

Facultat de Medicina i Odontologia
Departamento de Fisiología

TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA DISQUERATOSIS CONGÉNITA



Presentada por:
Carme Pérez Quilis

Dirigida por:
Prof. Dr. Federico Pallardó Calatayud
Dr. José Luis García Giménez
Dra. Rosario Perona Abellón

Facultat de Medicina i Odontologia
Departamento de Fisiología

TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA DISQUERATOSIS CONGÉNITA

Presentada por:
Carme Pérez Quilis

Dirigida por:
Prof. D. Federico Pallardó Calatayud
D. José Luis García Giménez
Dra. Rosario Perona Abellón

ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA DISQUERATOSIS CONGÉNITA

Carme Pérez Quilis

Prof. D. Federico V. Pallardó Calatayud, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

D. José Luis García Giménez, Doctor por la Universidad de Valencia.

Prof. Dra. Rosario Perona Abellón.

CERTIFICAN:

Que Dña. Carme Pérez Quilis, Licenciada en Farmacia y Máster en Fisiología por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su dirección la presente tesis titulada:

ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA DISQUERATOSIS CONGÉNITA

Para la obtención del título de Doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman la presente certificación.

Fdo. D. Federico V. Pallardó Calatayud

Fdo. D. José Luis García Giménez

Fdo. Rosario Perona Abellón

Las cosas no se dicen, se hacen porque al hacerlas se dicen solas... pero por si acaso:

A los directores de esta tesis:

A **Fede**, muchas gracias por guiarme en la tesis, pero sobre todo gracias por tu comprensión e inestimable apoyo en mis proyectos, sin tu ayuda no lo habría conseguido.

A **José Luis**, creo que ya no tengo que decir nada... más que director, amigo!

A **Rosario**, muchas gracias por querer compartir conmigo este proyecto y por ayudarme a que esta tesis quede "casi" perfecta.

A **Isa, Amparo, Gemita, Ana, Santi y Marta** gracias a todos los "raritos" como yo. Muchas gracias por vuestra ayuda a lo largo de esta tesis, han sido muchos buenos momentos que hemos pasado y que se quedarán en mi memoria.

A **Edu** (exrarito) y a **Sergio** (medio rarito) gracias por haberme hecho el camino de la tesis más llevadero y corto con vuestros chistes y sonrisas.

A **Paco, Jelena, Sonia, Mar y Consuelo** por ayudarme y enseñarme siempre con paciencia y cariño.

A **Eva, Elena y Mari**... Ay! lo solucionáis todo! Menos mal que estáis ahí siempre porque si no, no sé dónde terminaríamos!

A **Meri, Ana Brasil y Lele**, por haber sido tan buenas conmigo, siempre haberme ayudado cuando lo he necesitado y por vuestros buenos consejos.

A **Vladi, Helios, Thomas y Gloria** que momentos tan divertidos en el "labo" y fuera de él, gracias amigos!

AGRADECIMIENTOS

A **Pepe, Chelo, Juan, Raúl y Rubén** por abrirme las puertas a la investigación y enseñarme todo lo necesario para empezar bien una tesis. Ah! y esa papilla de moscas no se me olvidará!

A **Antonio Alberola y Luis Such** por vuestro continuo interés, apoyos y ánimos.

A la meua família i amics:

A les meues **amigues** i **amics** per ajudar-me, sentir-me i animar-me sempre a seguir.

Al vostre costat es fa fàcil perseguir les il·lusions.

Als meus **tios, cosins, germà i nebodes** gràcies per sempre estar ahí i creure en mi, saber que sempre vos tinc, me dona forces per a fer-ho tot.

A la meua **iaia** per voler-me tant i per ensenyar-me tantes coses bones, gràcies.

A **Anni**, la meua germana, com podria alegrar-me d'haver conclòs aquest projecte i els que vindran si no et tinguera per a compartir-ho? Gràcies Annita.

Als meus **pare**s perquè senzillament, sense ells res de res és possible i perquè gràcies a ells tot és fa possible.

A **Fabián**, que m'has mostrat que si fas tot el necessari per a aconseguir el que vols ho acabes conseguint!

Gracias a todos por ayudarme a conseguir la realización de esta tesis.

ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN MODELOS CELULARES
DE DISQUERATOSIS CONGÉNITA

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	19
I. INTRODUCCIÓN	23
1. ENFERMEDADES RARAS	24
2. DISQUERATOSIS CONGÉNITA	24
2.1. Disqueratosis congénita ligada al cromosoma X	28
2.2. Disqueratosis congénita y telómero	28
3. TELÓMERO Y TELOMERASA	29
4. ESTRÉS OXIDATIVO	33
4.1. Radicales libres	33
4.2. Estrés oxidativo	39
4.3. Antioxidantes fisiológicos	40
4.4. Reparación del daño por estrés oxidativo	44
5. ALTERACIONES EPIGENÉTICAS EN DISQUERATOSIS CONGÉNITA	
LIGADA AL CROMOSOMA X	49
5.1. Estrés oxidativo y cromatina	49
5.2. Envejecimiento y cromatina	51
II. OBJETIVOS	53
1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55

III. MATERIALES Y MÉTODOS	57
1. CULTIVOS CELULARES	58
2. DETERMINACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR	60
3. DETERMINACIONES DEL PERFIL DE ESTRÉS OXIDATIVO	61
3.1. Niveles de superóxido $O_2^{\cdot-}$	61
3.2. Niveles de malondialdehído (MDA) por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	62
4. PURIFICACIÓN DE HISTONAS A PARTIR DE CULTIVO CELULAR	62
5. DETERMINACIONES DE GSH y γ -H2AX POR MICROSCOPIA CONFOCAL	63
1) Análisis del GSH celular y su localización sub-celular en las células de pacientes con disqueratosis congénita transfectadas (24.2. y pLNCX)	63
2) γ -H2AX en fibroblastos de pacientes con disqueratosis congénita	64
3) Metilación lisina 9 de la histona H3 en células de pacientes con disqueratosis congénita transfectadas (24.2 y pLNCX)	65
6. CUANTIFICACIÓN DE GENES POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	66
1) Aislamiento y cuantificación de ARN	66
2) RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction)	66
3) Real time PCR o q-PCR	67

7. MEDICIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES POR EL MÉTODO DE LOWRY	70
8. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS ANTIOXIDANTES POR WESTERN BLOTTING	70
9. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS ANTIOXIDANTES	73
9.1. Actividad Gpx mediante el kit Glutathione Peroxidase Assay kit (Cayman)	73
9.2. Actividad catalasa	74
9.3. Actividades Superóxido dismutasa mediante el kit <i>"superoxide dismutase assay" (Cayman Chemical)</i>	76
- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	79
IV. RESULTADOS	81
- PACIENTES DE DISQUERATOSIS CONGÉNITA	82
1. EXPRESIÓN DEL GEN DKC1 EN PACIENTES CON DC LIGADA AL CROMOSOMA X	82
2. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE RADICAL SUPERÓXIDO	86
3. ESTUDIO DE LAS DEFENSAS ANTIOXIDANTES EN FIBROBLASTOS DE PACIENTES DE DISQUERATOSIS CONGÉNITA LIGADA AL CROMOSOMA X	89
3.1. CuZnSOD: Estudio de la actividad enzimática y de la expresión mediante QRT-PCR y western blot	89
3.2. MnSOD: Estudio de la actividad enzimática y de la expresión mediante QRT-PCR y western blot	93

3.3. Catalasa: Estudio de la actividad enzimática y de la expresión mediante QRT-PCR y western blot	98
3.4. Glutación peroxidasa: Estudio de la actividad enzimática y de la expresión mediante QRT-PCR y western blot	102
4. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL ADN EN FIBROBLASTOS DE PACIENTES CON DISQUERATOSIS CONGÉNITA LIGADA AL CROMOSOMA X	109
4.1. Determinación de γ -H2AX mediante microscopia confocal	109
4.2. RAD53	111
4.3. RAD51	114
4.4. Determinación de la 8-oxoguanina ADN glicosilasa (HOGG1)	117
4.5. Determinación de PARP-1	120
4.6. Determinación de lisina oxidasa (LOX)	123
- CÉLULAS DE PACIENTES CON DISQUERATOSIS CONGÉNITA LIGADA AL CROMOSOMA X TRANSFECTADAS CON EL INSERTO QUE RESTABLECE LA ACTIVIDAD TELOMERASA (24.2), Y LAS CÉLULAS TRANSFECTADAS CON EL VECTOR VACÍO (pLNCX)	126
1. ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR	127
2. ANÁLISIS DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO	128
3. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE MALONDIALDEHÍDO (MDA)	129
4. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE GSH CELULAR	130

5. ESTUDIO DE LAS DEFENSAS ANTIOXIDANTES EN CÉLULAS DE PACIENTES DE DISQUERATOSIS CONGÉNITA TRANSFECTADAS	
24.2. Y pLNCX	132
5.1. CuZnSOD: estudio de la actividad enzimática y de la expresión mediante qRTPCR y western blot	132
5.2. MnSOD: estudio de la actividad enzimática y de la expresión mediante qRTPCR y western blot	135
5.3. Catalasa: estudio de la actividad enzimática y de la expresión mediante QRTPCR y western blot	138
6. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL ADN	141
6.1. Determinación de γ -H2AX mediante western blot	141
6.2. RAD53	142
6.3. RAD51	143
6.4. HOGG1	144
6.5. PARP1	145
- ALTERACIONES EPIGENÉTICAS EN DISQUERATOSIS CONGÉNITA LIGADA AL CROMOSOMA X: pLNCX y 24.2	146
1. El restablecimiento de la actividad telomerasa origina cambios en los niveles de acetilación de las histonas	146
2. El restablecimiento de la actividad telomerasa origina cambios en los niveles de metilación de las histonas	148

3. El restablecimiento de la actividad telomerasa origina disminución en la carbonilación de la histona H1	150
V. DISCUSIÓN	153
- FIBROBLASTOS DE PACIENTES CON DC LIGADA AL CROMOSOMA X	155
- FIBROBLASTOS DE PACIENTES CON DC LIGADA AL CROMOSOMA X TRANSFECTADAS CON EL INSERTO QUE RESTABLECE LA ACTIVIDAD TELOMERASA (24.2), Y LAS CÉLULAS TRANSFECTADAS CON EL VECTOR VACÍO (pLNCX)	169
- Evaluación de los parámetros de estrés oxidativo	170
- ALTERACIONES EPIGENÉTICAS DE LA DC LIGADA AL CROMOSOMA X	183
- LIMITACIONES DEL ESTUDIO	186
VI. CONCLUSIONES	189
VII. BIBLIOGRAFÍA	193

ÍNDICE DE TABLAS

- <i>Tabla I.1. Características clínicas generales en DC y porcentaje de pacientes que presentan alguna de estas características</i>	26
- <i>Tabla I.2. Tipos de Superóxido dismutasa</i>	41
- <i>Tabla III.1. Nomenclatura y características generales de las células estudiadas en la primera parte de la tesis</i>	58
- <i>Tabla III.2. Programación del termociclador, para poder realizar la RT-PCR</i>	67
- <i>Tabla III.3. Especificaciones de los oligos usados y sus respectivos códigos</i>	68
- <i>Tabla III.4. Programación del termociclador para realizar la q-PCR</i>	69
- <i>Tabla III.5. Resumen de las cantidades utilizadas para la curva de calibrado</i>	78

