. 2003; Hanahan D. y Weinberg R.A. 2011;

Blagosklonny M. V. 2002; Meads M. B. *et al* 2009; Barckhausen C. *et al* 2014). Por lo tanto, estos procesos han sido ampliamente estudiados pero aisladamente uno del otro. Sin embargo, recientemente se ha observado una superposición de los mecanismos subyacentes a estas vías de señales (Alexander S. y Frield P. 2012) que amerita un estudio más profundo.

La adquisición de la habilidad de invadir por las células tumorales puede suceder de manera intrínseca o adquirida y es frecuentemente observada ante el estrés inducido por las terapias o la inflamación (Spano D. *et al* 2012; Alexander S. y Frield P. 2012; De Bock K. *et al.* 2011; Kargiotis O. *et al.* 2010; Wyckoff J. *et al.* 2004; Yilmaz M. y Christofori G. 2010; Hess D.A. y Allan A.L. 2011).

La resistencia ocurre cuando las células cancerígenas logran escapar de los efectos citotóxicos o citostáticos de la terapia, lo que conlleva a la sobrevivencia de la célula y a la progresión tumoral o a la recaída luego de un período de inactividad. De la misma forma que para la adquisición de la capacidad de invasión, la resistencia puede ser intrínseca debido a la acumulación de mutaciones oncogénicas durante la progresión tumoral (Blagosklonny M. V. 2002) o adquirida como una respuesta reactiva adaptativa al estrés del microambiente generado por agentes quimioterapéuticos, radiación o cirugía, resultando en la aparición de mutaciones de novo y/o alteraciones en las vías de señalización (Alexander S. y Frield P. 2012; De Bock K. *et al* 2011; Gottesman M.M. 2002; Bertout J.A *et al* 2008; Duda D.G. *et al* 2011). Además, puede surgir como una vía de escape del sistema inmune (Garrido F. *et al.* 2010; Singer K. *et al* 2011). Todos estos tipos de resistencia convergen en un resultado similar que es la alteración de los puntos de chequeo del ciclo celular y la inhibición de la inducción de apoptosis, con la consecuente sobrevivencia de la célula cancerígena asociada a la progresión tumoral (Alexander S. y Frield P. 2012).

En algunos tumores como el melanoma, los genes involucrados en la reparación del ADN y el chequeo del ciclo celular, cuya alteración se ha relacionado históricamente a la resistencia a los tratamientos, se encuentran sobreexpresados y esto también se ha asociado a la capacidad metastásica, mientras que en otros tipos de cáncer se ha observado lo contrario. Varios genes relacionados con la respuesta al daño al ADN como RAD9, PARP1, BRCA1, ATM y TP53 también han sido asociados al proceso metastásico. Sin embargo, no ha sido determinado, todavía, si la función de estos genes en los procesos de reparación del daño al ADN es

necesaria para promover la metástasis o si otras actividades en las que pueden estar involucrados son las responsables (Broustas C.G. y Lieberman H.B. 2014). Por lo tanto, es importante estudiar el rol de estos genes en la regulación del fenotipo metastásico. Por otro lado, ciertas vías de señalización han sido exploradas como candidatas a estar involucradas tanto en invasión como en resistencia, entre ellas se incluyen las vías de PI3K (del inglés, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase) y la serina-treonina quinasa mTOR (del inglés, mechanistic target of rapamycin), MAPKs (del inglés, mitogen-activated protein kinase), la familia de quinasas Src y la señalización de integrinas (Alexander S. y Field P. 2012; Downward J. 2003; Kim L.C. *et al.* 2009; Santiskulvong C. *et al.* 2011; Desgrosellier J.S. y Cheresch D.A. 2010; Maira S.M. *et al.* 2009; Yap J.L. *et al.* 2011). De todas formas, faltan estudios que evalúen la subyacente superposición y la interconexión de las vías moleculares asociadas a invasión y resistencia, las cuales intervienen en la progresión tumoral.

### **2.2.2 Radiorresistencia de las Células de Melanoma**

Por lo general, las células de melanoma son relativamente resistentes a los efectos citotóxicos de la radiación ionizante limitando de esta manera el uso de la radioterapia para el tratamiento del melanoma (Munshi A. *et al.* 2004). La interrupción de ciertas vías de señalización intracelular provoca la extraordinaria resistencia del melanoma tanto a la quimioterapia como a la radiación, esto se basa en mecanismos genéticos y epigenéticos alterados que, a su vez, dan como resultado la alteración de la maquinaria de muerte celular y/o la activación excesiva del crecimiento celular y las vías de supervivencia (Hassan M. *et al.* 2015).

Respecto a la radiosensibilidad intrínseca, durante la progresión del tumor los clones de células pueden adquirir mutaciones genéticas que alteran la señalización y las propiedades de diferenciación, lo que resulta en un crecimiento ilimitado y capacidades de supervivencia mejoradas. Con mutaciones genéticas adicionales y pasos de selección, la resistencia intrínseca resulta en sub- clones con diversas y adaptables propiedades de resistencia. Varios reguladores del ciclo celular y la supervivencia pueden ser afectados por mutaciones oncogénicas. Estas mutaciones imponen un control defectuoso del ciclo celular y resistencia a

la apoptosis, así como la supervivencia de las células tumorales a pesar de estrés genotóxico (Alexander S. 2012).

Alteraciones en el gen que codifica para la proteína p53 pueden jugar un papel significativo en la radiorresistencia de algunas líneas celulares de melanoma humano. Estudios previos demostraron que un tratamiento con una dosis 10Gy de rayos X da lugar a una sub-expresión sistemática de varias proteínas importantes que intervienen en el ciclo celular, la replicación del ADN y la estabilidad cromosomal 48 horas después de la irradiación. El melanoma es un tumor maligno con altas propiedades invasivas y metastásicas y su radiorresistencia influye gravemente el resultado clínico. Por lo tanto, sería interesante mejorar la sensibilidad de las células de melanoma a la radioterapia. (Wang F. *et al.* 2013).

### **2.3 Histona H2AX y Radiosensibilidad**

El nivel de  $\gamma$ -H2AX se ha utilizado en estudios *in vitro* como herramienta para la estimación de radiosensibilidad celular y como un biomarcador para estudios individuales en los ensayos de pacientes para medir el daño del ADN después de la radioterapia y / o quimioterapia (Qvarnström *et al.* 2004). Estudios recientes con células de melanoma HTB140 expuestas a rayos gamma en el intervalo de dosis de 1 a 16 Gy, a diferentes intervalos de tiempo después de la irradiación, demostraron que el nivel de  $\gamma$ -H2AX es tiempo-y dosis-dependiente. La proteína  $\gamma$ -H2AX se considera que es un indicador sensible de DSBs en el ADN, el desarrollo de diferentes ensayos de formación de  $\gamma$ -H2AX y los análisis de datos correspondientes son de gran importancia experimental e incluso clínica (Bulat T. *et al.* 2016).

Otros autores sugieren que el ensayo  $\gamma$ -H2AX puede cumplir la función de un biomarcador rápido y sensible que puede utilizarse para estudios epidemiológicos con el fin de medir las variaciones en la radiosensibilidad. Los polimorfismos de genes de reparación pueden afectar a la formación y reparación de DSBs. El análisis de focos de  $\gamma$ -H2AX, así como los polimorfismos de genes de reparación de DSBs se pueden utilizar para evaluar la radiosensibilidad celular, que será útil en la evaluación del riesgo de la población, la predicción de la enfermedad, la individualización de la radioterapia y también en la fijación de las normas de protección radiológica (Mumbreakar K. D. *et al.* 2016).

#### ***2.4 Vías Involucradas en la Respuesta al Daño al ADN***

La capacidad de las células cancerosas a reconocer el ADN dañado e iniciar su reparación es un mecanismo importante para la resistencia terapéutica (Biau, J. *et al.* 2016). Garantizar la integridad del genoma para evitar la acumulación de mutaciones, la muerte celular y el cáncer se encuentra a cargo de la DDR, la cual es una red compleja que detecta señales y ejecuta varios programas celulares, incluyendo la reparación del ADN, la detención del ciclo celular, la senescencia y la apoptosis. Esto implica la correcta regulación de una variedad de procesos celulares: la replicación del ADN y la transcripción, el procesamiento del ARN, la traducción del ARNm y la cantidad de los mismos, seguido de modificaciones post-traduccionales, como también degradación y localización de las proteínas. La evidencia acumulada en las últimas décadas ha demostrado que los ARN y el metabolismo del ARN son los principales actores reguladores de la DDR (Giono L. E. *et al.* 2016).

Los melanomas tienen altos niveles de inestabilidad genómica que puede contribuir a un mal pronóstico de la enfermedad. Estudios actuales, mostraron un nuevo defecto en el punto de control dependiente de ATM en líneas celulares de melanoma promoviendo la inestabilidad genómica. Se demostró que aunque la señalización de ATM a CHK2 esté intacta, las células son incapaces de mantener el arresto del ciclo celular debido a la sobreexpresión de Plk1, aumentando la inestabilidad genómica. Esta alteración podría presentarse en una mayor proporción de cánceres de lo previsto. La proteína codificada por Plk1 cumple funciones importantes en la fase M del ciclo celular, incluyendo la regulación de la maduración del centrosoma, la inactivación del complejo promotor de la anafase (APC) y la regulación de la salida de mitosis, por lo que se considera una proteína esencial en la comunicación de la progresión del ciclo celular y el daño del ADN (NG, Wayne Tiong Weng, *et al.* 2016).

La reducción de la actividad Plk1 permite el arresto del punto de control dependiente de ATM. En ese trabajo la pérdida del punto de control dependiente de ATM no afectó la sensibilidad celular a la radiación ionizante, demostrando que este defecto es distinto de la pérdida de función ATM. La incapacidad de ATM para imponer un arresto del ciclo celular en respuesta al daño al ADN aumenta la inestabilidad genómica (Spoerri L. *et al.* 2016).



Respecto a la vía de la apoptosis, otros autores estudiaron el factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF), el cual es un factor de supervivencia en los melanocitos y células de melanoma. MITF regula la expresión de genes antiapoptóticos y promueve la supervivencia en respuesta a la radiación ultravioleta (UV) y a agentes quimioterapéuticos. Se determinó que la subunidad catalítica, BRG1, del complejo SWI / SNF protege a las células de melanoma contra la muerte inducida por UV. BRG1 previene la apoptosis en células de melanoma irradiadas con UV mediante la activación de la expresión del inhibidor de la apoptosis en melanoma (ML-IAP). BRG1 regula la expresión ML-IAP mediante la cooperación con MITF (Saladi S. V. *et al.* 2013).

En un enfoque más general, otros estudios han utilizado varias líneas celulares de melanoma humano a partir de fases secuenciales de desarrollo del melanoma (fase de crecimiento radial, fase de crecimiento vertical y la fase metastásica) para comparar la frecuencia y la eficiencia de la inducción de la muerte celular a través de apoptosis y necrosis, la presencia de biomarcadores neuronales y células madre del cáncer, así como los receptores de muerte, DR5 y FAS y los efectos anti-apoptóticos de la producción endógena de citoquinas. Estos estudios han demostrado que la necrosis se generaba en solo dos líneas de melanoma, FEMX y OM431, las cuales presentan características metastásicas. Mientras que en la gran mayoría de las otras líneas de melanoma estudiadas prevalecía la ruta mitocondrial de la apoptosis (Ivanov, V.N. 2015).

### ***2.5 Perfiles de Expresión Génica Evaluados en Melanoma***

El pronóstico de pacientes con melanoma primario localizado está dado principalmente por el espesor del tumor, el estado ulcerativo y la tasa mitótica, mientras que el pronóstico de pacientes con melanoma metastásico se encuentra afectado por el número, sitio y tamaño de las metástasis, así como por la información clínica de parámetros bioquímicos como los niveles de lactato deshidrogenasa. Aunque esta aproximación es útil para asignar las probabilidades de recaída, posee un limitado poder predictivo a nivel individual. Por lo tanto, la búsqueda de nuevos biomarcadores moleculares se ha extendido intensamente. Actualmente, gracias a las tecnologías de alto rendimiento se cuenta en la bibliografía con varios trabajos asociados al estudio de firmas pronósticas de melanoma (Bogunovic D. *et al* 2009; Hoek K.S. *et al* 2006; Jaeger J. *et al* 2007; Jeffs A.R. *et al* 2009; John T. *et al* 2008;

Mandrizzato S. *et al* 2006; Riker A.I. *et al* 2008; Schramm S.J. y Mann G.J. 2011; Smith A.P. *et al* 2005; Talantov D. *et al* 2005; Wang L. *et al* 2012; Winnepenninckx V. *et al* 2006). Sin embargo, aunque las firmas pronósticas resultantes de estudios de expresión génica son prometedoras también presentan limitaciones como escasez de muestras y heterogeneidad de cohortes. Además en estos trabajos prácticamente el solapamiento entre los genes que se describen en cada una de las firmas con valor pronóstico es bajo. De todas formas, algunos estudios han comenzado a tratar de dilucidar estos aspectos (Schramm S.J. *et al.* 2012). En particular, la mayoría de las firmas difieren en cuanto a los genes que presentan con valor pronóstico debido a la gran heterogeneidad del melanoma en estadios avanzados. Por ejemplo, estudios recientes en la evaluación de los perfiles de expresión génica en células de melanoma A375 que sobreexpresan CD10 demostraron que su expresión en el melanoma aumenta con la progresión tumoral. CD10 codifica una metalo-endopeptidasa que escinde e inactiva a una variedad de péptidos de señalización y ha sido ampliamente utilizado en el diagnóstico del cáncer. Los genes regulados por la sobreexpresión de CD10 estaban en su mayoría involucrados en la proliferación celular, la angiogénesis y la resistencia a la apoptosis (Oba J. *et al.* 2016). Por otro lado, en otro estudio donde se analizaron microarrays de melanocitos normales, metástasis de ganglios linfáticos de melanoma y metástasis cerebrales de melanoma, se identificaron entre los genes expresados diferencialmente a BIRC5, BUB1, GMNN, AURKA, TOP2A, BUB1B, ICAM1 y NBN. Estos genes pueden jugar un papel clave en la progresión y el desarrollo del melanoma y han sido propuestos como objetivos terapéuticos específicos en el tratamiento de melanoma metastásico (Quan L. *et al.* 2015). Sin embargo, otros experimentos son necesarios para confirmar esos resultados.

### 3. Hipótesis

Teniendo en cuenta que el melanoma es un tipo de cáncer con alta capacidad metastásica y que a la vez presenta una considerable resistencia a los tratamientos en etapas más avanzadas, es de interés tratar de descifrar esta interconexión entre invasión y resistencia en este tipo tumoral. Además, a pesar de que han sido publicadas algunas firmas pronósticas de melanoma, la mayoría de ellas difieren en cuanto a los genes que presentan con valor pronóstico debido a la gran heterogeneidad del melanoma en estadios avanzados. Por lo tanto, a fin de aportar posibles mecanismos de resistencia del melanoma, en particular, a radiaciones ionizantes, y su asociación con la progresión maligna, en este proyecto se pretende obtener nuevos perfiles genómicos con valor pronóstico explorando un modelo más homogéneo de clones estables de melanoma humano derivados de la misma línea celular amelanótica (A375), que presentan distinto fenotipo, uno diferenciado y con capacidad de pigmentación y otro, invasor y metastásico. Este modelo ha sido evaluado previamente en nuestro laboratorio utilizando datos de tecnologías de alto rendimiento como los *microarrays* de expresión. Se busca, a partir de los resultados obtenidos de los *microarrays*, aplicar en este modelo, técnicas convencionales de biología celular y molecular, aportando información que permita mejorar la clasificación actual del melanoma y su respuesta al tratamiento. En particular, se propone definir grupos de genes involucrados en procesos asociados a la progresión tumoral y a la resistencia a radiaciones ionizantes, como las vías de ciclo celular, apoptosis, señalización de p53 y DDR, utilizando herramientas bioinformáticas estándar y algoritmos *ad hoc*. Se pretende evaluar el perfil de expresión conjunta de estos genes definidos *a priori* en los datos de *microarrays* de expresión experimentales del laboratorio. Además, se estudiará la radiosensibilidad intrínseca del modelo de melanoma mencionado, en respuesta a radiación ionizante gamma mediante la obtención de curvas de supervivencia, la evaluación de la inducción de apoptosis y la detección de proteínas involucradas en la respuesta al daño al ADN. A partir de los resultados que surjan del análisis anterior, se espera seleccionar los genes más relevantes con potencial pronóstico de agresividad tumoral y radiorresistencia para ser validados a futuro mediante técnicas convencionales de biología molecular y celular en el modelo de melanoma ya mencionado. De esta forma, pretendemos obtener una primera aproximación al estudio de la asociación entre la radiorresistencia y la agresividad en estas células de melanoma, para poder, a futuro, plasmar estudios más

profundos apuntando a la posibilidad de poder establecer nuevos marcadores y/o firmas genómicas con valor diagnóstico y pronóstico y evaluarlos en cortes histológicos de melanoma con distinto grado de agresividad en modelos *in vivo* extendiendo estos estudios a cortes histológicos de biopsias de pacientes con melanoma para la validación de su relevancia clínica como marcadores predictivos y pronósticos.

## 4. Metodología

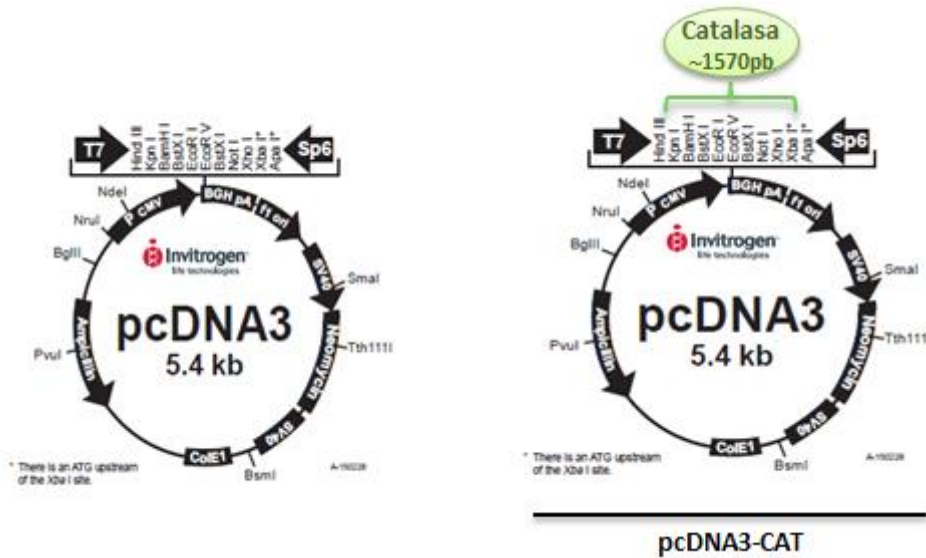
### 4.1 Modelo Experimental

#### 4.1.1 Línea Celular y Condiciones de Cultivo

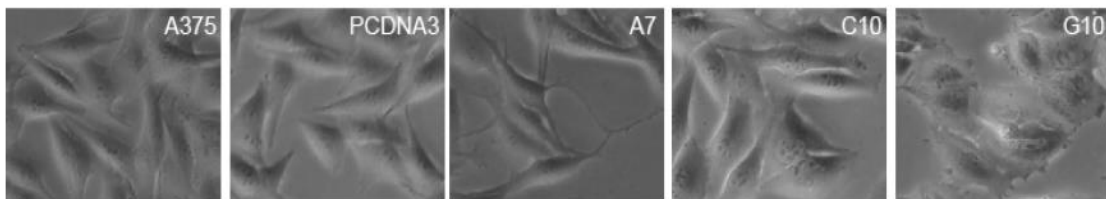
Se utilizó la línea celular de origen humano A375. La línea A375 (ATCC® CRL-1619™) deriva de un melanoma maligno de piel de una mujer de 54 años y se caracteriza por ser amelanótica y tumorigénica en ratones *nude*. Esta línea fue gentilmente donada por la Dra. Estela Medrano (Huffington Center on Aging, Departments of Molecular & Cellular Biology and Dermatology, Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA). Estas células fueron cultivadas en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium-Ham-F12 (DMEM/F-12, Invitrogen Argentina S.A.) en relación 1:1 suplementado con 17,6 µg/ml de ácido ascórbico, 150 µg/ml de ácido pirúvico, 300 µg/ml de galactosa, 5 µg/ml de insulina, 10% de suero fetal bovino (FBS) (Natocor), penicilina 50 U/ml y estreptomycin 50 µg/ml. La línea celular A375 fue cultivada a 37°C, en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>.

Se usó un modelo de clones estables de células A375 (A375-A7 y A375-G10), generado en el laboratorio por la Dra. Candelaria Bracalente (Bracalente C. *et al.* 2016b), a partir de la sobreexpresión del gen de la catalasa humana, con diferentes características fenotípicas en cuanto a sus niveles de agresividad. Con el objetivo de obtener líneas celulares con bajos niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se transfectó de forma estable la línea celular A375 con el plásmido pcDNA3-CAT (Fig.7) y se seleccionaron los clones que sobrevivieron y proliferaron. A fin de descartar que la transfección en sí misma indujera cambios, los resultados obtenidos por el control de células transfectadas con pcDNA3 fueron comparados con los resultados de la línea A375 sin transfectar. Los clones obtenidos fueron denominados: A375-A7 y A375-G10. El clon A375-G10 manifiesta un fenotipo apolar e invasivo *in vitro* y metastásico *in vivo*. Por otro lado, las células A375-A7, francamente multipolares y no invasivas, si bien lograron desarrollar tumores *in vivo*, revirtieron el fenotipo amelanótico *in vitro* e *in vivo* y exhibieron un aumento en los niveles de marcadores de diferenciación melanocítica. Además, se contó con el *pool* de células A375 transfectadas con el plásmido pcDNA3 vacío (A375-PCDNA3) como control, que presenta las mismas características fenotípicas, genómicas y de comportamiento *in vitro* e *in vivo* de la línea de origen, A375 (Fig.8). Con fines prácticos, de

aquí en más las células A375-A7, A375-G10 y A375-PCDNA3 serán denominadas A7, G10 y PCDNA3, respectivamente.



