

## PERSISTENT GENETIC DAMAGE INDUCED BY TOPOISOMERASE II POISONS IN NORMAL HUMAN FIBROBLASTS: GENERATION OF CHROMOSOME INSTABILITY

## DAÑO GENÉTICO PERSISTENTE INDUCIDO POR VENENOS DE TOPOISOMERASA II EN FIBROBLASTOS HUMANOS NORMALES: GENERACIÓN DE INESTABILIDAD CROMOSÓMICA

de Campos-Nebel M.<sup>1</sup>, Palmitelli M.<sup>1</sup>, Acevedo S.<sup>2</sup>, González-Cid M.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Mutagénesis, Instituto de Medicina Experimental, IMEX-CONICET, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup>División Genética, Departamento de Patología y Diagnóstico, Instituto de Investigaciones Hematológicas (IIHema), Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina.

\*Corresponding author: margoncid@hematologia.anm.edu.ar

### ABSTRACT

Topoisomerase II (Top2) poisons idarubicin (IDA) and etoposide (ETO) are anticancer drugs that target Top2 stabilizing DNA-enzyme complexes and generating double-strand breaks (DSB). These DNA lesions are dangerous because they lead to genomic instability and promote tumorigenesis. These drugs are associated with the development of leukemias characterized by translocations of the *MLL* gene in treated patients. Our aim was to analyze the residual genetic damage induced by IDA and ETO in normal human fibroblasts at different times. Cells were treated with sublethal concentrations of IDA and ETO for 2 h and persistent DSB were evaluated in interphase nuclei and chromosomal aberrations (CA) in metaphase at 26 h post-treatment. In addition, micronuclei and *MLL* gene rearrangements were determined in interphase nuclei at 30 h post-treatment. Unrepaired persistent DSB induced by IDA and ETO turned into chromatid and chromosome breaks and improper repair in chromatid and chromosome exchanges. Simultaneously with increased CA, there was a marked reduction of the mitotic index, principally in cultures treated with IDA, due to the accumulation of cells in G2/M phase of cell cycle. This chromosomal damage progressed to the following interphase causing an increase in the micronucleated cells and in the rearrangements of *MLL* gene. The persistent DNA damage produced by IDA and ETO in normal human cells plays an important role in the possible induction of Top2 poisons-mediated secondary malignancies.

**Key words:** idarubicin, etoposide, DNA damage, *MLL* gene, normal human cells.

### RESUMEN

Los venenos de topoisomerasa II (Top2) idarubicina (IDA) y etopósido (ETO) son drogas antitumorales que actúan sobre Top2 estabilizando complejos ADN-enzima y generando rupturas de doble cadena (RDC). Estas lesiones en el ADN son peligrosas debido a que llevan a inestabilidad genómica y a promover tumorigénesis. Estas drogas están asociadas al desarrollo de leucemias caracterizadas por translocaciones del gen *MLL* en los pacientes tratados. Nuestro objetivo fue analizar el daño genético residual inducido por IDA y ETO en fibroblastos humanos normales a diferentes tiempos. Las células se trataron con concentraciones subletales de IDA y ETO durante 2 hs y se evaluaron RDC persistentes en núcleos interfásicos y aberraciones cromosómicas (AC) en metafases a las 26 hs postratamiento. Además, se determinaron los micronúcleos y los rearrreglos del gen *MLL* en núcleos interfásicos a las 30 hs. Las lesiones persistentes inducidas por IDA y ETO se transformaron en rupturas cromatídicas y cromosómicas por falta de reparación y en figuras de intercambio cromatídico y cromosómico por reparación incorrecta. Junto al aumento de AC existió una marcada reducción del índice mitótico, en particular en los cultivos tratados con IDA, debido a la acumulación de células en la fase G2/M del ciclo celular. Este daño cromosómico progresó hacia la siguiente interfase causando un incremento de micronúcleos y de rearrreglos del gen *MLL*. El daño persistente en el ADN producido por IDA y ETO en células humanas normales juega un rol importante en la posible inducción de neoplasias secundarias debidas al tratamiento con venenos de Top2.

**Palabras clave:** idarubicina, etopósido, daño al ADN, gen *MLL*, células humanas normales.

## INTRODUCCIÓN

Las topoisomerasas de tipo II (Top2) resuelven problemas topológicos del ADN durante la replicación, transcripción y condensación cromosómica. Esta enzima cataliza la liberación de torsiones en el ADN mediante la introducción de rupturas transitorias en la doble cadena del mismo (RDC) (McClendon y Osheroff, 2007). En los seres humanos existen dos isoformas,  $\alpha$  y  $\beta$ , cuyas expresiones están reguladas durante el ciclo celular. Top2 $\alpha$  es fundamental para la supervivencia de células proliferantes y su expresión está relacionada con el crecimiento celular. En cambio, la concentración de Top2 $\beta$  es independiente del estado proliferativo de las células (Heisig, 2009).

Un gran número de los regímenes antitumorales están basados en la utilización de drogas dirigidas contra Top2 debido a las numerosas funciones celulares desempeñadas por la enzima (Nitiss, 2009). Estas drogas son llamadas venenos de Top2 pues convierten a esta enzima esencial en una potente toxina que fragmenta al genoma en su presencia (Deweese y Osheroff, 2009). Los venenos de Top2 interfieren con el paso de religación de los extremos rotos durante el ciclo catalítico estabilizando los complejos ADN-enzima, conocidos como complejos de clivaje. La acumulación de los complejos de clivaje genera RDC en el ADN, que pueden producir rearrreglos cromosómicos y promover el desarrollo tumoral o conducir a la muerte celular (Elliott y Jasin, 2002). Entre los venenos de Top2 se encuentran idarubicina (IDA) y etopósido (ETO).

La antraciclina IDA es utilizada en el tratamiento de leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica aguda y cáncer de mama (Hollingshead y Faulds, 1991), mientras que la epipodofilotoxina ETO es empleada en el cáncer de pulmón a células pequeñas, sarcomas, tumores de la línea germinal, ovario, gástrico, mama, leucemias y linfomas (Hande, 1998).

Nuestros resultados previos demostraron que Top2 $\alpha$  es responsable de la inducción de RDC en el ADN y de la citotoxicidad de los venenos de Top2 IDA y ETO en células humanas normales (de Campos-Nebel *et al.*, 2010). Asimismo, se ha establecido que la isoforma  $\alpha$  involucrada en la proliferación celular, sirve como blanco terapéutico para estas drogas antineoplásicas (Azarova *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2012).