ÍNDICE DE FIGURAS

- <i>Figura I.1. Fotografías de enfermos de DC con distrofia ungueal y leucoplasia en la mucosa oral</i>	25
- <i>Figura I.2. Modelo para los complejos telomerasa y "shelterin"</i>	27
- <i>Figura I.3. Actividad telomerasa y expresión de hTERT y hTERC en fibroblastos X-DC transfectados con el plásmido pLNCX y el elemento 24.2</i>	32
- <i>Figura I.4. Cadena de transporte electrónico mitocondrial</i>	36
- <i>Figura I.5. Esquema de degradación de las purinas</i>	38

- <i>Figura I.6. Ciclo Redox del glutatión</i>	44
- <i>Figura I.7. Mecanismo de interacción entre hOGG1 y el sustrato 8-oxodG</i>	47
- <i>Figura I.8. Acción de PARP-1 después del daño al ADN</i>	48
- <i>Figura IV.1. Expresión del gen DKC1 en líneas de fibroblastos de pacientes de X-DC determinados mediante qRTPCR</i>	83-84
- <i>Figura IV.2. Análisis de los niveles del radical superóxido mediante detección con dihidroetidio</i>	86-88
- <i>Figura IV.3. Estudio de la expresión y la actividad de la enzima CuZnSOD en X-DC</i>	90-92
- <i>Figura IV.4. Estudio de la expresión y la actividad la enzima MnSOD en X-DC</i>	84-97
- <i>Figura IV.5. Estudio de la expresión y de la actividad de la enzima catalasa en X-DC</i>	99-101
- <i>Figura IV.6. Estudio de la expresión y de la actividad de la enzima GPX en X-DC</i>	103-108
- <i>Figura IV.7. Distribución de γ-H2AX de las células AD respecto al Control 1 y Control 2</i>	110
- <i>Figura IV.8. Expresión del gen RAD53 en líneas de fibroblastos de pacientes de X-DC determinados mediante qRTPCR</i>	112-113
- <i>Figura IV.9. Expresión del gen RAD51 en líneas de fibroblastos de pacientes de X-DC determinados mediante qRTPCR</i>	115-116

- <i>Figura IV.10. Expresión del gen HOGG1 en líneas de fibroblastos de pacientes de X-DC determinados mediante qRTPCR</i>	118-119
- <i>Figura IV.11. Expresión del gen PARP1 en líneas de fibroblastos de pacientes de X-DC determinados mediante qRTPCR</i>	121-122
- <i>Figura IV.12. Expresión del gen LOX en líneas de fibroblastos de pacientes de X-DC determinados mediante qRTPCR</i>	124-125
- <i>Figura IV.13. Estudio de la proliferación celular</i>	127
- <i>Figura IV.14. Niveles de radical superóxido determinados por fluorimetría con la sonda dihidroetidio en células confluentes</i>	128
- <i>Figura IV.15. Niveles de MDA en células pLNCX y 24.2 confluentes</i>	129
- <i>Figura IV.16. Niveles de GSH celulares determinados mediante el método enzimático de la GSH transferasa a los 5 días</i>	130
- <i>Figura IV.17. Distribución del contenido de GSH celular con la sonda CMFDA por microscopia confocal</i>	131
- <i>Figura IV.18. Estudio de los niveles y de la actividad de la enzima CuZnSOD en las líneas pLNCX y 24.2</i>	132-134
- <i>Figura IV.19. Estudio de los niveles y de la actividad de la enzima MnSOD en las líneas pLNCX y 24.2</i>	135-137
- <i>Figura IV.20. Estudio de los niveles y de la actividad de la enzima catalasa</i>	138-140
- <i>Figura IV.21. Estudio del γ-H2AX mediante western blot</i>	141
- <i>Figura IV.22. Estudio de la expresión del gen RAD53</i>	142

- <i>Figura IV.23. Estudio de la expresión del gen RAD51</i>	143
- <i>Figura IV.24. Estudio de la expresión del gen HOGG1</i>	144
- <i>Figura IV.25. Estudio de la expresión del gen PARP1</i>	145
- <i>Figura IV.26. Análisis de los niveles de acetilación de Lisinas en las histonas H3, H4 y H2B obtenidas de células pLNCX y células 24.2</i>	147
- <i>Figura IV.27. Análisis de los niveles de lisina trimetilada en la lisina 9 de la histona H3 de células pLNCX y células 24.2</i>	149
- <i>Figura IV.28. Análisis de los niveles de carbonilación de las histonas obtenidas de células pLNCX y células 24.2</i>	151
- <i>Esquema V.I. Procesos que conllevan a la disfunción telomérica e inestabilidad genética estudiados en esta tesis</i>	158
- <i>Figura V.1. Diagrama de la disposición de las proteínas del telosoma de los telómeros</i>	163
- <i>Esquema V.II. Rutas de señalización celular mediadas por el inserto GSE24.2 que inducen la recuperación de la disfunción telomérica y disminuyen la inestabilidad genética estudiados en esta tesis</i>	182

ABREVIATURAS

- 8-oxodG: 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- ADNc: ADN complementario
- ARN: Ácido ribonucleico
- ARNm: ARN mensajero
- ATM: "Ataxia telangectasia mutated protein"
- ATR: "Ataxia telangectasia RAD3 related protein"
- BER: Reparación por escisión de bases/"Base Escision Repair pathway"
- BrdU: Bromodeoxiuridina
- CuZnSOD: Superóxido dismutasa dependiente de cobre y de Zn
- Cys: Cisteína
- DC: Disqueratosis congénita
- DKC: Disquerina
- ERN: Radicales libres derivados del nitrógeno
- ERO: Especies reactivas derivadas del oxígeno
- GCL: Glutamato cisteína ligasa
- GCLC: Glutamato cisteína ligasa unidad catalítica
- GCLM: Glutamato cisteína ligasa unidad modificadora
- γ -GCS: γ -glutamilcisteina sintasa
- Gpx: Glutación peroxidasa
- GSE24.2: Genetic supresor element 24.2

ABREVIATURAS

- GSH: Glutati3n reducido
- GSSG: Glutati3n oxidado
- H₂O₂: Per3xido de hidr3geno
- hOGG1: *OGG1* humana
- HPLC: Cromatograf3a l3quida de alta eficacia
- HR: Recombinaci3n homologa
- LOX: Lisina oxidasa
- MDA: Malondialdehido
- MDA-(TBA)₂: 3cido 2-tiobarbit3rico y MDA liberado
- MEF: "mouse embryonic fibroblasts"
- MnSOD: Super3xido dismutasa dependiente de manganeso
- MO: M3dula 3sea
- NAD⁺: Dinucle3tido adenina nicotinamida
- NHEJ: Uni3n de extremos no hom3logos/"non homologous end joining"
- Nrf2: Factor nuclear derivado eritroide 2
- O₂^{•-}: Ani3n super3xido
- OGG1: 8-oxoguanina-ADN glicosilasa
- OH[•]: Radical hidroxilo
- PAGE: Electroforesis previa en gel de poliacrilamida
- PAR: ADP-ribosa
- PARP: Poly (ADP-ribosa) polimerasa
- PARP1: Poly (ADP-ribosa) polimerasa 1

- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- R \cdot : Radical alquílico
- RO \cdot : Radical alcóxido
- ROO \cdot : Radical peróxido
- RT-PCR: reacción de retro-transcripción/"reverse transcription-polymerase chain reaction"
- Se-Gpx: Glutación peroxidasa selenio dependiente
- SOD: Enzima superóxido dismutasa
- TERT: Trascirptasa reversa
- TET: "Ten-eleven translocation"
- WRN: Síndrome de Werner
- X-DC: Disqueratosis congénita ligada al cromosoma X
- XDH: Xantina deshidrogenasa
- XO: Xantina oxidasa
- XOR: Enzima xantina oxidorreductasa

INTRODUCCIÓN

ENFERMEDADES RARAS

En la Unión Europea se considera una enfermedad rara, minoritaria o huérfana, aquella con peligro de muerte o invalidez crónica, que tiene una prevalencia menor de 5 casos por cada 10.000 habitantes. En la literatura médica hay descritas alrededor de 7.000 enfermedades raras, siendo alrededor del 80% de estas enfermedades de origen genético. Se estima que entre 4.000 y 5.000 no tienen tratamiento curativo (www.orphanet.com).

DISQUERATOSIS CONGÉNITA

Según orphanet, la disqueratosis congénita (DC) es una enfermedad rara con una prevalencia de 1-9/1.000.000.

El espectro de enfermedades que engloba la DC se ha expandido de manera considerable desde su descripción en 1910. La forma clásica de DC está caracterizada por una tríada de síntomas mucocutáneos que incluyen: pigmentación anormal, distrofia ungueal y leucoplasia en la mucosa oral (figura I.1)[1], aunque recientemente se ha visto que este último síntoma sólo es observable en un reducido número de pacientes [2].

La DC presenta un amplio ramillete de afecciones (Tabla I.1), tanto a nivel sistémico como local. Una de las más importantes es el fallo en la médula ósea (MO) al ser una de las principales causas de mortalidad (~60%-70%), seguida por enfermedad pulmonar (~10%-15%), y los tumores malignos (~10%).



Figura I.1. Fotografías de enfermos de DC con distrofia ungueal y leucoplasia en la mucosa oral. Extraído de: Dokal I. Dyskeratosis congenita, Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2011;2011:480-6.

I. INTRODUCCIÓN

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	% DE PACIENTES
Pigmentación anormal de la piel	89
Distrofia ungueal	88
Fallo médula ósea	85,5
Leucoplaquia	78
Epífora	30,5
Retraso mental	25,4
Enfermedades pulmonares	20,3
Retraso en el crecimiento	19,5
Pérdida o daño de los dientes	16,9
Pérdida prematura de pelo / Degeneración capilar	16,1
Hiperhidrosis	15,3

Tabla I.1. Características clínicas generales en DC y porcentaje de pacientes que presentan alguna de estas características Extraído de: Dokal I. *Dyskeratosis congenita*, *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:480-6.

Además, la DC (ORPHA1775) es una enfermedad muy heterogénea ya que han sido reconocidos tres modos de herencia: recesiva ligada al cromosoma X (OMIM, 305000) (la que estudiaremos en esta tesis), recesiva autosómica dominante (OMIM, 127550) y autosómica recesiva (OMIM, 224230). Es por ello por lo que el fenotipo clínico asociado a estas formas genéticas puede variar ampliamente.

Estudios realizados en los últimos 15 años han identificado 8 genes implicados en la DC: DKC1, TERC, TERT, NOP10, NHP2, TINF2, C16orf57 y TCAB1. Siete de estos genes son importantes en el mantenimiento del telómero porque codifican tanto componentes del complejo de la enzima telomerasa (DKC1, TERC, TERT, NOP10, NHP2 y TCAB1) como componentes del complejo shelterina (TINF2) que protege el final de los cromosomas [3] (figura I.2).