**Fig. 7.** Mapa del vector de expresión pcDNA3 y esquema de la construcción pcDNA3-CAT.



**Fig. 8.** Imágenes representativas de microscopía de contraste de fase de células de la línea A375, A375-PCDNA3 y los tres clones A375-A7, A375-C10 y A375-G10, que permiten apreciar las diferencias en la morfología y polaridad celular. (Bracalente C. *et al.* 2016b)

Tanto los clones obtenidos y el control PCDNA3, fueron crecidos en el medio de cultivo correspondiente conteniendo siempre 1500 µg/ml de antibiótico G418. Todos los experimentos se realizaron con células que no presentaran más de 5 pasajes luego de ser descongeladas. Se evaluó regularmente que todas las células estuviesen libres de micoplasma.

## ***4.2 Estudios In Silico***

### ***4.2.1 Implementación de Herramientas Bioinformáticas Para la Construcción de Redes de Genes Modulados en Procesos de Respuesta a Radiación***

Una de las primeras tareas de este proyecto fue construir una base de datos que incluya conjuntos de genes candidatos, los cuales se encuentren vinculados a respuesta a radiación. Se utilizó la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) para obtener grupos de genes asociados a vías y procesos involucrados en la respuesta celular a la radiación. Se seleccionaron como relevantes los procesos de apoptosis y ciclo celular, así como la vía de señalización de p53 para su posterior validación. Por otro lado, se construyó una red de genes asociada a la detección del daño al ADN en forma manual a partir de las vías de KEGG y de datos bibliográficos (Simao E. M. *et al.* 2012). La implementación de toda la cadena de procesos la realizó la Dra. Irene L. Ibañez utilizando principalmente el lenguaje y entorno de cálculo estadístico R (<http://www.r-project.org/>) y herramientas del repositorio de paquetes Bioconductor, ambos de código abierto.

### ***4.2.2 Evaluación del Perfil de Expresión Conjunta de Grupos de Genes Definidos a Priori a Partir del Análisis de los Datos de Microarrays de Expresión del Modelo de Melanoma Derivado de A375***

En el marco de un proyecto previo, se realizó la caracterización fenotípica *in vitro* e *in vivo* y de la expresión genómica de los clones A7 y G10 mediante técnicas convencionales de biología celular y molecular y experiencias de *microarrays* de expresión. Se determinó el perfil de expresión génica en comparación con sus correspondientes controles (PCDNA3 y A375) mediante experimentos de *microarrays* de genoma completo a través del kit GeneChip® Human Gene 1.0 ST (Affymetrix). Si bien los *microarrays* de expresión ya fueron utilizados para caracterizar en cuanto a su expresión génica diferencial a los clones A7

(diferenciado y melanótico) y G10 (invasivo y metastásico) y sus controles, estos nuevos estudios permitieron implementar los métodos ya existentes para evaluar la interconexión entre agresividad y resistencia en melanoma. Se utilizaron *scripts* desarrollados en R (versión 2.12.0) y distintas herramientas del repositorio de paquetes Bioconductor. Para evaluar el perfil de expresión conjunta de los genes experimentales mediante GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) se usaron los grupos de genes definidos *a priori* asociados a los procesos y vías relevantes del análisis previo. Se utilizó la base de datos GeneMANIA ([www.genemania.org](http://www.genemania.org)) para visualizar las redes de asociación de los genes obtenidos a partir de estos análisis y las vías de KEGG. Estos análisis estuvieron a cargo de la Dra. Irene L. Ibañez.

### ***4.3 Estudios In Vitro***

#### ***4.3.1 Experimento de Irradiación***

Para las irradiaciones gamma se utilizó una fuente de  $^{137}\text{Cs}$  (IBL-437C Irradiator; CIS Bio-International, CEBIRSA, Argentina).

#### ***4.3.2 Ensayo Clonogénico***

Para determinar la radiosensibilidad intrínseca de las células en estudio, las células en fase de crecimiento exponencial se levantaron y se sembraron en un número conocido por placa en frascos de 25 cm<sup>2</sup> (1000 células/frasco), se incubaron durante 18 hs y se irradiaron con dosis de 1-5 Gy de radiación gamma. Los controles sufrieron el mismo tratamiento que las células irradiadas pero no fueron irradiados. Luego las células se incubaron durante 15 días post-irradiación en un ambiente humidificado a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, las colonias formadas se fijaron con una mezcla de metanol: ácido acético (3:1) y se colorearon con violeta cristal al 0,5 % en 25 % de metanol. La fracción de células clonogénicas se determinó contando las colonias que contenían al menos 50 células. Se realizaron tres experimentos con triplicados por condición. Las curvas de sobrevivencia se ajustaron al modelo lineal-cuadrático mediante la siguiente ecuación:

$$S = \exp^{-(\alpha D + \beta D^2)}$$



### **4.3.3 Inmunocitofluorescencia y Cuantificación de $\gamma$ -H2AX**

Los focos de  $\gamma$ -H2AX se evaluaron mediante inmunocitoquímica de fluorescencia (Ibanez I.L. *et al.* 2009). Brevemente, las células al 70 % de confluencia fueron expuestas a una dosis de 2 Gy de radiación gamma mientras que los controles sufrieron el mismo tratamiento que las células irradiadas pero no fueron irradiados. Luego, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% a los 30 min post-irradiación para la detección de los focos a nivel nuclear. Para esto, las células se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,5 %, se bloquearon los sitios antigénicos inespecíficos con FBS al 5 % y se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo monoclonal anti -  $\gamma$ -H2AX (Upstate, Lake Placid, NY) en una dilución 1:500 en *buffer* fosfato salino (PBS), el cual se detectó con el anticuerpo secundario correspondiente marcado con fluoresceína isotiocianato (Sigma, St. Louis, MO). Se realizó una contratinción de los núcleos celulares con 4',6-diamidino-2-fenilindol 1 dihidro cloruro (DAPI). Los preparados se examinaron en un microscopio de epifluorescencia Olympus BX51. Se tomaron al menos 20 fotografías seriadas de cada muestra presentando al menos 5 núcleos por imagen. Se contabilizaron los focos de  $\gamma$ -H2AX por núcleo. Se realizaron dos experimentos con triplicados por condición.

### **4.3.4 Western Blot**

Las células al 70 % de confluencia fueron expuestas a 1-3 Gy de radiación gamma mientras que los controles sufrieron el mismo tratamiento que las células irradiadas pero no fueron irradiados. Las células incubadas por 0,5 y 24 horas post-irradiación, fueron lavadas dos veces con PBS y levantadas con 1 ml de PBS frío utilizando un rastrillo, manteniendo las placas en hielo. Se centrifugaron a 255 g durante 10 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron los *pellets* celulares con 70  $\mu$ l de *buffer* de lisis RIPA (Tris HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, Tritón X-100 1%, deoxicolato de sodio 0,5% y dodecilsulfato sódico (SDS) 0,1%). Se incubaron durante 30 minutos en hielo, agitando cada 5 min. Se centrifugaron a 13000 g durante 15 minutos a 4°C y se separaron los sobrenadantes a los cuales se les agregó 0,7  $\mu$ l de un kit de inhibidores de proteasas 100X (Sigma), esta mezcla contiene componentes individuales, incluyendo AEBSF (4- (2-aminoetil) bencenosulfonilo hidrocloreuro de fluoruro) 2 mM , aprotinina 0,3 M , bestatina 116 M , E-64 14 M , leupeptina 1 mM y EDTA 1 mM, cada componente tiene propiedades inhibitoras

específicas. Se determinó la concentración proteica de las muestras obtenidas por la técnica de Lowry (Kit BIORAD) y con lector de absorbancia DTX 880 Multimode Detector Beckman Coulter® a 620 nm. Se prepararon las muestras en las concentraciones correspondientes en *buffer* de corrida (Tris HCl 250 mM pH 6,8, SDS 8%, Azul de bromofenol 0,04%, Glicerol 40% y B-mercaptoetanol 20%) e hirvieron durante 5 minutos en baño de agua previo a la siembra en los geles para su análisis por *western blot*. El porcentaje del gel, según la cantidad de acrilamida y bisacrilamida, determina el tamaño del poro. A mayor porcentaje menor tamaño de poro. Debido a que los pesos moleculares de las proteínas a resolver rondan entre los 10 y 45 kDa (Tabla II), se decidió utilizar un gel con espesor de 1,5 mm y acrilamida al 15%. Se sembraron 20 µg de proteína por muestra y 3 µl del marcador de peso molecular (Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers, GE Healthcare) en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) al 15% para ser resueltas por electroforesis en el sistema Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio Rad) a 35 mA por gel.

Proteína	Tamaño
γ-H2AX	17 kDa
Actina	42 kDa

**Tabla II.** Tamaño de las proteínas resueltas en este trabajo por electroforesis en gel de poliacrilamida.

Se realizó la electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL Membrane, Amersham Biosciences, GE Health Care) en el sistema Mini- Trans- Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio Rad) durante 60 minutos a 100 volts. Se verificó que las proteínas estuvieran correctamente transferidas a la membrana por tinción de las mismas con rojo *ponceau* al 0,5% en 1% de ácido acético glacial y se lavó con PBS-Tween 20 0,05% (PBS-T). Previo a la inmunodetección, la membrana fue incubada en agitación, durante 1 h a temperatura ambiente con una solución de leche en polvo descremada al 5% en PBS-T con el fin de bloquear las uniones inespecíficas. Luego se enjuagó una vez con PBS-T.

Se utilizaron diluciones del anticuerpo primario anti-histona  $\gamma$ -H2AX 1:500 y del anticuerpo primario anti-actina 1:1000. La membrana se incubó en presencia del anticuerpo primario durante toda la noche a 4° C y al día siguiente 1 hora a temperatura ambiente en agitación. A continuación se lavó 3 veces con PBS-T a temperatura ambiente por 10 minutos. Se incubó con una dilución de anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano (Calbiochem) 1:700 preparado en PBS-T y 0.5% de BSA. Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, en agitación. Por último se lavó 3 veces con PBS-T a temperatura ambiente por 10 minutos. Para el revelado de los anticuerpos la membrana fue expuesta a una solución, de ácido p-cumárico 15% p/v, luminol 4.4% p/v y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% en *buffer* Tris-Hcl 1M pH 8.5 y las bandas se detectaron por quimioluminiscencia en placas radiográficas expuestas a la membrana tratada. Para cuantificar la densidad de las bandas de proteínas se utilizó el programa ImageJ versión 1.45 k (*National Institutes of Health*, NIH, USA). Los valores de densidad obtenidos de las bandas del anticuerpo anti-histona  $\gamma$ -H2AX se relativizaron a los valores de densidad de las bandas de actina. Los resultados se expresaron de forma relativa al de las células no irradiadas.

#### ***4.3.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real***

Este experimento fue realizado en conjunto con la Lic. Lara María Negrin en el marco de su Tesis de Maestría en Física Medica (Negrin L.M. 2015), con el fin de validar los análisis computacionales previamente descriptos. Brevemente, la técnica experimental conocida como PCR cuantitativa (Q-PCR) fue llevada a cabo mediante la previa extracción de ARN total utilizando el método de extracción fenólica por Trizol. Se determinó la calidad del ARN por medición de la absorbancia (A) a 260, 280 y 230 nm por espectrofotometría (Nanodrop2000, Thermo) y la integridad del ARN por electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente se realizó la síntesis de ADNc mediante la reacción de transcripción reversa con la enzima transcriptasa reversa (ImProm-II<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase, Promega). Se realizó el diseño de *primers* (Tabla III) para el gen de interés, el cual en este caso fue el gen MRE11, cuya participación en las vías de respuesta al daño al ADN como parte del complejo MRE11-RAD50-NBS1 lo vuelve una pieza clave de la maquinaria de reparación del ADN y la señalización de DSBs. Debido a estudios previos en otros tipos de cáncer (Soderlund K. *et al.* 2007; Choudhury A. *et al.* 2010; Teo M. T. W. *et al.* 2014) donde los resultados indican una

correlación positiva entre una alta expresión de la proteína MRE11 y una mejor respuesta al tratamiento radiante, respecto de otras proteínas, hemos decidido seleccionar este gen en particular para la realización de este experimento.

Para ello se buscó la secuencia completa del gen en la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), donde se encontró la secuencia bajo el nombre de: Homo sapiens MRE11 homolog A, double strand break repair nuclease (MRE11A), transcript variant 1, mRNA y el número de referencia NM\_005591.3. Los *primers* para el gen constitutivo GAPDH (Tabla III), utilizado como control, ya se encontraban validados en el laboratorio. Finalmente se realizó el ensayo de Q-PCR donde se agregó por cada reacción 7,5 µl de mezcla concentrada (2X) para PCR cuantitativa compuesta por Taq ADN Polimerasa, dNTPs, Mg<sup>++</sup>, *buffer* y fluorocromo verde intercalante de ADN, Sybergreen (Maxima SYBR Green qPCR Master Mix, Biotium), 0,5 µl de cada uno de los primers (100 µM) y agua libre de nucleasas, hasta alcanzar un volumen final de 12 µl en un tubo de pared delgada libre de nucleasas. Luego se agregaron 3 µl de una dilución 1:20 del ADNc muestra. Se colocó en el ciclador Real-Time (Qiagen) y se midió la amplificación, de acuerdo a cada par de *primers*, en el canal de fluorescencia verde perteneciente al rango de excitación-emisión del Sybergreen (Exc: 500 nm; Em: 530 nm). Se realizaron dos experimentos independientes cada uno por duplicado.

Gen	Primers	Tm (°C)	%GC
GAPDH	F- 5'-CCC ACT CCT CCA CCT TTG AC-3'	55,1	50
	R- 5'-CAA CAA AAC CAT ATC CTG CTG A-3'	54,7	45,5
MRE11	F- 5'-GTGGACAAGGAGGAGAAAGATG-3'	62	60
	R- 5'-TGTCTTCGAGGGCATCAATATG-3'	63	42

**Tabla III.** *Primers* utilizados para Q-PCR.

Para la cuantificación de expresión se utilizó el modelo matemático de cuantificación relativa de Pfaffl (Glorieux C. *et al.* 2011). La relación de expresión relativa del gen MRE11 respecto del gen de referencia (GAPDH) se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$R = \frac{(E_{MRE11})^{\Delta C_{t_{MRE11}}}}{(E_{GAPDH})^{\Delta C_{t_{GAPDH}}}}$$

#### **4.6 Análisis Estadístico**

Los resultados de los estudios *in vitro* se presentan como media  $\pm$  desviación estándar. Los cambios significativos fueron evaluados mediante análisis unidireccional de varianza y prueba no paramétrica de Kruskal - Wallis seguido de pruebas de comparación múltiple Tukey o Dunn's para determinar diferencias significativas entre las medias de los grupos. Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron significativos para todas las pruebas.

## **5. Resultados y Discusión**

### ***Estudios In Silico***

#### ***5.1 Análisis Bioinformático***

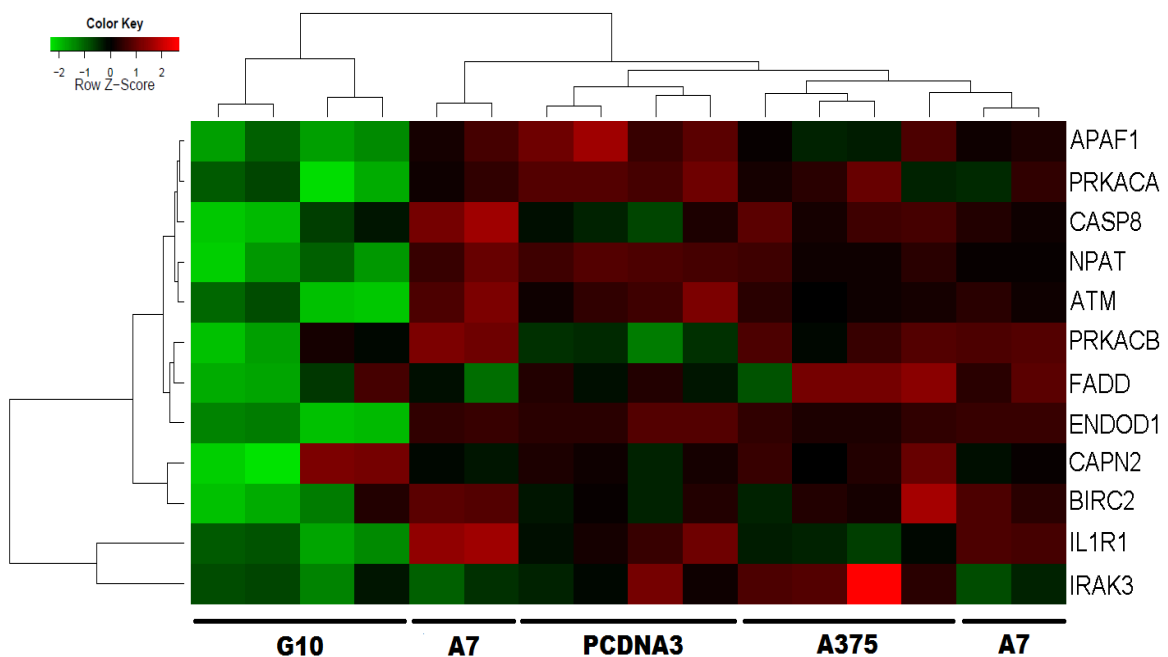
En el análisis se han incluido los genes involucrados en los procesos de detección y reparación del daño, regulación del ciclo celular, apoptosis y señalización de p53. Estos procesos tienen una gran importancia en la viabilidad celular. Los daños en el ADN de una célula llevan a la misma a intentar reparar el daño y por consiguiente a posponer la división celular. En el caso de una célula normal que no puede cumplir con la reparación, se producirá la muerte celular mediante la inducción de apoptosis. Las células neoplásicas en general tienen alteraciones en alguna o varias de estas vías, lo que genera que la célula continúe su proliferación aún con daños en el ADN no reparados. Esto conlleva a una mayor inestabilidad genómica en su descendencia y a un aumento en la malignidad celular.

Se han encontrado genes co-expresados en cada uno de estos procesos sub-expresados en las células G10 respecto del control mediante el análisis con GSEA.

#### ***5.1.2 Evaluación de los Perfiles de Expresión Génica en la Vía de Apoptosis***

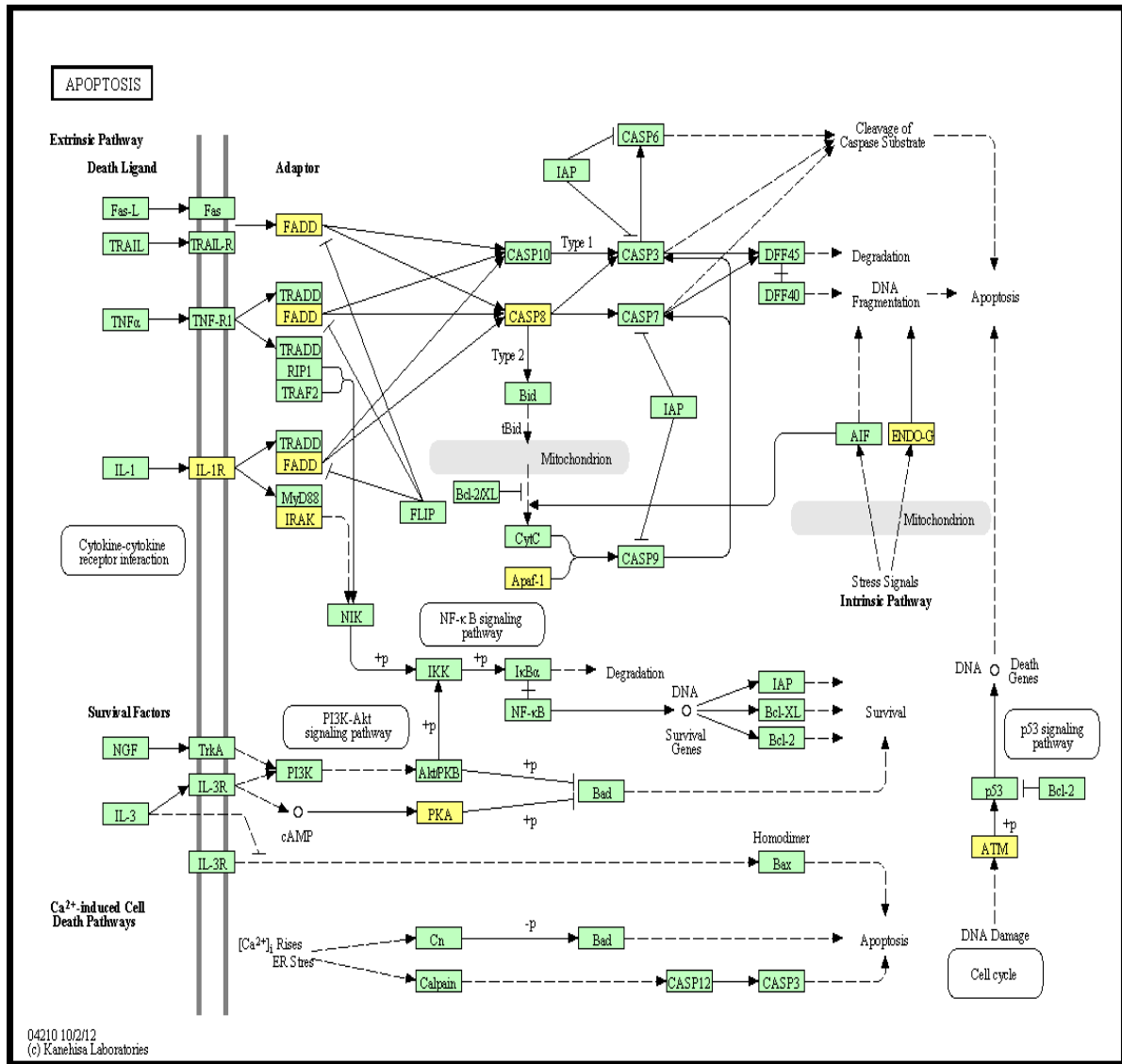
En el organismo adulto la apoptosis resulta esencial para mantener la homeostasis de los tejidos ya que elimina células dañadas que podrían ser peligrosas para el organismo. Cuando los mecanismos que regulan la apoptosis fallan, tanto por exceso como por defecto, este equilibrio se altera y pueden originarse diversas patologías. La resistencia a la apoptosis es una de las características que contribuyen a la generación de un tumor (Porrás A. y Marzo I. 2010) debido a que la evasión de la apoptosis puede ser parte de una respuesta de estrés celular para asegurar la supervivencia de la célula después de la exposición a estímulos estresantes. Esta resistencia a la apoptosis puede contribuir a la carcinogénesis, la progresión del tumor y también a la resistencia al tratamiento, ya que la mayoría de terapias contra el cáncer actuales incluyendo la radioterapia, actúan en última instancia mediante la activación de vías de muerte celular (Fulda S. 2010).