Si bien los venenos de Top2 son ampliamente utilizados en la clínica médica, su empleo está asociado con severos efectos adversos como el desarrollo de leucemias agudas relacionadas a la terapia, especialmente leucemia mieloide aguda (t-LMA). La incidencia de leucemias relacionadas con la terapia ha aumentado debido a una mayor tasa de supervivencia de los pacientes y al uso de regímenes quimioterapéuticos más intensivos para tratar cánceres primarios (Cowell y Austin, 2012; Pendleton *et al.*, 2014). La presencia de t-LMA reflejaría un daño genético no letal inducido por venenos de Top2 en células precursoras hematopoyéticas.

Las translocaciones cromosómicas balanceadas representan las anomalías cariotípicas características de la t-LMA asociada con venenos de Top2. En este sentido, el locus de leucemia de linaje mixto (MLL) ubicado en 11q23 es el más frecuentemente involucrado en estas translocaciones, manifestándose en un período de latencia corto luego del tratamiento (Felix *et al.*, 2006; Leone *et al.*, 2010).

Debido a la elevada frecuencia con la cual los regímenes antineoplásicos que utilizan venenos de Top2 inducen tumores secundarios relacionados a la terapia de diversas patologías, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la contribución de las RDC persistentes inducidas por IDA y ETO en generar inestabilidad cromosómica en células humanas normales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Cultivo celular y tratamientos*

La línea de fibroblastos humanos normales PTP (pasajes 25–35) fue proporcionada por la Dra. M.I. Tous, Servicio de Cultivo de Tejidos, Depto. de Virología, INEI-ANLIS “CG Malbrán”, Buenos Aires, Argentina. Las células crecieron en medio esencial mínimo MEM con 10 % suero fetal bovino, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina y 100  $\mu$ g/ml estreptomina (medio completo) a 37° C en una atmósfera húmeda con 5 % CO<sub>2</sub>. Las células en crecimiento exponencial se trataron con IDA (CAS N° 58957-92-9, Pharmacia y Upjohn) disuelta en agua destilada o ETO (CAS N° 33419-42-0, Sigma) disuelto en DMSO durante 2 hs, se lavaron dos veces con una solución de buffer fosfato (PBS) y se mantuvieron en medio completo durante diferentes tiempos. Los cultivos controles se trataron con los diluyentes correspondientes a cada agente empleado.

### *Evaluación de RDC ( $\gamma$ H2AX) persistentes*

#### *Por citometría de flujo*

Las células se trataron con IDA, se lavaron con PBS y permanecieron en cultivo con medio completo por 4 o 26 hs. Las células tratadas con ETO se cosecharon inmediatamente, o se lavaron y dejaron en cultivo con medio completo por 26 hs. Luego de los tratamientos, las células se recolectaron, centrifugaron y fijaron en 1 % paraformaldehído (PFA) en PBS por 10 min a 37° C y se resuspendieron en 90 % metanol durante por lo menos 30 min a 4° C. Luego se incubaron en solución bloqueante (1 % seroalbúmina bovina en PBS) durante 1 h, en solución bloqueante conteniendo el anticuerpo anti- $\gamma$ H2AX (1:200, *Cell Signaling*) por 1 h a temperatura ambiente y se resuspendieron en solución bloqueante conteniendo el anticuerpo secundario marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC, 1:100, Vector Laboratories) por 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. Las células se lavaron en PBS y se adicionaron 200  $\mu$ g/ml RNAsa A (libre de DNAsas) y 10  $\mu$ g/ml yoduro de propidio (IP) incubando durante 15 min en oscuridad. La adquisición de 30.000 células por muestra se realizó mediante un citómetro de flujo FACSCalibur utilizando el software Cell Quest. Se agregaron controles de isotipo apropiados y se determinó la media de la intensidad de fluorescencia (IF) de  $\gamma$ H2AX en 4 experimentos independientes.

#### *Por inmunofluorescencia en núcleos interfásicos*

Las células crecidas sobre cubreobjetos se trataron con IDA o ETO y se mantuvieron en medio completo durante 26 hs. Las células se fijaron en 2 % PFA y permeabilizaron con 0,25 % Tritón X-100 en PBS por 10 min a temperatura ambiente. Se incubaron, sucesivamente, en solución bloqueante (5 % suero fetal bovino y 0,25 % Tritón X-100 en PBS) durante 1 h, en presencia del anticuerpo primario anti- $\gamma$ H2AX (1:300) en solución bloqueante por 2 hs a 37° C en cámara húmeda y del anticuerpo secundario conjugado con FITC (1:200) en solución bloqueante durante 1 h a 37° C en cámara húmeda. Se colocaron los cubreobjetos sobre portaobjetos con medio de montaje conteniendo 4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI, Vector Laboratories) como contra-colorante. El porcentaje de células con focos nucleares  $\gamma$ H2AX se analizó en 200 células por tratamiento en 2 experimentos independientes. En este recuento no se consideraron los focos  $\gamma$ H2AX presentes en los núcleos en fase S por estar relacionados con la replicación del ADN.

### *Aberraciones cromosómicas estructurales (AC) en metafase e índice mitótico (IM)*

Las células se trataron y mantuvieron en medio completo por 26 hs. Se agregó 0,1  $\mu$ g/ml colchicina durante 2-4 hs, las células se recolectaron, se expusieron a una solución hipotónica 0,075 M KCl, se fijaron en 3 metanol: 1 ácido acético y se colorearon con 10 % Giemsa por 2,5 min. Se analizaron las AC (rupturas e intercambios cromatídicos y cromosómicos, figuras de intercambio cromatídico complejos y células altamente dañadas) en 100 metafases por tratamiento. El IM se calculó como el número de metafases en 2.000 núcleos y se expresó como porcentaje. Los valores de las AC y del IM se obtuvieron de 3 experimentos independientes.

#### *Ciclo celular*

Las células se trataron con IDA o ETO y se mantuvieron en medio completo por 26 hs. Se fijaron con 90 % metanol durante 1 h a -20° C, se lavaron en PBS y resuspendieron en PBS conteniendo 200  $\mu$ g/ml RNAsa A (libre de DNAsas) y 10  $\mu$ g/ml IP incubando 30 min a 37° C en oscuridad y se mantuvieron a 4° C hasta el momento de la adquisición mediante citómetro de flujo. Se adquirieron 30.000 células por muestra en 3 experimentos independientes utilizando el software Cell Quest. El análisis del ciclo celular se realizó utilizando el software ModFit.

#### *Ensayo de micronúcleos (MN)*

Las células crecidas sobre cubreobjetos se trataron y mantuvieron en medio completo por 30 hs. Luego se fijaron y permeabilizaron (1 % PFA y 0,25 % Tritón X-100 en PBS) y se procedió a la inmunomarcación para detectar señales  $\gamma$ H2AX (como se detalló previamente) en los MN y la presencia de MN en 2.000 células interfásicas por tratamiento en 4 experimentos independientes.