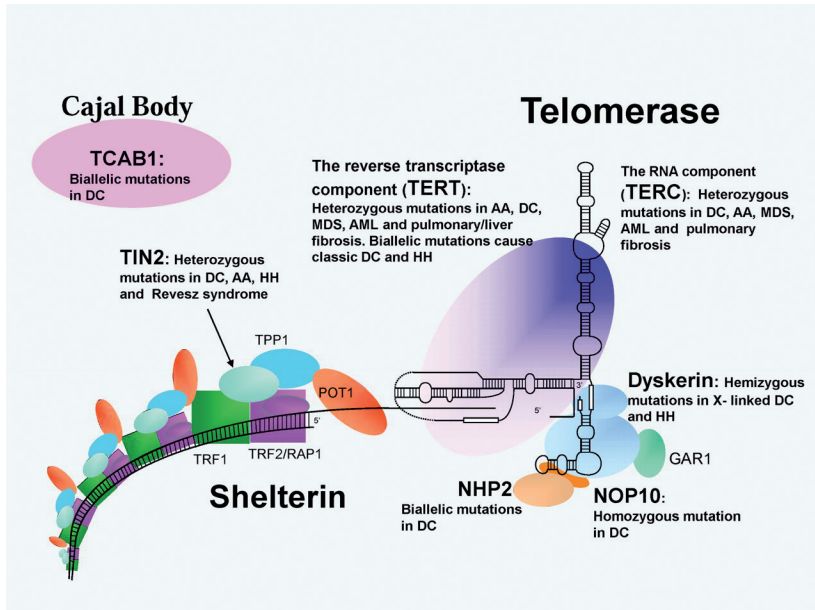


Figura 1.2 Modelo para los complejos telomerasa y "shelterin". La figura representa todos los elementos que constituyen los complejos ribonucleoprotéicos necesarios para el procesamiento de los telómeros. Por un lado el complejo telomerasa compuesto por TERT y el TERC, junto con la disquerina, GAR1, NOP10 y NHP2. Por otro lado, el complejo "shelterin" formado por los componentes TRF1, TRF2/RAP1, TPP1 y POT1. Extraído de: Dokal I. Dyskeratosis congenita, Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2011; 2011:480-6.

2.1. Disqueratosis congénita ligada al cromosoma X:

Esta tesis se centra en la forma recesiva ligada al cromosoma X, que de las tres que existen es la forma más prevalente.

El gen *DKC1* codifica una proteína multifuncional, de 514 aminoácidos y 57 kDa, llamada disquerina (DKC). Esta proteína interviene en la biosíntesis del ARN ribosomal y en el ensamblaje de las subunidades de los ribosomas o de centrómeros y los microtúbulos, estando por tanto comprometido el ciclo celular y la función nucleolar. Estas alteraciones explican el compromiso multiorgánico de esta forma de DC y el elevado riesgo de padecer enfermedades malignas por afectar a las características citogenéticas de las células, comportándose como un síndrome de inestabilidad cromosómica.

2.2. Disqueratosis congénita y telómero:

La primera evidencia de la asociación entre la longitud del telómero y la DC fue descrita en células de pacientes con mutaciones en el gen *DKC1* por Michael y colaboradores [4]. Las mutaciones en el complejo telomerasa y en el complejo shelterina causan un excesivo acortamiento de los telómeros. Debido a este acortamiento telomérico, con la edad, se va reduciendo la reserva de las células madre (hay un fallo en la MO en el 85,5% de los pacientes), incrementándose la incidencia de aplasia medular, causa principal de muerte en la DC [5]. Además otros factores ambientales (por ejemplo el tabaco) en el contexto de la constitución genética del individuo, podrían conducir a la aparición de inestabilidad genética y diversas patologías tumorales.

Los genes causantes de la DC están involucrados en el mantenimiento del telómero, lo que sugiere que el disfuncional y excesivo acortamiento del telómero que presentan los

enfermos será el denominador común de todas las formas genéticas que presenta esta enfermedad, jugando un papel trascendental en la patogénesis de la enfermedad [6].

3. TELÓMERO Y TELOMERASA

Los telómeros son múltiples repeticiones de la secuencia de nucleótidos TTAGGG que se encuentran en los extremos de los cromosomas. Los requerimientos moleculares del proceso de replicación no dejan que el extremo 5' de la cadena hija de ADN se pueda completar, acortándose el telómero en cada ronda de división celular [7,8]. Cuando se llega a un punto crítico de acortamiento de éstos, las células entran en senescencia y/o apoptosis y pierden la capacidad de dividirse. Este es un proceso que actúa como reloj biológico para prevenir una división celular incontrolada. Afortunadamente, existen mecanismos involucrados en la regulación y mantenimiento del telómero, entre ellos el mediado por la telomerasa.

La telomerasa es un complejo RNA-proteína que elonga los telómeros después de cada división celular. El núcleo de la enzima telomerasa está formado por una proteína transcriptasa reversa (TERT) codificada por el gen *hTERT*, y la parte ARN de la telomerasa codificada por el gen *hTERC* [9]. Además se encuentran en el complejo, la proteína disquerina (codificada por el gen *DKC1* en el cromosoma X, que se requiere para estabilizar TERC) y otras tres proteínas asociadas (NHP2, NOP10, GAR1) forman el complejo telomerasa [2,10]. En células somáticas humanas sanas, los telómeros se acortan en cada ciclo celular, y a lo largo de muchas divisiones esto trae como consecuencia la disfuncionalidad de los telómeros, que la célula interpreta como daño genómico y se activa un proceso de

I. INTRODUCCIÓN

parada del ciclo celular y detención del crecimiento [11]. La telomerasa hTERT se expresa solo en células madre y/o en células germinales de forma que estas células tienen una mayor capacidad de división celular ya que mantienen los telómeros funcionales por tiempo indefinido. [12,13].

Además del problema propio de la replicación del telómero, se han sugerido otros factores que contribuyen a su acortamiento. Se ha sugerido que uno de estos mecanismos es la producción de daño al ADN inducido por estrés oxidativo (alteración del equilibrio entre las especies prooxidantes y antioxidantes, a favor de las primeras) [8]. Además, tal y como ha sido propuesto con anterioridad, el estrés oxidativo evita que la telomerasa contrarreste el efecto del acortamiento del telómero al inducir la exportación de ésta del núcleo a la mitocondria [11].

El ADN telomérico es susceptible al estrés oxidativo, debido a que es monocatenario y además la secuencia tiene un alto contenido en guaninas [14,15]. Las especies reactivas derivadas del oxígeno (ERO), especialmente los radicales hidroxilo (OH[•]), reaccionan con los residuos de guanina de la cadena de ADN telomérico, dando como subproducto la 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodG) [16,17]. Esta especial sensibilidad al estrés oxidativo hace que la pérdida de telómero se vea acelerada. Además, se ha observado que las sustancias antioxidantes previenen el acortamiento telomérico inducido por estrés oxidativo [18].

Nuestro grupo ha investigado la correlación entre los cambios en la actividad telomerasa y los niveles del antioxidante celular, glutatión (GSH). Cuando fibroblastos NIH3T3 fueron incubados con butionina sulfoximina (un compuesto químico capaz de disminuir

los niveles de GSH celular al inhibir la síntesis de GSH) la actividad telomerasa disminuyó alrededor de un 60% y el crecimiento celular se retrasó. Sin embargo, cuando se recuperaron los niveles de GSH intracelular incubando los fibroblastos con glutatión etil éster, la actividad telomerasa aumentó considerablemente, estableciendo la importancia de mantener los residuos de cisteína (Cys) presentes en algunas subunidades de la telomerasa en su estado reducido [19].

Perez-Rivero y colaboradores establecieron una correlación entre la actividad telomerasa y la actividad de la enzima antioxidante catalasa en fibroblastos procedentes de embriones de ratón MEF ("mouse embryonic fibroblasts") *TERC*^{-/-} [20]. Estos autores mostraron como estos fibroblastos deficientes en *TERC* presentaban estrés oxidativo y bajos niveles de enzima catalasa. Sin embargo, la sobreexpresión de *TERC* produjo la recuperación de la actividad telomerasa disminuyendo el estrés oxidativo.

Aunque estos autores no establecieron ningún tipo de explicación molecular, pusieron en evidencia una posible relación entre la actividad telomerasa y la respuesta antioxidante. Por ello, sería interesante confirmar si existe alguna relación o conexión molecular entre la actividad telomerasa y la expresión de enzimas antioxidantes.

Por lo tanto, en esta tesis intentaremos establecer una relación entre la actividad telomerasa y la respuesta antioxidante usando dos modelos celulares: i) fibroblastos de pacientes con X-DC comparados con los de personas sanas; ii) fibroblastos transfectados provenientes de células GM01774 de un paciente con X-DC con el inserto GSE24.2 que corrige el defecto en la telomerasa (células 24.2). La línea celular control es del mismo paciente, tiene el inserto pero sin la corrección (células pLNCX).

I. INTRODUCCIÓN

El "genetic supresor element" (GSE) llamado 24.2 codifica para el dominio pseudouridina sintasa de la DKC [21]. Las investigaciones llevadas a cabo por el grupo de la Dra. Perona establecieron que la inserción del elemento GSE24.2 en células con déficit en actividad telomerasa inducía la expresión de la hTERT y hTRC recuperando la actividad telomerasa (figura I.3).

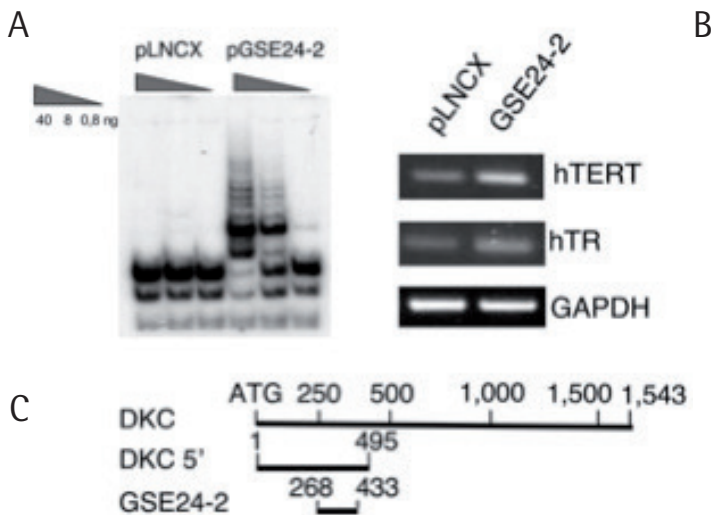


Figura I.3.- Actividad telomerasa y expresión de hTERT y hTRC en fibroblastos X-DC transfectedos con el plásmido pLNCX y el elemento 24.2. (A) Actividad telomerasa medida mediante el kit "TRAP assay" utilizando distintas cantidades de extracto protéico (la cantidad de proteínas totales está representada en los triángulos); (B) Expresión de hTERT y hTR mediante RT-PCR en la línea celular que ha incorporado el vector vacío pLNCX y el elemento GSE24.2. Se usa el GAPDH como control; (C) Diagrama de la secuencia de ADN de la disquerina que muestra la localización de GSE24.2 y la DKC5'. Extraído de Machado-Pinilla y col. *Blood*, 2008

4. ESTRÉS OXIDATIVO

4.1. Radicales libres:

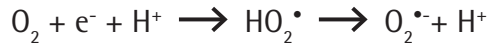
4.1.1. Concepto de radical libre:

Un radical libre es una molécula o fragmento de molécula, que contiene uno o más electrones desapareados en su orbital externo. Tienen una vida media del orden de milisegundos debido a su gran reactividad, aunque varía según el tipo de radical libre. Existen radicales libres derivados del oxígeno y también radicales libres derivados del nitrógeno (ERN). Las ERO han sido consideradas como causantes en parte del envejecimiento de la piel [22]. Estudios *in vitro* han demostrado la implicación de las ERO en el acortamiento de los telómeros [18]. En fibroblastos en cultivo se ha demostrado que elevados niveles de oxígeno y elevadas dosis de peróxido de hidrógeno, causan un rápido acortamiento del telómero y al mismo tiempo aceleran el proceso de senescencia celular [18,23].

