

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Máster en Biomedicina

2023/2024

Consecuencias para la progenie celular tras sufrir
roturas de la doble hebra de ADN durante las
últimas etapas de la mitosis

Sergio Pérez Herrera

Tutora: Dra. Veronique A. J. Smits

Cotutor: Dr. Jessel Ayra Plasencia

Unidad de Investigación

Hospital Universitario de Canarias

Dra Veronique A.J. Smits, coordinador del Grupo de Investigación “Checkpoint en respuesta a daño en el DNA y enfermedades humanas”, y Dr Jessel Ayra Plasencia, adscritos a la Titulación Máster en Biomedicina por la ULL

CERTIFICAN

- Que el Trabajo Fin de Máster (TFM) titulado “Consecuencias para la progenie celular tras sufrir roturas de la doble hebra de ADN durante las últimas etapas de la mitosis” ha sido realizado bajo nuestra supervisión por D Sergio Pérez Herrera, matriculado en el Máster en Biomedicina, durante el curso académico 2023/2024.
- Que una vez revisada la memoria final del TFM, damos nuestro consentimiento para ser presentado a la evaluación (lectura y defensa) por el Tribunal designado por la Comisión Académica de la Titulación.
- Que se ha indicado expresamente, a través del mecanismo de entrega de la memoria TFM por sede electrónica ULL, el deseo de hacer público o no los resultados del TFM.

Para que conste, se firma el presente certificado en La Laguna a 5 de julio de 2024

SMITS
VERONIQUE
ADELA JOHANNA
- X8753642A

Firmado digitalmente
por SMITS VERONIQUE
ADELA JOHANNA -
X8753642A
Fecha: 2024.07.05
22:50:04 +01'00'

Dra Veronique A.J. Smits



Dr Jessel Ayra Plasencia

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
1. ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 Lesiones en el ADN e inestabilidad genómica	3
2.2 Roturas de la doble hebra de ADN: Señalización y vías de reparación	4
2.2.1 Mecanismos de reparación de DSBs: Interfase	6
2.2.2 Mecanismos de reparación de DSBs: Mitosis	7
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	8
4. MATERIAL Y MÉTODOS	9
4. 1 Líneas celulares	9
4.2 Tratamientos.....	9
4.2.1 Sincronización celular.....	9
4.3 Extracción de proteínas	10
4.3.1 Obtención de los extractos totales celulares	10
4.3.2 Determinación de la concentración de proteínas	11
4.4 Western blot	12
4.4.1 Preparación de muestras	12
4.4.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	12
4.4.3 Transferencia a membrana de nitrocelulosa	14
4.4.4 Inmunodetección de proteínas	14

4.4.5 Análisis de resultados	15
4.5 Ensayos clonogénicos de supervivencia celular	16
4.5.1 Formación de colonias	16
4.5.2 Tinción de colonias	16
4.5.3 Análisis de resultados	16
4.6 Análisis del ciclo celular por citometría de flujo	17
4.6.1 Fijación de células.....	17
4.6.2 Preparación de muestras para citometría de flujo	17
4.6.3 Análisis de resultados	17
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
5.1 Consecuencias para la supervivencia celular tras la generación de DSBs.....	18
5.2 Ejecución de checkpoints.....	19
5.2.1 Análisis de expresión de las quinasas del checkpoint	20
5.2.2 Determinación de la activación de Chk1	22
5.2.3 Análisis de expresión de la proteína mediadora RNF8	23
5.2.4 Análisis de expresión de la proteína efectora Rad51	24
5.2.5 Activación de vías apoptóticas	26
5.3 Análisis del ciclo celular después de irradiación	27
6. CONCLUSIONES.....	30
7. BIBLIOGRAFÍA.....	31

1. RESUMEN

La integridad del ADN es crucial para la supervivencia celular, pero está constantemente en riesgo por factores externos e internos que causan diversas lesiones. Las roturas de doble hebra (DSBs) son las más graves y mutagénicas. Para enfrentarlas, las células usan principalmente dos mecanismos: la unión de extremos no homólogos (NHEJ), rápida pero propensa a errores, y la recombinación homóloga (HR), que es más precisa, porque emplea la cadena hermana como molde de reparación. La elección del método de reparación depende principalmente de la fase del ciclo celular en la que se produce el DSB, predominando NHEJ en G1 y HR en las fases S y G2. Sin embargo, existen desavenencias en cuanto a la reparación empleada durante mitosis. Mientras algunos estudios determinan que la respuesta canónica se encuentra inhibida, otros han demostrado que las células ejecutan mecanismos de reparación alternativos, como la unión de extremos mediada por microhomología. En este estudio se ha analizado la respuesta al daño en el ADN comparando las diferentes fases del ciclo celular, hallándose que en mitosis tardía la viabilidad celular a largo plazo disminuye. Luego, se observó que en las células supervivientes hay una respuesta inicial de daño al ADN, debido al aumento en la expresión de Chk1 y RNF8. Posteriormente, se caracterizó que estos daños estimulan la apoptosis intrínseca en gran medida. Por último se determinó que los DSBs en mitosis tardía interrumpen el ciclo celular en la G1 siguiente durante 3-7 horas.

Palabras clave: DSBs, checkpoint, radiosensibilidad, ciclo celular, reparación de ADN, mitosis tardía, NHEJ, HR, apoptosis.

1. ABSTRACT

DNA integrity is crucial for cell survival, but it is constantly at risk from external and internal factors that cause various lesions. DNA double-strand breaks (DSBs) are the most severe and mutagenic. To repair these, cells mainly use two mechanisms: non-homologous end joining (NHEJ), which is fast but error-prone, and homologous recombination (HR), which is more precise, as it uses the sister strand as a repair template. The choice of repair method mainly depends on the phase of the cell cycle in which the DSB occurs, with NHEJ predominating in G1 and HR in S and G2 phases. However, there is disagreement as to the DSB repair mechanism used during mitosis. While some studies determine that the canonical response is inhibited, others have shown that cells execute alternative repair mechanisms, such as microhomology-mediated end joining. In this study, we analysed the response to DNA damage by comparing different phases of the cell cycle, finding that for late mitosis, the long-term cell viability is lower than in other phases. We observed an initial DNA damage response in the survival cells, with increased expression of Chk1 and RNF8. Later, we showed that this damage leads to intrinsic apoptosis to a large extent. Finally, we determined that DSBs in late mitosis interrupt the cell cycle at the next G1 for 3-7 hours.

Keywords: DSBs, checkpoint, radiosensitivity, cell cycle, DNA repair, late mitosis, NHEJ, HR, apoptosis.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Lesiones en el ADN e inestabilidad genómica

La supervivencia celular depende en gran medida de mantener de forma correcta la integridad del ADN. Esta se encuentra expuesta a multitud de factores como la radiación ultravioleta solar o varios productos tóxicos del metabolismo que llevan a la aparición de diversas lesiones en la estructura de la molécula (Xu, et al. 2020).

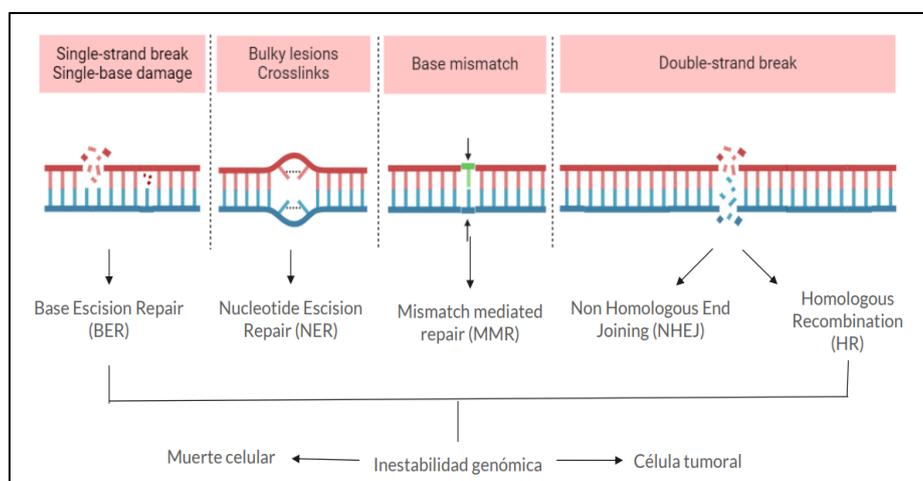


Figura 1: Lesiones en el ADN, mecanismos de reparación asociados y posibles consecuencias de la acumulación de estas lesiones. (Generado por BioRender.com)

Entre estas lesiones pueden aparecer apareamientos entre bases nitrogenadas incorrectos, estructuras anómalas producto de enlaces covalentes intracatenarios, roturas de cadena sencilla (SSBs, del inglés single-strand breaks) o roturas de la doble hebra (DSBs, del inglés double-strand breaks) del ADN (Timmins et al., 2023). La célula ha desarrollado numerosos mecanismos altamente especializados para detectar, señalar y reparar las lesiones (**Figura 1**). Además tienen la capacidad de detener la progresión del ciclo celular de manera transitoria, evitando transmitir los daños a las células hijas. Esta vía de señalización se denomina la respuesta al daño en el ADN (DDR del inglés DNA damage response) (Carusillo et al., 2020).

La DDR es altamente eficiente, aunque no está exenta de riesgos. Puede darse el caso de que las lesiones no sean reparadas, dando lugar a la aparición de inestabilidad genómica o, en última instancia, a la muerte de la célula. Si las lesiones provocan reordenamientos cromosómicos, las células pueden sufrir mutaciones que pueden promover la transformación y en consecuencia iniciar carcinogénesis (**Figura 1**). Por ello, resulta fundamental que la ejecución temporal de la DDR sea precisa (Hopkins et al., 2022).