#### *Estudio del gen MLL mediante hibridación in situ fluorescente (FISH)*

Las células crecidas sobre cubreobjetos se trataron y cultivaron con medio completo durante 30 hs. Luego, se fijaron con 3 metanol: 1 ácido acético durante 20 min y se efectuó la técnica de FISH para determinar la presencia o ausencia del rearrreglo en el gen *MLL*. Para ello se utilizó la sonda de ADN *break apart* (Cytocell) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Los preparados pretratados con pepsina y formaldehído, se lavaron con PBS y deshidrataron en alcoholes crecientes (70, 90 y 100 %). Cada preparado se desnaturalizó con formamida 70 % en

2XSSC a  $72 \pm 1^\circ \text{C}$  durante 3 min y se pasó por alcoholes crecientes (70, 90 y 100 %). Por su parte, la sonda de ADN desnaturalizada a  $72 \pm 1^\circ \text{C}$  se colocó sobre la zona elegida del preparado, se cubrió con un cubreobjeto y se incubó en cámara húmeda y oscura a  $37^\circ \text{C}$  durante 16 hs. Luego, se realizaron lavados en 2X SSC 0,4 % NP40 a  $37^\circ \text{C}$  por 2 min y 2X SSC 0,1 % NP40 a temperatura ambiente por 1 min. Se dejó secar en oscuridad y se contra-coloreó con DAPI. Como control positivo, se utilizó un cultivo de 24 hs de la médula ósea de un paciente (con los requisitos de consentimiento informado debidamente cumplimentados) con LMA confirmada mediante biología molecular (RT-PCR). El paciente era portador de una translocación entre el cromosoma 4 y 11.

#### *Evaluación de células apoptóticas*

Las células se trataron con IDA o ETO y se mantuvieron en medio completo por 30 hs. La caracterización morfológica de apoptosis se determinó usando naranja de acridina (NA)/bromuro de etidio (BE). Suspensiones celulares de 25  $\mu\text{l}$  se mezclaron con 1  $\mu\text{l}$  de la solución NA 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  + BE 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en PBS y se extendieron sobre portaobjetos. Se contaron 200 células por tratamiento en 4 experimentos independientes.

#### *Análisis estadístico*

Las diferencias entre las medias de IF y de focos  $\gamma\text{H2AX}$ , del IM, de MN y apoptosis se analizaron usando el test t de Student. Las AC se evaluaron mediante la prueba de Chi cuadrado (Primer of Biostatistics, version 3.0 by S.A. Glantz, McGraw-Hill, 1992).

## RESULTADOS

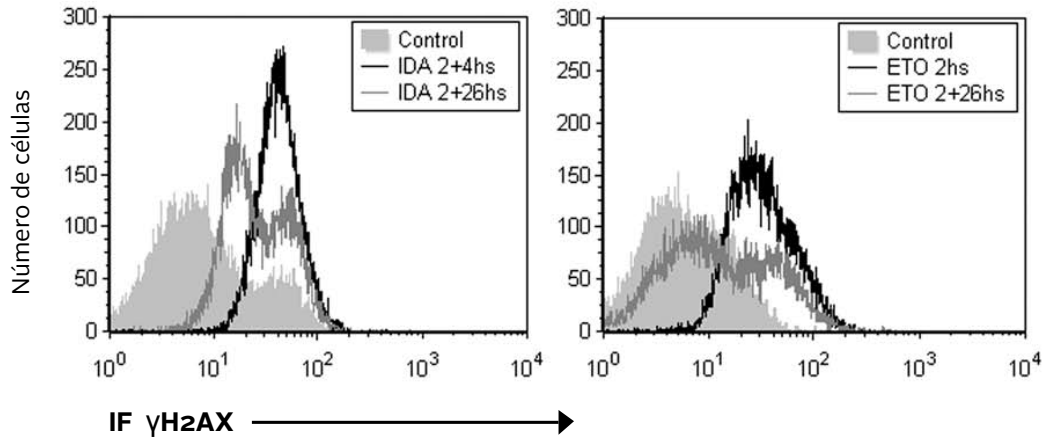
#### *RDC persistentes inducidas por venenos de Top2*

Para analizar la cinética de reparación de las RDC inducidas por IDA o ETO en la línea de fibroblastos humanos normales PTP, se evaluó la IF media de  $\gamma\text{H2AX}$  por citometría de flujo (Tabla 1 y Figura 1). Los valores máximos se obtuvieron a las 4 hs para IDA e inmediatamente para ETO luego de 2 hs de tratamiento. Una disminución de la IF media de  $\gamma\text{H2AX}$  de  $\sim 58\%$  se observó a las 26 hs postratamiento para ambas drogas, permaneciendo una fracción de RDC sin reparar. La determinación del

número de focos  $\gamma\text{H2AX}$  en los núcleos interfásicos por inmunofluorescencia corroboró estos resultados (Figura 2). A las 26 hs, el porcentaje de células sin focos  $\gamma\text{H2AX}$  fue de  $63,4 \pm 5,9\%$ ,  $16,8 \pm 2,4\%$  y  $23,5 \pm 2,1\%$  en el cultivo control, en el tratado con IDA y en el tratado con ETO, respectivamente. El porcentaje de células con  $\geq 20$  focos  $\gamma\text{H2AX}$  por célula fue de  $11,0 \pm 1,4\%$  para IDA y de  $17,0 \pm 3,8\%$  para ETO en relación a  $1,5 \pm 0,7\%$  en los controles. Por otro lado, el análisis del número de focos  $\gamma\text{H2AX}$  por núcleo mostró para IDA un valor de  $4,87 \pm 0,62$  y para ETO de  $4,22 \pm 0,06$ , siendo de  $1,07 \pm 0,04$  focos  $\gamma\text{H2AX}$  por núcleo en los controles ( $p < 0,013$ ).