Con el fin de caracterizar la radiorresistencia intrínseca que presentan las células en estudio, se realizó un estudio bioinformático que nos permitiera analizar el comportamiento de los genes involucrados en la vía de la apoptosis, partiendo de la vía proporcionada por la base de datos KEGG. Como resultado se han encontrado 12 genes sub-expresados en conjunto en la línea celular G10 respecto del control (Fig. 9).



**Fig. 9.** Evaluación de la expresión génica por *microarrays* de genes asociados a la vía de apoptosis. La imagen muestra los grupos de genes sub-expresados del clon G10 respecto del promedio de los controles (A375 y PCDNA3). (Color rojo: 2 expresión aumentada y verde: -2 expresión disminuida).

Con respecto a los genes que fueron encontrados sub-expresados en G10 a partir de este análisis y teniendo en cuenta las funciones que cumplen en la vía de la apoptosis (Fig. 10), se pueden destacar ciertos mecanismos, descritos a continuación, que podrían encontrarse afectados.



**Fig. 10.** Vía de apoptosis alterada en función de los genes sub-expresados en las células G10 respecto del control. Los genes indicados en color amarillo representan a aquellos que se encuentran sub-expresados. Figura modificada a partir de la original de KEGG.

En la vía extrínseca de la apoptosis, FADD se asocia a la procaspasa-8. Luego, se forma un complejo de muerte inducida y como resultado la procaspasa-8 se activa. Una vez que ocurre esto, se inicia la fase de ejecución de apoptosis. Esta fase es considerada la vía final de apoptosis. (Silva A. *et al.* 2002). La baja expresión del gen FADD en las células G10, explica también los bajos niveles de caspasa 8.



Por otro lado, las calpaínas existen como proenzimas inactivas en el citosol. Cuando hay una sobrecarga en los niveles de calcio intracelular, se convierten a su forma activa y degradan la membrana, sustratos citoplásmicos y nucleares, lo que lleva a la ruptura de la arquitectura celular y finalmente a la apoptosis (Momeni HR. 2011). La disminución en la expresión de la calpaína 2 (CAPN2) en las células G10 muestra otro camino de inducción de apoptosis que podrían evadir estas células. A su vez, la proteína APAF1 se une a la caspasa 9 a través de sus respectivos dominios homólogos en presencia de citocromo c y ATP, un evento que conduce a la activación de la caspasa 9. La caspasa 9 activa la caspasa 3. Por consiguiente, la ausencia de la caspasa 9 atenuaría la activación de la caspasa 3 y la respuesta apoptótica celular (LI P. *et al.* 1997). APAF1 es otro de los genes sub-expresados en G10.

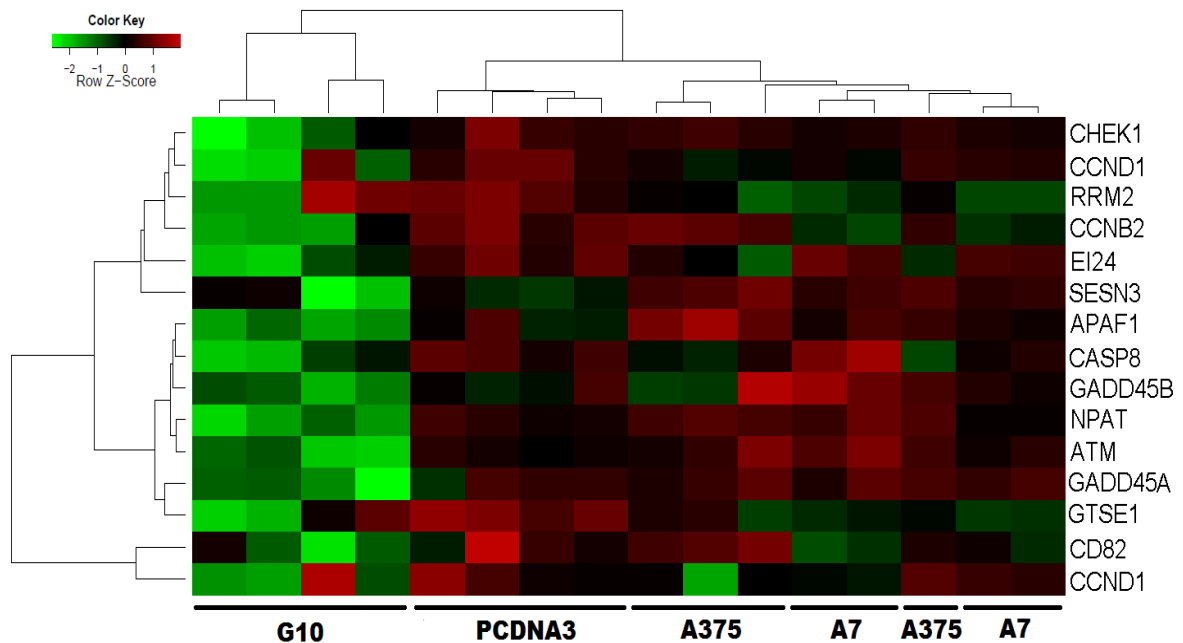
Cuando la endonucleasa G es liberada por la mitocondria conduce a una secuencia de cambios morfológicos que van desde la condensación nuclear hasta la exposición de la fosfatidilserina y de moléculas de adhesión en la superficie de las células que han entrado en apoptosis (Amarante-Mendes G.P. *et al.* 1999), el gen ENDOG se encuentra sub-expresado en las células G10, lo que da idea de la incapacidad que podrían presentar estas células para entrar en apoptosis.

### ***5.1.3 Evaluación de los Perfiles de Expresión Génica en la Vía de Señalización de p53***

La proteína p53 se encuentra en un estado latente y no funcional en las células no expuestas a agresiones. En condiciones de agresión o daño celular, p53 se activa, incrementa sus niveles, principalmente aumentando la vida media de la proteína y genera una respuesta que conduce a un arresto del ciclo celular y a la reparación del posible daño, aunque si éste se encuentra muy extendido p53 provoca la entrada de la célula en apoptosis (Rotter V. *et al.* 1994; Kastan M. B. *et al.* 1992). De este modo, p53 disminuye la probabilidad de que se generen clones celulares llevando defectos genéticos (mutaciones, deleciones, inversiones) y actúa como “guardián del genoma” (Gottlieb T. M. y Oren M. 1996; Lane D. P. 1992). La proteína p53 se ha implicado también en procesos de reparación del ADN dañado, cuando se produce la escisión de nucleótidos, actuando como modulador. Sin embargo, el papel de p53 en estos procesos es más dudoso. De todas formas, se ha observado cómo la pérdida de p53 conduce a un incremento en la inestabilidad genómica debida a un descenso en la tasa de

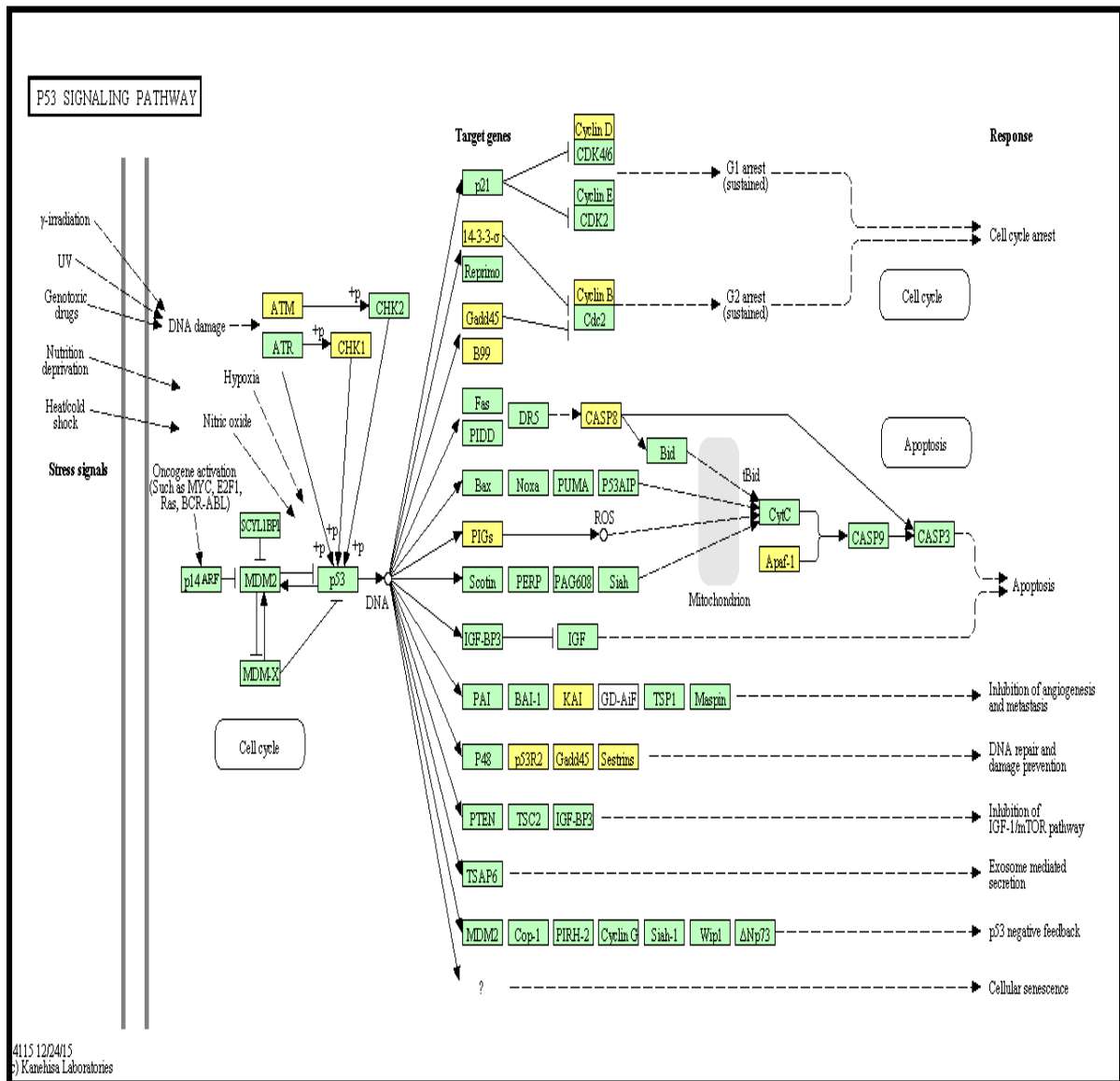
reparación del ADN durante la recombinación homóloga, sugiriendo un papel para p53 en el proceso (Wang X. W. *et al.* 1995; M. L. Smith M. L. *et al.* 1995).

A partir de lo conocido sobre el rol de esta proteína, hemos decidido analizar el perfil de co-expresión génica de la vía de señalización de p53, lo que nos dio como resultado 15 genes sub-expresados en las células G10 respecto del control (Fig. 11). La figura 12 muestra la localización de estos genes en la vía de señalización de p53 y por lo tanto, cómo podrían verse alterados, los distintos procesos asociados.



**Fig. 11.** Evaluación de la expresión génica por *microarrays* de genes asociados a la vía de señalización de p53. La imagen muestra los grupos de genes sub-expresados del clon G10 respecto del promedio de los controles (A375 y PCDNA3). (Color rojo: 2 expresión aumentada y verde: -2 expresión disminuida).

Con respecto a los genes que fueron encontrados sub-expresados en G10 a partir de este análisis y teniendo en cuenta las funciones que cumplen en la vía de señalización de p53 (Fig. 12), se pueden destacar ciertos mecanismos, descriptos a continuación, que podrían encontrarse afectados.



**Fig. 12.** Vía de señalización de p53 alterada en función de los genes sub-expresados en las células G10 respecto del control. Los genes indicados en color amarillo representan a aquellos que se encuentran sub-expresados. Figura modificada a partir de la original de KEGG.

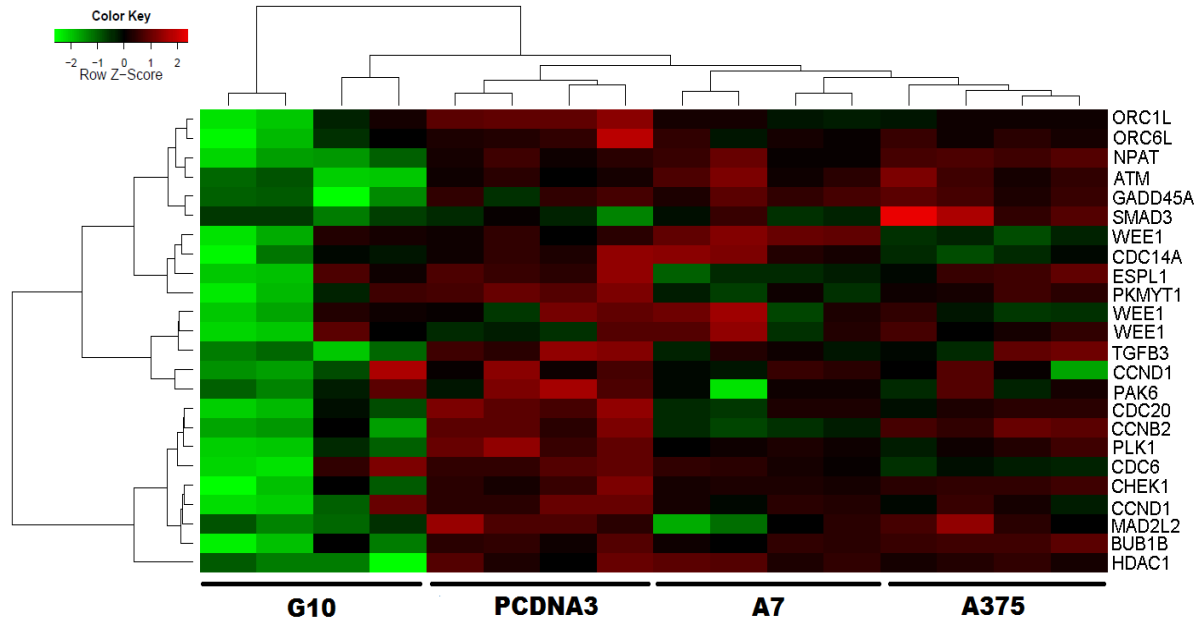
Numerosas proteínas con función inhibidora o activadora pueden actuar sobre MDM2 para modificar su afinidad por p53 y llevar por tanto a su degradación o bien, a su estabilización (Lee MH. *et al.* 2006). MDM2 es una proteína de 90 kD codificada por un oncogén cuya sobreexpresión inhibe la activación de genes de la vía supresora tumoral asociada a p53. Cuando gracias a la actividad quinasa de ATM, ATR, ChK1, ChK2 o ADN-PK, la proteína p53 es fosforilada en las serinas 15 y 20 y en la treonina 18 del extremo N-terminal, cambia su conformación espacial, lo que hace que pierda afinidad por la proteína MDM2 y se disocie de ella (Sancar A. *et al.* 2004; Lou Z. y Chen J. 2006). En el microarray los genes ATM y CHK1 resultaron sub-expresados en las células G10 lo que podría indicar una menor eficiencia en dichas fosforilaciones de p53 y por lo tanto en una disminución de la acción de p53 frente al daño al ADN.

La estabilización de p53 aumenta su vida media, lo que se refleja en una mayor concentración celular de la proteína, suficiente para activar la transcripción de genes que participan en los puntos de control G1/S o G2/M del ciclo celular, como p21WAF-1, GADD45 $\alpha$ , 14-3-3 $\sigma$  y B99 entre otros (Lee MH. *et al.* 2006; Utrera R. *et al.* 1998). Al respecto es interesante considerar que la desregulación del punto de control G2 es una de las características de la transformación maligna, pues constituye la última barrera antes de que las células con el ADN mutado puedan adquirir inmortalidad (Chuaire-Noack L. *et al.* 2008). El producto del gen Gadd45 detiene el crecimiento y se induce por daño al ADN, por lo que toma parte en los procesos de apoptosis, supervivencia celular e inmunidad innata (Wang X.W. *et al.* 1999; Zhang Y. *et al.* 2006). En nuestro análisis bioinformático, los genes GADD45 $\alpha$ , 14-3-3 $\sigma$  y B99 se encuentran sub-expresados en las células G10. Así se puede inferir que los bajos niveles de estos genes se deberían a la estabilización defectuosa de p53, quien es responsable de activar la transcripción de los mismos.

#### ***5.1.4 Evaluación de los Perfiles de Expresión Génica en la Vía del Ciclo Celular***

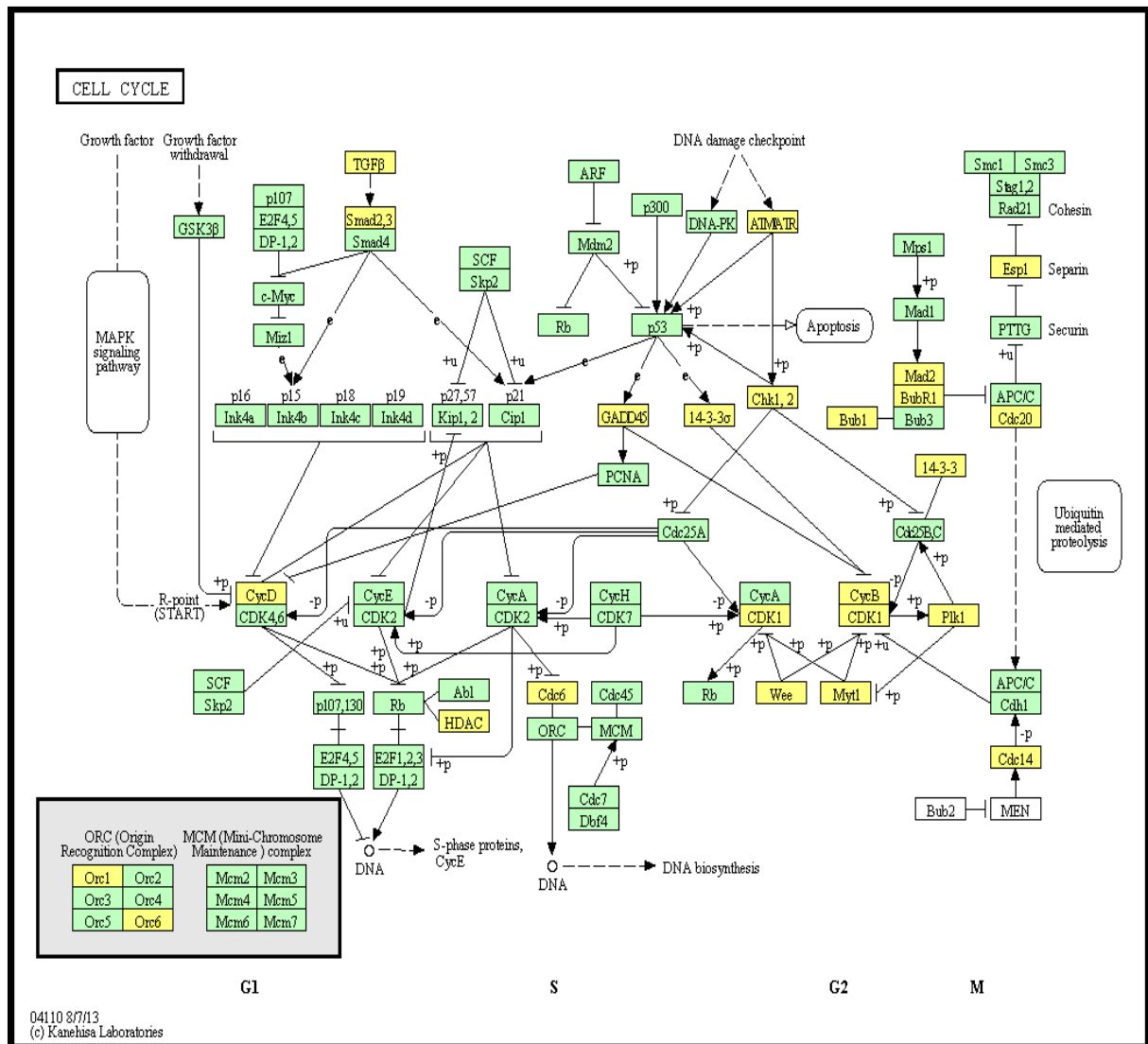
El proceso conocido como ciclo celular es de gran importancia para la célula ya que tiene como función la formación completa de una nueva célula, evitando en lo posible la creación de células con múltiples errores. Esto le permite al organismo permanecer en un constante equilibrio, previniendo así aquellos desórdenes que puedan perjudicar su salud. (Lomanto L.D. *et al.* 2003). El ciclo celular es la base para la reproducción de los organismos. Su función no es solamente originar nuevas células sino asegurar que el proceso se realice en forma debida y con la regulación adecuada (Alberts B. *et al.* 1996). Como todo proceso biológico, el ciclo celular está sujeto a regulación. Ésta es realizada en los puntos de control o de chequeo, que pueden frenar o disparar diversos procesos que le permitan a la célula proseguir con su ciclo normal de replicación del material genético, crecimiento y división (Nashmyt K. 1996).