Por otro lado, los agentes que dañan el ADN también se utilizan en el tratamiento del cáncer, por ejemplo generando roturas durante la replicación del ADN o usando la radioterapia (Nambiar et al., 2023). Así que es esencial conocer cómo se enfrentan las células al daño en el ADN.

2.2 Roturas de la doble hebra de ADN: Señalización y vías de reparación

Los DSBs se consideran el tipo de daño más deletéreo para la célula. Durante el inicio de la DDR, estos daños se reconocen por el complejo MRE11-RAD50-NBS1 (MRN). Tras ello, se activan las quinasas ATM y ATR. Su principal función es la de fosforilar una serie de proteínas clave para la ejecución de la DDR (checkpoints). Entre ellas, destaca la fosforilación de H2AX (γ H2AX), que se fosforila en la serina 139 y rápidamente se extiende en regiones adyacentes a la rotura (Blackford et al., 2020). ATR y ATM también promueven la fosforilación de las quinasas Chk1 (serina 345) y Chk2 (treonina68), respectivamente. Ambas favorecen la correcta detención del ciclo celular para permitir que se lleve a cabo la reparación (Shibata et al., 2021 y Smits et al., 2015). Entre otros sustratos además se encuentra MDC1. Después de su fosforilación, este iniciador organiza la respuesta de reparación interaccionando con la ubiquitina ligasa E3 RNF8, y promueve una cascada de ubiquitinación que estimula la elección de la vía de reparación (Nakada et al., 2016).

La mayoría de los mecanismos de reparación se clasifican en dos grupos, conocidos como la Unión de Extremos No Homólogos (NHEJ, del inglés Non-Homologous End Joining), y la Recombinación Homóloga (HR, del inglés Homologous Recombination). El primero da continuidad física a la hebra de ADN tras procesar brevemente y ligar los extremos rotos. Se considera propensa a errores, pues podría generar pequeñas inserciones, deleciones o mutaciones puntuales (Chang et al., 2017).

Este comienza con el reconocimiento y la unión a la región dañada del heterodímero Ku70-Ku80 que actúa de andamiaje para reclutar la maquinaria implicada en este proceso (Chang et al., 2017). Primero, la subunidad Ku70 se ancla la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de ADN (DNA-PKcs) formando el complejo DNA-PKs. Si las roturas han generado extremos incompatibles con el ligamiento, se promueve la actuación de nucleasas y polimerasas, para procesarlos ligeramente. Finalmente se da el ligamiento de los extremos a través de la ADN ligasa IV (Chang et al., 2017) (**Figura 2**).

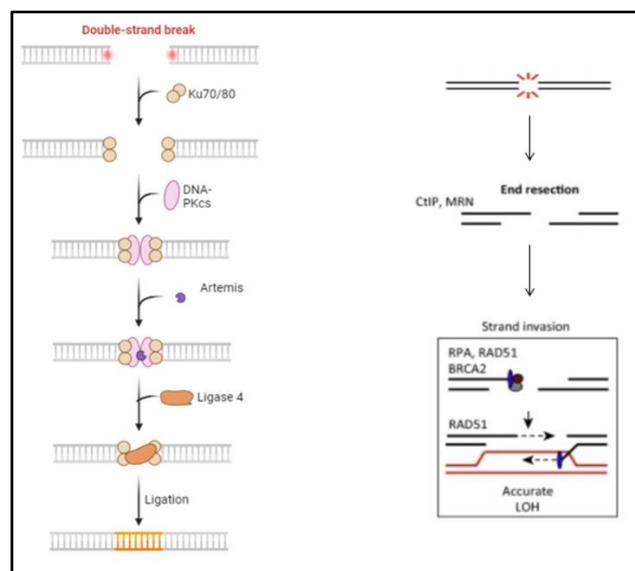


Figura 2: Mecanismos de reparación de DSBs: Reparación vía NHEJ (izquierda) y vía HR (derecha).
(Modificado de Ceccaldi et al., (2016) y BioRender.com)

Por otro lado, la HR se considera un conjunto de mecanismos libre de errores. Los extremos dañados son profundamente procesados, y la reparación tiene lugar tras buscar homología en una hebra intacta para copiar la secuencia (Li et al., 2008).

Esta da inicio con una resección de uno de los extremos rotos por medio del complejo MRN y la nucleasa CtIP, generando extremos 3' de cadena sencilla (ssADN, ss del inglés single-stranded). Una vez realizada la resección, el complejo RPA se recluta hacia las porciones de ssDNA con el fin de protegerlas de la degradación mediada por endonucleasas. Además, RPA sirve de andamiaje para reclutar a la recombinasa Rad51,

que se encarga de buscar homología y promover la invasión de la cromátida hermana para reparar (**Figura 2**) (Ceccaldi et al., 2016).

Además de estos dos mecanismos, la célula es capaz de ejecutar diferentes vías de reparación adicionales. Estas son conocidas como mecanismos de reparación no canónicos. Entre ellos se encuentra una vía de reparación denominada MMEJ (del inglés Microhomology-Mediated End Joining) caracterizada por la aparición de una resección de los extremos rotos, además de pequeñas regiones de microhomología en las regiones 3' protuberantes. El ligamiento se da por estas regiones de homología eliminando pequeños fragmentos, lo que hace que este mecanismo sea mutagénico (Howard et al., 2015).

2.2.1 Mecanismos de reparación de DSBs: Interfase

La elección de la vía de reparación se encuentra regulada por diversos factores. Entre ellos destacan, la presencia de una cromátida hermana sobre la que copiar la región dañada, las modificaciones postraduccionales de la cromatina y diversas proteínas, y el entorno bioquímico de la célula presente en el momento de la rotura. Todo ello a su vez se encuentra regulado por el ciclo celular, que se divide en cuatro fases bien diferenciadas. Mientras que G1, S, y G2 comprenden la interfase celular (periodo en el que se produce el crecimiento y la replicación del material genético), la fase M corresponde con la división. El paso a través de las diferentes fases del ciclo celular dependerá en gran medida de los niveles de las ciclinas y la actividad de las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) (**Figura 3**) (Brown et al., 2018).

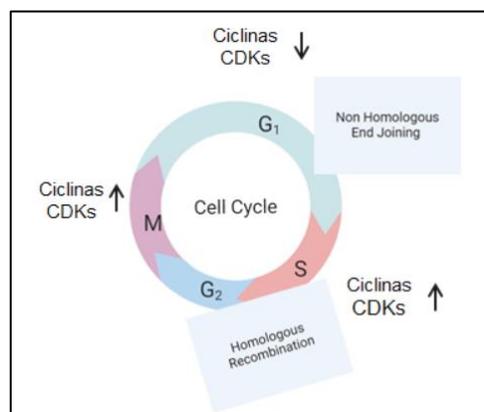


Figura 3: Relación de ciclinas/actividad CDKs en la progresión del ciclo celular y el mecanismo de reparación de ADN asociado a cada fase. (Generado por BioRender.com)

En interfase, los DSBs generados durante la fase G1 y S temprana, donde no existe una cromátida molde y los niveles de ciclinas, así como de las actividades de CDKs son inferiores, se reparan principalmente vía NHEJ. A medida que los niveles de estos reguladores aumentan, la célula entra en la fase S. Finalmente, durante las fases S tardía y G2, donde ya hay existencia de cromátida hermana y la actividad de las CDKs es superior, se estimula la reparación vía HR (Swift et al., 2021).

2.2.2 Mecanismos de reparación de DSBs: Mitosis

A diferencia de lo que sucede durante la interfase celular, los mecanismos de reparación de DSBs generados durante la mitosis no están estrictamente definidos. La bibliografía relativa al campo es diversa y presenta multitud de resultados contradictorios.

Por un lado, existe una corriente que establece la mitosis como fase donde se inhibe la reparación. Una vez producidas y señalizadas las roturas, se mantienen intactas hasta que las células entran en la siguiente G1 y reparan a través de la NHEJ (Giunta et al., 2010 y Bakhoum et al., 2017). Sin embargo, estas lesiones sí son reconocidas por la DDR, que resulta en la fosforilación de H2AX durante mitosis. Esto permite que las hebras dañadas segreguen juntas para ser reparadas por las células hijas (Blackford et al., 2020 y van Vugt et al., 2023). No obstante, recientemente se ha demostrado que al menos en mitosis temprana se puede ejecutar la MMEJ. Es importante destacar que se detectaron la presencia de la polimerasa Polθ y otros participantes de esta vía en las regiones dañadas (**Figura 4**) (Gelot et al., 2023 y Brambati et al., 2023).

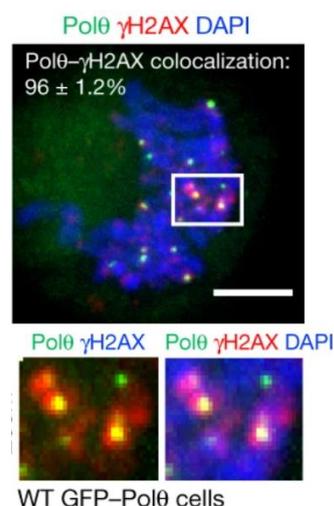


Figura 4: Colocalización de la polimerasa Polθ y la histona fosforilada γ H2AX en células que han sufrido DSBs durante la mitosis (Gelot et al., 2023).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La gran mayoría de estudios se ha centrado en determinar cómo se reparan estos DSBs durante las primeras etapas de la mitosis, prometafase y metafase. No obstante, la reparación de DSBs en mitosis tardía supone un escenario paradójico. Por un lado, la regulación molecular existente promovería la HR, ya que la actividad de ciclina/CDK se asemeja a la fase S tardía/G2. Sin embargo, resulta complejo imaginar cómo se llevaría a cabo si las cromátidas hermanas que actúan como molde han segregado previamente durante anafase. Esta situación genera varias preguntas. ¿Son capaces de ejecutar la DDR durante mitosis tardía? ¿Inhiben la HR y la NHEJ en favor de la MMEJ? ¿Pueden las células sobrevivir a la generación de DSBs mientras transitan anafase y telofase? ¿Son más resistentes o más sensibles a tratamientos quimioterápicos?