Las ERO más estudiadas, y que se describen a continuación, son el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el radical hidroxilo, además del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que no es un radical libre pero sí que es una especie muy reactiva y puede dar lugar a EROs.

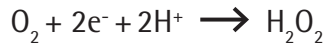
4.1.1.1. Anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$):

El oxígeno se encuentra en un estado de oxidación de $-1/2$ debido a la ganancia de un electrón formado en muchas reacciones de oxidación. Es relativamente poco reactivo, pero potencialmente tóxico, ya que puede iniciar reacciones que den lugar a otros intermediarios a su vez mucho más reactivos. Puede formarse como producto de muchas reacciones catalizadas enzimáticamente, también en reacciones no enzimáticas del oxígeno con la cisteína o la riboflavina [24], o bien se produce en la cadena respiratoria mitocondrial mediante la reacción que se muestra a:



4.1.1.2. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2):

Estado de reducción de dos electrones del oxígeno, formado a partir del radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ por dismutación, o directamente de la reducción del O_2 en medio ácido



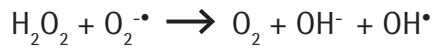
No es un radical libre, pero su reactividad es importante ya que atraviesa fácilmente las membranas. Muchas enzimas producen peróxido de hidrógeno a partir de oxígeno molecular [26,27]. También puede producirse por reacciones químicas, como la autooxidación del ácido ascórbico catalizada por el cobre [28]. Se convierte en agua por acción de la catalasa, un proceso que determina su vida media.

4.1.1.3. Radical hidroxilo (OH^\bullet):

El radical hidroxilo es la especie de oxígeno más reactiva, con una vida media estimada de alrededor de 10^{-9} s [29]. Puede generarse *in vivo* como consecuencia de radiaciones de alta energía (rayos X y rayos γ) que pueden provocar rotura homolítica del agua. La luz UV no tiene suficiente energía como para escindir una molécula de agua, pero puede descomponer el agua oxigenada dando lugar al radical hidroxilo. Otro proceso todavía más importante en la formación del radical hidroxilo es la llamada reacción de Fenton [30], mostrada a continuación:



También a partir de agua oxigenada y del radical superóxido puede formarse el radical hidroxilo, en una reacción catalizada por metales como hierro o cobre conocida como reacción de Haber-Weiss [31]:



4.1.2. Génesis de las ERO:

Todos los radicales libres descritos anteriormente corresponden a especies cuya formación es endógena, pero el organismo también está expuesto a radicales libres procedentes de fuentes externas.

Las fuentes exógenas más importantes en la generación de especies reactivas de oxígeno son [32]:

- Agentes antineoplásicos y otros medicamentos
- Radiaciones electromagnéticas o de partículas
- Factores ambientales

Las fuentes endógenas más importantes son:

- Cadena de transporte electrónico mitocondrial.
- Sistema xantina oxidasa
- NADPH oxidasa

La cadena de transporte electrónico mitocondrial (Figura I.4) es una de las principales fuentes celulares de radicales libres [33]. Son muchas las patologías en las que se ha descrito que la mitocondria genera radicales libres, siendo la causa principal del estrés oxidativo que sufre la célula.

I. INTRODUCCIÓN

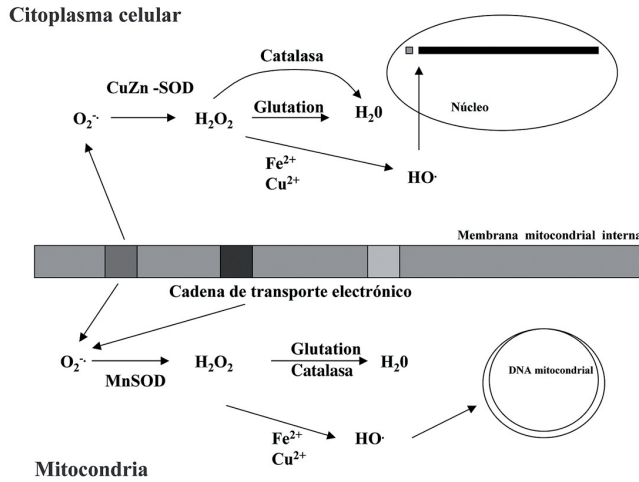


Figura I.4.- Cadena de transporte electrónico mitocondrial. Producción de radicales superóxido por la cadena de transporte de electrones mitocondrial y gestión de los mismos en la matriz mitocondrial y en el citoplasma celular.

Los radicales libres generados extracelularmente deben cruzar la membrana plasmática antes de reaccionar con otros componentes celulares y, por tanto, pueden iniciar reacciones tóxicas en la misma. Los ácidos grasos insaturados presentes en la membrana y las proteínas transmembrana que tienen aminoácidos oxidables son susceptibles de ser oxidados por los radicales libres. Estas reacciones alteran las propiedades de las membranas de tal modo que cambian su fluidez, aumentan la permeabilidad de la membrana, disminuyen el potencial de membrana, hacen perder las funciones secretoras e inhiben los procesos metabólicos celulares, todo ello provocado por la peroxidación lipídica, o la oxidación de importantes proteínas estructurales [34].

La enzima xantina oxidoreductasa (XOR) es una enzima descrita originalmente como una aldehído oxidasa en 1902 [35]. Esta enzima está ampliamente distribuida entre seres vivos de distinta complejidad. En las distintas especies cataliza la hidroxilación de una amplia gama de sustratos como purinas, pirimidinas, proteínas y aldehídos [36]. La XOR existe en dos formas interconvertibles, la xantina deshidrogenasa (XDH) y la xantina oxidasa (XO). En la forma XO, el oxígeno molecular se usa como un aceptor de electrones y la hipoxantina y la xantina son reducidas a ácido úrico y superóxido. Durante condiciones de activación, la XDH se convierte en XO vía oxidación sulfidrónica, o bien vía eliminación proteolítica [37].

La xantina deshidrogenasa es capaz de utilizar el NAD⁺ o el oxígeno como aceptor de electrones, aunque tiene preferencia por el primero. Sin embargo, la xantina oxidasa sólo es capaz de utilizar el oxígeno como aceptor de electrones. Es la enzima encargada de la degradación de las purinas como se muestra en la figura I.5.

I. INTRODUCCIÓN

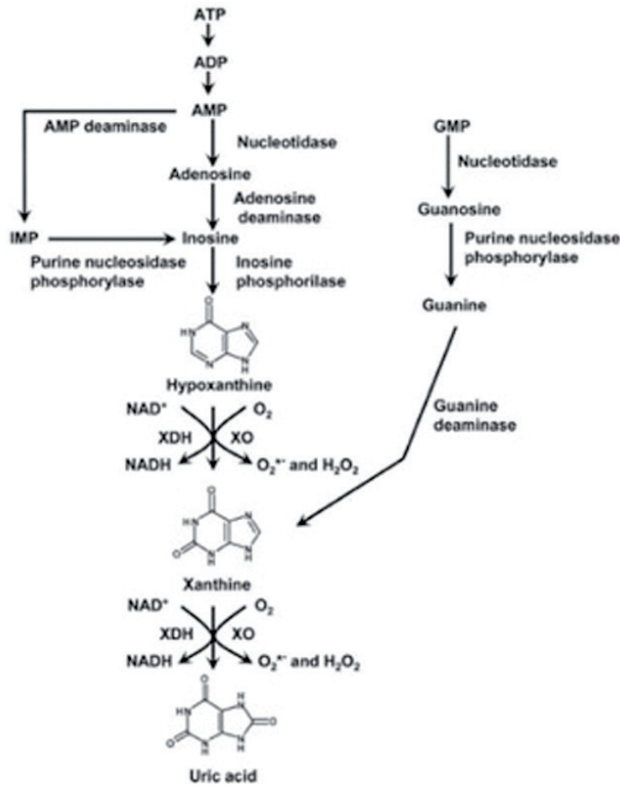


Figura I.5.- Esquema de degradación de las purinas. Desde la hipoxantina y la guanina se forma un compuesto xantina, que da origen al ácido úrico. Estos últimos 2 pasos son catalizados por la xantina oxidasa (ésta contiene FAD, molibdeno y hierro no hemo) dando lugar al ácido úrico. Extraída de: Pacher P, Nivorozhkin A, Szabo C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. Pharmacol Rev 2006;58:87-114

4.2. Estrés oxidativo:

4.2.1. Concepto de estrés oxidativo:

A pesar del papel fisiológico que desempeñan algunas ERO también pueden dar lugar a reacciones de oxidación indeseadas, contra las cuales los organismos han tenido que desarrollar defensas antioxidantes [38].

La primera definición de estrés oxidativo lo enuncia como una alteración del equilibrio entre las especies prooxidantes y las antioxidantes, a favor de las primeras [39], originándose éste por un exceso de sustancias prooxidantes, una deficiencia de agentes antioxidantes, o por ambos factores a la vez y produciéndose como resultado el daño oxidativo. En el 2006 se ha redefinido este concepto debido a que se ha visto que el estado redox en plasma producido por GSH/GSSG no se encuentra en equilibrio con el pool de cisteína/cistina lo que indica que el balance entre oxidantes y antioxidantes, no puede ser entendido como una sola entidad. Además, estos sistemas no responden de la misma manera a estímulos fisiológicos y a tóxicos. Por ello, el nuevo concepto de estrés oxidativo desde un punto de vista mecanístico se define como un desequilibrio entre los sistemas redox y el control de estos [40].

4.2.2. Estrés oxidativo y daño a biomoléculas:

4.2.2.1. Daño oxidativo a lípidos:

Los lípidos, y sobre todo los ácidos grasos poliinsaturados, son las biomoléculas más susceptibles a ser atacadas por los radicales libres [17,41]. Los radicales libres que pueden empezar esta reacción son: el radical hidroxilo, el peróxido ($\text{ROO}\cdot$), el alcóxido ($\text{RO}\cdot$) y el alquílico ($\text{R}\cdot$). El proceso de ataque oxidativo a los lípidos se denomina peroxidación lipídica, siendo el malondialdehído (MDA) uno de los productos finales de esta oxidación

I. INTRODUCCIÓN

[42]. Esta es una reacción en cadena, de modo que el ataque por un solo radical libre da lugar a la formación de un gran número de especies activadas, lo cual desemboca en la oxidación de una gran cantidad de moléculas.