Considerando que en nuestras células de estudio, la presencia de alteraciones en los genes involucrados en este proceso puede contribuir a la inestabilidad genética y a la progresión maligna, hemos realizado un estudio bioinformático de los perfiles de expresión génica seleccionando los genes de esta vía a partir de la base de datos KEGG. Se observaron 24 genes sub-expresados en las células G10 respecto del control (Fig. 13). En la figura 14 se muestra la participación de estos genes en la vía del ciclo celular.



**Fig. 13.** Evaluación de la expresión génica por *microarrays* de genes asociados a la vía de ciclo celular. La imagen muestra los grupos de genes sub-expresados del clon G10 respecto del promedio de los controles (A375 y PCDNA3). (Color rojo: 2 expresión aumentada y verde: -2 expresión disminuida).

Con respecto a los genes que fueron encontrados sub-expresados en G10 a partir de este análisis y teniendo en cuenta las funciones que cumplen en la vía del ciclo celular (Fig. 14), se pueden destacar ciertos mecanismos, descritos a continuación, que podrían encontrarse afectados.



**Fig. 14.** Vía del ciclo celular alterada en función de los genes sub-expresados en las células G10 respecto del control. Los genes indicados en color amarillo representan a aquellos que se encuentran sub-expresados. Figura modificada a partir de la original de KEGG.

La proteína que deriva del gen GADD45 actúa en los puntos de control G1 y G2. En G1 detiene el ciclo mediante su interacción con PCNA, mientras que en G2 inhibe al complejo ciclina B1-CDK2, también llamado factor promotor de la mitosis MPF, lo que impide la transición a la fase M. GADD45 contribuye además a la estabilidad genómica, en

razón de que participa en el mecanismo de reparación por escisión del ADN (Wang X.W. *et al.* 1999; Zhang Y. *et al.* 2006).

En la fase G2 del ciclo celular actúa también el producto proteico del gen 14-3-3 $\sigma$  cuando es inducido por p53 en respuesta al daño del ADN. Una vez expresada, la proteína interactúa con quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y puede regular el ciclo en forma negativa, pues “secuestra” complejos CDK2/CDK1-ciclina B y los transporta desde el núcleo hasta el citoplasma. Además, las proteínas 14-3-3 $\sigma$  ejecutan una retroalimentación positiva sobre p53, lo que aumenta su estabilidad y su actividad transcripcional. Esto se debe a la regulación negativa que 14-3-3 $\sigma$  ejerce sobre MDM2, lo que potencia la actividad de p53. Es explicable entonces su papel en el control de la transformación tumoral, sobre el que existe bibliografía que muestra una disminución en la expresión de 14-3-3 $\sigma$  en varios tipos de cáncer (Lodygin D. *et al.* 2004; Uchida D. *et al.* 2004).

En el mismo sentido, la sub-expresión de TGF $\beta$  en G1 favorecería el avance en el ciclo celular dado que la activación de los genes TGFB1 y TGFB2, interrumpe la progresión del ciclo celular en fase G1 (Kolke M. *et al.* 1994).

El punto de control del huso mitótico es un mecanismo de vigilancia crucial para mantener el correcto número de cromosomas durante la división celular. Los componentes principales de este punto de control comprenden las proteínas MAD1, MAD2, BUB1, BUB3, BUBR1 y MPS1. Las alteraciones en el punto de control del huso mitótico se encuentran implicadas en la generación de aneuploidías (ganancia o pérdida de cromosomas completos), lo cual es una característica frecuente en cáncer. Particularmente en G1, MAD2 y BUB1 se encuentran subexpresadas. MAD2 inhibe el complejo promotor de la anafase (APC) para prevenir la separación de las cromátides hermanas (Nasmyth K. 2005). Varios estudios han demostrado que MAD2 se encuentra involucrado en la respuesta al daño del ADN, asociándose con la expresión de  $\gamma$ -H2AX. Ello sugiere su posible papel en la inhibición del ciclo celular para promover la reparación del ADN en respuesta a DSBs (Garber P.M. *et al.* 2002; Mikhailov A. *et al.* 2002; Fung M.K. *et al.* 2008). Además, MAD2 regula al gen E2F manteniendo sus niveles de expresión y asegurando la euploidía.



BUB1 es uno de los primeros componentes del punto de control del huso mitótico necesario para ensamblar el cinetocoro naciente en la profase temprana (Jablonski S. A. *et al.* 1998) y es una verdadera proteína del punto de control. El reclutamiento del cinetocoro por BUB1 ocurre a través de la directa interacción entre la repetición tetratricopéptido (TPR) de su dominio N terminal y blinkin (también conocido como hKNL1, AF15q14, D40 y CASC5), miembro de la red de proteínas del cinetocoro (Cheeseman I.M. *et al.* 2006; Cheeseman I.M. *et al.* 2008). BUB1 determina el reclutamiento de varios blancos del cinetocoro, incluyendo las proteínas centroméricas E y F (Cenp-E and Cenp-F, respectivamente), BUB3, MAD3/BUBR, MAD1 y MAD2 (Boyarchuk Y. *et al.* 2007; Warren C.D. *et al.* 2002). Alteraciones en el punto de control del huso mitótico en el gen BUB1 se han asociado con inestabilidad cromosómica (CIN) en cáncer de colon. Las células que pierden la expresión de BUB1 pueden escapar de la apoptosis, continuando con la progresión en el ciclo celular. En este sentido, a medida que el ciclo celular “alterado” progresa, las células hijas reciben complementos cromosómicos anormales y se genera la aneuploidía. En líneas celulares de carcinoma de colon se han identificado dos mutaciones en el gen BUB1 (Chen R. H. 2004), las cuales actúan de manera negativa y conllevan al desarrollo de CIN y a aneuploidía.

La progresión en el ciclo celular está gobernada por una serie de ciclinas y CDKs. Las ciclinas actúan en diferentes fases del ciclo celular por unirse y activar las CDKs y juegan un papel importante en el control del ciclo celular. Varios complejos ciclinas/CDKs involucrados en la regulación del ciclo celular, ciclina D1/CDK4 o CDK6 y ciclina B1/CDK2, son de particular interés porque dirigen la transición G1/S y la fase G2/M y son esenciales para la síntesis de ADN y la proliferación celular. La expresión desregulada de estas ciclinas y CDKs podría llevar al crecimiento celular descontrolado y a la transformación maligna. El complejo ciclina B1/CDK2 está involucrado en la maduración/promoción de la mitosis en la transición G2/M durante el ciclo celular (Vermeulen K. *et al.* 2003). Así, la desregulación de la expresión de ciclina B1 podría estar involucrada en el crecimiento celular descontrolado y en la transformación maligna. La asociación de la ciclina B1 con la forma activa de CDK2 inicia la condensación cromosómica, destrucción de la membrana nuclear y el ensamblaje del huso mitótico. El incremento en la expresión de ciclina B1 es un evento frecuente en las células tumorales; su sobreexpresión se ha demostrado en cáncer colorrectal, cáncer de próstata, de

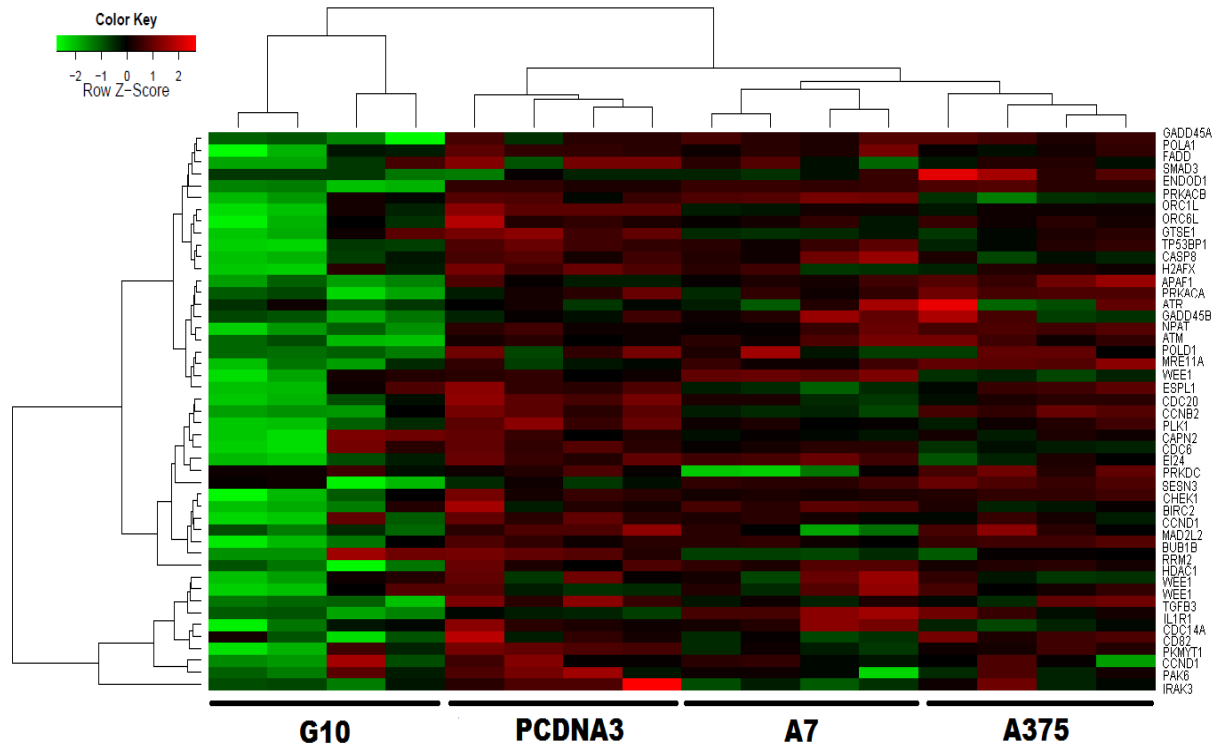
mama, de esófago, de cabeza y cuello, y en linfoma de Hodgkin y de tejido linfoide asociado a las mucosas (Kawamoto H. *et al.* 1997; Wang A. *et al.* 1997). Diferencias significativas en el índice de marcaje de ciclina B1 entre lesiones benignas/premalignas en cáncer de mama sugieren su papel en la transformación maligna de células epiteliales. Además, la actividad del complejo ciclina B1/CDK2 se inhibe por la fosforilación del residuo tirosina quinasa 15 (Tyr15) sobre CDK2 (Kawamoto H. *et al.* 1997). La fosforilación de Tyr15 se lleva a cabo por la quinasa WEE1, una proteína nuclear que retrasa la mitosis hasta la terminación de la replicación del ADN en células con ADN dañado (Wang A. *et al.* 1997). En células de carcinoma de colon se ha observado la disminución en la expresión de WEE1, sugiriendo que podría actuar como un supresor de tumores (Mashal R.D. *et al.* 1996).

Teniendo en cuenta lo descrito y los genes de la vía del ciclo celular sub-expresados en las células G10, podemos inferir que la expresión disminuida de GADD45 llevaría a que no se pueda detener el ciclo en G1 y que tampoco se impida la transición a la fase M del ciclo celular. La expresión disminuida del gen 14-3-3 $\sigma$  llevaría a no regular el ciclo en forma negativa por no poder secuestrar los complejos CDK2/CDK1-ciclina B. La sub-expresión de los genes TGFB1 y TGFB2 no permitiría interrumpir correctamente la progresión del ciclo celular en fase G1. La expresión disminuida de MAD2 haría defectuosa la inhibición del complejo promotor de la anafase (APC) para prevenir la separación de las cromátides hermanas. La sub-expresión de BUB1 proporcionaría a las células la capacidad de escapar de la apoptosis y les permitiría continuar con la progresión en el ciclo celular. La expresión disminuida de WEE1 representaría una falta de capacidad para reducir la transformación maligna. La sub-expresión de ciclina B se asociaría a una menor proliferación, lo cual tiene coherencia con las características de estas células ya que si bien son metastásicas, presentan baja capacidad proliferativa. Las células G10 presentan desdiferenciación asociada a un mayor grado de malignidad tumoral, como es la capacidad de migración celular y metástasis. A diferencia del clon A7, G10 no presenta polaridad en comparación con el control (Bracalente C. 2013). Esto es una característica de células con capacidad migratoria y metastásica (Sidani *et al.* 2007). Por otro lado, si bien las células G10 tienen menor capacidad proliferativa y de crecimiento independiente de anclaje como el clon A7 respecto del control, mostraron características relacionadas con un fenotipo agresivo (Bracalente C. 2013).

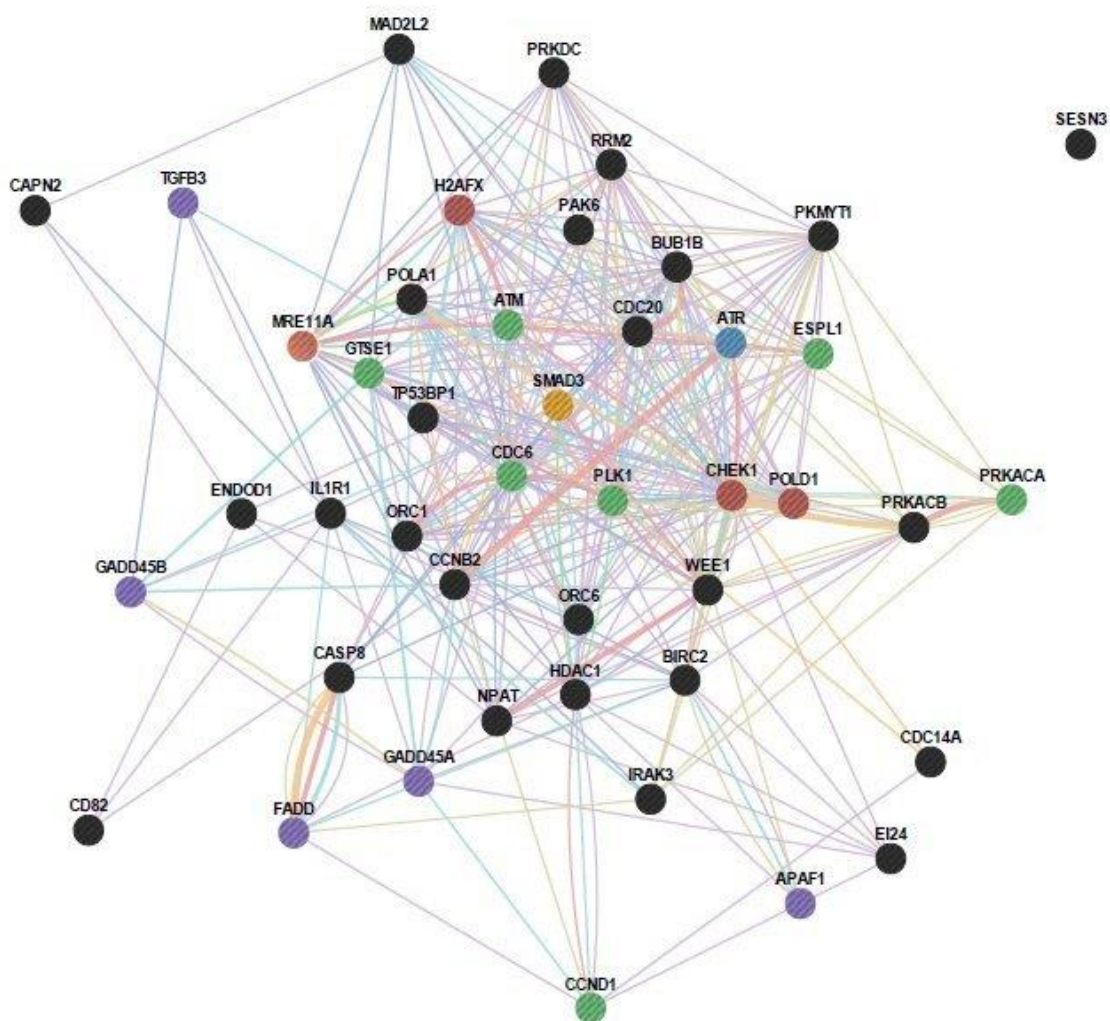
Así, las células G10 presentan múltiples defectos en la vía del ciclo celular y por consiguiente, una división sin detección adecuada del daño al ADN y sin las correcciones necesarias para llevar a cabo, de manera óptima, cada fase del ciclo, provocando mayor inestabilidad genómica a causa de las posibles aberraciones cromosómicas generadas por divisiones incorrectas del material genético.

#### ***5.1.5 Evaluación de Expresión Génica Integrando las Vías de Apoptosis, p53, Ciclo Celular y Respuesta al Daño al ADN***

Con el fin de estudiar las vías anteriormente mencionadas y su relación en la respuesta al daño al ADN se realizó un análisis global de expresión génica de estas vías junto con los genes asociados a la respuesta al daño al ADN. Se destaca un total de 44 genes sub-expresados en la línea celular G10 (Fig. 15), de los cuales 7 genes pertenecen a la vía de detección y reparación del daño, 23 genes están implicados principalmente en el proceso de regulación del ciclo celular, 11 genes están relacionados directamente con el proceso de apoptosis y 2 genes son esenciales para llevar a cabo la vía de señalización de p53. A su vez, una gran parte de ellos están involucrados en más de una de estas vías y se encuentran interconectados entre sí formando una red (Fig. 16). En la Tabla 4 se muestran las funciones específicas de cada gen.



**Fig. 15.** Genes sub-expresados en conjunto en las células G10 involucrados en los procesos de detección y reparación del daño, ciclo celular, apoptosis y señalización de p53. Se muestra el resultado de la modulación de los genes del clon G10 respecto del promedio de los controles (A375 y PCDNA3). (Color rojo: 2 expresión aumentada y verde: -2 expresión disminuida).



**Tipo de interacción**

- Co-expresión
- Co-localización
- Interacción genética
- Proceso
- Interacción física
- Previstos
- Comparten dominios proteicos

**Funciones**

- Regulación positiva del ciclo celular
- Regulación positiva de la apoptosis
- Arresto del ciclo celular
- Regulación positiva de la respuesta al daño del ADN, transducción de señales mediante p53
- Respuesta a la radiación

Gen	Función asociada
ATM	<span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #32cd32; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> <span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #ffc107; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> <span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #c0392b; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> <span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #17a2b8; border: 1px solid black;"></span>
CCND1	<span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #32cd32; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> <span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #ffc107; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> <span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #c0392b; border: 1px solid black;"></span>
MRE11A	<span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #c0392b; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> <span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #17a2b8; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> <span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #ffc107; border: 1px solid black;"></span>
GADD45A	<span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #673ab7; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> <span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #c0392b; border: 1px solid black;"></span>
ATR	<span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #c0392b; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> <span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #17a2b8; border: 1px solid black;"></span>
PRKACA	<span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #32cd32; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> <span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #ffc107; border: 1px solid black;"></span>
GTSE1	<span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #32cd32; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> <span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #ffc107; border: 1px solid black;"></span>
H2AFX	<span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #c0392b; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> <span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #17a2b8; border: 1px solid black;"></span>

**Fig. 16.** Red de genes sub-expresados en G10 respecto del control. Los genes se representaron en círculos y las líneas que los unen representan el tipo de interacción entre ellos. El color de cada gen representa la función asociada al mismo. En la tabla se muestran los genes con más de una función asociada. Resultados visualizados a través de GeneMania.