Para determinar las consecuencias para la progenie celular tras sufrir DSBs durante las últimas etapas de la mitosis, el objetivo principal de este trabajo es realizar un estudio comparativo entre la DDR ejecutada tras la generación de DSBs en: G1, G2, mitosis temprana y mitosis tardía. Los objetivos específicos comprenden:

- Comparar la tasa de supervivencia a partir de DSBs surgidos en las distintas fases del ciclo celular.
- Determinar la capacidad de ejecutar checkpoints.
- Evaluar la capacidad para adaptarse al daño y reanudar con el ciclo celular.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Líneas celulares

Todas las aproximaciones experimentales de este trabajo se han llevado a cabo utilizando la línea celular humana HeLa (cáncer de tipo cérvico-uterino).

Se empleó el medio de cultivo DMEM (Dubecco's Modification of Eagle Medium) suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10%, 200 mM de penicilina, 100 µg/mL de streptomycin y 100 U/mL de L-Glutamina. Las células se incubaron en una atmósfera de 5% CO₂ y a una temperatura de 37 °C en placas de 10 cm de diámetro.

Para proceder a la toma de muestras y/o tratamientos que conllevaran la resuspensión de las células, se incubó cada placa con 1 mL de Tripsina durante 5 minutos a 37 °C. Este procedimiento disuelve la adherencia del cultivo a la superficie de la placa.

4.2 Tratamientos

4.2.1 Sincronización celular

Para sincronizar las células en las diferentes fases del ciclo celular se usó:

- G1/S: Las células se incubaron en medio DMEM con 2 mM de timidina (Sigma-Aldrich) durante 24 horas.
- G2/M: Las células se trataron con timidina para sincronizarlas en G1/S. Tras su liberación, se trataron con 20 ng/mL de nocodazole (Sigma-Aldrich) durante 15 horas.
- Mitosis tardía: Se realizó el tratamiento para bloquear las células en G2/M. Esta sincronización da lugar a dos poblaciones diferenciadas por morfología. Las células con forma irregular y adheridas a la superficie de la placa comprenden la sincronización en fase G2. Las células esféricas se encuentran sincronizadas en prometafase. Éstas tienen una menor relación área celular/superficie de la placa, por lo que realizar la técnica de “mitotic shake-off” (agitación de las placas) ayuda a eliminar la adherencia y enriquecer el medio de cultivo en células mitóticas en suspensión. Finalmente, las células se liberaron de prometafase y se incubaron durante 35 minutos hasta alcanzar anafase/telofase.

4.2.2 Generación de roturas en la doble hebra de ADN

Para la generación de daños en el ADN, las placas fueron irradiadas con rayos X a diferentes intensidades mediante el uso de un equipo CellRad (Faxitron):

- Para el estudio de la tasa de supervivencia celular, las placas se irradiaron a 1 Gy, 2 Gy y 4 Gy de intensidad.
- Para el resto de experimentos se prepararon muestras irradiadas con una dosis de 4 Gy.

4.3 Extracción de proteínas

4.3.1 Obtención de los extractos totales celulares

La extracción de proteínas se llevó a cabo mediante lisis ácida. Para ello, se eliminó el medio de cultivo de una placa de 10 cm de diámetro, se añadió 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 20% en la placa y se recogió el homogenizado celular en tubos eppendorf. Cada muestra se sonicó con una amplitud del 80% durante 5 minutos a intervalos de 30 segundos mediante el Sonicador de ultrasonido Q800R3 (QsonicaTM).

Luego, se añadió 400 µL de TCA 5% en cada tubo, y se centrifugaron las muestras a 13500 rpm durante 5 minutos. Finalmente, el precipitado fue disuelto en 80-150 µL de solución tampón Laemmli (**Tabla 1**).

Tampón Laemmli 2X
4% SDS
20 % Glicerol
120 mM Tris-HCl pH 6,8

Tabla 1: Composición de la solución tampón Laemmli.

4.3.2 Determinación de la concentración de proteínas

Para determinar la concentración de proteínas de las muestras, se ha generado una curva de calibración mediante un método colorimétrico utilizando el reactivo de ácido bicinconínico (BCA) en medio alcalino. Este método se basa en la reducción de iones cúpricos (Cu^{2+}) a iones cuprosos (Cu^+) por las proteínas presentes en la muestra bajo condiciones alcalinas. Los iones Cu^+ luego forman un complejo con el ácido bicinconínico, cambiando su conformación electrónica y permitiendo que el complejo absorba luz a una longitud de onda de 542 nm, generando un color púrpura. La intensidad de la luz absorbida es directamente proporcional a la concentración de proteína en la muestra.

En la siguiente tabla se muestran las cantidades de los componentes utilizados para generar la recta patrón (**Figura 5**) y la medición de cada muestra:

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	M1
BSA (μL)	0	1	2	4	8	16	-
H₂O (μL)	16	15	14	12	8	0	16
Laemmli (μL)	3	3	3	3	3	3	-
Muestra en tampón laemmli (μL)	-	-	-	-	-	-	3

Tabla 2: Volumen de cada compuesto para generar recta de calibrado.

Finalmente, a cada muestra se añadió 150 μL del reactivo BCA (Novagen) y sulfato de cobre (Sigma-Aldrich, 4%) en proporción 50:1. Tras un periodo de incubación de 10 minutos a 37 °C, se midió la absorbancia de cada pocillo a 542 nm con un espectrofotómetro para multipocillos Multiskan FC (Thermo ScientificTM).

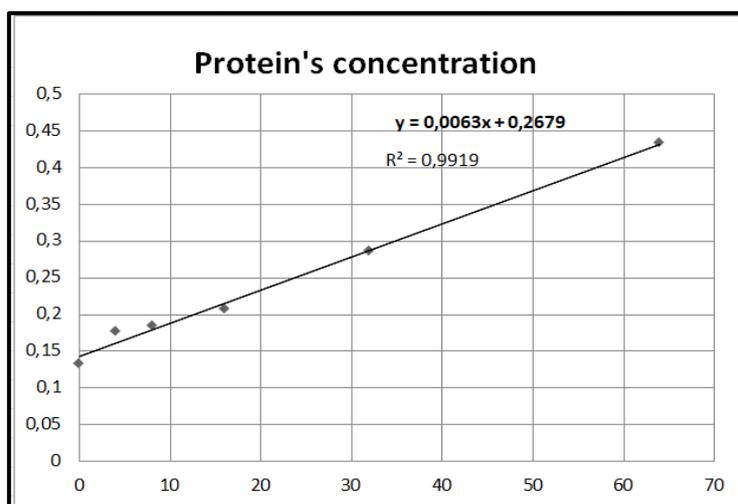


Figura 5: Recta patrón generada para la extracción proteica

4.4 Western blot

4.4.1 Preparación de muestras

Para cada muestra se mezcló 20-30 μg de proteínas con tampón de carga desnaturizante (**Tabla 4**). Finalmente, se desnaturizó cada muestra durante 5 minutos a 95 – 100 $^{\circ}\text{C}$ y se procedió a cargar en los correspondientes geles.

4.4.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida

En primer lugar se polimerizó cada gel de poliacrilamida mediante el uso del sistema Miniprotean 3 (BioRad) para efectuar la electroforesis SDS-PAGE. Se componen de dos fases diferenciadas. La superior sirve para concentrar las proteínas en una sola fracción, mientras que la inferior sirve para separarlas por su peso molecular. En la **Tabla 3A** se muestra la composición de cada uno.

A

Resolving							Stacking
	6%	7%	8%	10%	12%	15%	4%
H ₂ O (mL)	4.4	4.1	3.9	3.4	2.8	2	3
Lower Buffer 4X (pH=8.8) (mL)	2	2	2	2	2	2	1.25 (Upper Buffer 4X, pH=6.8)
Acrilamida 29:1 (mL)	1.6	1.9	2.1	2.6	3.2	4	0.7
APS (10%)/TEMED (μL)	100/10						50/5

B

Lower Buffer pH 8.8 4X	Upper Buffer pH 6.8 4X
1.5 M Tris-HCl	0.5 M Tris-HCl
0.4% SDS	0.4% SDS

Tabla 3: Composiciones de los geles de poliacrilamida. (A): Composición de las dos fases del gel de poliacrilamida usado para electroforesis SDS-PAGE. Se preparó 8 mL del gel resolving y 5 mL del stacking. (B): Composición de las soluciones tampón empleadas en la preparación de los geles.

Tras preparar los geles, se cargó las muestras, el tampón de carga desnaturizante y el marcador de peso molecular Tris-Glycine 4-20% (11-245 kDa) para usarlo como referencia de peso molecular. Se puso a correr los geles a 120 V durante 15 minutos embebidos en tampón SDS-PAGE (**Tabla 3B**), para que todas las proteínas lleguen a la vez a la fase inferior del gel. Tras ese tiempo, se aumentó el voltaje a 150 V durante el tiempo necesario para poder visualizar la proteína de interés particular.

Tampón de carga desnaturizante	Tampón SDS-PAGE 1X
Upper Buffer pH 6.8 4X	19,2 mM Glicina
5% β-mercaptoetanol	2,5 mM Tris-HCl
2% SDS	0.01% SDS
20% Glicerol	
25 μg/mL Azul de Bromofenol	

Tabla 4: Composición del tampón de carga desnaturizante y el tampón SDS-PAGE empleados durante la electroforesis SDS-PAGE.