4.2.2.2. Daño oxidativo a proteínas:

Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser atacados por los radicales libres (principalmente por el radical hidroxilo). Esta oxidación puede dar lugar a un cambio conformacional de la proteína, y por tanto, a una pérdida o modificación de su función biológica [43].

4.2.2.3. Daño oxidativo al ADN:

El ADN también es susceptible de daño oxidativo en todos sus componentes. Se sabe que el oxígeno es capaz de adicionarse a las bases o al azúcar del ADN formándose radical peróxido. Las posteriores reacciones de estas especies radicalarias en el ADN dan lugar a un gran número de productos [44].

El daño oxidativo al ADN incluye la oxidación de bases y/o roturas de una hebra o de doble hebra en el ADN [45,46], daño que puede alterar incluso la viabilidad de la célula.

4.3. Antioxidantes fisiológicos:

4.3.1. Concepto de antioxidante:

Todas las células están sujetas a estrés oxidativo. El organismo ha desarrollado una serie de mecanismos, diseñados para protegerse de la acción de los radicales libres conocidos como antioxidantes, y desde un punto de vista bioquímico, pueden clasificarse según sean de naturaleza enzimática o no enzimática.

4.3.2. Antioxidantes enzimáticos:

4.3.2.1. Superóxido dismutasa:

Es la familia de antioxidantes más ampliamente distribuida en la naturaleza. Su actividad fue descrita por primera vez por McCord y Fridovich en 1969 [47,48]. La enzima superóxido dismutasa (SOD) transforma el radical superóxido en peróxido de hidrógeno, constituyendo el primer paso de defensa frente a las ERO [49-52].



Hay descritas cuatro formas diferentes de esta enzima antioxidante, según el grupo prostético y tipo de metal ligado a ella. En la siguiente tabla se resumen los tipos y su localización sub-celular mayoritaria.

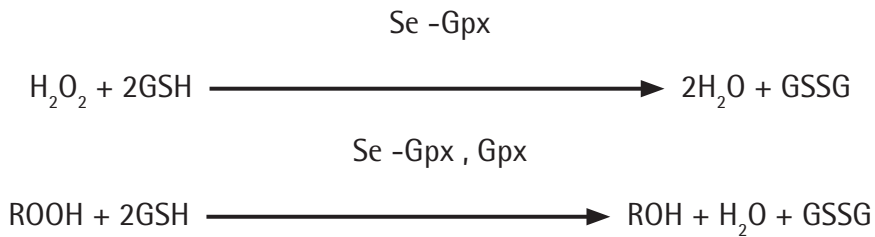
Enzima	Grupo prostético	Localización celular
Cu-Zn SOD	Cu, Zn	- Citosol - Núcleo
Mn-SOD	Mn	- Matriz mitocondrial
Mn-SOD	Mn	- Bacterias
Fe-SOD	Fe	- Bacterias

Tabla 1.2. Tipos de Superóxido dismutasa. División según grupo prostético y localización celular.

En esta tesis estudiamos las formas Cobre zinc superóxido dismutasa (CuZnSOD) y la Manganese superóxido dismutasa (MnSOD). La MnSOD es una enzima homotetramérica con manganeso que tiene su función en la mitocondria, mientras que CuZnSOD es un homodímero que tiene su función en el citosol [53].

4.3.2.2. Glutación peroxidasa:

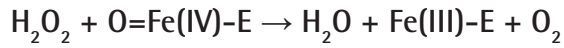
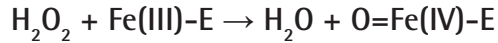
La Glutación peroxidasa (Gpx) juega un papel importante en la detoxificación del peróxido de hidrógeno y lipoperóxidos que se generan en las células [39]. La mayor parte de la actividad Gpx se encuentra en el citosol, aunque también está presente en la matriz mitocondrial. Existen dos tipos de glutación peroxidasa, una selenio dependiente (Se-Gpx), y otra que no contiene selenio (Gpx). Ambas requieren glutación reducido como dador de equivalentes reductores para catalizar la siguiente reacción:



En esta tesis trataremos dos formas (no selenio dependiente): GPX1 y GPX4. La GPX1 es la más abundante y se encuentra en el citoplasma de la mayoría de las células de mamífero, mientras que en el caso de la GPX4 se expresa en multitud de células de mamífero, pero en menor cantidad. Además, GPX4 tiene preferencia por los lipoperóxidos [54].

4.3.2.3. Catalasa:

La catalasa participa en la detoxificación del peróxido de hidrógeno, dando lugar a agua y a una molécula de oxígeno [39]. También es capaz de catalizar ciertas reacciones de peroxidación en presencia de H_2O_2 , actuando sobre algunos alcoholes, aldehídos y ácidos orgánicos como sustratos. La catalasa se halla principalmente en los peroxisomas [55], aunque también se ha descrito actividad catalasa en mitocondrias y citosol. La siguiente reacción representa la función de la catalasa de descomposición del peróxido de hidrógeno.



4.3.3. Antioxidantes no enzimáticos:

4.3.3.1. Glutación:

Es el tiol no proteico más abundante en las células de mamífero. Fue descubierto por Hopkins en 1921 y está constituido por 3 aminoácidos: ácido glutámico, cisteína y glicina [56]. Su estructura le confiere ciertas características que hacen que el glutati3n tenga una funcionalidad amplia e importante en la c3lula.

El glutati3n se puede encontrar en dos formas seg3n su estado de 3xido-reducci3n: como GSH o glutati3n reducido, o como GSSG o glutati3n oxidado que est3 compuesto por dos mol3culas de GSH unidas por un puente disulfuro entre las ciste3nas.

El GSH desempeña numerosas e importantes funciones metab3licas [57], una de ellas es la de proteger a la c3lula contra los radicales libres, los per3xidos y otros compuestos t3xicos, as3 como proteger frente al efecto nocivo de las radiaciones. El GSH puede reaccionar directamente con los radicales libres, sin intervenci3n enzimática alguna y detoxificarlos, o bien puede reducir los per3xidos formados por medio de la glutati3n peroxidasa. Cuando se produce una agresi3n oxidativa, el GSH que act3a como cofactor de la glutati3n peroxidasa se oxida a GSSG para aportar el poder reductor a esta enzima detoxificadora de per3xidos. El GSSG formado es inmediatamente reducido a GSH por medio del enzima glutati3n reductasa. La glutati3n reductasa requiere NADPH como cofactor, que ser3 suministrado por la glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa. Tanto la glutati3n peroxidasa como la glutati3n reductasa se hallan predominantemente en el citosol, existiendo tambi3n cierta actividad en la mitocondria [58].

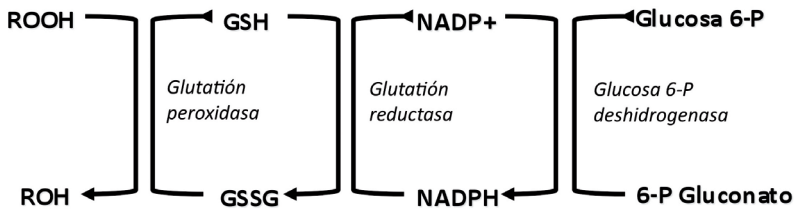


Figura 1.6. Ciclo Redox del glutatión. El glutatión existe en los estados reducido (GSH) y oxidado (GSSG). En el estado reducido, el grupo tiol de la cisteína es capaz de donar un equivalente de reducción ($H^+ + e^-$) a otras moléculas inestables, como las especies reactivas de oxígeno. En la donación de un electrón, el glutatión se convierte en reactivo, pero reacciona rápidamente con otro glutatión reactivo para formar glutatión oxidado (GSSG). El GSH puede regenerarse a partir de GSSG por la enzima glutatión reductasa. Extraído de: Grimes AJ. Human red cell metabolism. Oxford: Blackwell; 1966. pp. 192–201.

4.4. Reparación del daño inducido por estrés oxidativo:

El daño inducido por estrés oxidativo a la célula en general pero sobretodo el daño al ADN por oxidación de bases y/o por rotura de una hebra o de doble hebra del ADN, puede alterar la integridad del genoma y comprometer la viabilidad de la célula, por ello la célula posee respuestas a este daño para así repararlo. Estas respuestas se basan en la detección de las hebras de ADN dañadas, por complejos proteicos especializados que reclutan y activan dos proteínas quinasas (ATM "Ataxia telangectasia mutated protein" y ATR "Ataxia telangectasia RAD3 related protein"), en el sitio de lesión [59,60]. La incorporación de cualquiera de estas dos quinasas al sitio de daño, provoca una fosforilación local de la histona H2AX [61,62], lo que finalmente provocará la activación de otras qui-

nasas (CHK2, RAD53) con capacidad de producir la parada del ciclo celular y así facilitar la reparación del ADN. Cabe destacar que varias de las proteínas que participan en las respuestas al daño al ADN son reclutadas al sitio de daño en el ADN. Además en algunos casos pueden coincidir con las estructuras teloméricas [63-65]. Una vez la lesión es reparada, los focos del daño al ADN son desensamblados por la desfosforilación de γ -H2AX a través de fosfatasas específicas y de toda una maquinaria encargada del remodelado de la cromatina [66].

Cabe destacar que las roturas de doble hebra representan una variante especialmente peligrosa de daño al ADN, ya que la presencia de roturas en ambas hebras del ADN interrumpe la continuidad de dicha molécula. Estas roturas bicatenarias se producen de manera natural en el transcurso de la replicación del ADN y por compuestos genotóxicos que dañan al ADN a través de la creación de roturas en ambas hebras. La reparación de las roturas de doble hebra tienen lugar a través de mecanismos de reparación que permiten unir de nuevo las hebras rotas [67]. En este proceso las principales rutas se caracterizan por la recombinación de secuencias homólogas de ADN de un cromosoma intacto, mecanismo conocido como recombinación homóloga (HR) o bien puede ser mediante la unión de los extremos rotos de una molécula sencilla de ADN, denominado unión de extremos no homólogos (NHEJ), aunque este último mecanismo se asocia a una tasa alta de error debido a la delección de bases entorno al punto dañado [68].

En esta tesis estudiaremos algunos de los componentes de la vía de recombinación entre secuencias homólogas de ADN, que implica el intercambio de información entre moléculas de ADN que comparten homología de secuencia a lo largo de cientos de bases. Entre las moléculas de ADN homólogas se intercambian hebras simples que están empalmadas

I. INTRODUCCIÓN

las unas con las otras, conduciendo a la formación de una región de heterodúplex, en las que las dos hebras de la doble hélice recombinante se derivan de diferentes moléculas progenitoras. En este proceso de recombinación homóloga, participan enzimas entre ellas la proteína RAD51 [69], proteína que se une al sitio de lesión del ADN de hebra sencilla para facilitar el proceso de recombinación, puesto que está implicado en la búsqueda de homología entre hebras.