Gen	Función
<b>GADD45A</b>	<i>La proteína codificada por este gen estimula la reparación de ADN e inhibe la entrada de las células en la fase S del ciclo celular.</i>
<b>POLA1</b>	<i>La proteína codificada por este gen está involucrada en la iniciación de la replicación y en la reparación del ADN.</i>
<b>FADD</b>	<i>La proteína codificada por este gen juega un papel crucial en la etapa final que da lugar a la ejecución de la apoptosis.</i>
<b>SMAD3</b>	<i>La proteína codificada por este gen está implicada en muchas de actividades biológicas que incluyen el crecimiento celular, la apoptosis y la diferenciación.</i>
<b>ENDOD1</b>	<i>La proteína codificada por este gen es una endonucleasa.</i>

<b>PRKACB</b>	<i>El resultado de la expresión de este gen es una subunidad catalítica de la proteína quinasa A, regula diversos procesos celulares tales como la proliferación celular, el ciclo celular y la diferenciación.</i>
<b>ORC1L</b>	<i>La proteína codificada por este gen es esencial para la iniciación de la replicación del ADN.</i>
<b>ORC6L</b>	<i>La proteína codificada por este gen es un componente del complejo de reconocimiento del origen (ORC) que se une a orígenes de replicación.</i>
<b>GTSE1</b>	<i>Este gen sólo se expresa en las fases S y G2 del ciclo celular, donde se colocaliza con la tubulina citoplasmática y los microtúbulos. Puede estar implicado en la detención del ciclo celular p53 retrasando la fase G2 / M al interferir con reordenamientos de microtúbulos que se requieren para entrar en la mitosis.</i>
<b>TP53BP1</b>	<i>La proteína codificada por este gen mejora la activación transcripcional mediada por p53 y está involucrada en la respuesta al daño de ADN, promoviendo la reparación.</i>
<b>CASP8</b>	<i>Este gen codifica para la proteína Caspasa 8 implicada en la señalización de la apoptosis.</i>
<b>H2AFX</b>	<i>Este gen codifica para una proteína miembro de la familia de las histonas H2A. Se requiere para la detención de la progresión del ciclo celular en respuesta a bajas dosis de radiación ionizante y para la reparación DSBs, siendo específicamente modificadas por fosforilación C-terminal.</i>
<b>APAF1</b>	<i>La proteína codificada por este gen interviene en la activación de la pro-caspasa-9, que conduce a la activación de caspasa-3 y la apoptosis.</i>
<b>PRKACA</b>	<i>Este gen codifica para una de las subunidades catalíticas de la proteína quinasa A.</i>

<b>ATR/ATM</b>	<i>Las proteínas codificadas por estos genes están estrechamente relacionadas con quinasas que se activan por daño en el ADN.</i>
<b>GADD45B</b>	<i>La proteína codificada por este gen interviene en la regulación del crecimiento y la apoptosis.</i>
<b>NPAT</b>	<i>La proteína codificada por este gen se requiere para la progresión del ciclo celular a través de las fases G1 y S.</i>
<b>POLD1</b>	<i>Este gen codifica para la subunidad catalítica de la ADN polimerasa delta.</i>
<b>MRE11A</b>	<i>La proteína codificada por este gen está implicada en la unión de extremos rotos del ADN, actividad endo y exonucleasa. Señalización en la reparación de DSB.</i>
<b>WEE1</b>	<i>La proteína codificada por este gen cataliza la fosforilación de la tirosina inhibidora de CDK2 / ciclina B.</i>
<b>ESPL1</b>	<i>La proteína codificada por este gen desempeña un papel central en la segregación de los cromosomas en el inicio de la anafase.</i>
<b>CDC20</b>	<i>La proteína codificada por este gen actúa como proteína regulador interactuando con varias otras proteínas en múltiples puntos del ciclo celular. Se requiere para movimiento de microtúbulos y para la separación de los cromosomas en la anafase.</i>
<b>CCNB2</b>	<i>La expresión de este gen es esencial para el control del ciclo celular en la transición G2 / M.</i>
<b>PLK1</b>	<i>Este gen codifica para la proteína quinasa serina/treonina que cumple funciones importantes en la regulación del ciclo celular sobre todo durante la mitosis.</i>
<b>CAPN2</b>	<i>La proteína codificada por este gen está involucrada en la vía de la apoptosis</i>
<b>CDC6</b>	<i>La proteína codificada por este gen participa en la iniciación de la replicación del ADN y en los puntos de control que aseguran que la replicación se complete antes de iniciar la mitosis.</i>

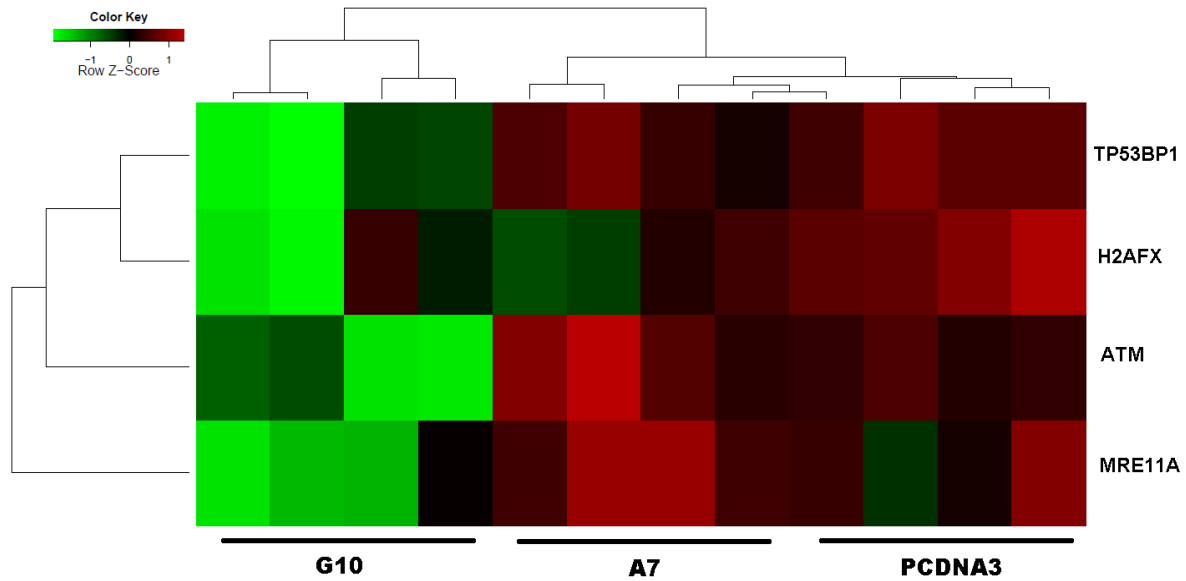


<b>EI24</b>	<i>Este gen está regulado directamente por p53, codifica una proteína que suprime el crecimiento celular e induce la apoptosis.</i>
<b>PRKDC</b>	<i>La proteína codificada por este gen es un sensor molecular de daño del ADN. Esta implicada en la etapa de ligación de extremos no homólogos en la vía de reparación del ADN.</i>
<b>SESN3</b>	<i>La proteína codificada por este gen interviene en la señalización de p53.</i>
<b>CHEK1</b>	<i>La proteína codificada por este gen es importante en la regulación del ciclo celular, inhibe su progreso en respuesta al daño en el ADN o ADN no replicado. Fosforila e inhibe CDK25C, evitando así la activación del complejo CDK2-ciclina B y la entrada a mitosis.</i>
<b>BIRC2</b>	<i>La proteína codificada por este gen regula la apoptosis, la señalización inflamatoria, la inmunidad y la proliferación celular, así como la invasión de células y la metástasis.</i>
<b>CCND1</b>	<i>Este gen codifica un componente regulador del complejo ciclina D1-CDK4 (DC) que fosforila e inhibe los miembros de la familia de proteínas de retinoblastoma (RB), incluyendo RB1 y regula el ciclo celular durante la transición G1/ S.</i>
<b>MAD2L2</b>	<i>Este gen codifica para un componente del punto de control del ensamblaje mitótico, impide el inicio de la anafase hasta que todos los cromosomas están correctamente alineados en la metafase.</i>
<b>BUB1B</b>	<i>Este gen codifica para un componente esencial del punto de control de la mitosis. Una de sus funciones es inhibir la actividad de APC.</i>
<b>RRM2</b>	<i>La proteína codificada por este gen proporciona los precursores necesarios para la síntesis de ADN.</i>
<b>HDAC1</b>	<i>La proteína codificada por este gen está implicada en la desacetilación de histonas, importante en la regulación transcripcional y la progresión del ciclo celular.</i>

<b>TGFB3</b>	<i>La proteína codificada por este gen está involucrada en la diferenciación celular.</i>
<b>IL1R1</b>	<i>Este gen codifica para el receptor de interleuquina 1. Implicado en la respuesta inflamatoria controlando diferentes funciones celulares incluyendo la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular y apoptosis.</i>
<b>CDC14A</b>	<i>La proteína codificada por este gen es importante para la separación del centrosoma y la citocinesis durante la división celular.</i>
<b>CD82</b>	<i>La proteína codificada por este gen es un inhibidor de la metástasis activada por p53.</i>
<b>PKMYT1</b>	<i>La proteína codificada por este gen es una quinasa asociada a la membrana que regula negativamente la transición G2 / M del ciclo celular mediante la fosforilación e inactivación de CDK1.</i>
<b>PAK6</b>	<i>Este gen codifica un miembro de una familia de proteínas p21. Involucrado en la apoptosis.</i>
<b>IRAK3</b>	<i>La proteína codificada por este gen es un transductor de señal para la citoquina proinflamatoria interleuquina-1.</i>

**Tabla IV.** Genes sub-expresados en las células G10 respecto del control y de las células A7 acompañados de las funciones asociadas a las proteínas que codifican (Se utilizó la base de datos *GenCards* para asignar las distintas funciones). Los colores indican las vías en las que participan. Celeste: señalización de DSB; Rosa: ciclo celular; Verde: apoptosis; Naranja: señalización de p53.

A su vez, hemos seleccionado del análisis bioinformático cuatro genes en particular que mostraron una disminución significativa en la expresión en G10 vs. el control PCDNA3 y A7. En la figura 17 se muestra el perfil de expresión de dichos genes ATM, TP53BP1, MRE11A y H2AFX.



**Fig. 17.** Perfil de expresión diferencial de genes relacionados con la respuesta al daño al ADN.

La proteína ATM, está involucrada en el control del ciclo celular, la recombinación mitótica, el monitoreo de la longitud de los telómeros y la respuesta al daño al ADN. Después de la exposición a la radiación ionizante o en presencia de DSBs se produce un rápido aumento de su actividad quinasa (Mavrou A. *et al.* 2008). ATM y p53 desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la integridad del genoma. Ambos cooperan en el punto de control G1 y G2, la fosforilación dependiente de ATM es responsable de la activación de p53 (McKinnon P.J. 2004). Las alteraciones en estas proteínas pueden contribuir a una mayor incidencia de los cambios genómicos, tales como deleciones, translocaciones y amplificaciones, que son comunes durante la oncogénesis (Mavrou A. *et al.* 2008).

TP53BP1 (proteína de unión a la proteína tumoral p53 1, 53BP1) es un gen que codifica una proteína que desempeña un papel clave en la respuesta al daño al ADN. Esta proteína participa en la señalización del punto de control de la mitosis y mejora la activación transcripcional mediada por TP53. La proteína 53BP1 puede promover directamente la actividad quinasa de ATM. La magnitud de este efecto es proporcional al nivel de Mre11-Rad50-Nbs1 (Complejo MRN) en la reacción, en relación con la idea de que 53BP1 facilita las interacciones productivas entre MRN y ATM y que estas interacciones están limitadas

cuando las concentraciones de MRN caen por debajo del umbral (Lee J.H. *et al.* 2010). Por otra parte, la disminución mediada por siRNA de los niveles de 53BP1 en células humanas reduce la fosforilación de p53, CHK2, BRCA1 y SMC1, sobre todo después de los daños inducidos por dosis bajas de radiación ionizante (Lee J.H. *et al.* 2010; Wang B. *et al.* 2002). La proteína 53BP1 también es fosforilada por ATM después del daño en el ADN y se requiere esta fosforilación para la señalización, aunque el reclutamiento de 53BP1 a los sitios de daño en el ADN es independiente de su fosforilación (Lee J.H. *et al.* 2010; Zgheib O. *et al.* 2005).

El gen MRE11A codifica una proteína nuclear implicada en la recombinación homóloga, el mantenimiento de longitud de los telómeros y la reparación de DSBs. Esta proteína es un componente del complejo MRN que posee actividad endonucleasa de una sola hebra y actividad específica de doble cadena 3'-5' exonucleasa, ambas proporcionadas por MRE11A. El complejo también puede ser necesario para la señalización del daño al ADN a través de la activación de la quinasa ATM, que ayuda a las interacciones entre proteínas del complejo MRN lo que contribuye a su estabilidad y función. Mutaciones en las proteínas Mre11 desestabilizan el complejo MRN, disminuyendo significativamente los niveles de Rad50 y Nbs1 *in vivo* (Lamarche B.J. *et al.* 2010). Por otra parte, las mutaciones en MRE11 humana conducen al trastorno ataxia-telangiectasia (Lamarche B.J. *et al.* 2010), en el que los pacientes presentan ataxia y neurodegeneración, asemejándose a los fenotipos de la deficiencia de ATM (Taylor A.M. *et al.* 2004). La participación de MRN en la señalización del punto de control del ciclo celular, hace que las células de los pacientes con trastorno de ataxia-telangiectasia tengan una activación defectuosa del punto de control (Lamarche B.J. *et al.* 2010).

Por otro lado, el gen H2AFX codifica para la histona H2AX. Como se mencionó previamente  $\gamma$ -H2AX se acumula en el sitio de daño y desencadena vías de señalización con el fin de estimular la respuesta al daño al ADN que también incluye la reparación de las DSBs. Por lo tanto,  $\gamma$ -H2AX es un biomarcador sensible y robusto de daño en el ADN (Heylmann D. *et al.* 2016). Otros autores afirman que H2AX está implicada en el desarrollo de diversos tumores malignos, ya que mediante la regulación de la expresión de H2AX se modula el crecimiento de células y la progresión del ciclo celular. Dichos autores han

demostrado que la sobreexpresión de H2AX suprime en gran medida el crecimiento celular del cáncer e inhibe la progresión del ciclo celular, actuando a su vez con otras proteínas (Yang H. *et al.* 2015). En base a esto podemos suponer que bajos niveles de H2AX contribuyen a la radiorresistencia de las células de melanoma, por su incapacidad de señalar la detención del ciclo celular frente a las DSBs.

En concordancia con esto otros estudios afirman que la sensibilidad a la radiación ionizante se correlaciona con mayor fosforilación de H2AX, y con la persistencia y aumento de los focos  $\gamma$ -H2AX (Bracalente C. *et al.* 2013).

Por lo tanto, la disminución observada en los niveles de TP53BP1, MRE11A y H2AFX en las células G10 puede estar relacionada con una respuesta defectuosa al daño al ADN, favorecida por una reducción de la actividad quinasa ATM, que también mostró una significativa disminución de la expresión. Además, los bajos niveles de estos genes en las células G10 ayudarían a saltar los puntos de control del ciclo celular. Por lo tanto, la incapacidad de bloquear la progresión del ciclo celular después de daños en el ADN podría convertir a las células G10 en más radiorresistentes, contribuyendo también a aumentar la inestabilidad genómica y la malignidad en estas células. A su vez, estos resultados coinciden con el análisis de GSEA realizado en estas células, el cual mostro una disminución de genes co-expresados (Fig.16) en las diferentes vías de señalización estudiadas, como la apoptosis, el ciclo celular y la vía de señalización de p53. Estos conjuntos de genes sub-expresados están particularmente implicados en la reparación del ADN, los puntos de control del ciclo celular, la regulación negativa del ciclo celular y la apoptosis.

### ***Estudios in Vitro***

#### ***5.2 Evaluación de las Respuestas Celulares a la Radiación Gamma: Curva de Sobrevida***

Las diferencias encontradas en las líneas celulares mediante los estudios *in silico*, nos llevó a realizar una evaluación de las respuestas celulares a la radiación gamma en este modelo. Para determinar la radiosensibilidad intrínseca de las células en estudio se realizaron ensayos clonogénicos de las células irradiadas con dosis de 1-5 Gy de radiación gamma. Las curvas de sobrevida se ajustaron al modelo lineal-cuadrático.

El ensayo clonogénico es un método experimental *in vitro* que se emplea para medir la sensibilidad celular ante un agente citotóxico. Consiste en determinar en qué proporción disminuye la capacidad clonogénica de una población celular después de una exposición a dicho agente. Las células que tras un tratamiento son capaces de formar colonias son las células sobrevivientes. Por lo tanto, a partir del conteo de colonias se obtiene la fracción de sobrevivida. (Hall, 1998)

Este método es el más empleado para determinar la radiosensibilidad celular en células tumorales y no tumorales (Fértil, 1981). La radiosensibilidad celular evaluada a través de este método se relaciona significativamente con el número de DSBs inducidas en el ADN tras irradiar células *in vitro*, lo que refuerza la relación entre la integridad y el daño genético (Ruiz de Almodóvar, 1994).

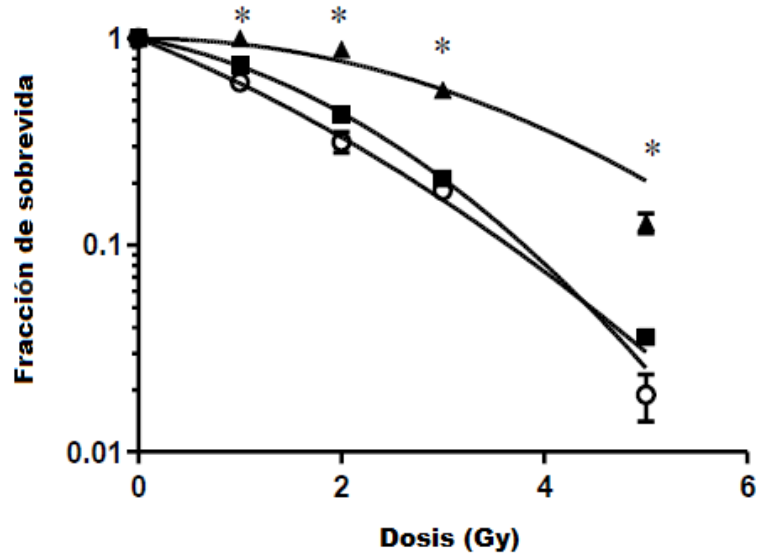
Dado que la sobrevivida celular se ajusta a una función exponencial, al representarla de forma semilogarítmica se pueden observar mejor las diferencias de radiosensibilidad en el dominio de las dosis bajas (pendiente u hombro de las curvas) (Steel, 1993). La morfología de las curvas de sobrevivida en células de mamífero se caracteriza por presentar una parte inicial curva a dosis bajas, seguida por una porción rectilínea (exponencial). La primera parte de la curva, conocida con el nombre de hombro, se interpreta como una región en la cual no se produce un incremento exponencial de la muerte celular, en este nivel de dosis la célula repara parcialmente el daño biológico causado por la radiación. A medida que aumenta la dosis, el daño se acumula y la inactivación celular se incrementa exponencialmente. A mayor pendiente y menor hombro, mayor es la radiosensibilidad de las células (Awwad, 1990).

Según el modelo lineal-cuadrático la muerte celular es el resultado de la inactivación de una diana biológica (con relevancia para la viabilidad). Esta inactivación se alcanza a través de la suma de dos componentes: lineal y cuadrático. El componente lineal representa la dosis necesaria para inactivar dicha diana con una sola interacción:  $e^{-(\alpha D)}$ . En una curva de sobrevivida,  $\alpha$  representa la pendiente inicial. La radiosensibilidad será tanto mayor como mayor sea el valor de  $\alpha$ , este parámetro expresa la susceptibilidad del ADN a la radiación y representaría a las lesiones DSBs y sitios locales de daño múltiple (del inglés, Local Multiple Damaged Sites, LMDS). Este valor se asocia en gran medida a la radiosensibilidad celular, al menos en el rango de las dosis de radiación utilizadas en oncología (Steel, 1989). El componente cuadrático representa la dosis necesaria para inactivar una diana biológica debido

a la acumulación de lesiones subletales:  $e^{-(\beta D^2)}$ . El sustrato de las lesiones subletales se encuentra representado por los cambios de base y roturas simples de la cadena de ADN. Con el aumento de la dosis, el componente cuadrático va ganando importancia a la vez que se acumulan las lesiones subletales y se saturan los mecanismos de reparación. Al final, la muerte celular llega debido al gran número de lesiones subletales que se han generado llegando a ser equivalentes a las lesiones DSBs y LMDS. Cuanto mayor es  $\beta$ , mayor es la capacidad para reparar el daño subletal y mayor es el hombro de la curva de sobrevida (Balart Serra J. *et al.* 2001).

El concepto de radiosensibilidad celular intrínseca indica el grado de susceptibilidad – pérdida de la capacidad reproductiva– ante la radiación, independientemente de los factores ambientales. El grado de daño genético radioinducido y la capacidad de respuesta y reparación de dicho daño determinarán la radiosensibilidad celular. Se utiliza como parámetro para expresar la radiosensibilidad, la fracción de sobrevida a 2 Gy (SF2) que representa la supervivencia celular tras una dosis de 2Gy (Fétil, 1986; West, 1992). Se considera que este parámetro es el que mejor expresa la radiosensibilidad (Fétil. 1981; Deacon. 1984; Bristow. 1990; Deschavanne. 1996).

El ensayo clonogénico y las curvas de sobrevida resultantes nos permitieron caracterizar la respuesta a la radiación de las células en estudio (Fig. 18). Las células G10, que exhiben un fenotipo invasivo y metastásico, fueron significativamente más radiorresistentes ( $p < 0,01$ ) que las células A7 (más diferenciadas y no invasivas) y el control PCDNA3.