4.4.3 Transferencia a membrana de nitrocelulosa

Tras finalizar la electroforesis, se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Protran Premium 0.45 μ m) usando el sistema de transferencia Miniprotean 3 (BioRad).

Este sistema consta de una serie de componentes que siempre se sitúan del mismo modo, tal y como se observa en la **Figura 6**.

Esponja – 3 papeles de filtro – gel – membrana – 3 papeles de filtro – Esponja
--

Figura 6: Sistema de transferencia. Todos los componentes han de ser sumergidos previamente en tampón de transferencia

Tras prepararlo, se cerró por medio de soportes que los mantienen completamente apretados y se pusieron a correr en frío a 100 V durante 60 minutos, embebidos completamente en tampón de transferencia (**Tabla 5**) al 20% en etanol.

Tampón de transferencia 1X
19,2 mM Glicina
2,5 mM Tris-HCl pH 6.8

Tabla 5: Composición de la solución tampón usada para la transferencia

Una vez finalizada la transferencia, se bloqueó cada membrana con una solución de leche desnatada (Nestlé Sveltesse) al 5% en el buffer PBS con Tween 20 (PBS-T) al 0.1% durante 1 hora.

4.4.4 Inmunodetección de proteínas

Para detectar las proteínas de interés, cada membrana se incubó con el anticuerpo correspondiente (dilución 1:2000) disuelto en solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C (**Tabla 6**).

Anticuerpo	Origen	Peso molecular	Referencia
Chk1	Ratón	55 kDa	sc-8408 (Santa Cruz Biotechnology)
Chk1-P (Ser345)	Ratón	55 kDa	11/2008 (Cell Signalling)
Chk2	Conejo	65 kDa	Producido en el laboratorio
RNF8	Conejo	60 kDa	Producido en el laboratorio
Ku86	Ratón	86 kDa	sc-5280 (Santa Cruz Biotechnology)
α -tubulin	Ratón	50 kDa	sc-5286 (Santa Cruz Biotechnology)
Rad51	Ratón	37 kDa	MA1-23271 (Invitrogen)
PARP-1	Ratón	113 kDa	sc-8007 (Santa Cruz Biotechnology)

Tabla 6: Listado de anticuerpos primarios, pesos moleculares de las moléculas diana, organismos orígenes y referencias comerciales utilizados en el laboratorio.

Finalizada la hibridación del anticuerpo primario, se realizó la amplificación de la señal a través del uso de anticuerpos secundarios conjugados a la enzima peroxidasa de rábano (dilución 1:10000). Tras la hibridación, se procedió al revelado de las membranas.

Para revelar las membranas, se ha hecho uso del kit West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo ScientificTM), con el que se han preparado diluciones 1:1 de Luminol/H₂O₂. Se han incubado con 2 mL de esta disolución durante 3 minutos y se han detectado las proteínas por medio de un equipo de quimioluminiscencia ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare).

4.4.5 Análisis de resultados

Para cuantificar las intensidades de banda obtenidas tras el Western blot se ha usado el software Image Studio Lite Ver 5.2. Luego, se determinó la relevancia estadística de los diferentes resultados obtenidos, mediante el software Microsoft Excel utilizando el Test t de Student, usando el valor 0.05 como nivel de significación estándar (α).

Los resultados con p-valores inferiores a 0.05 se denotaron con un asterisco (*), indicando una significancia estadística a un nivel de confianza mínimo del 95%. Aquellos con p-valores inferiores a 0.01 se marcaron con dos asteriscos (**), denotando un nivel de confianza igual o superior al 99%. Finalmente, los que obtuvieron p-valores

inferiores a 0.001 se indicaron con 3 asteriscos (***) , determinando una significancia muy alta de los resultados a un nivel de confianza igual o superior al 99.9% .

4.5 Ensayos clonogénicos de supervivencia celular

4.5.1 Formación de colonias

Para la determinación de la tasa de supervivencia celular se realizó ensayos de supervivencia clonogénica. Las células, previamente sincronizadas e irradiadas, se cuantificaron con un contador automático Luna II TM. Se sembró 1000 células en 2 mL de medio de cultivo en placas de 6 pocillos por triplicado. Finalmente, se incubó cada placa entre 7 y 10 días a 37 °C.

4.5.2 Tinción de colonias

Para teñir las colonias, se eliminó el medio de las placas a través de 2 lavados con PBS. Seguidamente, se añadió solución de tinción a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos (**Tabla7**). Una vez concluido el tiempo de espera se lavó la solución de cristal violeta y se llevó a cabo el recuento de colonias celulares.

Solución de tinción de colonias
0.25% cristal violeta
10% formaldehído
50% metanol

Tabla 7: Composición de la solución de tinción empleada para fijar y teñir colonias celulares.

4.5.3 Análisis de resultados

Finalmente, mediante el software Microsoft Excel, se llevó a cabo la determinación de las medias de las colonias celulares cultivadas por triplicado. Estos datos permitieron obtener una estimación precisa de la respuesta celular a las condiciones experimentales evaluadas. Posteriormente, se analizó y comparó las diferencias observadas entre las distintas muestras estudiadas. Para esta aproximación experimental también se empleó

el Test t de Student, estableciendo como nivel de significancia estadística estándar (α) el valor 0.05.

4.6 Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

Para analizar la progresión del ciclo celular se usó citometría de flujo. A través de la medición del contenido en ADN poblacional, se pretende monitorizar y cuantificar la duración de los checkpoints tras generación de DSBs en las distintas fases del ciclo.

4.6.1 Fijación de células

Cada muestra se recogió en los tiempos correspondientes y se fijó en una solución de paraformaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente.

4.6.2 Preparación de muestras para citometría de flujo

Finalizado el tiempo de fijado, se incubó el pellet celular en 500 μ l de una solución de permeabilización y desnaturalización del ADN (**Tabla 8**) durante 30 minutos a 37 °C.

Solución de permeabilización y desnaturalización del ADN
2M HCl
0,5% Tritón X-100

Tabla 8: Composición de la solución de permeabilización y desnaturalización del ADN.

A continuación, se resuspendió cada muestra en una solución de PBS con 25 μ g/mL de RNasa A (Sigma-Aldrich) y 10 μ g/mL de Ioduro de Propidio (PI, de sus siglas en inglés; Sigma-Aldrich).

Tras una breve incubación de 10 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente, se procedió a medir las muestras con el citómetro MACSQuant® Analyzer 10 (Miltenyi).

4.6.3 Análisis de resultados

Para analizar los resultados obtenidos en el citómetro de los perfiles de ADN se usó el software MACSQuantify.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Consecuencias para la supervivencia celular tras la generación de DSBs

Dado que diversos estudios han demostrado que el tratamiento de células con radiación ionizante conduce a una menor supervivencia celular (Stobbe et al., 2002 y Giunta et al., 2010), se estudió la supervivencia clonogénica para determinar la capacidad de resistencia a los DSBs generados durante diferentes fases del ciclo celular a largo plazo.

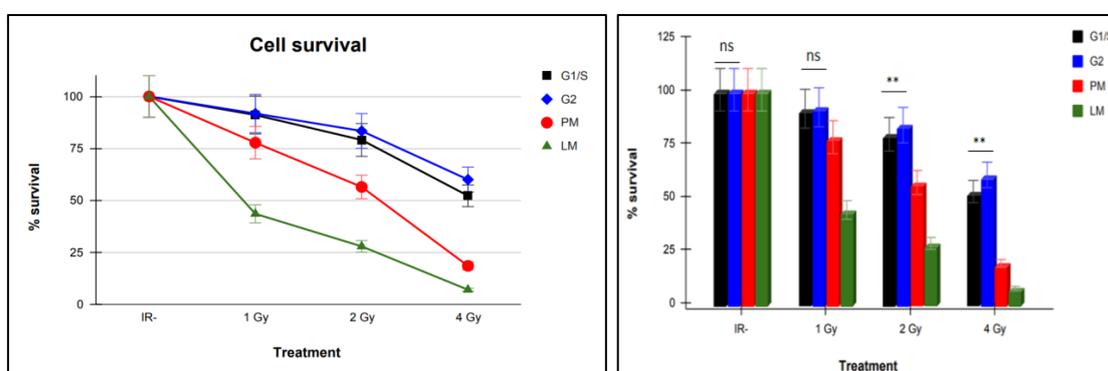


Figura 7: Supervivencia celular a largo plazo tras irradiar las muestras celulares a diferentes intensidades durante las distintas etapas del ciclo celular. Células HeLa se sincronizaron en diferentes fases del ciclo celular y posteriormente se irradiaron a la dosis indicada. Los datos estadísticos se obtuvieron a partir de tres réplicas experimentales. (G1/S): Fases G1 y S temprana. (G2): Fase G2. (PM): Prometafase. (LM): Las últimas etapas mitóticas (anafase/telofase).

Como se aprecia en la **Figura 7**, la supervivencia celular disminuyó a medida que aumentó la dosis de radiación para cada una de las fases del ciclo celular. En lo referente a los DSBs generados durante las fases G1 y G2, la supervivencia a largo plazo fue sustancialmente mayor que la observada durante prometafase y mitosis tardía. En primera instancia, a dosis de irradiación bajas (1 Gy), en las etapas correspondientes a interfase, la supervivencia fue del 90%, mientras que durante prometafase disminuyó hasta el 78%. Por otro lado, la supervivencia correspondiente a las últimas etapas mitóticas redujo severamente hasta un 40%.