Por otra parte se sabe también que el oxígeno es capaz de reaccionar con las bases o el azúcar del ADN formándose el radical peróxido. Las posteriores reacciones de estas especies radicalarias en el ADN dan lugar a un gran número de productos de oxidación. La modificación de este tipo que más se observa es la 8-oxodG. Su importancia reside en su poder mutagénico ya que durante la replicación producirá transversiones G-T [44]. Por ello, la cantidad del nucleósido 8-oxodG se utiliza como índice del daño oxidativo al ADN.

Las alteraciones en 8-oxodG suelen ser reparadas por el mecanismo de reparación por escisión de bases (BER) "Base Excision Repair pathway". En esta ruta el ADN dañado es reconocido y eliminado, como bases independientes. El espacio vacío generado se rellena con la síntesis de una nueva hebra de ADN, utilizando la hebra complementaria no dañada como molde. El primer paso consiste en la escisión de la base dañada por una ADN glicosilasa, en este caso denominada 8-oxoguanina-ADN glicosilasa (OGG1). La OGG1 es una enzima glicosilasa bifuncional que por una parte posee la capacidad de escisión de la base 8-oxoG y por otra parte posee actividad AP liasa que permite que en el sitio donde se ha escindido la base, se genere un sitio apurínico/apirimidínico denominado sitio AP, dejando una hebra simple sin la necesidad de una AP endonucleasa (Figura I.7).

Así pues, la OGG1 juega un papel fundamental en la prevención de la acumulación del daño oxidativo al ADN, tanto en el genoma nuclear como en el genoma mitocondrial [70]

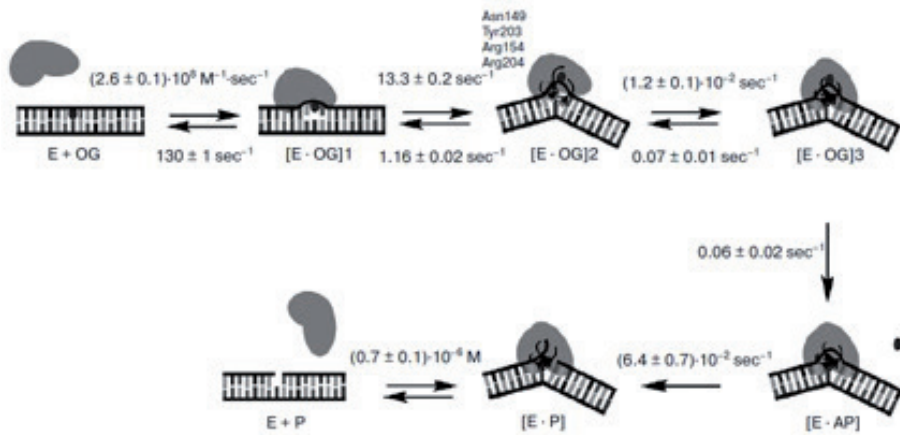


Figura 1.7. Mecanismo de interacción entre hOGG1 y el sustrato 8-oxodG. Extraído de: Kuznetsov NA et. Al., *Mechanism of recognition and repair of damaged DNA by human 8-oxoguanine DNA glycosylase hOGG1. Biochemistry (Mosc).* 2011; 118-30. Review.

Poly (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) es otra enzima implicada en la reparación del ADN dañado mediante la ruta BER. PARP se encarga de reclutar la ADN ligasa III y su cofactor XRCC1, la ADN polimerasa beta (la polimerasa más importante en humanos) y una quinasa al sitio de rotura. La poly (ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP1), de la familia de las PARP, está implicada además en otras vías de reparación del daño oxidativo al ADN. Esta enzima actúa usando el dinucleótido adenina nicotinamida (NAD⁺) como sustrato, para unir múltiples unidades de ADP-ribosa (PAR) a sí mismo y a otras proteínas aceptoras que ayudan en la reparación del ADN dañado [71,72]. Esta Poly (ADP) ribosilación

I. INTRODUCCIÓN

permite que las proteínas a las que se les añaden las unidades de PAR, puedan reparar el daño producido al ADN de una manera eficiente [73].

Sin embargo, en situaciones de daño oxidativo al ADN muy severo la sobreexpresión de PARP-1 produce la muerte celular (figura I.8) [74].

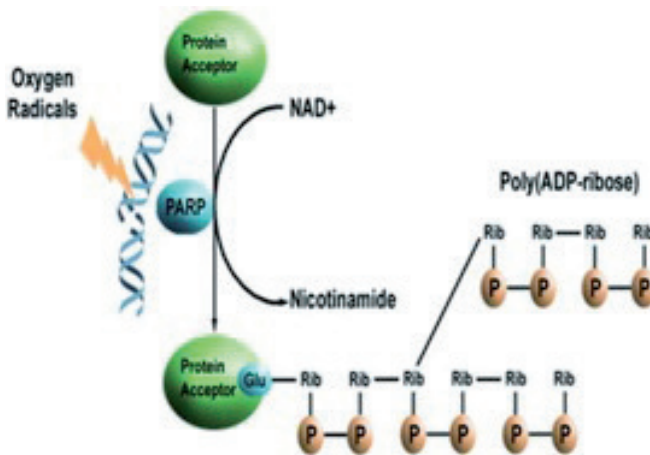


Figura I.8. Acción de PARP-1 después del daño al ADN. PARP-1 añade unidades de PAR a las proteínas reparadoras del daño al ADN para facilitar su reparación. Esta reparación requiere NAD⁺ y ATP. La activación de PARP-1 debido a un daño severo al ADN depleciona las células de NAD⁺ y de ATP almacenadas por la célula. Figura extraída de: Peter J. Giannone, Alicia A. Alcamo, Brandon L. Schanbacher, Craig A. Nankervis, Gail E. Besner, and John A. Bauer. Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1: A Novel Therapeutic Target in Necrotizing Enterocolitis. *Pediatr Res.* 2011 July; 70(1): 67–71.

PARP-1 también es conocido por su papel en la transcripción a través de la remodelación de la cromatina mediante la PARSilación de histonas y la relajación de la estructura

cromatínica, lo que permite que acceda la maquinaria de transcripción a los genes [74]. Se ha propuesto que el ADN mitocondrial sufre mucho más daño oxidativo que el ADN nuclear [75,76]. El genoma mitocondrial presenta ciertos rasgos que le hacen especialmente susceptible de ser atacado por agentes oxidantes: i) carece de histonas que puedan recibir el ataque en lugar del ADN [77]; ii) el sistema de reparación es poco efectivo [78,79]; iii) se encuentra muy cerca de la cadena de transporte mitocondrial, uno de los sistemas principales de producción de ERO [80]. Otro factor distintivo del ADN mitocondrial es que no posee intrones, de manera que la modificación de cualquier base afecta a una zona de ADN codificante [81,82], y su repercusión suele ser, por tanto, más importante.

5. ALTERACIONES EPIGENÉTICAS EN DISQUERATOSIS CONGÉNITA LIGADA AL CROMOSOMA X

5.1. Estrés oxidativo y cromatina:

Aunque existen todavía muy pocas evidencias, cuando se postuló que la producción de las ERO y el GSH podían tener influencia sobre la expresión génica ya se estaba preparando el camino para indicar que el balance redox celular podía regular la conformación y la estructura de la cromatina [83,84].

En 2008, Sadickovic y colaboradores publicaron un estudio sobre la línea de células tumorales MCF-7 tratadas con benzopireno (BZP), donde observaban alteraciones en los niveles de acetilación de la histona H3K9, generando hipoacetilación en algunos genes e hiperacetilación en otros. El BZP generaba además descensos en la metilación global

I. INTRODUCCIÓN

de ADN, e inhibición de las ADN metiltransferasas *in vitro* [85]. Las observaciones de este grupo apuntarían a que la depleción del GSH podría llevar a la hipoacetilación de la histona H3, ya que se sabe que productos generados por el BZP pueden producir la depleción del GSH [86].

Muchas enfermedades en las que se ha descrito un estrés oxidativo están asociadas a alteraciones epigenéticas, como es el caso del Síndrome de Hutchinson-Gilford o el Síndrome de Werner [87]. Ambos síndromes progeroides están caracterizados por tener inestabilidad genética.

Además, se ha demostrado que el estrés oxidativo puede inducir cambios epigenéticos. Por ejemplo, se ha visto como las ERO pueden inducir hipermetilación de los islotes CpG en el promotor del gen E-cadherina, un regulador de la transición de epitelio a mesénquima en células de carcinoma hepatocelular [88]. También pueden activar la familia de las "Ten-eleven translocation" (TET), que son unas proliil hidroxilasa que reprimen HIF1 α en condiciones de elevado estrés oxidativo [89], o modular mediante la metilación del ADN o mediante la modificación de los extremos de las histonas, la capacidad antioxidante del organismo en el útero [90], o la variación de la actividad de las histonas deacetilasas de tipo III o sirtuinas [91].

5.2. Envejecimiento y cromatina:

El envejecimiento ha sido asociado a cambios conformacionales y aberraciones en la estructura de la cromatina [92,93].

En un proceso de envejecimiento normal los dominios de la heterocromatina, sobre todo los correspondientes a la heterocromatina constitutiva perinuclear, van disminuyendo en número. Además, distintos eventos de estrés oxidativo producen la aparición de dominios asociados a heterocromatina, los denominados SAHFs (senescence-associated heterochromatin foci) en dominios que anteriormente eran eucromatina.

En síndromes progeroides como el de Hutchinson-Gilford, producido por mutaciones en la lámina A, el proceso de alteración de la cromatina está acelerado [87]. Asimismo, se han observado como los patrones de modificaciones post-traduccionales se alteran considerablemente. Por ejemplo, Shumaker y colaboradores han descrito la pérdida de marcas de heterocromatina, como la trimetilación en H3K27 y H3K9, tanto en modelos celulares como en células provenientes de pacientes de Hutchinson-Gilford [87]. En el caso del síndrome de Werner (WRN), progeria con una elevada susceptibilidad al cáncer y producida por un déficit en la proteína, se ha descrito un acortamiento telomérico acelerado debido a una disminución en los niveles de hTERT [87]. En esta enfermedad se ha observado que la elevada inestabilidad génica es debida a la aparición de aberraciones cromatínicas y se ha demostrado que la inducción de la expresión de la actividad telomerasa induce la disminución del número de metafases encontradas en algunos cromosomas aberrantes [94].

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis es confirmar si existe alguna conexión molecular entre la actividad telomerasa, la expresión de enzimas antioxidantes y los sistemas de reparación del ADN. Para ello, se estudiarán líneas celulares provenientes de fibroblastos de tres pacientes con DC ligada al cromosoma X (que nosotros denominaremos AD, BD, CD) y un modelo de células de pacientes con DC ligada al cromosoma X (X-DC) en el que se ha restaurado la actividad telomerasa mediante transfección con un inserto GSE24.2 (genetic supresor element 24.2) que codifica para el dominio pseudouridina sintasa de DKC. La expresión de este dominio incrementa la supervivencia contra el cisplatino y la resistencia a los inhibidores de la telomerasa. GSE24.2 activa el promotor de *c-myc* a través de NHEIII que consecuentemente activa el promotor de *hTERT* aumentando la actividad telomerasa de esta línea celular.