#### *Los venenos de Top2 causan AC en metafase*

Las RDC persistentes en los núcleos interfásicos pueden dar origen a AC en la metafase inmediata por falta o incorrecta reparación de las mismas. La Tabla 2 muestra un aumento significativo en el porcentaje de metafases anormales en los cultivos tratados con IDA o ETO en comparación a sus respectivos controles. Las principales AC inducidas fueron rupturas cromatídicas y cromosómicas (resultado de RDC sin reparar) y figuras de intercambio cromatídico (debido a una incorrecta reparación de RDC). El efecto clastogénico de IDA y ETO se determinó convirtiendo las AC obtenidas como eventos de rupturas por célula (Figura 3a). Para obtener este cálculo se consideraron a las rupturas cromatídicas y cromosómicas como una ruptura y a los intercambios cromatídicos (cuadrirradiales y trirradiales) y cromosomas dicéntricos o en anillo como dos rupturas. En esta evaluación no se tuvieron en cuenta las figuras de intercambio cromatídico complejo y las células altamente dañadas debido a la dificultad de establecer el número de rupturas involucradas. La Figura 3b muestra los diferentes tipos de AC estructurales inducidas por los venenos de Top2. El aumento de las AC fue acompañado de una marcada reducción del IM (Figura 3c), en particular en los cultivos tratados con IDA, lo cual condicionó el recuento de metafases. El análisis del ciclo celular por citometría de flujo reveló que el IM descendió debido a la acumulación de células en la fase G2/M luego del tratamiento con los venenos de Top2 (Figura 3d). El porcentaje de células en G2/M se incrementó 1,7 veces en el tratamiento con IDA y 1,4 veces con ETO en comparación a sus respectivos controles (considerados como 1).



**Figura 1.** Histogramas representativos de la intensidad de fluorescencia (IF) de  $\gamma$ H2AX inducidas por IDA 0,1 $\mu$ g/ml y ETO 10 $\mu$ g/ml a diferentes tiempos en células humanas normales.

**Tabla 1.** Rupturas de doble cadena ( $\gamma$ H2AX) inducidas por venenos de Top2 en células humanas normales.

Tratamiento	IF media de $\gamma$ H2AX $\pm$ DE
Isotipo	0,43 $\pm$ 0,11
Control	2,01 $\pm$ 0,90
IDA 0,1 $\mu$ g/ml (2+4 hs)	76,45 $\pm$ 3,40*
IDA 0,1 $\mu$ g/ml (2+26 hs)	31,53 $\pm$ 11,89*
ETO 10 $\mu$ g/ml (2 hs)	42,88 $\pm$ 4,39*
ETO 10 $\mu$ g/ml (2+26 hs)	18,04 $\pm$ 6,45*

IF: intensidad de fluorescencia, DE: desvío estándar  
\*p= 0,0001 vs. control, test t de Student.

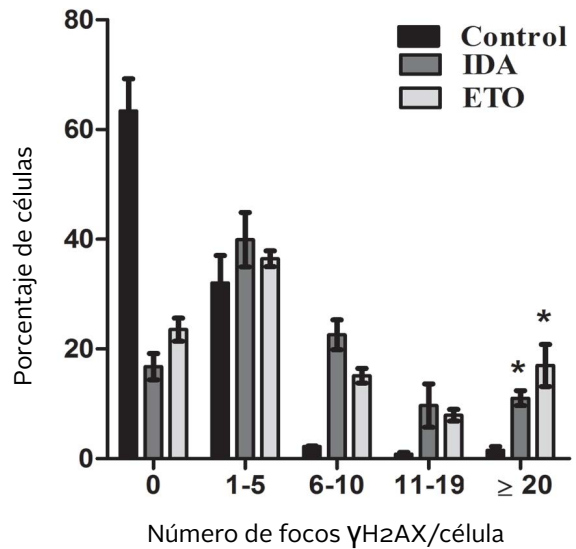
**Tabla 2.** Aberraciones cromosómicas estructurales inducidas por venenos de Top2 en células humanas normales a las 26 hs postratamiento.

Tratamiento	Células contadas	Células anormales (%)	rc	RC	FIC	Dicéntricos	Anillos	FIC complejos (%)	Células altamente dañadas (%)
CONTROL	300	4 (1,3)	4	0	0	0	0	0	0
DMSO 0,5 %	300	6 (2)	6	0	0	0	0	0	0
IDA 0,01 $\mu$ g/ml	150	38 (25,3)*	160	11	55	1	0	5 (3,3)	9 (6,0)
ETO 5 $\mu$ g/ml	300	37 (12,3)*	48	27	52	2	1	4 (1,3)	3 (1,0)

rc: rupturas cromatídicas, RC: rupturas cromosómicas, FIC: figuras de intercambio cromatídico (cuadrirradiales y trirradiales).

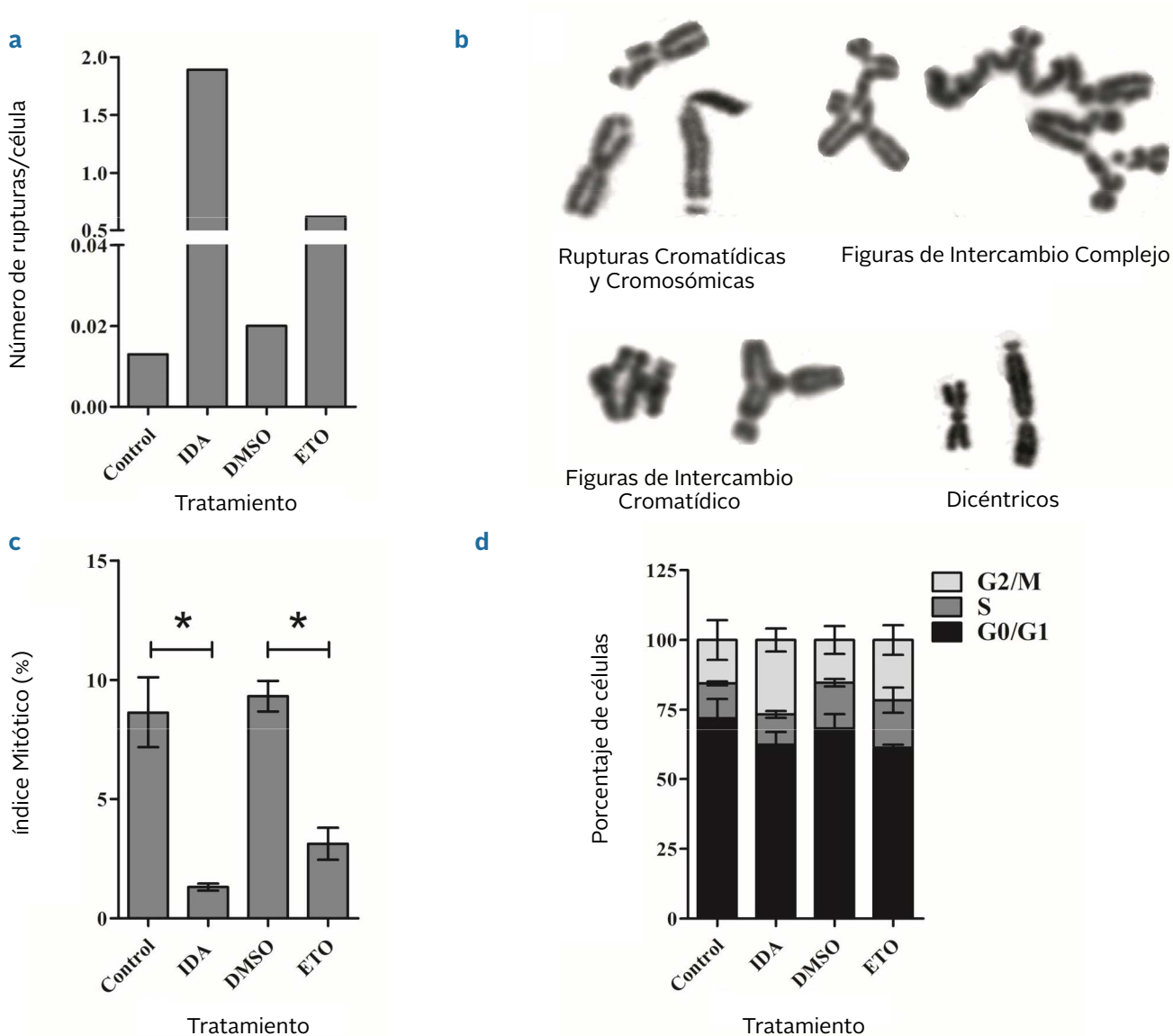
Células altamente dañadas: > 15 rupturas por metafase.