En segundo lugar, se puede apreciar que la supervivencia tras irradiar a 2 Gy y 4 Gy disminuyó de manera gradual durante interfase. Destaca que las células irradiadas en

G2, con alta actividad de CDK y presencia de cromátida hermana, mostraron el mayor porcentaje de supervivencia. Este resultado se debe probablemente a que, durante esta fase se utiliza la HR como mecanismo de reparación. Los DSBs, por tanto, pueden repararse sin introducir mutaciones que en muchos casos resultan deletéreas, como ocurre durante G1 con la ejecución de la NHEJ.

Por otro lado, atendiendo a la supervivencia obtenida tras la generación de roturas durante mitosis, se observó que los DSBs generados durante prometafase proporcionan mayor resistencia a la radiación a largo plazo que los DSBs generados durante las últimas etapas mitóticas. Esto sugiere que la presencia de cromátidas hermanas alineadas y cohesionadas en prometafase presenta una oportunidad de reparar a través de moldes intactos. Por el contrario, su ausencia en mitosis tardía provocó una caída más que notable de la viabilidad. Estos resultados pueden estar en concordancia con estudios que proponen la nula reparación en mitosis y su posterior procesado en el siguiente ciclo celular (Stobbe et al., 2002; y Giunta et al., 2010).

A pesar de que la viabilidad disminuyó drásticamente en mitosis con respecto a la existente en interfase, cabe destacar que hay un porcentaje de células que sí sobrevivieron a los tratamientos (~50% (1 Gy), ~ 25% (2 Gy), y ~10% (4 Gy)). Este hecho evidencia que a pesar de mostrar mayor sensibilidad, existió una proporción de células que evadió la muerte celular. Esto podría deberse a la aparición de diversas mutaciones, producto de roturas reparadas a través de procesos mutagénicos como la MMEJ. Esta adquisición de resistencia, trasladada al contexto de células tumorales, supone un reto para las terapias antitumorales. Dado que en un tumor sólido existe un mayor porcentaje de células transitando mitosis que en tejidos sanos, los tratamientos de irradiación podrían provocar la diversificación genética del mismo.

5.2 Ejecución de checkpoints

Una vez determinado que la sensibilidad a la radiación ionizante de las células en mitosis es ampliamente superior a la observada cuando los daños se generan durante otras fases, se determinó si se encuentran ejecutando checkpoints de respuesta al daño en el ADN. Para ello se analizaron por Western blot los niveles de traducción y modificación postraduccional de una batería de proteínas implicadas en el reconocimiento y la reparación del ADN.

5.2.1 Análisis de expresión de las quinasas del checkpoint

En primer lugar, dado que se observó un porcentaje de células que sobrevivieron al tratamiento, se estudió si estas se encontraban iniciando una DDR. Por ello, se determinó el nivel de expresión de la quinasa Chk1. Esta comprende un papel principal en la respuesta de daño al ADN al promover la interrupción del ciclo celular para dar paso al mecanismo de reparación (Lee et al., 2021).

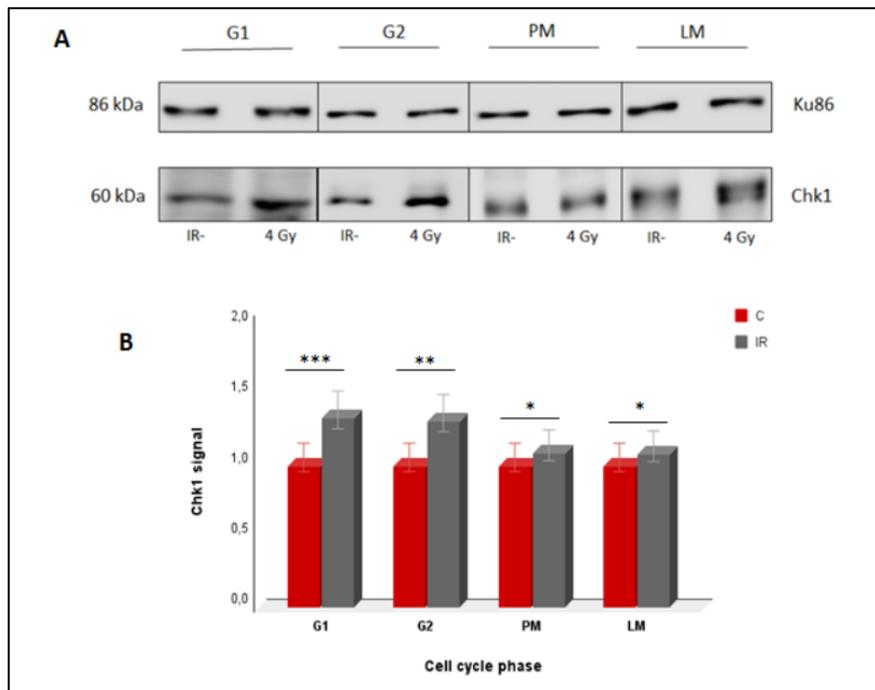


Figura 8: Expresión de la proteína Chk1 tras la generación de DSBs en diferentes fases del ciclo celular. Células HeLa fueron sincronizadas en diferentes fases del ciclo celular, posteriormente irradiadas con 4 Gy y lisadas una hora después. Los extractos totales fueron analizados mediante Western blot utilizando los anticuerpos indicados. (G1): Fase G1. (G2): Fase G2. (PM): Prometáfase. (LM): Las últimas etapas mitóticas (anafase/telofase). (A): Western blot de un experimento representante (B): Cuantificación de los niveles de proteínas Chk1 en comparación con el control de carga de Ku86 de 4 experimentos independientes.

Observando la **Figura 8**, como era esperable, durante G1 y G2, los niveles de expresión de Chk1 aumentaron después de la irradiación. Esto se debe a que ante estas condiciones la DDR se activó para detener el ciclo celular. Del mismo modo, se aprecia un ligero aumento durante mitosis. Este resultado muestra que en condiciones de

generación de DSBs pueden estar activándose vías de reconocimiento y que este factor puede presentar un papel relevante.

Luego, se buscó determinar los niveles de expresión de la quinasa Chk2. Esta se encarga, entre otras funciones, de fosforilar a BRCA1 y por tanto promover la reparación del ADN por medio del mecanismo HR (Zannini et al., 2014). Además, fosforila a su vez a Cdc45A (proteína dependiente de CDK2) para interrumpir la continuación del ciclo tras la generación de DSBs en la fase G1 (Stolz et al., 2011).

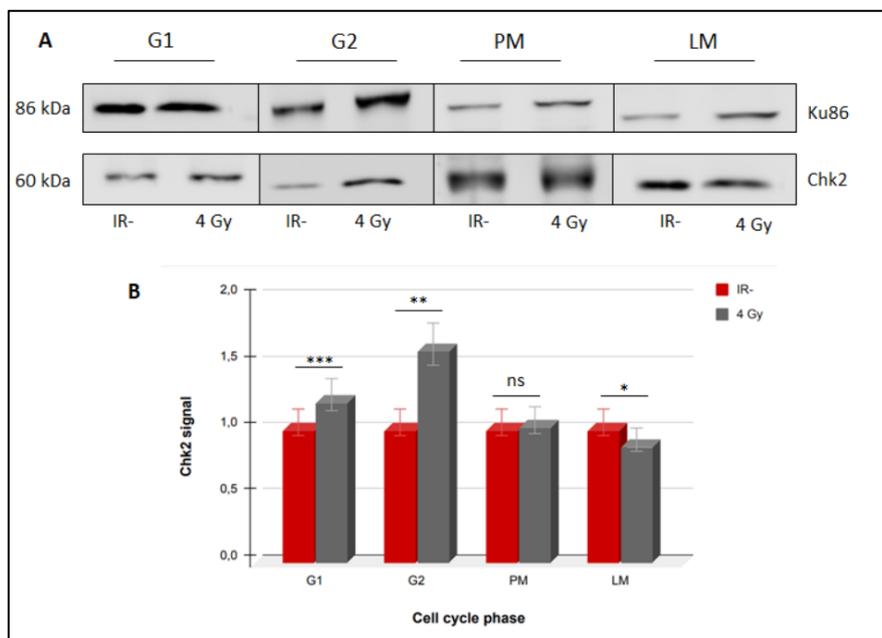


Figura 9: Expresión de la proteína Chk2 tras la generación de DSBs en diferentes fases del ciclo celular. Células HeLa fueron sincronizadas en diferentes fases del ciclo celular, posteriormente irradiadas con 4 Gy y lisadas una hora después. Los extractos totales fueron analizados mediante Western blot utilizando los anticuerpos indicados. (G1): Fase G1. (G2): Fase G2. (PM): Prometafase. (LM): Las últimas etapas mitóticas (anafase/telofase). (A): Western blot de un experimento representante (B): Cuantificación de los niveles de proteínas Chk1 en comparación con el control de carga de Ku86 de 4 experimentos independientes.

Observando la **Figura 9**, se apreció un aumento de la quinasa Chk2 en condiciones de irradiación durante G1 y G2. En estas condiciones se detiene el ciclo y se ejerce una acción en respuesta al daño tal y como se muestra en Zannini et al., (2014) y Stolz et al., (2011). No obstante, durante mitosis, los niveles de Chk2 se mantuvieron constantes

después de irradiar células en prometafase y disminuidos en las mismas condiciones en mitosis tardía. Estos resultados sugieren que durante esta fase, esta proteína se inactiva o se degrada parcialmente, no presentando relevancia en la DDR.

5.2.2 Determinación de la activación de Chk1

Dado que en el análisis anterior los niveles de la proteína Chk1 se vieron ligeramente elevados durante mitosis tardía, se determinó la activación de este factor analizando los niveles de su fosforilación en el residuo de serina 345.