	PCDNA3 (○)	A7 (■)	G10 (▲)
SF2	0.32 ± 0.03	0.43 ± 0.16	0.89 ± 0.05
$\alpha$ (Gy <sup>-1</sup> )	0.45 ± 0.05	0.20 ± 0.05	0
$\beta$ (Gy <sup>-2</sup> )	0.05 ± 0.02	0.11 ± 0.03	0.06 ± 0.02

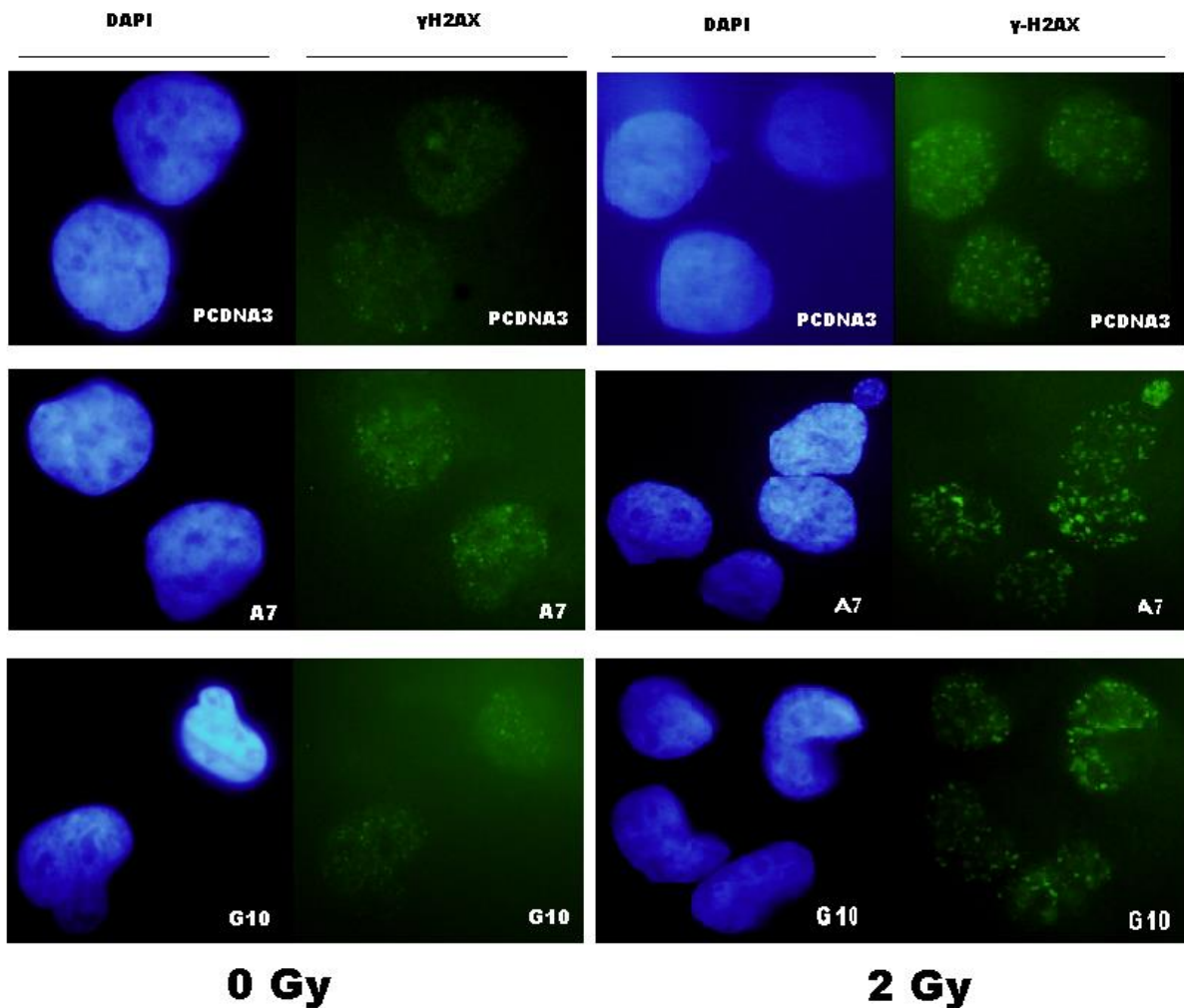
**Fig. 18.** Curva de sobrevivencia de células de melanoma luego de la irradiación con rayos gamma. La tabla muestra el factor de sobrevivencia a 2 Gy (SF2) y los parámetros  $\alpha$  y  $\beta$ . \*p<0.01.

Se puede observar la caída de las curvas correspondientes a las células A7 y PCDNA3 a partir de la dosis 1 Gy, mientras que para las células G10 la curva presenta una pendiente más pequeña y un mayor hombro, lo que indica su radiorresistencia superior. Este comportamiento también se muestra a través del SF2. Respecto al parámetro  $\alpha$ , las células PCDNA3 presentaron el valor más alto, lo que nos permitió considerarlas como el tipo celular más radiosensible, seguido de A7 y por último de G10, que presentó un valor de 0 para este parámetro, lo que confirma también su menor radiosensibilidad.



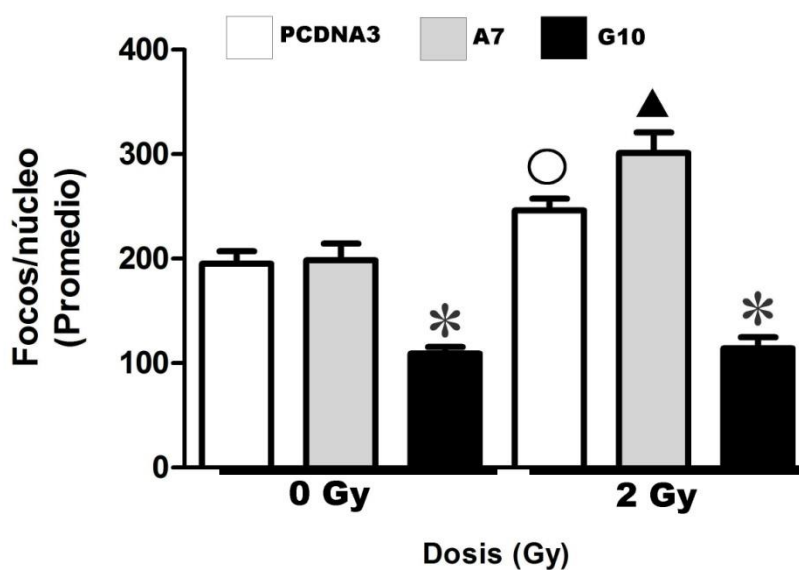
### 5.3 Cuantificación de Focos de $\gamma$ -H2AX como Determinación de DSBs en el ADN

En cuanto a la inducción y el sensado de DSBs en este modelo de melanoma, se realizó el conteo de focos de  $\gamma$ -H2AX en las células no irradiadas (0 Gy) y luego de irradiar con una dosis de 2Gy (Fig.19) tomando como referencia la contratinción de los núcleos celulares con DAPI.



**Fig. 19.** Imagen representativa de los Focos de  $\gamma$ -H2AX sin irradiar y luego de irradiación 2Gy. DAPI: tinción de ADN nuclear (azul);  $\gamma$ - H2AX: tinción con FITC de los focos de  $\gamma$ -H2AX (verde).

Como resultado de esta cuantificación, se observó que las células A7 y PCDNA3 aumentaron el número medio de focos  $\gamma$ -H2AX por núcleo 30 min post- irradiación en comparación con el número medio de focos  $\gamma$ -H2AX por núcleo en las células sin irradiar. Por el contrario, las células G10 no presentaron cambios en el número medio de focos después de la irradiación. A su vez se vio una marcada diferencia en el número medio de focos  $\gamma$ -H2AX de las células G10 respecto de A7 y PCDNA3, tanto en las células irradiadas como en las células sin irradiar (Fig.20). La falta de inducción en células G10 es consistente con el perfil de expresión génica de estas células. Estos resultados confirman los datos obtenidos en el *microarray* ya que el valor cuantificado en las células sin irradiar resultó menor para las células G10 con respecto a la misma condición para las células A7 y PCDNA3. Por otro lado, si bien el número de focos basales observados en todos los tipos celulares aquí estudiados es muy alto, esto podría estar asociado al hecho de que las células de melanoma en general expresan mayor número de focos de  $\gamma$ -H2AX en relación con las células normales (Ibañez I.L. *et al.* 2009).



**Fig. 20.** Cuantificación de focos por núcleo de  $\gamma$ -H2AX. Número medio de focos por núcleo vs. dosis. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de un experimento representativo. Los asteriscos marcan diferencia significativa respecto de A7 y PCDNA3. El círculo marca diferencia significativa respecto de PCDNA3 0Gy. El triángulo marca diferencia significativa respecto de A7 0Gy.

Con respecto a las proteínas que participan en la fosforilación de H2AX, ATM ha sido ampliamente mencionada como la principal enzima encargada de este efecto vinculado al daño inducido por radiaciones ionizantes (Kinner *et al.* 2008), mientras que la fosforilación por ATR se produce en respuesta al daño del ADN inducido por UV (Hanasoge y Ljungman. 2007) o al estrés en la replicación (Ward y Chen 2001). Por otra parte, la ADN-PKcs es capaz de fosforilar H2AX en los nucleosomas durante la fragmentación del ADN en la apoptosis (Rogakou *et al.* 2000) y desempeña también un importante rol en la generación de  $\gamma$ -H2AX inducido por radiación ionizante (An *et al.* 2010). El reclutamiento de proteínas de señalización y reparación en los sitios de lesiones, constituye el primer evento de la respuesta celular al daño al ADN. Muchos componentes involucrados en la reparación del ADN, incluyendo ATM, BRCA1, 53BP1, MDC1, RAD51 y el complejo MRN (Mre11/RAD50/NBS1) co-localizan con los focos de  $\gamma$ -H2AX. Estos microdominios contienen cientos de moléculas que se acumulan alrededor de cada DSB (Fernandez-Capetillo *et al.* 2004). Mediante la denominada “respuesta al daño del ADN” se detecta, señala y promueve la reparación de las lesiones. Células defectuosas en estos mecanismos suelen mostrar mayor sensibilidad a los agentes genotóxicos, generando como consecuencia, inestabilidad genómica y enfermedades como el cáncer (Polo y Jackson. 2011). Cuando las DSBs no son reparadas eficientemente, pueden dar lugar a diversas aberraciones cromosómicas que se asocian con defectos en el desarrollo, radiosensibilidad, enfermedades neurodegenerativas, inmunodeficiencia, esterilidad y predisposición al cáncer (Jackson y Bartek. 2009).

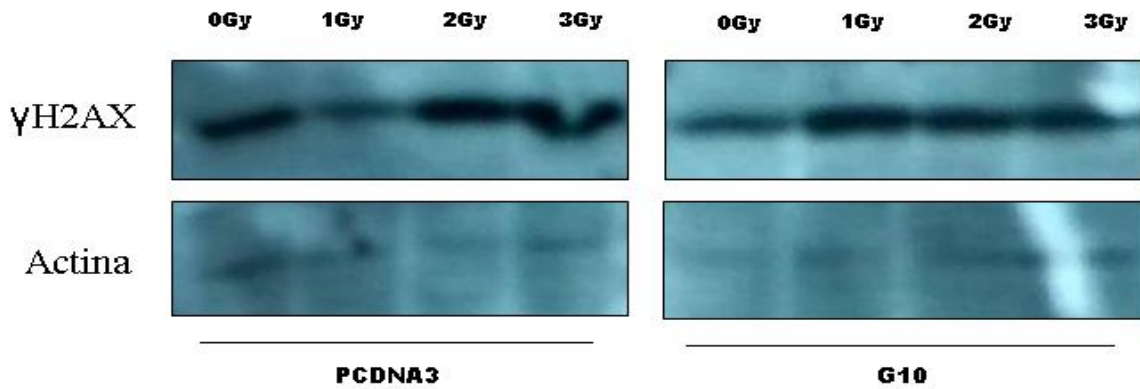
En función de lo expuesto y las características ya conocidas sobre los tipos celulares en estudio, resulta coherente el aumento en el número medio de focos para las células A7 y PCDNA3 luego de la irradiación a 2Gy en comparación con las células sin irradiar. Por otro lado, las células G10, no mostraron un aumento significativo en el número medio de focos después de la irradiación respecto de las células no irradiadas y a su vez presentaron una menor cantidad de focos en comparación con las células A7 y PCDNA3 en ambas condiciones (sin irradiar y post-irradiación). Esto podría explicarse por la presencia de fallas en la vía de respuesta al daño al ADN en estas células debido a la disminución en la expresión de genes claves en esta vía como pudo observarse mediante el análisis

bioinformático.

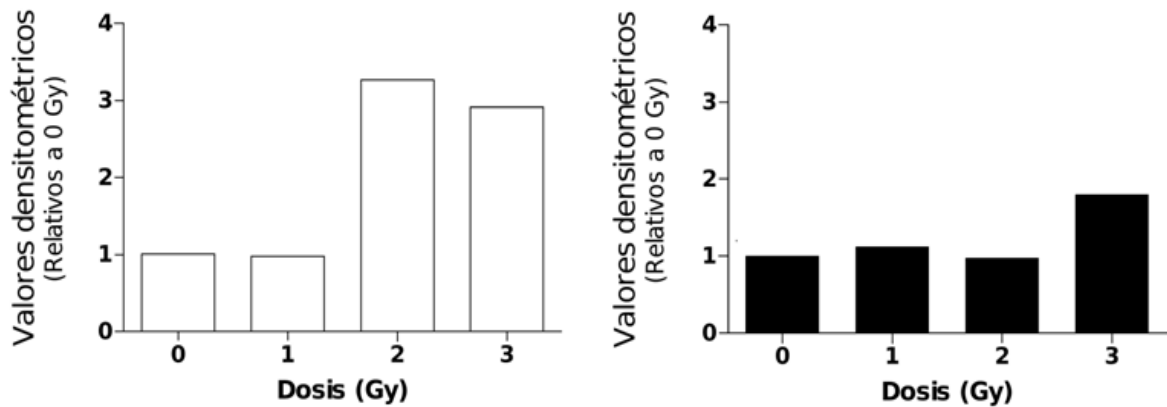
#### **5.4 Evaluación de $\gamma$ -H2AX por Western Blot**

Considerando los resultados previos de cuantificación de los focos de esta proteína, se decidió evaluar sus niveles mediante *western blot* a dos tiempos con el fin de evaluar la inducción y reparación de DSBs en estas células. Teniendo en cuenta que las células PCDNA3 y A7 presentaron resultados similares en cuanto a radiosensibilidad intrínseca e inducción de focos de  $\gamma$ -H2AX, se seleccionó al control PCDNA3 para ser comparado con las células G10 por medio de este ensayo. Las células fueron irradiadas a distintas dosis y se tomaron las muestras a los 30 min post-irradiación para evaluar la inducción de DSBs y a las 24 horas con el fin de tener una medida de posible reparación de las DSBs, asociada a la disminución de los niveles de la proteína fosforilada por la desaparición de los focos de  $\gamma$ -H2AX. La cuantificación realizada mediante densitometría de las bandas obtenidas a partir de las imágenes de *western blot* realizado con las muestras tomadas a 30 min post-irradiación (Fig. 21) permitió confirmar los resultados obtenidos mediante el ensayo de inmunofluorescencia. Se observó un aumento significativo en los niveles de  $\gamma$ -H2AX en las células PCDNA3 a los 30 min post-irradiación a 2Gy respecto de las células no irradiadas, mientras que el clon G10 no presentó cambios significativos post-irradiación a esa dosis y tiempo respecto de las células no irradiadas.

A)

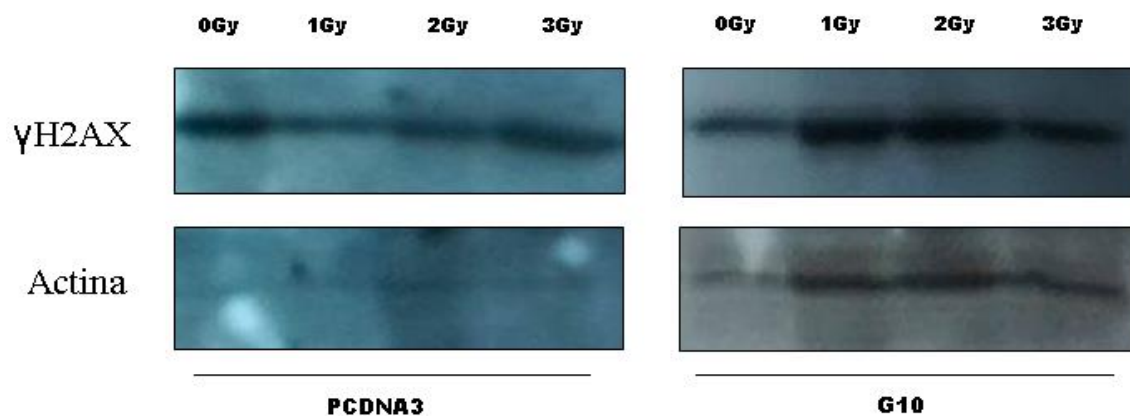


B)

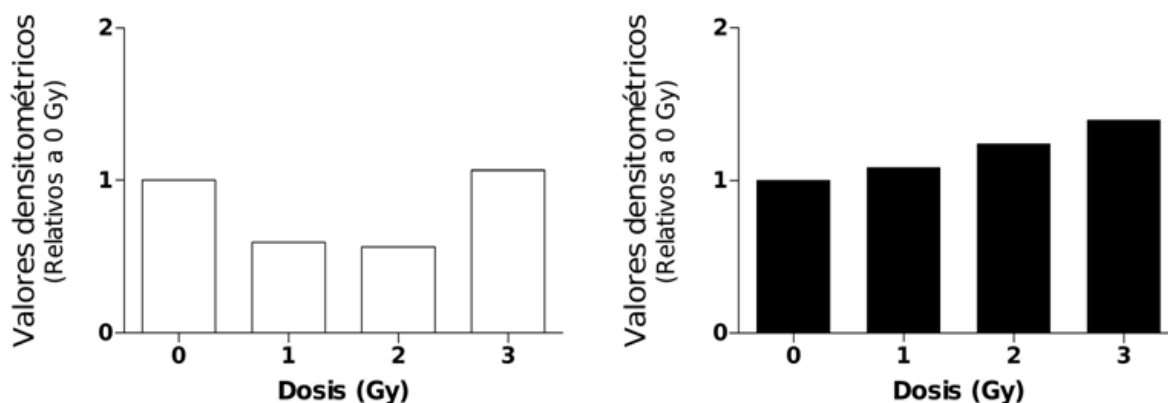


**Fig. 21.** Expresión de  $\gamma$ -H2AX y actina evaluada por *western blot* a 30 min post-irradiación con dosis de 0 a 3 Gy. A) Imágenes representativas. B) Cuantificación de los niveles de expresión de  $\gamma$ -H2AX por densitometría de bandas de las imágenes representativas. El gráfico de barras blanco pertenece a los valores de PCDNA3 y el gráfico de barras negro pertenece a los valores de G10.

A)



B)



**Fig. 22.** Expresión de  $\gamma$ -H2AX y actina evaluada por *western blot* a 24 hs post-irradiación con dosis de 0 a 3 Gy. A) Imágenes representativas. B) Cuantificación de los niveles de expresión de  $\gamma$ -H2AX por densitometría de bandas de las imágenes representativas. El gráfico de barras blanco pertenece a los valores de PCDNA3 y el gráfico de barras negro pertenece a los valores de G10.

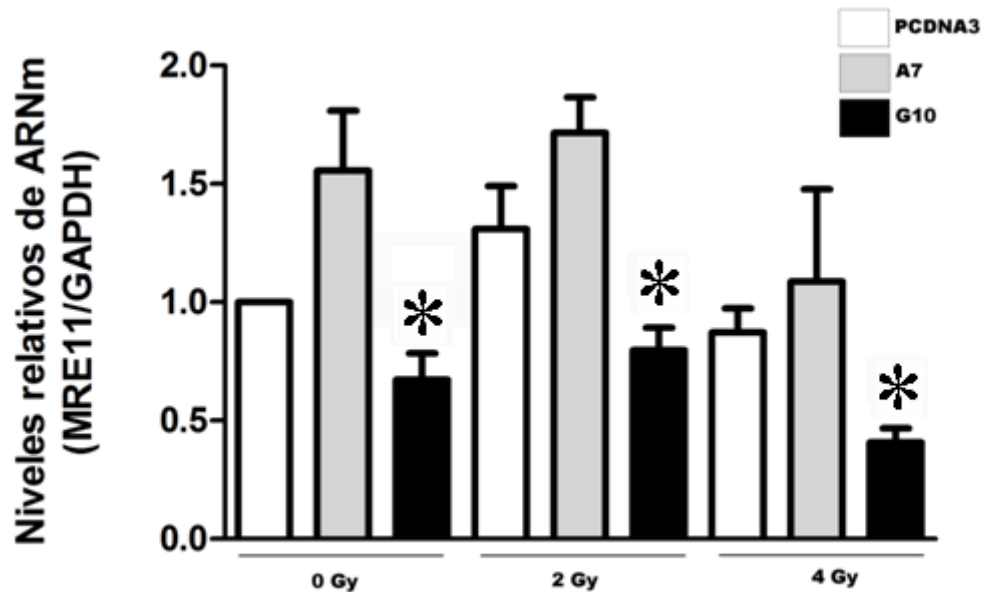
En cuanto a la cuantificación realizada para los resultados del *western blot* correspondiente a los niveles de  $\gamma$ -H2AX 24 hs después de la irradiación (Fig. 22), se observó en las células PCDNA3 una disminución de los niveles de la proteína fosforilada para las dosis 1 y 2 Gy e iguales niveles con respecto al control no irradiado para la dosis de 3 Gy. Estos resultados se podrían asociar a una mayor capacidad de reparación de DSBs en las células PCDNA3 con respecto a G10. Una vez que la ruptura de doble cadena es reparada, es necesario restablecer la estructura de la cromatina, por lo tanto es indispensable remover la  $\gamma$ -H2AX que desestabiliza la estructura con su grupo fosfato. Este restablecimiento de la organización de la cromatina se puede producir mediante la sustitución de la  $\gamma$ -H2AX por una histona sin fosforilar, o por desfosforilación directa de la histona presente en el nucleosoma (Svetlova *et al.* 2007; Chowdhury *et al.* 2005). Por otro lado, en las células G10 no se observó una baja en los niveles de la proteína H2AX fosforilada, manteniéndose similares para ambos tiempos. Estos resultados podrían relacionarse a la incapacidad de las células G10 para desencadenar mecanismos de sensado, señalización y reparación del daño al ADN. Existe una asociación entre la actividad deficiente de ADN-PKcs (subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de ADN) con la persistencia y el aumento en la cantidad de focos  $\gamma$ -H2AX 6 horas después de la irradiación, estudios realizados en líneas celulares defectuosas para ADN-PKcs muestran la persistencia de las rupturas doble cadena evaluadas mediante fosforilación de H2AX, resultando mayor en las células deficientes para ADN-PKcs que en las no deficientes para esta proteína (Bracalente C. *et al.* 2013). Otros autores de acuerdo con esta asociación, han propuesto que la ADN-PKcs regula los niveles de ATM, independientemente de su actividad quinasa y por lo tanto el aumento de la fosforilación H2AX en células defectuosas para ADN-PKcs (Bracalente C. *et al.* 2013). A su vez, han demostrado que las células IR-sensibles, carentes de actividad de ADN-PKcs, muestran persistencia y aumento de focos  $\gamma$ -H2AX, revelando que la ADN-PKcs se requiere como principal mecanismo de reparación de DSB (Bracalente C. *et al.* 2013). Esto concuerda con los resultados de los estudios *in silico*, donde el gen de ADN-PKcs se encontró sub-expresado en las células G10. De todas formas, a pesar de esta deficiencia las células G10 resultaron ser más radiorresistentes lo que podría estar asociado con la sub-expresión de genes en las vías de apoptosis y de señalización de p53, ya que aún en presencia de ADN dañado estas células se verían imposibilitadas para

arrestar el ciclo celular e inducir apoptosis. De esta manera, estas las células G10 al presentar una disminución en la expresión de genes responsables de la eficiencia de estas vías, podrían mantener la viabilidad celular en condiciones génicas aberrantes y esto contribuiría a la transformación maligna de estas células.