\*p= 0,0001 vs. respectivos controles, prueba de Chi cuadrado.



**Figura 2.** Distribución de rupturas de doble cadena (focos  $\gamma$ H2AX, media  $\pm$ DE) en núcleos interfásicos de células humanas normales tratadas con IDA 0,01 $\mu$ g/ml y ETO 5 $\mu$ g/ml durante 2 hs y analizadas por inmunofluorescencia a las 26 hs postratamiento. Dado que los controles sin tratar y tratados con DMSO 0,5% no mostraron diferencias estadísticamente significativas, los datos fueron agrupados.  
\* p<0,03 vs. control, test t de Student, n=2





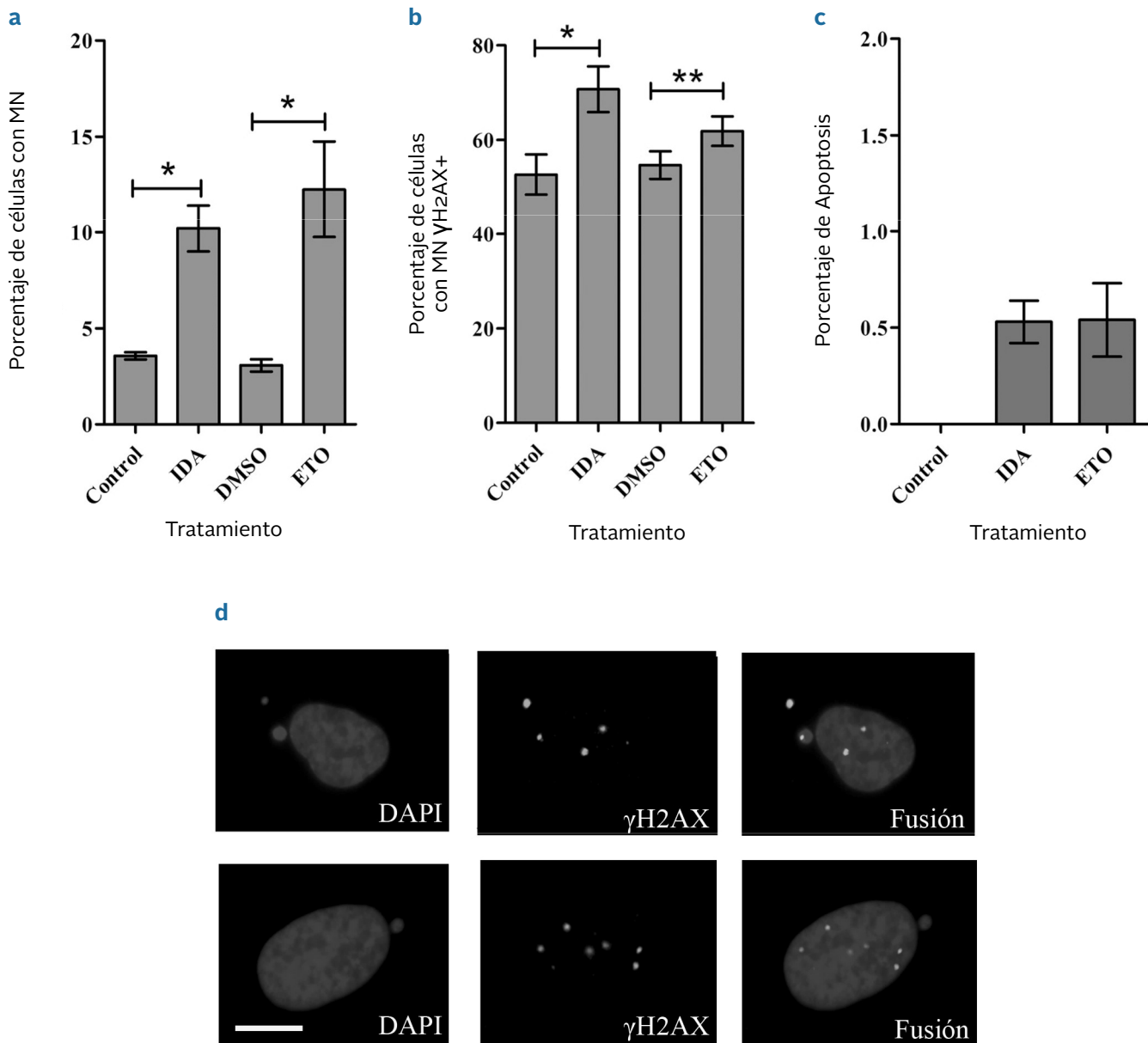
**Figura 3.** a. Rupturas cromosómicas totales por célula, b. Diferentes tipos de aberraciones cromosómicas estructurales, c. Índice mitótico (media $\pm$ DE) y d. Distribución de las poblaciones celulares en el ciclo celular inducidos por IDA 0,01 $\mu$ g/ml y ETO 5 $\mu$ g/ml durante 2 hs y analizados a las 26 hs postratamiento. Rupturas cromosómicas totales: rupturas cromatídicas y cromosómicas se contaron como 1 ruptura y figuras de intercambio cromatídico, cromosomas dicéntricos y en anillo se contaron como 2 rupturas.