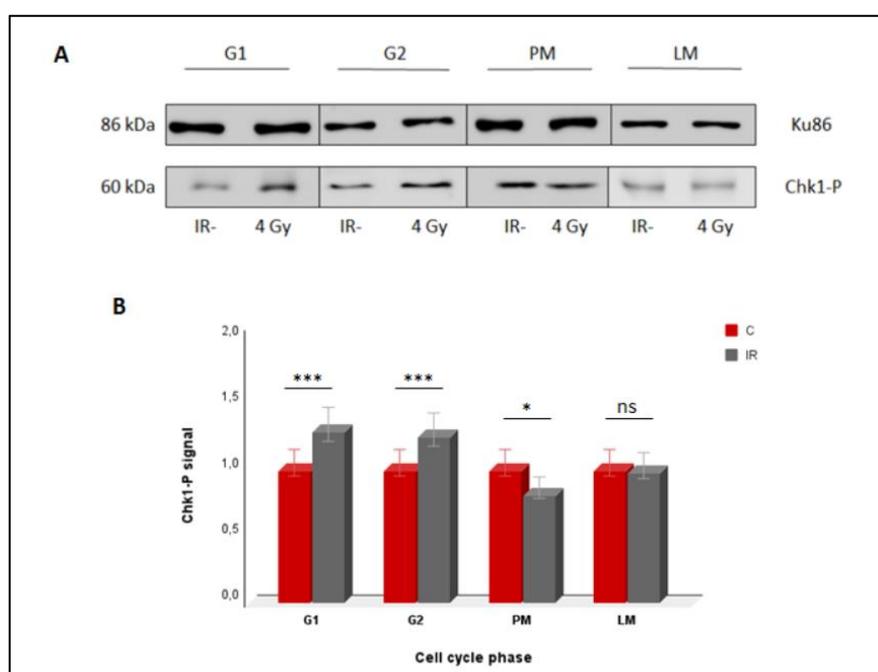


Figura 10: Fosforilación de Chk1 tras generación de DSBs en diferentes fases del ciclo celular. Células HeLa fueron sincronizadas en diferentes fases del ciclo celular, posteriormente irradiadas con 4 Gy y lisadas una hora después. Los extractos totales fueron analizados mediante Western blot utilizando los anticuerpos indicados. (G1): Fase G1. (G2): Fase G2. (PM): Prometafase. (LM): Las últimas etapas mitóticas (anafase/telofase). (A): Western blot de un experimento representante (B): Cuantificación de los niveles de proteínas Chk1 en comparación con el control de carga de Ku86 de 4 experimentos independientes.

Observando la **Figura 10**, en interfase, los niveles de Chk1 fosforilado aumentaron considerablemente en condiciones de irradiación (~ 30%). Esto evidencia su activación

para estimular la vía de señalización que llevará a la reparación de los daños como se argumenta en Smits et al., (2015).

Por otro lado, atendiendo a mitosis, no se apreció activación por medio de esta fosforilación en Chk1, disminuyendo en prometafase (~20%) y manteniéndose constante en mitosis tardía. Esto podría sugerir que en mitosis tardía los DSBs no estimulan la activación de este factor. Sin embargo, cabe destacar que a diferencia de lo que cabría esperar, los niveles referentes a la población sin irradiar en todas las fases fueron muy elevados. Probablemente esto se deba a que el tratamiento de sincronización genera daño en el ADN y por eso estimula la activación de esta proteína.

5.2.3 Análisis de expresión de la proteína mediadora RNF8

En segundo lugar, se buscó estudiar la expresión de proteínas adicionales de la DDR, como RNF8, crítica para la señalización en esta vía. Esta E3 ligasa promueve el reclutamiento de 53BP1 y de BRCA1 estimulando la ejecución de las dos vías de reparación de DSBs principales (Nakada et al., 2016).

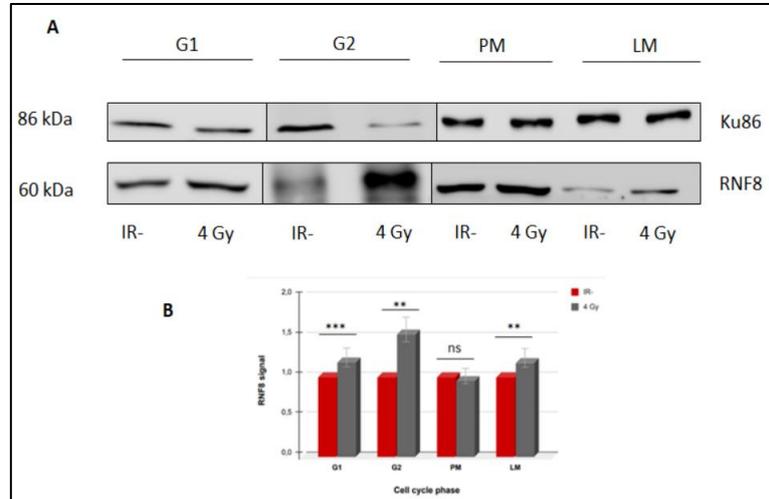


Figura 11: Expresión de la proteína RNF8 tras la generación de DSBs en diferentes fases del ciclo celular. Células HeLa fueron sincronizadas en diferentes fases del ciclo celular, posteriormente irradiadas con 4 Gy y lisadas una hora después. Los extractos totales fueron analizados mediante Western blot utilizando los anticuerpos indicados. (G1): Fase G1. (G2): Fase G2. (PM): Prometafase. (LM): Las últimas etapas mitóticas (anafase/telofase). (A): Western blot de un experimento representante (B): Cuantificación de los niveles de proteínas Chk1 en comparación con el control de carga de Ku86 de 4 experimentos independientes.

Observando la **Figura 11**, durante G1 y G2, los niveles de expresión de la proteína RNF8 aumentaron en condiciones de irradiación. Estos resultados concuerdan con los comentados en Nakada et al., (2016) donde argumentan que durante estas fases se están activando los mecanismos canónicos de reparación del ADN.

Por otro lado, atendiendo a mitosis, en prometafase, los niveles de RNF8 se mantuvieron invariables. Sin embargo, a diferencia de lo que cabría esperar, durante mitosis tardía los niveles de RNF8 se vieron ligeramente aumentados en condiciones de irradiación. Esto podría sugerir la aparición de alguna función de esta proteína en estas condiciones, aunque con este análisis no es posible determinarlo y sería interesante determinar si aparecen acumulaciones de esta proteína en las regiones dañadas, que se puede observar mediante la formación de focos en experimentos de inmunofluorescencia.

No obstante, otra posible explicación de esto podría ser que durante mitosis tardía el factor RNF8 se asocia a diversas estructuras como el cinetocoro o los centrosomas (Giunta et al., 2011). Del mismo modo, irregularidades en la actividad de esta proteína se han asociado a errores durante la citocinesis (Zhou et al., 2019). Por lo que, su papel en la regulación de mitosis podría explicar el aumento observado en condiciones de irradiación, dado que, sería posible que su activación se diera por mecanismos similares a los ejecutados en respuesta a la aparición de DSBs.

5.2.4 Análisis de expresión de la proteína efectora Rad51

En tercer lugar, y dado el aumento observado en los niveles de expresión del intermediario RNF8, se estudió la expresión de la recombinasa efectora Rad51. Esta ejerce un papel principal en la búsqueda e invasión de la cromátida hermana, que será utilizada como molde para la reparación a través de la vía HR (Ceccaldi et al., 2016).

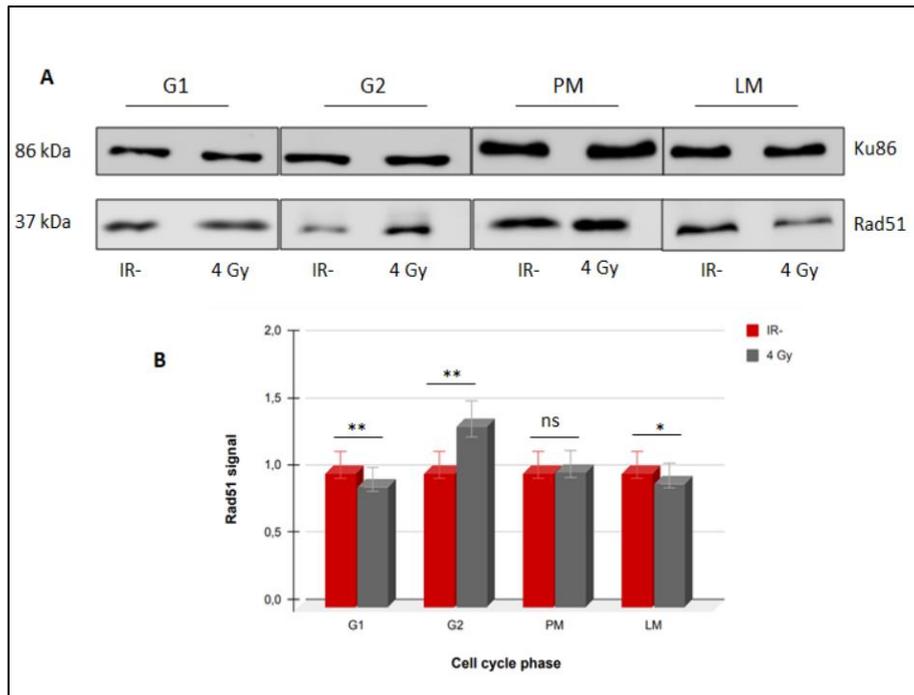


Figura 12: Expresión de la proteína Rad51 tras la generación de DSBs en diferentes fases del ciclo celular. Células HeLa fueron sincronizadas en diferentes fases del ciclo celular, posteriormente irradiadas con 4 Gy y lisadas una hora después. Los extractos totales fueron analizados mediante Western blot utilizando los anticuerpos indicados. (G1): Fase G1. (G2): Fase G2. (PM): Prometáfase. (LM): Las últimas etapas mitóticas (anafase/telofase). (A): Western blot de un experimento representante (B): Cuantificación de los niveles de proteínas Chk1 en comparación con el control de carga de Ku86 de 4 experimentos independientes.