Estos estudios permitirán conocer la relación molecular entre la actividad telomerasa y la respuesta antioxidante. Al mismo tiempo, el estudio de los defectos en la respuesta antioxidante, permitirá evaluar la relación con la respuesta a la reparación del ADN, así como su efecto en las modificaciones epigenéticas que participan en la conformación de la cromatina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Determinación del estrés oxidativo y de enzimas antioxidantes en fibroblastos de pacientes afectados de la enfermedad.
- 2.- Estudio de la expresión de genes implicados en la reparación del ADN y su correlación con el perfil oxidativo y la implicación de la regulación epigenética.
- 3.- Determinación del perfil de estrés oxidativo y expresión de enzimas antioxidantes en una línea celular X-DC en la que se ha reestablecido la actividad telomerasa mediante la inserción del elemento GSE24.2.

MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. CULTIVOS CELULARES

Las células con las que se ha realizado la primera parte de esta tesis, proceden del Coriell Institute Research. Se trata de fibroblastos de biopsia de piel, provenientes de pacientes caucásicos diagnosticados de DC, pacientes portadores de la enfermedad y de sujetos sanos. Las características de estas células, así como la nomenclatura que se usará a partir de ahora para referirse a ellas se muestran en la siguiente tabla (tabla III.1):

CÓDIGO	SEXO	RAZA	EDAD	TIPO CEL.	AFECTACIÓN CLÍNICA
GM08398 (BC)	H.	CAUCÁSICO	8	FIBROL.	NO
GM03348 (CC)	H.	CAUCÁSICO	10	FIBROL.	NO
GM04421 (AC)	M.	CAUCÁSICO	29	FIBROL.	NO
GM01774 (BD)	H.	CAUCÁSICO	7	FIBROL.	Leucoplasia en lengua, dedos de pies y manos displásicos; con BdrU aumenta la inestabilidad cromosómica
AG0464 (CD)	H.	CAUCÁSICO	11	FIBROL.	Erupciones cutáneas; anemia; distrofia ungueal y anomalías esofágicas. La historia familiar es negativa
M01786 (AD)	M.	CAUCÁSICO	30	FIBROL.	Presenta DKC X-linked; clínicamente no afectada; afectados padre e hijo

Tabla III.1. Nomenclatura y características generales de las células estudiadas en la primera parte de la tesis.

Los fibroblastos, pLNCX y 24.2 con los que se han realizado la segunda parte de esta tesis, proceden del grupo de investigación de la Dra. Rosario Perona del Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" del CSIC de Madrid. Estos fibroblastos provienen del Coriell Cell repositories (Institute for Medical Research, New Jersey), de la línea GM01774. 24.2 es un modelo celular de pacientes con DC en el que se ha restaurado la actividad telomerasa mediante transfección con un inserto GSE24.2 (genetic supresor element 24.2) que codifica para el dominio pseudouridina sintasa de DKC. La expresión de este dominio incrementa la supervivencia contra el cisplatino y los inhibidores de la telomerasa. GSE24.2 activa el promotor de c-myc a través de NHEIII que consecuentemente activa el promotor de *hTERT*. Las células pLNCX son sus controles, células DC transfectadas pero con el inserto vacío.

Tanto los fibroblastos de pacientes provenientes del Coriell Cell repositories (AD, BD, CD, AC, BC, CC), como los clones transfectados (pLNCX con el vector pECL vacío y 24.2 que contiene el inserto que restablece la actividad telomerasa de los fibroblastos GM01774, GSE24.2.), fueron cultivados en MEM suplementado con 10% suero bovino fetal no inactivado, 15% L-Glutamina y 1% de antibióticos penicilina/estreptomicina en incubadores al 5% de CO₂ a 37 °C.

2. DETERMINACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Fundamento:

La caracterización del momento en el que las células están proliferando se determinó a través de la incorporación de Bromodeoxiuridina (BrdU) mediante el kit "Cell proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) de Roche". La BrdU es un análogo de la timidina que marca las células que están en fase S al incorporarse a moléculas de ADN que se están replicando.

Procedimiento:

Las células fueron cultivadas en placas de 96 pocillos (100 μ L/pocillo) durante diferentes tiempos: 6h, 24h, 48h, 72h, 120h y 192h. Posteriormente se le añadió 10 μ L/pocillo de BrdU (dilución 1:1000 con medio de cultivo) y se incubaron aproximadamente 3 h a 37°C (durante este periodo la BrdU es incorporada en lugar de la timidina en el ADN de las células en proliferación). Después de eliminar el medio, las células fueron fijadas y el ADN simultáneamente desnaturalizado (desnaturalización necesaria para facilitar la accesibilidad del anticuerpo que detectará el BrdU) añadiendo 200 μ L/pocillo de FixDenat. Se incubó a 20°C durante 30 minutos y seguidamente eliminamos el medio de fijación. Hicimos una dilución 1:100 del anti-BrdU-POD y se añadió 100 μ L/pocillo que se ligó al BrdU incorporado. Se desechó el medio y se lavó 3 veces con 200 μ L/pocillo de PBS 1X. Finalmente se eliminó el PBS, se añadió 100 μ L/pocillo del sustrato y se incubó a 20°C durante 20 minutos. A continuación se produce una reacción colorimétrica que fue medida en un espectrofotómetro (spectraMAX PLUS 384 de Molecular Devices) a una

longitud de onda de 370-492nm en 3 intervalos de 5 minutos. La variación de absorbancia es proporcional a la incorporación de BrdU.

3. DETERMINACIONES DEL PERFIL DE ESTRÉS OXIDATIVO

3.1. Niveles de superóxido $O_2^{\cdot-}$

Fundamento:

Los niveles de superóxido fueron determinados en las células provenientes del "Coriell Cell Repositories" y en las células pLCNX, 24.2, usando dihidroetidio (Dihydrithidium, D7008-Sigma), que entra en ellas y es oxidado por el $O_2^{\cdot-}$ hasta producir etidio, que a su vez se une al ADN, produciendo finalmente fluorescencia.

Procedimiento:

Las células sembradas en placas de 12 pocillos se recogieron confluentes. Se desechó el medio de cultivo y se lavó dos veces con PBS atemperado. Se disolvieron 0,003 g de dihidroetidio en 1 mL de DMSO [10mM], de esta dilución se hizo otra de 2 μ L/mL de medio que se añadió a las placas; las placas fueron incubadas a 37°C durante 20 minutos; luego se lavaron con PBS dos veces y se añadió medio sin dihidroetidio. Finalmente, después de otra incubación de 1 hora a 37°C, se midió la fluorescencia en un espectrofluorímetro (spectraMAX GEMINIXS de Molecular Devices) a las longitudes de onda entre 535 y 570nm.

3.2. Niveles de malondialdehido (MDA) por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Fundamento:

Para la determinación de lipoperóxidos en forma de MDA, se procede primero a la hidrólisis de los lipoperóxidos presentes en la muestra y posterior formación de un aducto entre el ácido 2-tiobarbitúrico y el MDA liberado (MDA-(TBA)₂) susceptible de ser analizado por HPLC en fase reversa.

Procedimiento:

Para determinar el MDA se necesitaron 50 µL de muestra a los que se le añaden 75 µL de H₃PO₄ 0,44 M y 25 µL de la solución de ácido 2-tiobarbitúrico; se agita y se mantiene 60 minutos en un baño a 95 °C. Una vez transcurrido el tiempo, se añaden 150 µL de la solución neutralizante. Se centrifuga a 1000 g durante 5 minutos a 4 °C y se inyectan 25 µL del sobrenadante en el HPLC. La detección del aducto MDA-TBA₂ se realizó con un detector ultravioleta visible a una longitud de onda de 532 nm.

4. PURIFICACIÓN DE HISTONAS A PARTIR DE CULTIVO CELULAR

Para la purificación de histonas se procede al aislamiento de los núcleos celulares como se describió previamente por Shechter y colaboradores [95]. En este procedimiento, los núcleos celulares se aíslan mediante el uso de tampón de lisis hipotónico (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.4 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 1 mM de ortovanadato y 1 µL/mL de inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics) se incuban las células durante 30 min en rotor de noria a 4 °C. Los núcleos se recuperan por cen-

trifugación a 10.000 g durante 10 min a 4 °C. El precipitado nuclear se resuspende en 400 µL de H₂SO₄ 0.4 N y se dejó durante 12 horas en rotor de noria a 4 °C. Transcurrido este tiempo las muestras se centrifugan a 16.000 g, 10 min a 4 °C. El sobrenadante que contiene las histonas se recupera en un nuevo tubo. Se procede a la precipitación de las histonas mediante la adición de 135 µL de ácido tricloroacético al 100% (Sigma-Aldrich) incubado durante 30 min en hielo.

A continuación las histonas se recuperan mediante centrifugación a 16.000 g, 10 min a 4 °C. Se descarta el sobrenadante y se lavan las histonas con 3 lavados con acetona fría, centrifugando cada vez a 16.000 g durante 10 min a 4 °C.

Finalmente el precipitado de histonas se redissuelve con 100 µL de agua autoclavada, cuantificadas por el método de Lowry y guardadas hasta su uso a -20

5. DETERMINACIONES DE GSH y γ-H2AX POR MICROSCOPIA CONFOCAL

Mediante el microscopio confocal "Leica TCS-SP2 laser scanning" unido a "Leica DM1RB inverted microscope", se realizaron dos experimentos distintos:

1) Análisis del GSH celular y su localización sub-celular en las células de pacientes con disqueratosis congénita transfectadas (24.2. y pLNCX):

Mediante el microscopio confocal, se obtuvieron "secciones ópticas" de la muestra que generaron imágenes tridimensionales para analizar la cantidad de GSH celular y su localización citosólica y/o nuclear gracias al fluorocromo CellTracker green 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA-Molecular Probes), específico para GSH en un 95% y al fluorocromo Hoechst (Sigma), que nos permitió localizar los núcleos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Las tinciones se realizaron con placas de confocal de cuatro pocillos (Lab-Trek® II, Chamber Nalge Nunc International Corp.). Para la tinción con el fluorocromo CMFDA, se diluyó con DMSO (dilución 1:10), se añadió 5 µL/mL de medio y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Después se eliminó el medio y se cambió por otro nuevo durante 15 minutos a 37°C. Finalmente, se visualizó con el microscopio confocal.

Para la tinción de los núcleos, se diluyó el Hoechst 33342 (Invitrogen) (dilución 1:10) con PBS. De esta dilución, se añadió 2 µL/mL de medio a las placas y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, se visualizó con el microscopio confocal.

2) γ -H2AX en fibroblastos de pacientes con disqueratosis congénita:

La determinación de γ -H2AX, también es de interés debido a que es la forma fosforilada de H2AX, que surge como resultado del daño al ADN.

Los tipos celulares AD, BD y CD con sus respectivos controles AC, BC y CC, se sembraron en una placa de 12 pocillos (sobre un cubre colocado en el interior de los pocillos) con medio de cultivo, y se dejaron en la estufa incubando durante 6 días hasta que llegaron a confluencia.