\* p=0,0001 vs. controles respectivos, test t de Student.

#### MN inducidos por venenos de Top2 en interfase posmitótica

La progresión del daño cromosómico se determinó analizando los MN y los focos  $\gamma$ H2AX en los MN de células interfásicas posmitóticas a las 30 hs de efectuados los tratamientos (Figura 4). Los MN se forman a partir de cromosomas enteros (efecto aneugénico, MN sin focos  $\gamma$ H2AX) o fragmentos acéntricos (efecto clastogénico, MN con focos  $\gamma$ H2AX) excluidos de los núcleos de las nuevas células durante la anafase mitótica. La Figura 4a muestra un incremento del porcentaje de células micronucleadas entre 3-4 veces luego del tratamiento con IDA o ETO comparado con sus controles. Además, ambas drogas aumentaron el porcentaje de células micronucleadas con

focos  $\gamma$ H2AX (Figura 4b). De los MN inducidos por IDA, el 70,7  $\pm$  4,8 % presentó focos  $\gamma$ H2AX, mientras que en el control sin tratar el 52,7  $\pm$  4,3 % de los MN tenían señal  $\gamma$ H2AX. Por otro lado, en el tratamiento con ETO, el 61,9  $\pm$  3,1 % de los MN mostraron focos  $\gamma$ H2AX, siendo este valor de 54,7  $\pm$  2,9 % en el control tratado con DMSO. Estos resultados indicaron que los venenos de Top2 inducen MN cuyo origen es, en su mayor parte, clastogénico. En la Figura 4d se muestran MN con y sin focos  $\gamma$ H2AX. Por otro lado, a las concentraciones usadas de IDA y ETO se indujo un ligero aumento del porcentaje de células apoptóticas en relación a los controles, donde no se observó este efecto (Figura 4c).



**Figura 4.** a. Células con micronúcleos (MN) (media±DE), b. Células con MN conteniendo focos γH2AX (media±DE), c. Células apoptóticas (media±DE) inducidas por IDA 0,01μg/ml y ETO 5μg/ml durante 2 hs y analizadas a las 30 hs postratamiento y d. Núcleo con MN conteniendo focos γH2AX (arriba) y núcleo con MN sin focos γH2AX (abajo). Barra de escala: 10μm.

\* p=0,001 vs. controles respectivos. \*\* p=0,013 vs. control tratado con DMSO 0,5%, test t de Student.

#### Rearreglos del gen *MLL* inducido por venenos de *Top2*

Los rearreglos cromosómicos recíprocos involucrando al gen *MLL* están asociados al desarrollo de LMA debido al uso de quimioterapias con venenos de *Top2*. Estos rearreglos son el resultado de errores en la reparación de las RDC persistentes. Los núcleos interfásicos de fibroblastos humanos normales tratados con IDA o ETO se analizaron a las 30 hs mediante la técnica de FISH. La sonda de ADN

dual color está diseñada de forma tal que flanquea al gen *MLL* y cuando se separa se considera que ha ocurrido un rearreglo del mismo. Ambos tratamientos indujeron rearreglos de este gen *MLL* revelados por la separación de las señales, mientras que en los cultivos controles se observó una estructura normal del mismo. El control positivo, médula ósea de un paciente con LMA, presentó el rearreglo en todas las células analizadas (Tabla 3).

**Tabla 3.** Núcleos con rearrreglos (señal *split*) del gen *MLL* inducidos por venenos de Top2 en células humanas normales a las 30 hs postratamiento.

Tratamiento	Células contadas	Núcleos con señal <i>MLL split</i>
Control	400	0
IDA 0,01 $\mu\text{g/ml}$	400	3
ETO 5 $\mu\text{g/ml}$	400	8
Control positivo (t-LMA)	100	100

## DISCUSIÓN

Los venenos de Top2 actúan estabilizando los complejos de clivaje ADN-enzima, impidiendo la reunión de los extremos de ADN rotos y generando numerosas RDC para eliminar las células con activa proliferación (McClendon y Osheroff, 2007). Su uso está asociado a la aparición de neoplasias secundarias en los pacientes tratados (Cowell y Austin, 2012; Pendleton *et al.*, 2014). Además, estas drogas dañan al ADN de células normales, lo cual conduce a la formación de rearrreglos cromosómicos y al posible desarrollo de un nuevo tumor.

Las células humanas cuentan con dos mecanismos de reparación de las RDC para prevenir que estas lesiones se perpetúen: la vía de reunión de extremos no homólogos (*non-homologous end joining*, NHEJ) y la vía de recombinación homóloga (*homologous recombination*, HR). La principal diferencia entre ambas está en que NHEJ opera en forma rápida, aunque está sujeta a cometer errores y HR actúa en forma lenta pero es una vía precisa. Mientras que HR utiliza la cromátida hermana para restaurar la información original en la molécula dañada; NHEJ reúne los extremos rotos sin necesidad de homología originando mutaciones como sustitución de bases, inserciones o deleciones, en los sitios de la lesión (Shrivastav *et al.*, 2008).

Nuestros resultados previos establecieron la contribución de ambas vías en la reparación de las RDC inducidas por los venenos de Top2 IDA y ETO en fibroblastos humanos normales (de Campos-Nebel *et al.*, 2010). En este sentido y con el fin de profundizar los resultados obtenidos se evaluó el daño residual presente en los fibroblastos humanos por citometría de flujo. Se observó que la máxima inducción de RDC se alcanzó a las 4 hs o inmediatamente luego del tratamiento durante 2 hs para IDA y ETO, respectivamente,

y que existió una disminución por reparación de las mismas hacia las 26 hs, permaneciendo una parte de las lesiones sin reparar. Asimismo, la cuantificación de focos  $\gamma\text{H2AX}$  en núcleos interfásicos por inmunofluorescencia confirmó la presencia de RDC persistentes en el ADN luego de 26 hs.

La fosforilación de la histona H2AX en serina 139,  $\gamma\text{H2AX}$ , es un evento temprano en la reparación de las RDC y el recuento de los focos  $\gamma\text{H2AX}$ , es usado como un marcador biológico de estas rupturas (Scully y Xie, 2013).

La falta o la incorrecta reparación de las RDC llevan a la formación de AC estructurales. Durante *et al.* (2013) establecieron que las RDC sin reparar aparecen en la mitosis como rupturas en el cromosoma y las RDC erróneamente reunidas producirán aberraciones de tipo intercambio intra- o entre cromosomas. Los venenos de Top2 causaron fundamentalmente un aumento de rupturas cromatídicas y cromosómicas y de figuras de intercambio cromatídico en las metafases evaluadas a las 26 hs postratamiento. El daño cromosómico inducido afectó la dinámica del ciclo celular y las células se acumularon en la fase G2/M, con la consiguiente reducción del número de metafases analizables.