Al irradiar las células en fase G1, los niveles de Rad51 disminuyeron. Este resultado está en concordancia con lo mostrado en Chang et al., (2017), pues durante esta fase se realiza la NHEJ como mecanismo de reparación de daños y no es necesaria la búsqueda e invasión de una cromátida hermana (**Figura 12**). Por otro lado, durante G2, los niveles de Rad51 fueron significativamente aumentados en condiciones de generación de DSBs. Esto podría estar relacionado con la reparación de DSBs principalmente vía HR en esta fase del ciclo celular (Li et al., 2008).

Finalmente, se observó que en mitosis, los niveles de Rad51 se encontraron invariables después de la irradiación en prometáfase, o disminuidos tras la generación de DSBs durante anafase/telofase. Estos resultados podrían evidenciar que el mecanismo de reparación HR se encuentra suprimido durante esta etapa, tal y como se muestra en Heijink et al., (2013) y Terasawa et al., (2014).

5.2.5 Activación de vías apoptóticas

Finalmente, se estudió si las células que mueren al ser tratadas con irradiación durante mitosis tardía están activando vías apoptóticas de muerte celular programada. Para ello se analizó por Western blot la estabilidad de la proteína PARP-1. En condiciones de apoptosis, PARP-1 se hidroliza por las Caspasas 3 y 7, por lo que se detecta a través de una forma de la proteína con peso molecular menor.

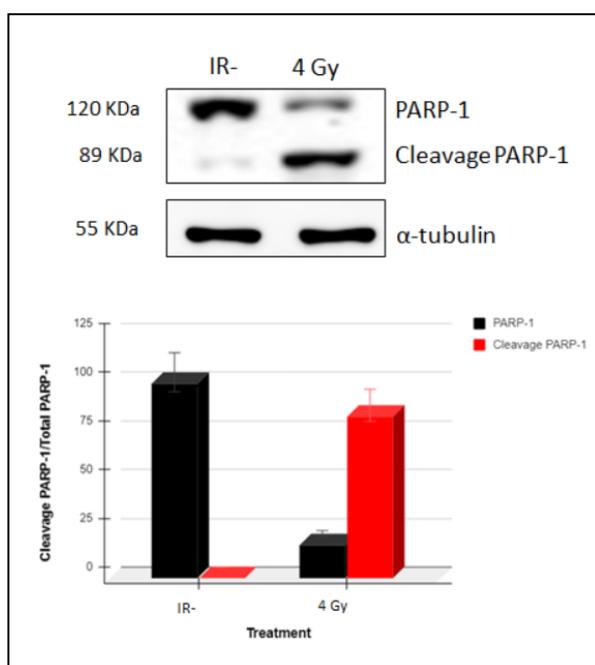


Figura 13: Inducción de apoptosis después de irradiación. Células HeLa fueron sincronizadas en mitosis tardía, irradiadas con 4 Gy y lisadas una hora después. Los extractos totales fueron analizados mediante Western blot utilizando los anticuerpos indicados. Arriba: Western blot de un experimento representante. Abajo: Cuantificación del ratio PARP-1 hidrolizado/PARP-1 total en comparación con el control de carga de α -tubulin de 4 experimentos independientes.

Observando la **Figura 13**, durante las últimas etapas de la mitosis, se observó una banda intensa de aproximadamente 120 kDa, que hace referencia a la proteína PARP-1 sin degradar. También se apreció una banda muy tenue de alrededor de 89 kDa que hace referencia a la proteína PARP-1 hidrolizada. Este pequeño porcentaje de hidrólisis se debe a la ejecución de la apoptosis de manera intrínseca en el cultivo control, siendo muy minoritaria. Sin embargo, la irradiación de las células aumentó considerablemente los niveles de PARP-1 hidrolizado hasta un 85%. Este resultado indica que las células,

efectivamente, son capaces de activar la muerte celular programada en condiciones de DSBs durante mitosis tardía.

5.3 Análisis del ciclo celular después de irradiación

Finalmente se analizó la capacidad de las células para detener y reanudar el ciclo celular tras inducir DSBs en diferentes fases del ciclo celular. Se realizó a través de la medición del contenido de ADN a nivel poblacional mediante citometría de flujo.

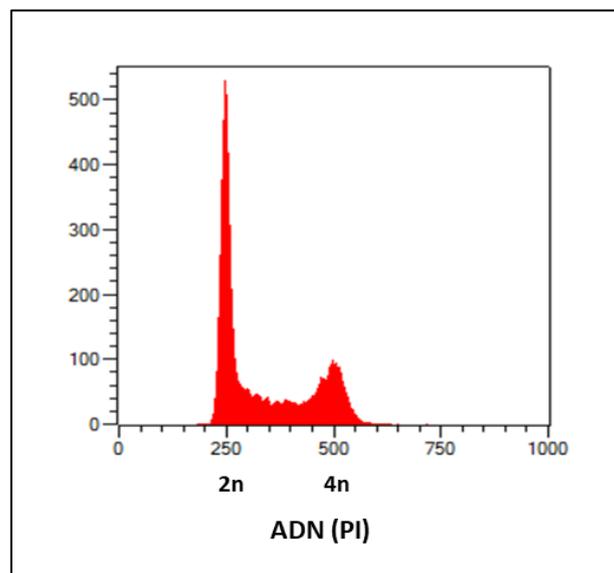


Figura 14: Representación gráfica de los perfiles de ADN obtenidos a través de citometría de flujo sobre muestras de una población celular asincrónica. (2n): Población celular con dotación cromosómica 2n (fase G1). (4n): Población celular con dotación cromosómica 4n (fase G2/M).

La **Figura 14** muestra un perfil de ADN de células asincrónicas. La señal de 2n hace referencia a las células que tienen un contenido de ADN diploide, mientras que la señal de 4n alude a aquéllas que en el momento de la medición son tetrahaploides. Esto supone que las células en 2n se encuentran en G1. En 4n se detectan aquéllas que ya han replicado y por tanto transitan en G2 y mitosis. La señal correspondiente a los valores intermedios entre 2n y 4n se detecta en células que están replicando el ADN.

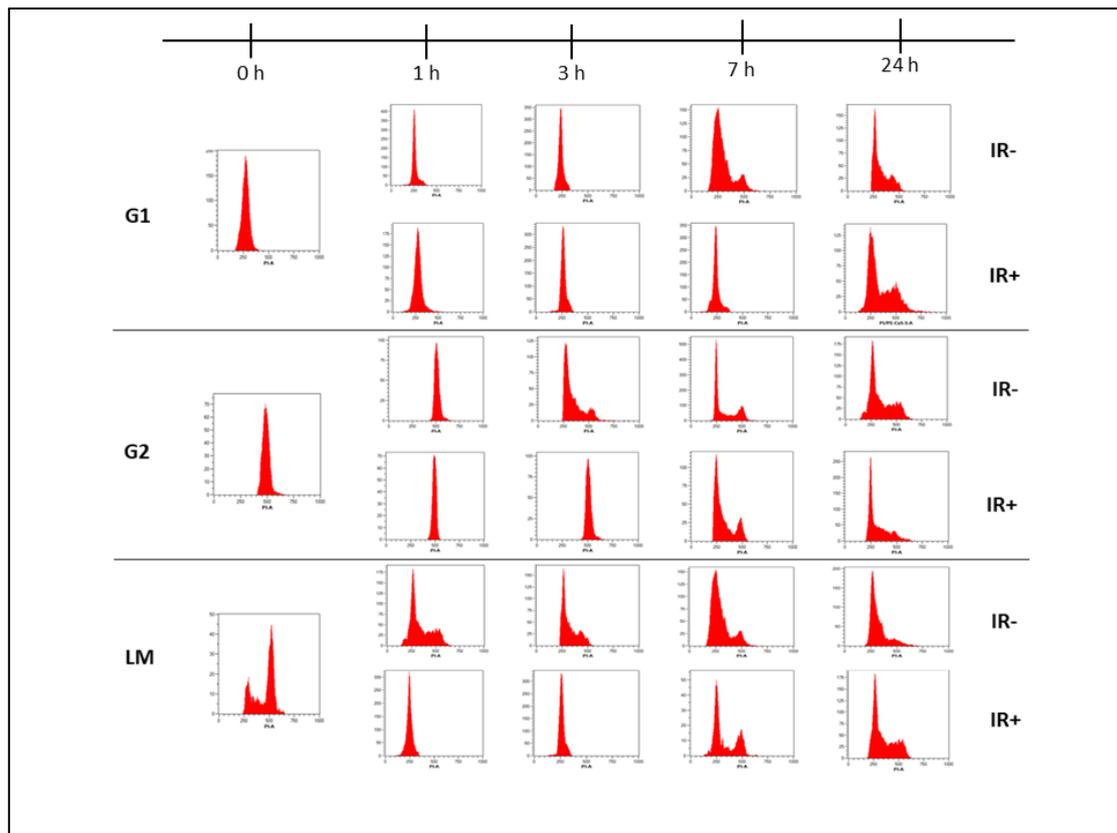


Figura 15: Perfiles de ADN de irradiación de células sincronizadas en diferentes fases del ciclo celular. Las células Hela fueron sincronizadas en las fases indicadas (LM = mitosis tardía), se dejaron sin tratar o se irradiaron con 4Gy, se liberaron del bloqueo y se fijaron en los momentos indicados. Los perfiles de ADN se midieron mediante citometría de flujo tras permeabilizar las células y tratarlas con yoduro de propidio.