### ***5.5 Evaluación del Gen MRE11 por PCR Cuantitativa***

Se ha mencionado anteriormente la importancia de la vía de detección y reparación del daño al ADN, especialmente la reparación de DSB en respuesta a la radiación gamma y su vínculo con la viabilidad celular. Teniendo en cuenta esto y los estudios previos que correlacionan la expresión de la proteína MRE11 y la respuesta celular inducida por radiación, se estudió la expresión del gen MRE11 mediante PCR en tiempo real (Q-PCR). Este estudio permitió también realizar otra validación de los datos obtenidos por el análisis bioinformático del ensayo de *microarray*. Se observó una notable disminución de la expresión del gen MRE11A en las células G10 mediante el análisis bioinformático de los *microarrays* de expresión. Los resultados obtenidos mediante Q-PCR confirmaron estos resultados, ya que las células G10 presentaron una menor expresión del gen MRE11 respecto del control (Fig. 23) a nivel basal sin irradiar. Los tratamientos con radiación gamma no generaron diferencias significativas en la expresión del gen MRE11 en ninguno de los tipos celulares estudiados. Se observaron diferencias significativas en la expresión del gen MRE11 entre las células G10 y las células PCDNA3 y A7. Además, las células G10 irradiadas con una dosis de 4 Gy presentaron una tendencia a la disminución en la expresión del gen.





**Fig. 23.** Perfil de expresión del gen MRE11 evaluado a través de la cuantificación relativa de los niveles de ARNm por Q-PCR. Los datos representan la media  $\pm$ SEM de la cuantificación de los niveles de ARNm de MRE11 relativos a GAPDH. Los asteriscos representan diferencia significativa respecto de PCDNA3 y A7 ( $p < 0,05$ ).

Como se mencionó anteriormente el gen MRE11A codifica una proteína nuclear implicada en la recombinación homóloga, el mantenimiento de longitud de los telómeros y la reparación de las DSBs. El complejo MRN del cual forma parte puede ser requerido para la señalización del daño del ADN a través de la activación de la quinasa ATM. Estudios realizados en cáncer de mama (Soderlund K. *et al.* 2007) y vejiga (Choudhury A. *et al.* 2010; Teo M. T. W. *et al.* 2014) en donde se evaluó la correlación entre la supervivencia sin recidiva luego de la radioterapia con la expresión de varias proteínas implicadas en la vía de señalización y reparación de DSBs (H2AX, ATM, MRE11, RAD50 y NBS1) indicaron una correlación positiva entre una alta expresión de la proteína MRE11 y una mejor respuesta al tratamiento radiante, no encontrando correlación entre la respuesta a la radioterapia y las demás proteínas estudiadas. Las células G10 presentaron menor expresión de este gen, lo cual en combinación con las alteraciones en la expresión de genes asociados con ciclo celular y

apoptosis, podría tener una relación directa con las características de radiorresistencia encontradas.

Los bajos niveles del gen MRE11A en células G10 denotan una respuesta al daño defectuosa contemplando la ineficiencia de las vías de la apoptosis, señalización de p53 y ciclo celular. Estos estudios culminan en una mayor inestabilidad genómica por parte de estas células, producto de no reconocer el daño al ADN y evadirla detención del ciclo celular, lo que provoca aberraciones en el número de copias y mala distribución del material genético en el momento de la duplicación celular. Este resultado en los niveles de MRE11A confirma uno de los motivos por los que este tipo celular presenta mayor radiorresistencia y a su vez un alto grado de malignidad y fenotipo agresivo siendo invasivo y metastásico, en comparación con las células A7 y PCDNA3. Por lo tanto, se puede inferir que existe una relación entre la falta de inducción del MRE11 en la respuesta al daño al ADN desencadenada por los efectos de la radiación ionizante y la capacidad de las células G10 de sobrevivir a dicho estímulo, siendo este contraproducente en la estabilidad genómica confiriéndoles mayor malignidad.

## 6. Conclusión

Se espera que la profundización en los estudios de la biología del melanoma permita explicar por qué algunos tumores permanecen estables o silenciosos durante años, por qué otros presentan agresividad desmesurada y, también, por qué algunos tumores, que tenían un pronóstico desfavorable, no presentan problemas mientras que otros con muy buen pronóstico inicial desarrollan un comportamiento muy agresivo con invasión y metástasis. Los resultados de este trabajo permiten inferir que células más agresivas con capacidad metastásica podrían desarrollar distintos mecanismos para escapar de los efectos de la radiación ionizante. En particular, hemos descripto algunos aspectos genéticos que contribuyen a la evasión de la respuesta a la radiación por parte de las células del melanoma. Se demostró la co-expresión diferencial de genes sub-expresados en las células metastásicas G10 respecto de las células no invasivas A7 y el control PCDNA3 principalmente en las vías de señalización de p53, ciclo celular, apoptosis y detección y reparación del daño al ADN. Por consiguiente, el perfil genético de las células G10 en cuanto a estas vías resulta interesante para ser evaluado en otras células de melanoma maligno, ya que podrían asociarse a fenotipos metastásicos o resistentes a las terapias radiantes. La radiorresistencia de las células G10 puede explicarse en este modelo por la deficiente detección del daño al ADN por presencia de alteraciones clave en la vía de señalización de detección y reparación de las DSBs en combinación con la potencial resistencia a la apoptosis. Así, la disminución en el reclutamiento de moléculas encargadas de la reparación del daño al ADN, arresto del ciclo celular e inducción de apoptosis contribuiría a la proliferación sin control, aumentando las aberraciones cromosómicas y conduciendo a mayor inestabilidad genómica, que podría asociarse al desarrollo de características más agresivas en las células. Resultó interesante el estudio de genes como MRE11A y H2AFX, que llevan a cabo tareas cruciales en las vías mencionadas anteriormente y se encontraron sub-expresados en las células G10. La disminución en la expresión de estos genes, así como la disminución de los niveles de la proteína fosforilada  $\gamma$ -H2AX podría asociarse con fallas en la detección y reparación del daño al ADN. Esto asociado a la imposibilidad de arresto del ciclo celular y la evasión de las vías de la apoptosis les conferiría a las células resistencia a las radiaciones ionizantes, contribuyendo a una mayor inestabilidad genómica y a la progresión maligna.

En resumen, hemos demostrado en un modelo homogéneo de células de melanoma humano con diferentes grados de malignidad un perfil de expresión génica que puede estar asociado con radiorresistencia y progresión maligna. Este estudio si bien necesita ser extendido a otras líneas de melanoma con distinto grado de agresividad para validar los resultados obtenidos, contribuye como prueba de concepto a la comprensión de la radiorresistencia del melanoma en función de su regulación génica y el grado de agresividad. Estos resultados permiten proponer una asociación entre deficiencias en el sistema de detección y reparación de daño al ADN, la resistencia a la apoptosis y la inducción de inestabilidad genómica, la cual podría explicar los mecanismos comunes entre las vías de resistencia a tratamientos y de progresión maligna. Asimismo, estos hallazgos, una vez validados en otros melanomas, podrían permitir a futuro el desarrollo de herramientas de detección y tratamientos más eficaces que aumenten la supervivencia de los pacientes con esta enfermedad.

## 7. Referencias

ALBERTS, Bruce Bray, *et al.* *Biología molecular de la célula*. Barcelona, Omega, 3 ed. 1996. p. 596-614.

ALEXANDER, Stephanie; FRIEDL, Peter. Cancer invasion and resistance: interconnected processes of disease progression and therapy failure. *Trends in molecular medicine*, 2012, vol. 18, no 1, p. 13-26.

AMARANTE-MENDES, G. P.; GREEN, D. R. The regulation of apoptotic cell death. *Brazilian journal of medical and biological research*, 1999, vol. 32, no 9, p. 1053-1061.

ASOCIACION MEDICA ARGENTINA, *et al.* Consenso nacional Inter-sociedades sobre Melanoma cutáneo. *Rev. Argentina, Cancerol*, 2011, vol. 39, p. 62-85.

AWWAD, Hassan K. Dose survival relationships: Methodology, forms, and interpretations. En *Radiation Oncology: Radiobiological and Physiological Perspectives*. Springer Netherlands, 1990. p. 19-52.

BALART SERRA, Josep, *et al.* Análisis de la radiosensibilidad de las células tumorales pancreáticas humanas y su modulación por 5-fluorouracilo. 2001.

BANERJEE, Taraswi; CHAKRAVARTI, Debabrata. A peek into the complex realm of histone phosphorylation. *Molecular and cellular biology*, 2011, vol. 31, no 24, p. 4858-4873.

BARCKHAUSEN, C., *et al.* Malignant melanoma cells acquire resistance to DNA interstrand cross-linking chemotherapeutics by p53-triggered upregulation of DDB2/XPC-mediated DNA repair. *Oncogene*, 2014, vol. 33, no 15, p. 1964-1974.

BATUS, Marta, *et al.* Optimal management of metastatic melanoma: current strategies and future directions. *American journal of clinical dermatology*, 2013, vol. 14, no 3, p. 179-194.

BELL, Daphne W. Our changing view of the genomic landscape of cancer. *The Journal of pathology*, 2010, vol. 220, no 2, p. 231-243.

BERTOUT, Jessica A.; PATEL, Shetal A.; SIMON, M. Celeste. The impact of O<sub>2</sub> availability on human cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2008, vol. 8, no 12, p. 967-975.

BIAU, J., *et al.* [Dbait: An innovative concept to inhibit DNA repair and treat cancer]. *Bulletin du cancer*, 2016.

BLAGOSKLONNY, Mikhail V. Oncogenic resistance to growth-limiting conditions. *Nature reviews Cancer*, 2002, vol. 2, no 3, p. 221-224.

BOGUNOVIC, Dusan, *et al.* Immune profile and mitotic index of metastatic melanoma lesions enhance clinical staging in predicting patient survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, vol. 106, no 48, p. 20429-20434.

BOYARCHUK, Yekaterina, *et al.* Bub1 is essential for assembly of the functional inner centromere. *The Journal of cell biology*, 2007, vol. 176, no 7, p. 919-928.

BRACALENTE, Candelaria. Evaluación de la histona  $\gamma$ -H2AX como medida de la radiosensibilidad de células deficientes en la reparación del ADN post-irradiación, Tesis de Licenciatura, 2007.

BRACALENTE, Candelaria. Expresión Génica Diferencial en Respuesta a la Modulación de los Niveles de Especies Reactivas de Oxígeno en Células de Melanoma, Tesis Doctoral, 2013, p.146.

BRACALENTE, Candelaria. Expresión Génica Diferencial en Respuesta a la Modulación de los Niveles de Especies Reactivas de Oxígeno en Células de Melanoma, Tesis Doctoral, 2013, p. 32-33.

BRACALENTE, Candelaria. Expresión Génica Diferencial en Respuesta a la Modulación de los Niveles de Especies Reactivas de Oxígeno en Células de Melanoma. Tesis Doctoral, 2013, p. 39-40

BRACALENTE, Candelaria, *et al.* Induction and Persistence of Large  $\gamma$ -H2AX Foci by High Linear Energy Transfer Radiation in DNA-Dependent protein kinase-Deficient Cells. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 2013, vol. 87, no 4, p. 785-794.

BRACALENTE, Candelaria, *et al.* Reprogramming human A375 amelanotic melanoma cells by catalase overexpression: Upregulation of antioxidant genes correlates with regression of

melanoma malignancy and with malignant progression when downregulated. *Oncotarget*, 2016a, en prensa.

BRACALENTE, Candelaria, *et al.* Reprogramming human A375 amelanotic melanoma cells by catalase overexpression: Reversion or promotion of malignancy by inducing melanogenesis or metastasis. *Oncotarget*, 2016b, en prensa.

BRISTOW, R. G.; HARDY, P. A.; HILL, R. P. Comparison between in vitro radiosensitivity and in vivo radioresponse of murine tumor cell lines I: Parameters of in vitro radiosensitivity and endogenous cellular glutathione levels. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 1990, vol. 18, no 1, p. 133-145.

BROUSTAS, Constantinos G.; LIEBERMAN, Howard B. DNA damage response genes and the development of cancer metastasis. *Radiation research*, 2014, vol. 181, no 2, p. 111-130.

BULAT, TANJA, *et al.* Radiation dose determines the method for quantification of DNA double strand breaks. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 2016, no AHEAD, p. 0-0.

CHEESEMAN, Iain M.; DESAI, Arshad. Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2008, vol. 9, no 1, p. 33-46.

CHEESEMAN, Iain M., *et al.* The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore. *Cell*, 2006, vol. 127, no 5, p. 983-997.

CHEN, Rey-Huei. Phosphorylation and activation of Bub1 on unattached chromosomes facilitate the spindle checkpoint. *The EMBO journal*, 2004, vol. 23, no 15, p. 3113-3121.

CHOUDHURY, Ananya, *et al.* MRE11 expression is predictive of cause-specific survival following radical radiotherapy for muscle-invasive bladder cancer. *Cancer research*, 2010, vol. 70, no 18, p. 7017-7026.

CHOWDHURY, Dipanjan, *et al.*  $\gamma$ -H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Molecular cell*, 2005, vol. 20, no 5, p. 801-809.

CHUAIRE-NOACK, Lilian; SÁNCHEZ-CORREDOR, Magda Carolina; RAMÍREZ-CLAVIJO, Sandra. p53 y su papel en el epitelio superficial del ovario. Revisión. *Investigación Clínica*, 2008, vol. 49, no 4.

CLEAVER, James E.  $\gamma$ -H2Ax: Biomarker of damage or functional participant in DNA repair “all that glitters is not gold!” *Photochemistry and photobiology*, 2011, vol. 87, no 6, p. 1230-1239.

COWELL, John K.; HAWTHORN, Lesleyann. The application of microarray technology to the analysis of the cancer genome. *Current molecular medicine*, 2007, vol. 7, no 1, p. 103-120.

CURADO, Maria-Paula, *et al.* *Cancer incidence in five continents, Volume IX*. IARC Press, International Agency for Research on Cancer, 2007.

LANE, David P. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 1992, vol. 358, p. 15-16.

DEACON, J.; PECKHAM, M. J.; STEEL, G. G. The radioresponsiveness of human tumours and the initial slope of the cell survival curve. *Radiotherapy and Oncology*, 1984, vol. 2, no 4, p. 317-323.

DE BOCK, Katrien; MAZZONE, Massimiliano; CARMELIET, Peter. Antiangiogenic therapy, hypoxia, and metastasis: risky liaisons, or not?. *Nature reviews Clinical oncology*, 2011, vol. 8, no 7, p. 393-404.

DESCHAVANNE, Patrick J.; FERTIL, Bernard. A review of human cell radiosensitivity in vitro. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 1996, vol. 34, no 1, p. 251-266.

DESGROSELLIER, Jay S.; CHERESH, David A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Cancer*, 2010, vol. 10, no 1, p. 9-22.

DOWNWARD, Julian. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 2003, vol. 3, no 1, p. 11-22.

DUDA, Dan G., *et al.* CXCL12 (SDF1 $\alpha$ )-CXCR4/CXCR7 pathway inhibition: an emerging sensitizer for anticancer therapies?. *Clinical Cancer Research*, 2011, vol. 17, no 8, p. 2074-2080.

DUMMER, R.; HAUSCHILD, A.; PENTHEROUDAKIS, G. Cutaneous malignant melanoma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 2009, vol. 20, no suppl 4, p. 129-131.



ERICKSON, Carol A.; REEDY, Mark V. Neural crest development: the interplay between morphogenesis and cell differentiation. *Current topics in developmental biology*, 1998, vol. 40, p. 178-211.

FANG, Dong, *et al.* Expression of microtubule-associated protein 2 in benign and malignant melanocytes: implications for differentiation and progression of cutaneous melanoma. *The American journal of pathology*, 2001, vol. 158, no 6, p. 2107-2115.

FERLAY, J.; PARKIN, D. M.; STELIAROVA-FOUCHER, E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *European journal of cancer*, 2010, vol. 46, no 4, p. 765-781.

FERNANDEZ-CAPETILLO, Oscar, *et al.* H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA repair*, 2004, vol. 3, no 8, p. 959-967.

FIDLER, Isaiah J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature Reviews Cancer*, 2003, vol. 3, no 6, p. 453-458.

FORSCHNER, Andrea, *et al.* The role of radiotherapy in the overall treatment of melanoma. *Clinics in dermatology*, 2013, vol. 31, no 3, p. 282-289.

FRIEDL, Peter; WOLF, Katarina. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews Cancer*, 2003, vol. 3, no 5, p. 362-374.

FULDA, Simone. Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer. *International journal of cell biology*, 2010, vol. 2010.

FUNG, Maggie KL, *et al.* MAD2 interacts with DNA repair proteins and negatively regulates DNA damage repair. *Journal of molecular biology*, 2008, vol. 381, no 1, p. 24-34.

GARBER, Peter M.; RINE, Jasper. Overlapping roles of the spindle assembly and DNA damage checkpoints in the cell-cycle response to altered chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 2002, vol. 161, no 2, p. 521-534.

GARRIDO, Federico; CABRERA, Teresa; APTSIAURI, Natalia. "Hard" and "soft" lesions underlying the HLA class I alterations in cancer cells: implications for immunotherapy. *International Journal of Cancer*, 2010, vol. 127, no 2, p. 249-256.

GAVIRIA, J.; NIÑO, C. Melanoma: actualización en su enfoque y tratamiento. *Universitas Médicas*, 2005, vol. 46, p. 82-93.

GeneMANIA [En línea] © University of Toronto 2016. [Consulta 15 nov 2015]  
<www.genemania.org>

GHANEM, Ghanem; FABRICE, Journé. Tyrosinase related protein 1 (TYRP1/gp75) in human cutaneous melanoma. *Molecular oncology*, 2011, vol. 5, no 2, p. 150-155.

GIONO, Luciana E., *et al.* The RNA response to DNA damage. *Journal of Molecular Biology*, 2016.

GLORIEUX, Christophe, *et al.* Catalase overexpression in mammary cancer cells leads to a less aggressive phenotype and an altered response to chemotherapy. *Biochemical pharmacology*, 2011, vol. 82, no 10, p. 1384-1390.

GONZÁLEZ, Ana Dopazo. Micro y nanotecnología en Medicina: Los chips o microarrays de ADN. *Encuentros multidisciplinares*, 2002, vol. 4, no 12, p. 31-38.

GOTTESMAN, Michael M. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annual review of medicine*, 2002, vol. 53, no 1, p. 615-627.

GOTTLIEB, Tanya M.; OREN, Moshe. p53 in growth control and neoplasia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1996, vol. 1287, no 2, p. 77-102.

HALL, E. J. Radiobiology for the radiologist. 1988.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 2011, vol. 144, no 5, p. 646-674.

HANASOGE, Sheela; LJUNGMAN, Mats. H2AX phosphorylation after UV irradiation is triggered by DNA repair intermediates and is mediated by the ATR kinase. *Carcinogenesis*, 2007, vol. 28, no 11, p. 2298-2304.

HARPER, J. Wade; ELLEDGE, Stephen J. The DNA damage response: ten years after. *Molecular cell*, 2007, vol. 28, no 5, p. 739-745.

HASSAN, Mohamed, *et al.* Endoplasmic reticulum stress-mediated pathways to both apoptosis and autophagy: Significance for melanoma treatment. *World journal of experimental medicine*, 2015, vol. 5, no 4, p. 206.

HESS, David A.; ALLAN, Alison L. Migratory strategies of normal and malignant stem cells. *Stem Cell Migration: Methods and Protocols*, 2011, p. 25-44.

HEYLMANN, Daniel; KAINA, Bernd. The  $\gamma$ -H2AX DNA damage assay from a drop of blood. *Scientific reports*, 2016, vol. 6.

HOEK, Keith S., et al. Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature. *Pigment Cell Research*, 2006, vol. 19, no 4, p. 290-302.

HOEK, Keith S. DNA microarray analyses of melanoma gene expression: a decade in the mines. *Pigment Cell Research*, 2007, vol. 20, no 6, p. 466-484.