Löbrich *et al.* (2010) reportaron que la duración del arresto en G2 depende de la dosis de las radiaciones y de la capacidad de reparación de las células. Sin embargo, este arresto no se mantiene hasta completar la reparación de las RDC. Se ha observado que fibroblastos humanos normales expuestos a rayos X son liberados del punto de control G2/M con  $\sim 20$  focos  $\gamma\text{H2AX}$  por núcleo. En este sentido, se estimó que  $\sim 1$  de 10 RDC inducidas puede visualizarse como 1 ruptura cromosómica mitótica (Deckbar *et al.*, 2007).

La persistencia posmitótica de daño en el ADN llevará a inestabilidad genómica. Para evaluar la progresión del daño persistente se analizaron los MN presentes en interfase luego de 30 hs de realizados los tratamientos. Ambas drogas, IDA y ETO, indujeron un aumento en el porcentaje de células micronucleadas. Resultados similares se obtuvieron con venenos de Top2 en células de hámster chino CHO9 y V79 (Wang *et al.*, 2007; Elguero *et al.*, 2012).

El tipo de aberración cromosómica contenida en los MN depende del agente inductor (Norppa y Falck, 2003). Los venenos de Top2 promueven tanto aberraciones cromosómicas estructurales como numéricas (Degrassi *et al.*, 2004). En base a ello, se determinó el origen de los MN mediante inmunofluorescencia para detectar la presencia o no de focos  $\gamma\text{H2AX}$  en los mismos. Los resultados



mostraron que la mayoría de los MN inducidos por IDA y ETO poseían señales  $\gamma$ H2AX en relación a sus respectivos controles, donde el porcentaje de MN con señales  $\gamma$ H2AX fue cercano al 50 %. Esto concuerda con que los MN inducidos por los venenos de Top2 contienen fragmentos acéntricos provenientes de rupturas en los cromosomas o en los puentes nucleoplásmicos originados a partir de figuras de intercambio cromatídico o cromosómico. Además, el tratamiento con IDA provocó más rupturas cromosómicas por metafase que ETO y esto se manifestó en un porcentaje más alto de MN con focos  $\gamma$ H2AX.

Así, las células con daño cromosómico alcanzaron la siguiente interfase. A su vez, en estas células interfásicas se pueden formar rearrreglos cromosómicos. Las translocaciones entre cromosomas representan el producto final de una serie de eventos celulares erróneos. Entre ellos, la presencia concomitante de RDC sin reparar, la reunión inadecuada de estas lesiones y la proximidad espacial y/o la relocalización de los extremos rotos de cromosomas diferentes dentro del espacio nuclear (Iarovaia *et al.*, 2014; Roukos y Misteli, 2014).

Numerosa evidencia clínica muestra una clara relación entre exposición previa a venenos de Top2 y el desarrollo subsecuente de t-LMA caracterizada por la translocación del gen *MLL* ubicado en la banda cromosómica 11q23 (Felix *et al.*, 2006; Le *et al.*, 2009; Leone *et al.*, 2010; Cowell y Austin, 2012; Pendleton *et al.*, 2014). Además, muchos de los rearrreglos aislados de los pacientes con t-LMA se localizan dentro de una región de 8,3 kb (*breakpoint cluster region*) que contiene secuencias de reconocimiento de clivaje de la enzima Top2 y elementos repetitivos (Nakada *et al.*, 2006; Sung *et al.*, 2006).

Teniendo en cuenta estos hallazgos, se evaluó la presencia de rearrreglos del gen *MLL* en núcleos interfásicos posmitóticos a las 30 hs. Los resultados obtenidos indicaron que los venenos de Top2 causaron rearrreglos cromosómicos en los fibroblastos humanos normales.

Las lesiones inducidas por IDA o ETO no generaron un daño genético masivo capaz de desencadenar procesos de muerte celular por apoptosis en forma substancial. Estos resultados son similares a los obtenidos en un trabajo previo de nuestro grupo (de Campos-Nebel *et al.*, 2010). Las concentraciones empleadas en la presente investigación son bajas (subletales) en relación a la hallada en el plasma de los pacientes tratados con ETO (Soubeyrand *et al.*, 2010).

La inestabilidad genómica es una característica fundamental de las células tumorales. La acumulación progresiva de mutaciones somáticas o translocaciones durante sucesivos ciclos celulares es un rasgo propio de la transformación maligna (Helleday *et al.*, 2014). A diferencia de este proceso gradual, se ha descrito recientemente el fenómeno de cromotripsis. Este fenómeno ocurre cuando un cromosoma se fragmenta en varias partes en un solo paso (*all at once*) y se vuelve a reunir mediante reparación por NHEJ en un orden aleatorio durante un único ciclo celular (Zhang *et al.*, 2015). Este evento está presente en muchos tipos de cánceres evidenciado al secuenciar el genoma de las células tumorales (Stephens *et al.*, 2011; Kloosterman y Cuppen, 2013).

Hatch y Hetzer (2015) mostraron la existencia de un nexo entre cromotripsis y MN. Los MN pueden ser descartados de la célula con la consiguiente pérdida de cromatina. Sin embargo, en otros estudios se observó su reincorporación al núcleo permaneciendo durante varias generaciones celulares (Terradas *et al.*, 2010; Crasta *et al.*, 2012). La cromatina de estos MN puede fragmentarse e integrarse al genoma celular. Crasta *et al.* (2012) reportaron que existe la posibilidad que el daño adquirido en el MN pueda causar translocaciones, aunque a una frecuencia baja (~1/100 núcleos por generación).

En resumen, ambas alteraciones cromosómicas, los MN y los rearrreglos del gen *MLL* observadas en células humanas normales generadas por IDA y ETO pueden contribuir al proceso tumorigénico como es la aparición de neoplasias secundarias en pacientes tratados con regímenes que involucran a los venenos de Top2.