Para analizar si las células pueden reanudar el ciclo celular tras inducir DSBs, estas fueron sincronizadas, irradiadas y lavadas para permitirles reiniciar el ciclo celular.

La irradiación de células en G1 y G2 provocó un retraso en la progresión del ciclo celular. En G1, se apreció como aquellas que fueron irradiadas progresaron con el ciclo celular tras 7-24 horas desde el tratamiento, mientras que las células control avanzaron más rápido desde el bloqueo del ciclo celular. Por otro lado, las células irradiadas en G2 tardaron entre 3-7 horas en continuar el ciclo. Estos datos podrían mostrar que el mecanismo de reparación por HR usado durante G2, repara las roturas más rápidamente que el mecanismo de reparación NHEJ que se utiliza en G1, tal y como se observa en Nakada et al., (2016).

Por otro lado, al observar los perfiles obtenidos de células de mitosis tardía, se apreció que las células irradiadas continuaron el ciclo tras 1 hora desde el tratamiento. Estos datos muestran que en las últimas fases mitóticas el ciclo no se detiene de forma canónica como en el resto de fases. Este resultado, puede sugerir que los daños producidos no son reparados durante las últimas etapas de la mitosis. Sin embargo, otra posibilidad sería que en caso de emplearse MMEJ como vía de reparación, las células podrían reparar dichas roturas a medida que progresan con el ciclo celular.

Por último, atendiendo a la proporción de células que han sufrido DSBs durante mitosis tardía y que se encuentran en la siguiente G1, las que sufrieron daño han tardado entre 3-7 horas en progresar en el ciclo. Comparando estos resultados con los obtenidos cuando los daños sucedieron en G1 (7-24 horas), se apreció que en mitosis tardía el ciclo progresa antes que durante G1. Esta diferencia podría deberse a que, aunque los daños no sean reparados directamente durante mitosis tardía, cabe la posibilidad de que sí sean reconocidos y marcados durante esta fase como se especifica en Blackford et al., (2020) y van Vaught et al., (2023). Esto facilitaría la posterior reparación por las células hijas dando como resultado una progresión del ciclo celular más rápida cuando los DSBs son generados en mitosis tardía que cuando son producidos durante G1.

6. CONCLUSIONES

Finalmente, en base a lo determinado en este estudio, las conclusiones son:

- La radiosensibilidad a largo plazo de las células durante las últimas etapas mitóticas es mayor que la observada en interfase.
- Los DSBs en mitosis tardía provocan el aumento de los niveles de las proteínas Chk1 y RNF8, mostrando una activación de la DDR.
- Sin embargo, Chk1 no parece ser activado por fosforilación de la serina 345 después del daño en mitosis tardía.
- Las células que han sufrido DSBs durante las últimas etapas de la mitosis activan la apoptosis intrínseca.
- La generación de DSBs durante mitosis tardía no interrumpe la progresión del ciclo celular hasta la siguiente fase G1 donde se detiene entre 3 y 7 horas antes de progresar.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Bakhoun, S. F., Kabeche, L., Compton, D. A., Powell, S. N., & Bastians, H. (2017). Mitotic DNA Damage Response: At the Crossroads of Structural and Numerical Cancer Chromosome Instabilities. *Trends in Cancer*, 3: 225-234.
- Bhargava, R., Onyango, D. O., & Stark, J. M. (2016). Regulation of Single-Strand Annealing and its Role in Genome Maintenance. *Trends in Genetics*, 32: 566-575.
- Blackford, A. N., & Stucki, M. (2020). How Cells Respond to DNA Breaks in Mitosis. *Trends in Biochemical Sciences*, 45: 321-331.
- Brambati, A., Sacco, O., Porcella, S., Heyza, J., Kareh, M., Schmidt, J. C., & Sfeir, A. (2023). RHINO directs MMEJ to repair DNA breaks in mitosis. *Science*, 381: 653-660.
- Brown A., & Geiger H. (2018). Chromosome integrity checkpoints in stem and progenitor cells: transitions upon differentiation, pathogenesis, and aging. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75: 3771–3779.
- Carusillo, A., & Mussolino, C. (2020). DNA Damage: From Threat to Treatment. *Cells*, 9: 1665.
- Ceccaldi, R., Rondinelli, B., & D'Andrea, A. D. (2016). Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends in Cell Biology*, 26: 52-64.
- Chang, H. H. Y., Pannunzio, N. R., Adachi, N., & Lieber, M. R. (2017). Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 18: 495-506.

- Gelot, C., Kovacs, M. T., Miron, S., Mylne, E., Haan, A., Boeffard-Dosierre, L., Ghouil, R., Popova, T., Dingli, F., Loew, D., Guirouilh-Barbat, J., Del Nery, E., Zinn-Justin, S., & Ceccaldi, R. (2023). Pol θ is phosphorylated by PLK1 to repair double-strand breaks in mitosis. *Nature*, 621: 415-422.
- Giunta, S., Belotserkovskaya, R., & Jackson, S. P. (2010). DNA damage signaling in response to double-strand breaks during mitosis. *The Journal of Cell Biology*, 190: 197-207.
- Giunta, S., & Jackson, S. (2011). Give me a break, but not in mitosis. The mitotic DNA damage response marks DNA double-strand breaks with early Signalling events. *Cell Cycle*, 10: 1215-1221.
- Heijink, A. M., Krajewska, M., & van Vugt, M. A. (2013). The DNA damage response during mitosis. *Mutation Research*, 750: 45-55.
- Hopkins, J. L., Lan, L., & Zou, L. (2022). DNA repair defects in cancer and therapeutic opportunities. *Genes & Development*, 36: 278-293.
- Howard, S. M., Yanez, D. A., & Stark, J. M. (2015). DNA Damage Response Factors from Diverse Pathways, Including DNA Crosslink Repair, Mediate Alternative End Joining. *PLOS Genetics*, 11:1004943.
- Lee, K. Y., & Dutta, A. (2021). Chk1 promotes non-homologous end joining in G1 through direct phosphorylation of ASF1A. *Cell Reports*, 34: 108680.
- Li, X., & Heyer, W. D. (2008). Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res*, 18: 99–113.
- Mashimo, M., Onishi, M., Uno, A., Tanimichi, A., Nobeyama, A., Mori, M., Yamada, S., Negi, S., Bu, X., Kato, J., Moss, J., Sanada, N., Kizu, R., & Fujii, T. (2021). The 89-kDa PARP1 cleavage fragment serves as a cytoplasmic PAR

carrier to induce AIF-mediated apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 296: 100046.

- Nakada, S. (2016). Opposing roles of RNF8/RNF168 and deubiquitinating enzymes in ubiquitination-dependent DNA double-strand break response signaling and DNA-repair pathway choice. *Journal of Radiation Research*, 57: 133-140.
- Nambiar, D. K., Mishra, D., & Singh, R. P. (2023). Targeting DNA repair for cancer treatment: Lessons from PARP inhibitor trials. *Oncology Research*, 31: 405-421.
- Prado, F., Cortés-Ledesma, F., Huertas, P., & Aguilera, A. (2003). Mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 42: 185-198.
- Scully, R., Panday, A., Elango, R., & Willis, N. A. (2019). DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 20: 698-714.
- Shibata, A., & Jeggo, P. A. (2021). ATM's Role in the Repair of DNA Double-Strand Breaks. *Genes*, 12: 1370.
- Smits, V. A. J., & Gillespie, D. A. (2015). DNA damage control: regulation and functions of checkpoint kinase 1. *The FEBS Journal*, 282: 3681-3692.
- Stobbe, C. C., Park, S. J., & Chapman, J. D. (2002). The radiation hypersensitivity of cells at mitosis. *International Journal of Radiation Biology*, 78: 1149-1157.
- Stolz, A., Ertych, N., & Bastians, H. (2011). Tumor Suppressor CHK2: Regulator of DNA Damage Response and Mediator of Chromosomal Stability. *Clinical Cancer Research*, 17: 401-405.

- Swift, M. L., Beishline, K., Flashner, S., & Azizkhan-Clifford, J. (2021). DSB repair pathway choice is regulated by recruitment of 53BP1 through cell cycle-dependent regulation of Sp1. *Cell Reports*, 34: 108840.
- Terasawa, M., Shinohara, A., & Shinohara, M. (2014). Double-strand break repair-adox: Restoration of suppressed double-strand break repair during mitosis induces genomic instability. *Cancer Science*, 105: 1519-1525.
- Timmins, J. (2023). Recognition of DNA Lesions. *International Journal Of Molecular Sciences*, 24: 9682.
- Van Vugt, M. A. T. M., & Tijsterman, M. (2023). POLQ to the rescue for double-strand break repair during mitosis. *Nature Structural & Molecular Biology*, 30: 1828-1830.
- Xu, Y., & Xu, D. (2020). Repair pathway choice for double-strand breaks. *Essays in Biochemistry*, 64: 765-777.
- Yam C. Q. Y., Lim H. H., & Surana U. (2022). DNA damage checkpoint execution and the rules of its disengagement. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10: 1020643.
- Zannini, L., Delia, D., & Buscemi, G. (2014). CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond. *Journal of Molecular Cell Biology*, 6: 442-457.
- Zhou, T., Yi, F., Wang, Z., Guo Q., Liu, J., Bai, N., Li, X., Dong, X., Ren, L., Cao, L., & Song, X. (2019). The Functions of DNA Damage Factor RNF8 in the Pathogenesis and Progression of Cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 15: 909-918.