HOERTER, James D., et al. Does melanoma begin in a melanocyte stem cell? *Journal of skin cancer*, 2012, vol. 2012.

HUANG, Xuan, et al. Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis. *Cell proliferation*, 2005, vol. 38, no 4, p. 223-243.

HYOUDOU, Kenji, et al. Prevention of pulmonary metastasis from subcutaneous tumors by binary system-based sustained delivery of catalase. *Journal of Controlled Release*, 2009, vol. 137, no 2, p. 110-115.

IBAÑEZ, Irene L., et al. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging inhibits G1/S transition by increasing nuclear levels of p27 KIP1. *Cancer letters*, 2011.

IBAÑEZ, Irene L., et al. Induction and rejoining of DNA double strand breaks assessed by H2AX phosphorylation in melanoma cells irradiated with proton and lithium beams. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 2009, vol. 74, no 4, p. 1226-1235.

ISMAIL, Ismail Hassan; WADHRA, Tabasum Imran; HAMMARSTEN, Ola. An optimized method for detecting  $\gamma$ -H2AX in blood cells reveals a significant interindividual variation in the  $\gamma$ -H2AX response among humans. *Nucleic acids research*, 2007, vol. 35, no 5, p. e36.

IVANOV, Vladimir N.; HEI, Tom K. Regulation of viability, differentiation and death of human melanoma cells carrying neural stem cell biomarkers: a possibility for neural trans-differentiation. *Apoptosis*, 2015, vol. 20, no 7, p. 996-1015.

JABLONSKI, S. A., et al. The hBUB1 and hBUBR1 kinases sequentially assemble onto kinetochores during prophase with hBUBR1 concentrating at the kinetochore plates in mitosis. *Chromosoma*, 1998, vol. 107, no 6-7, p. 386-396.

JACKSON, Stephen P.; BARTEK, Jiri. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 2009, vol. 461, no 7267, p. 1071-1078.

JAEGER, Jochen, et al. Gene expression signatures for tumor progression, tumor subtype, and tumor thickness in laser-microdissected melanoma tissues. *Clinical cancer research*, 2007, vol. 13, no 3, p. 806-815.

JEFFS, Aaron R., et al. A gene expression signature of invasive potential in metastatic melanoma cells. *PLoS One*, 2009, vol. 4, no 12, p. e8461.

JEMAL, Ahmedin, et al. Cancer statistics, 2008. *CA: a cancer journal for clinicians*, 2008, vol. 58, no 2, p. 71-96.

JOHN, Thomas, et al. Predicting clinical outcome through molecular profiling in stage III melanoma. *Clinical Cancer Research*, 2008, vol. 14, no 16, p. 5173-5180.

KARGIOTIS, Odysseas, et al. Effects of irradiation on tumor cell survival, invasion and angiogenesis. *Journal of neuro-oncology*, 2010, vol. 100, no 3, p. 323-338.

KASTAN, Michael B., et al. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell*, 1992, vol. 71, no 4, p. 587-597.

KASTAN, Michael B., et al. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer research*, 1991, vol. 51, no 23 Part 1, p. 6304-6311.

KAWAMOTO, Hisanori; KOIZUMI, Hirotaka; UCHIKOSHI, Toshiyuki. Expression of the G2-M checkpoint regulators cyclin B1 and cdc2 in nonmalignant and malignant human breast lesions: immunocytochemical and quantitative image analyses. *The American journal of pathology*, 1997, vol. 150, no 1, p. 15.

KHANNA, Kum Kum; JACKSON, Stephen P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature genetics*, 2001, vol. 27, no 3, p. 247-254.

KHOSRAVI SHAHI, P.; PÉREZ MANGA, G. La aplicación de la tecnología de los Microarrays en la Oncología clínica. En *Anales de Medicina Interna*. Arán Ediciones, SL, 2006. p. 255-256.

KINNER, Andrea, et al.  $\gamma$ -H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic acids research*, 2008, vol. 36, no 17, p. 5678-5694.

KIM, Lori C.; SONG, Lanxi; HAURA, Eric B. Src kinases as therapeutic targets for cancer. *Nature reviews Clinical oncology*, 2009, vol. 6, no 10, p. 587-595.

KOIKE, Manabu, *et al.* Growth inhibition of SV40-transformed human keratinocytes by TGF- $\beta$ s is not linked to dephosphorylation of the Rb gene product. *Biochemical and biophysical research communications*, 1994, vol. 201, no 2, p. 673-681.

LAMARCHE, Brandon J.; ORAZIO, Nicole I.; WEITZMAN, Matthew D. The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance. *FEBS letters*, 2010, vol. 584, no 17, p. 3682-3695.

LEE, Mong-Hong; LOZANO, Guillermina. Regulation of the p53-MDM2 pathway by 14-3-3  $\sigma$  and other proteins. En *Seminars in cancer biology*. Academic Press, 2006. p. 225-234.

LEE, Ji-Hoon, *et al.* 53BP1 promotes ATM activity through direct interactions with the MRN complex. *The EMBO journal*, 2010, vol. 29, no 3, p. 574-585.

LEONG, Stanley PL. Selective sentinel lymphadenectomy for malignant melanoma. *Surgical Clinics of North America*, 2003, vol. 83, no 1, p. 157-185.

LI, Peng, *et al.* Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 1997, vol. 91, no 4, p. 479-489.

LODYGIN, Dimitri; DIEBOLD, Joachim; HERMEKING, Heiko. Prostate cancer is characterized by epigenetic silencing of 14-3-3 $\sigma$  expression. *Oncogene*, 2004, vol. 23, no 56, p. 9034-9041.

LOMANTO DÍAZ, Leonardo David, *et al.* El ciclo celular. *MedUNAB*, 2003, vol. 6, no 16, p. 21-29.

LORIA, Dora I.; GONZÁLEZ, Abel; LATORRE, Clara. Epidemiología del melanoma cutáneo en Argentina: análisis del Registro Argentino de Melanoma Cutáneo. *Dermatología Argentina*, 2010, vol. 16, no 1, p. 39-45.

LOU, Zhenkun; CHEN, Junjie. Cellular senescence and DNA repair. *Experimental cell research*, 2006, vol. 312, no 14, p. 2641-2646.

MAIRA, Sauveur-Michel, *et al.* PI3K inhibitors for cancer treatment: where do we stand?. *Biochemical Society Transactions*, 2009, vol. 37, no 1, p. 265-272.

MANDRUZZATO, Susanna, et al. A gene expression signature associated with survival in metastatic melanoma. *J Transl Med*, 2006, vol. 4, no 1, p. 50.

MARKS, Paul A., et al. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nature Reviews Cancer*, 2001, vol. 1, no 3, p. 194-202.

MARTÍNEZ PASTOR, Bárbara. Estudio del impacto de la estructura de la cromatina en la respuesta a daño en el ADN. 2010.

MASHAL, Robert D., et al. Expression of cell cycle-regulated proteins in prostate cancer. *Cancer research*, 1996, vol. 56, no 18, p. 4159-4163.

MAVROU, Ariadni, et al. The ATM gene and ataxia telangiectasia. *Anticancer research*, 2008, vol. 28, no 1B, p. 401-405.

MCKINNON, Peter J. ATM and ataxia telangiectasia. *EMBO reports*, 2004, vol. 5, no 8, p. 772-776.

MEADS, Mark B.; GATENBY, Robert A.; DALTON, William S. Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nature Reviews Cancer*, 2009, vol. 9, no 9, p. 665-674.

MIKHAILOV, Alexei; COLE, Richard W.; RIEDER, Conly L. DNA damage during mitosis in human cells delays the metaphase/anaphase transition via the spindle-assembly checkpoint. *Current Biology*, 2002, vol. 12, no 21, p. 1797-1806.

MOMENI, Hamid Reza. Role of calpain in apoptosis. *Cell J*, 2011, vol. 13, no 2, p. 65-72.

MUMBREKAR, Kamallesh Dattaram, et al. Polymorphisms in Double Strand Break Repair Related Genes Influence Radiosensitivity Phenotype in Lymphocytes from Healthy Individuals. *DNA Repair*, 2016.

MUNSHI, Anupama, et al. Inhibition of constitutively activated nuclear factor- $\kappa$ B radiosensitizes human melanoma cells. *Molecular cancer therapeutics*, 2004, vol. 3, no 8, p. 985-992.

NASHMYT, K. Putting the cell cycle in order. *Science*, 1996, vol. 277, p. 2854-80.

NASMYTH, Kim. How do so few control so many?. *Cell*, 2005, vol. 120, no 6, p. 739-746.

NG, Wayne Tiong Weng, et al. Molecular interactions of polo-like kinase 1 in human cancers. *Journal of clinical pathology*, 2016, p. jclinpath-2016-203656.

NISHIKAWA, Makiya; HASHIDA, Mitsuru. Inhibition of tumour metastasis by targeted delivery of antioxidant enzymes. *Expert opinion on drug delivery*, 2006, vol. 3, no 3, p. 355-369.

OBA, Junna, et al. CD10-Equipped Melanoma Cells Acquire Highly Potent Tumorigenic Activity: A Plausible Explanation of Their Significance for a Poor Prognosis. *PLoS one*, 2016, vol. 11, no 2, p. e0149285.

POLO, Sophie E.; JACKSON, Stephen P. Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes & development*, 2011, vol. 25, no 5, p. 409-433.

PORRAS, Almudena; MARZO, Isabel. SEBBM DIVULGACION LA CIENCIA AL ALCANCE DE LA MANO. 2010.

QUAN, L., et al. Identification of potential therapeutic targets for melanoma using gene expression analysis. *Neoplasma*, 2015, vol. 62, no 5, p. 733.

QVARNSTRÖM, Olov Fredrik, et al. DNA double strand break quantification in skin biopsies. *Radiotherapy and oncology*, 2004, vol. 72, no 3, p. 311-317.

RAMÍREZ, Jorge, et al. Microarreglos de DNA. *Mensaje Bioquímico, Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México*, 2003, vol. 27.

RASTRELLI, Marco, et al. Melanoma m1: diagnosis and therapy. *in vivo*, 2014, vol. 28, no 3, p. 273-285.

RIKER, Adam I., et al. The gene expression profiles of primary and metastatic melanoma yields a transition point of tumor progression and metastasis. *BMC medical genomics*, 2008, vol. 1, no 1, p. 1.

RILEY, Patrick A. Melanogenesis and melanoma. *Pigment cell research*, 2003, vol. 16, no 5, p. 548-552.

ROBERT, Caroline, et al. Metastatic melanoma: New paradigms of treatment and new toxicities. *European Journal of Cancer Supplements*, 2013, vol. 11, no 2, p. 278-280.

ROGAKOU, Emmy P., *et al.* Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, vol. 275, no 13, p. 9390-9395.

ROGAKOU, Emmy P., *et al.* Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *The Journal of cell biology*, 1999, vol. 146, no 5, p. 905-916.

ROTHKAMM, Kai; LÖBRICH, Markus. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, vol. 100, no 9, p. 5057-5062.

ROTTER, V., *et al.* Does wild-type p53 play a role in normal cell differentiation?. En *Seminars in cancer biology*. 1994. p. 229-236.

RUIZ DE ALMODOVAR, JM, Nuñez MI, McMillan TJ. Inicial radiation-induced DNA damage un human tumour cell lines: a correlation with intrinsic cellular radiosensitivity. *Br J Cancer*, 1994, vo 69, p. 457-462.

SALADI, Srinivas V., *et al.* BRG1 promotes survival of UV-irradiated melanoma cells by cooperating with MITF to activate the melanoma inhibitor of apoptosis gene. *Pigment cell & melanoma research*, 2013, vol. 26, no 3, p. 377-391.

SANCAR, Aziz, *et al.* Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual review of biochemistry*, 2004, vol. 73, no 1, p. 39-85.

SANTISKULVONG, Chintda, *et al.* Dual targeting of phosphoinositide 3-kinase and mammalian target of rapamycin using NVP-BEZ235 as a novel therapeutic approach in human ovarian carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 2011, vol. 17, no 8, p. 2373-2384.

SCHRAMM, Sarah-Jane, *et al.* Review and cross-validation of gene expression signatures and melanoma prognosis. *Journal of Investigative Dermatology*, 2012, vol. 132, no 2, p. 274-283.

SCHRAMM, Sarah-Jane; MANN, Graham J. Melanoma prognosis: a REMARK-based systematic review and bioinformatic analysis of immunohistochemical and gene microarray studies. *Molecular cancer therapeutics*, 2011, vol. 10, no 8, p. 1520-1528.



SILVA, Augusto, *et al.* Estructura, regulación y funciones del gen supresor de tumores p53. En V Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. Coganat-2002.

SIMÃO, Éder Maiquel, *et al.* Induced genome maintenance pathways in pre-cancer tissues describe an anti-cancer barrier in tumor development. *Molecular BioSystems*, 2012, vol. 8, no 11, p. 3003-3009.

SINGER, Katrin, *et al.* Suppression of T-cell responses by tumor metabolites. *Cancer immunology, immunotherapy*, 2011, vol. 60, no 3, p. 425-431.

SMALLEY, Keiran SM. Understanding melanoma signaling networks as the basis for molecular targeted therapy. *Journal of Investigative Dermatology*, 2010, vol. 130, no 1, p. 28-37.

SMITH, Amanda Pfaff; HOEK, Keith; BECKER, Dorothea. Whole-genome expression profiling of the melanoma progression pathway reveals marked molecular differences between nevi/melanoma in situ and advanced-stage melanomas. *Cancer biology & therapy*, 2005, vol. 4, no 9, p. 1018-1029.

SMITH, Martin L., *et al.* Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of uv-type DNA damage. *Oncogene*, 1995, vol. 10, no 6, p. 1053-1059.

SÖDERLUND, Karin, *et al.* Intact Mre11/Rad50/Nbs1 complex predicts good response to radiotherapy in early breast cancer. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 2007, vol. 68, no 1, p. 50-58.

SORTINO-RACHOU, Ana Maria; CURADO, Maria Paula; CANCELA, Marianna de Camargo. Cutaneous melanoma in Latin America: a population-based descriptive study. *Cadernos de Saúde Pública*, 2011, vol. 27, no 3, p. 565-572.

SPANO, Daniela, *et al.* Molecular networks that regulate cancer metastasis. En *Seminars in cancer biology*. Academic Press, 2012. p. 234-249.

SPOERRI, Loredana, *et al.* A novel ATM-dependent checkpoint defect distinct from loss of function mutation promotes genomic instability in melanoma. *Pigment cell & melanoma research*, 2016.

STEEL, G. Gordon; PEACOCK, John H. Why are some human tumours more radiosensitive than others? *Radiotherapy and Oncology*, 1989, vol. 15, no 1, p. 63-72.

STEEL, G. G. Clonogenic cells and the concept of cell survival. *Basic clinical radiobiology*, 1993, vol. 2, p. 28-39.

SVETLOVA, Maria, *et al.* Elimination of radiation-induced  $\gamma$ -H2AX foci in mammalian nucleus can occur by histone exchange. *Biochemical and biophysical research communications*, 2007, vol. 358, no 2, p. 650-654.

TALANTOV, Dmitri, *et al.* Novel genes associated with malignant melanoma but not benign melanocytic lesions. *Clinical Cancer Research*, 2005, vol. 11, no 20, p. 7234-7242.

TAYLOR, A. M. R.; GROOM, A.; BYRD, P. J. Ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD)—its clinical presentation and molecular basis. *DNA repair*, 2004, vol. 3, no 8, p. 1219-1225.

TENTORI, Lucio; LACAL, Pedro Miguel; GRAZIANI, Grazia. Challenging resistance mechanisms to therapies for metastatic melanoma. *Trends in pharmacological sciences*, 2013, vol. 34, no 12, p. 656-666.

TEO, M. T. W., *et al.* Next-generation sequencing identifies germline MRE11A variants as markers of radiotherapy outcomes in muscle-invasive bladder cancer. *Annals of oncology*, 2014, vol. 25, no 4, p. 877-883.

TUBIANA, Maurice. *et al.* Introduction to Radiobiology 1990. p. 1-22 ISBN 0-203-98366-1.

UCHIDA, D., *et al.* Frequent downregulation of 14-3-3  $\sigma$  protein and hypermethylation of 14-3-3  $\sigma$  gene in salivary gland adenoid cystic carcinoma. *British journal of cancer*, 2004, vol. 91, no 6, p. 1131-1138.

UONG, Audrey; ZON, Leonard I. Melanocytes in development and cancer. *Journal of cellular physiology*, 2010, vol. 222, no 1, p. 38-41.

UTRERA, René, *et al.* A novel p53-inducible gene coding for a microtubule-localized protein with G2-phase-specific expression. *The EMBO journal*, 1998, vol. 17, no 17, p. 5015-5025.

VAN'T VEER, L. J., et al. van der Kooy K., MJ Marton, AT Witteveen, GJ Schreiber, RM Kerkhoven, C. Roberts, PS Linsley, R. Bernards, and SH Friend. *Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. Nature*, 2002, vol. 415, p. 530-536.

VERMEULEN, Katrien; VAN BOCKSTAELE, Dirk R.; BERNEMAN, Zwi N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation*, 2003, vol. 36, no 3, p. 131-149.

WANG, Aijin, et al. Overexpression of cyclin B1 in human colorectal cancers. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 1997, vol. 123, no 2, p. 124-127.

WANG, Weigang, et al. Identification and testing of a gene expression signature of invasive carcinoma cells within primary mammary tumors. *Cancer research*, 2004, vol. 64, no 23, p. 8585-8594.

WANG, Xin Wei, et al. GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, vol. 96, no 7, p. 3706-3711.

WANG, Bin, et al. 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science*, 2002, vol. 298, no 5597, p. 1435-1438.

WANG, Li, et al. Cell cycle gene networks are associated with melanoma prognosis. *PloS one*, 2012, vol. 7, no 4, p. e34247.

WANG, Fengling, et al. Quantitative proteomic analysis for radiation-induced cell cycle suspension in 92-1 melanoma cell line. *Journal of radiation research*, 2013, p. rrt010.

WANG, Xin Wei, et al. p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity. *Nature genetics*, 1995, vol. 10, no 2, p. 188-195.

WARD, Irene M.; CHEN, Junjie. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, vol. 276, no 51, p. 47759-47762.

WARREN, Cheryl D., et al. Distinct chromosome segregation roles for spindle checkpoint proteins. *Molecular biology of the cell*, 2002, vol. 13, no 9, p. 3029-3041.

WEST, CML; HENDRY, J. H. Intrinsic radiosensitivity as a predictor of patient response to radiotherapy. *British journal of radiology*, 1992, p. 146-152.

WINNEPENNINCKX, Véronique, et al. Gene expression profiling of primary cutaneous melanoma and clinical outcome. *Journal of the National Cancer Institute*, 2006, vol. 98, no 7, p. 472-482.

WYCKOFF, Jeffrey, et al. A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer research*, 2004, vol. 64, no 19, p. 7022-7029.

YAMAGUCHI, Hideki; WYCKOFF, Jeffrey; CONDEELIS, John. Cell migration in tumors. *Current opinion in cell biology*, 2005, vol. 17, no 5, p. 559-564.

YANG, Huan, et al. MicroRNA-138 regulates DNA damage response in small cell lung cancer cells by directly targeting H2AX. *Cancer investigation*, 2015, vol. 33, no 4, p. 126-136.

YAP, Jeremy L., et al. Small-Molecule Inhibitors of the ERK Signaling Pathway: Towards Novel Anticancer Therapeutics. *ChemMedChem*, 2011, vol. 6, no 1, p. 38-48.

YILMAZ, Mahmut; CHRISTOFORI, Gerhard. Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Molecular Cancer Research*, 2010, vol. 8, no 5, p. 629-642.

ZGHEIB, Omar, et al. ATM signaling and 53BP1. *Radiotherapy and Oncology*, 2005, vol. 76, no 2, p. 119-122.

ZHANG, Yadong, et al. Nucleolin links to arsenic-induced stabilization of GADD45 $\alpha$  mRNA. *Nucleic Acids Research*, 2006, vol. 34, no 2, p. 485-495.

## 8. Anexo

### *Problemas Técnicos*

Entre los Objetivos de este trabajo se planteó evaluar la inducción de apoptosis en el modelo en estudio luego de la irradiación gamma. La técnica principal propuesta se basa en la determinación de proteínas como caspasa 3 activa y PARP mediante *western blot*. Lamentablemente, estos ensayos no pudieron ser finalizados debido a una baja capacidad de detección del anticuerpo secundario correspondiente y a la demora en la entrega del nuevo anticuerpo secundario comprado. De todas formas, se espera poder realizar a futuro estos experimentos para así confirmar los resultados obtenidos por el análisis bioinformático de los *microarrays* de expresión presentados en la sección 5. En base a estos resultados *in silico* se espera observar niveles bajos de caspasa 3 activa y la ausencia del clivaje de PARP en las células G10 a nivel basal y en respuesta a la radiación gamma en comparación con el control PCDNA3 y las células A7. Otro ensayo que permitiría estudiar los niveles de apoptosis así como el ciclo celular en este modelo en respuesta a radiación gamma es la tinción con yoduro de propidio de ADN y evaluarlo mediante citometría de flujo. De esta manera, se observaría en sub-G0 mayor contenido de ADN en las células que presentaran apoptosis en respuesta a la radiación, previendo menores niveles en las células G10 en comparación con el control PCDNA3 y las células A7, dado que el clon G10 presentó la sub-expresión de genes clave en la vía de apoptosis. Estos ensayos se empezaron a realizar y se espera contar con resultados próximamente que permitan explicar la mayor radiorresistencia observada en las células metastásicas G10 no sólo en función de la alteración de la vía de respuesta al daño al ADN sino también en función de la de apoptosis.