## BIBLIOGRAFÍA

- Azarova A.M., Lyu Y.L., Lin C.P., Tsai Y.C., Lau J.Y., Wang J.C., Liu L.F. (2007) Roles of DNA topoisomerase II isozymes in downloded from chemotherapy and secondary malignancies. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 104: 11014-11019.
- Chen W., Qiu J., Shen Y.M. (2012) Topoisomerase II $\alpha$ , rather than II $\beta$ , is a promising target in development of anti-cancer drugs. Drug Discov. Ther. 6: 230-237.
- Cowell I.G., Austin C.A. (2012) Mechanism of generation of therapy related leucemia in response to anti-

- topoisomerase II agents. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 9: 2075–2091.
- Crasta K., Ganem N.J., Dagher R., Lantermann A.B., Ivanova E.V., Pan Y., Nezi L., Protopopov A., Chowdhury D., Pellman D. (2012) DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. *Nature* 482: 53–58.
- de Campos-Nebel M., Larripa I., González-Cid M. (2010) Topoisomerase II-mediated DNA damage is differently repaired during the cell cycle by non-homologous end joining and homologous recombination. *PLoS One* 5: e12541.
- Deckbar D., Birraux J., Krempler A., Tchouandong L., Beucher A., Walker S., Stiff T., Jeggo P., Löbrich M. (2007) Chromosome breakage after G2 checkpoint release. *J. Cell. Biol.* 176: 749–755.
- Degrassi F., Fiore M., Palitti F. (2004) Chromosomal aberrations and genomic instability induced by topoisomerase-targeted antitumour drugs. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* 4: 317–325.
- Deweese J.E., Osheroff N. (2009) The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing. *Nucleic Acids Res.* 37: 738–748.
- Durante M., Bedford J.S., Chen D.J., Conrad S., Cornforth M.N., Natarajan A.T., van Gent D.C., Obe G. (2013) From DNA damage to chromosome aberrations: Joining the break. *Mutat. Res.* 756: 5–13.
- Elguero M.E., de Campos-Nebel M., González-Cid M. (2012) DNA-PKcs-dependent NHEJ pathway supports the progression of topoisomerase II poison-induced chromosome aberrant cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 53: 608–618.
- Elliott B., Jasin M. (2002) Double-strand breaks and translocations in cancer. *Review Cell. Mol. Life Sci.* 59: 373–385.
- Felix C.A., Kolaris C.P., Osheroff N. (2006) Topoisomerase II and the etiology of chromosomal translocations. *Review DNA Repair* 5: 1093–1108.
- Hande K.R. (1998) Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur. J. Cancer* 34: 1514–1521.
- Hatch E.M., Hetzer M.W. (2015) Linking Micronuclei to Chromosome Fragmentation. *Cell* 161: 1502–1504.
- Heisig P. (2009) Type II topoisomerases-inhibitors, repair mechanisms and mutations. *Mutagenesis* 24: 465–469.
- Helleday T., Eshtad S., Nik-Zainal S. (2014) Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers. *Nature Rev. Genet.* 15: 585–598.
- Hollingshead L.M., Faulds D. (1991) Idarubicin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in the chemotherapy of cancer. *Review Drugs* 42: 690–719.
- Iarovaia O.V., Rubtsov M., Ioudinkova E., Tsfasman T., Razin S.V., Vassetzky Y.S. (2014) Dynamics of double strand breaks and chromosomal translocations. *Review Mol. Cancer* 13: 249.
- Kloosterman W.P., Cuppen E. (2013) Chromothripsis in congenital disorders and cancer: similarities and differences. *Review Curr. Opin. Cell. Biol.* 25: 341–348.
- Le H., Singh S., Shih S.J., Du N., Schnyder S., Loredó G.A., Bien C., Michaelis L., Toor A., Diaz M.O., Vaughan A.T. (2009) Rearrangements of the MLL gene are influenced by DNA secondary structure, potentially mediated by topoisomerase II binding. *Genes Chromosomes Cancer* 48: 806–815.
- Leone G., Fianchi L., Pagano L., Voso M.T. (2010) Incidence and susceptibility to therapy-related myeloid neoplasms. *Chem. Biol. Interact.* 184: 39–45.
- Löbrich M., Shibata A., Beucher A., Fisher A., Ensminger M., Goodarzi A.A., Barton O., Jeggo P.A. (2010)  $\gamma$ H2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle* 9: 662–669.
- McClendon A.K., Osheroff N. (2007) DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. *Review Mutat. Res.* 623: 83–97.

- Nakada S., Katsuki Y., Imoto I., Yokoyama T., Nagasawa M., Inazawa J., Mizutani S. (2006) Early G2/M checkpoint failure as a molecular mechanism underlying etoposide-induced chromosomal aberrations. *J. Clin. Invest.* 116: 80-89.
- Nitiss J.L. (2009) Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 9: 338-350.
- Norppa H., Falck G.C. (2003) What do human micronuclei contain? *Review Mutagenesis* 18: 221-233.
- Pendleton M., Lindsey R.H.Jr., Felix C.A., Grimwade D., Osheroff N. (2014) Topoisomerase II and leukemia. *Review Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1310: 98-110.
- Roukos V., Misteli T. (2014) The biogenesis of chromosome translocations. *Nat. Cell. Biol.* 16: 293-300.
- Scully R., Xie A. (2013) Double strand break repair functions of histone H2AX. *Review Mutat. Res.* 750: 5-14.
- Shrivastav M., De Haro L.P., Nickoloff J.A. (2008) Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res.* 18: 134-147.
- Soubeyrand S., Pope L., Haché R.J. (2010) Topoisomerase II $\alpha$ -dependent induction of a persistent DNA damage response in response to transient etoposide exposure. *Mol. Oncol.* 4: 38-51.
- Stephens P.J., Greenman C.D., Fu B., Yang F., Bignell G.R., Mudie L.J., Pleasance E.D., Lau K.W., Beare D., Stebbings L.A., McLaren S., Lin M.L., McBride D.J., Varela I., Nik-Zainal S., Leroy C., Jia M., Menzies A., Butler A.P., Teague J.W., Quail M.A., Burton J., Swerdlow H., Carter N.P., Morsberger L.A., Iacobuzio-Donahue C., Follows G.A., Green A.R., Flanagan A.M., Stratton M.R., Futreal P.A., Campbell P.J. (2011) Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* 144: 27-40.
- Sung P.A., Libura J., Richardson C. (2006) Etoposide and illegitimate DNA double-strand break repair in the generation of MLL translocations: new insights and new questions. *Review DNA Repair* 5: 1109-1118.
- Terradas M., Martín M., Tusell L., Genescà A. (2010) Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? *Mutat. Res.* 705: 60-67.
- Wang L., Roy S.K., Eastmond D.A. (2007) Differential cell cycle-specificity for chromosomal damage induced by merbarone and etoposide in V79 cells. *Mutat. Res.* 616: 70-82.
- Zhang C.Z., Spektor A., Cornils H., Francis J.M., Jackson E.K., Liu S., Meyerson M., Pellman D. (2015) Chromothripsis from DNA damage in micronuclei. *Nature* 522: 179-184.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por subsidios de la Fundación A.J. Roemmers y por el PIP-0114/14 de CONICET.