Pasados estos días, se eliminó el medio donde se había incubado las células. Se puso 1 mL de formaldehído al 4% (diluido con PBS) para fijar las células y se dejó a 4°C durante 1 hora. Luego se eliminó el formaldehído de las placas y se añadió 1 mL/pocillo de solución de permeabilización (50 mL PBS + 100 µL TWEEN). Seguidamente se dejó agitando durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó la solución de permeabilización y se añadió 1 mL/pocillo de solución de bloqueo (9,5 mL de solución de permeabilización

+ 0,5 mL de SBF) y se dejó agitando con esta solución durante 1 hora a temperatura ambiente.

Se añadió el anticuerpo primario γ -H2AX (abcam, ab11174) (dilución de 1:2000) en medio de cultivo normal en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. Se eliminó el anticuerpo primario y se incubó con el anticuerpo secundario Alexa fluor 488 mouse (BD biosciences), 1 mL/pocillo (dilución 1:2000) preparado en 1% SBF y 0,2% TWEEN-PBS. Se incubó toda la noche a 4°C en agitación de balanceo. Después de esta incubación, se hicieron 3 lavados de 5 minutos con PBS en agitación y a temperatura ambiente. Finalmente, se añadió 1 mL/pocillo de PBS con Hoechst 33342 (Invitrogen) (dilución 1:10) y se dejó 10 minutos en agitación y a temperatura ambiente. Colocamos una gota de aceite de inmersión (prolong gold, antifade reagent, Invitrogen) sobre un porta, y sobre este añadimos el cubre donde se encuentran adheridas las células. Lo dejamos como mínimo 1 hora en congelador y luego lo visualizamos en microscopio confocal.

3) Metilación lisina 9 de la histona H3 en células de pacientes con disqueratosis congénita transfectadas (24.2 y pLNCX):

Los tipos celulares 24.2. y pLNCX, se sembraron en una placa de 12 pocillos y se realizó el proceso de incubación y de fijación de células explicado en el apartado anterior.

Pusimos el anticuerpo primario H3K9me3 (Abcam, Cambridge, MA, USA) (dilución de 1:300) en medio de cultivo normal en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. Se eliminó el anticuerpo primario y pusimos el anticuerpo secundario Alexa Fluor 543 (Invitrogen) (dilución 1:350) preparado en 1% SBF y 0,2% TWEEN-PBS. Se incubó toda la noche a 4°C en agitación de balanceo. Después de esta incubación, se

III. MATERIALES Y MÉTODOS

hicieron 3 lavados de 5 minutos con PBS en agitación y a temperatura ambiente. Finalmente, se añadió 1 mL/pocillo de PBS con Hoechst 33342 (Invitrogen) (dilución 1:10) y se dejó 10 minutos en agitación y a temperatura ambiente. Colocamos una gota de aceite de inmersión (prolong gold, antifade reagent, Invitrogen) sobre un porta, y sobre este añadimos el cubre donde se encuentran adheridas las células. Lo dejamos como mínimo 1 hora en congelador y luego lo visualizamos en microscopio confocal.

6. CUANTIFICACIÓN DE GENES POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

1) Aislamiento y cuantificación de ARN:

El aislamiento de ARN a partir de células se realizó mediante el kit *"total ARN isolation, Nucleospin ARN XS"* (Macherey-Nagel). Se realizó la medida de la cantidad extraída de ARN mediante el NanoDrop 2000/2000c (Thermo Fisher scientific), midiendo la absorbancia a 260 nm. La pureza del ARN se calcula realizando el cociente 260/280. Valores comprendidos entre 1.8 y 2.0 indican que se obtuvo un ARN de buena calidad.

2) RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction):

Fundamento.

Una hebra de ARN se retrotranscribe en ADN complementario (ADNc) mediante la transcriptasa reversa de alta fidelidad de copia, cebadores inespecíficos (random primers) y dNTPs

Para sintetizar el ADNc a partir del ARN usamos el kit *"High Capacity cADN Reverse Transcription Kit"* de Applied Biosystems.

Partimos de una cantidad de 160 ng de ARN, que se mezcla con el mix que contiene el kit (10xRT Buffer; 25x dNTP Mix (100 mM), 10xRT Cebadores randomizados, MultiScribe™ Reverse Transcriptase, H₂O libre de ARNasas), obteniendo un volumen final de 20 µL, en una placa de 96 pocillos. Las condiciones de la retrotranscripción que se programaron en el termociclador (GeneAmp® PCR System 9700 Thermal Cycler, Applied Biosystems) se muestran en la Tabla III.2:

	PASO 1	PASO 2	PASO 3	PASO 4
TEMPERATURA (°C)	25	37	85	4
TIEMPO (minutos)	10	120	5	∞

Tabla III.2. Programación del termociclador, para poder realizar la RT-PCR.

3) Real time PCR o q-PCR:

Fundamento:

Es una variante de la PCR estándar utilizada para cuantificar ADN o ARN mensajero (mARN). Utilizando cebadores específicos y complementarios de una secuencia concreta es posible sintetizar numerosas copias del fragmento de ADN comprendido entre los cebadores diseñados.

Cuando la PCR a tiempo real se combina con una reacción de retro-transcripción o RT (RT-PCR), puede determinarse la cantidad de mARN de una muestra mediante una cuantificación relativa. En nuestro caso, para la amplificación del ADNc usamos, la sonda "TaqMan" de Applied Biosystems. Estas sondas permiten evaluar la amplificación de las secuencias analizadas, esto es debido a que dicha sonda posee un fluoróforo en su extremo 3' y una molécula en el 5' que bloquea su emisión de fluorescencia "quencher"

III. MATERIALES Y MÉTODOS

que tras el proceso de amplificación se libera y permite que el fluoróforo emita.

Procedimiento:

Se prepara un mix con el ADNc, 10 μ L de la enzima TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, U.S.) y 1 μ L de los cebadores comerciales que se presentan en la tabla (III:3) junto con 7,5 μ L/muestra de agua libre de RNAasa y DNAasa..

GEN	CÓDIGO
Disquerina 1	Hs00154737_m1
GADPH	Hs99999906_m1
8-Oxoguanina glicosilasa (OGG1)	Hs00213454_m1
Poli-(ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP1)	Hs00242302_m1
Glutación peroxidasa 4 (Gpx4)	Hs00989766_g1
RAD53	Hs00200485_m1
RAD51	Hs00153418_m1
Lisina oxidasa 1 (LOX1)	Hs00942480_m1
Catalasa (CAT)	Hs00150308_m1
Cu/Zn Superóxido dismutasa (SOD1)	Hs00533490_m1
Mn Superóxido dismutasa (SOD2)	Hs00167309_m1

Tabla III.3. Especificaciones de los oligos usados y sus respectivos códigos.

De la mezcla ("mix") cogemos 18,5 μL y los ponemos en una placa de 96 pocillos. Posteriormente añadimos 1,5 μL de ADNc, dando un total de 20 μL por pocillo. La placa se coloca en el termociclador (7900 HT Fast Real-Time PCR system, Applied Biosystems), que previamente se ha programado de la siguiente manera (tabla III.4):

	Activación de la Taq polimerasa	Desnaturalización	Unión de cebadores	Extensión
TEMPERATURA (°C)	95	95	60	72
TIEMPO (minutos)	10	15 sec	45 sec	1

Tabla III.4. Programación del termociclador para realizar la q-PCR.

Lo primero que se producirá es la hibridación: se hibrida uniéndose el ADNc a la sonda Taqman. A medida que la temperatura baja, los cebadores van uniéndose a la ADNc con la sonda fluorescente. La Taq polimerasa ADN (Taqman) sintetiza nuevo ADN, añadiendo el nucleótido complementario, a la cadena de ADNc. El "quencher" es separado del fluoróforo, y entonces se emite fluorescencia, siendo entonces detectado.

Cálculos:

La cuantificación de la expresión relativa de las distintas muestras se relativizó internamente frente a la expresión del gen de la Glicer aldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). El incremento de la fluorescencia se midió a tiempo real durante los ciclos de amplificación hasta conseguir alcanzar el valor de inflexión de ciclo "Thershold cycle"

III. MATERIALES Y MÉTODOS

(C_t). La expresión relativa de una muestra frente a su control se expresó como $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$, siendo el $\Delta C_t = C_t$ (gen estudio) - C_t (GAPDH).

7. MEDICIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES POR EL MÉTODO DE LOWRY

Preparamos la recta patrón con concentraciones conocidas de BSA [mg/ml]: [12,5]; [6,25]; [3,125]; [1,56]; [1,78]; [0,39]; [0,19]; [0,097]; [0,048] y el blanco: 500 μ L de H₂O bidestilada. Las muestras se preparan de la siguiente manera: 10 μ L muestra + 490 μ L H₂O bidestilada = 500 μ L. Cargamos la recta patrón: 10 μ L recta patrón + 490 μ L H₂O bidestilada = 500 μ L. Luego agregamos el reactivo de Lowry a cada muestra: 500 μ L reactivo Lowry + 500 μ L de muestra = 1 ml (Volumen_{final}). Se lleva a oscuridad por 20 minutos. Se agregan 250 μ L del reactivo de Folin y agitamos brevemente. Se deja en oscuridad 30 minutos y finalmente, medimos a 660 nm

Se utilizan microcubetas para la medición mediante espectrofotómetro a una longitud de onda de 660 nm. Todas las muestras, incluyendo el blanco y la recta patrón, será medidas por duplicado. El valor definitivo será la media.

8. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS ANTIOXIDANTES POR WESTERN BLOTTING

Fundamento:

La técnica de western blotting permite la identificación de proteínas basándose en la especificidad de la unión antígeno-anticuerpo. Esta unión permite la detección de una única proteína dentro de una muestra compleja proveniente de un extracto proteico de

origen diverso (células, fluidos biológicos o tejidos). Para ello es necesaria la separación de las proteínas mediante una electroforesis previa en gel de poliacrilamida (PAGE), seguida de una transferencia a una membrana de nitrocelulosa o PVDF, en las que las proteínas quedan retenidas y expuestas para facilitar el reconocimiento por el anticuerpo.

Procedimiento:

La técnica de electroforesis consiste en la separación de las proteínas de una muestra en función de su peso molecular. Para esto, las proteínas de la muestra se desnaturalizaron, calentándose a 95°C durante 5 minutos (se rompen los enlaces de hidrógeno), se le añadió tampón de carga con β -mercaptoetanol (que rompe los enlaces disulfuro) y un detergente (SDS-dodecil sulfato) para cargar negativamente las proteínas. Se cargaron las muestras en el gel de poliacrilamida, colocándose en una cubeta horizontal (BIO RAD Mini-PROTEAN Tetra cell) con "running buffer" (900 μ L de H₂O, 100 mL de running 10X): La cubeta tiene unos electrodos que se conectaron a la fuente de alimentación (Power Pac, Bio rad) (a 100 V de manera constante hasta que veamos que el frente de las muestras llegue hasta el final del gel).

Una vez separadas las proteínas, se procedió a la transferencia de éstas desde el gel de electroforesis a una membrana de nitrocelulosa formando un sandwich entre dos electrodos sumergidos en una solución conductora (transfer buffer: 80 mL transfer 10X hasta 800 mL H₂O bidestilada y 200 mL metanol). Las proteínas se transfirieron aplicando el campo eléctrico a 100 V aproximadamente durante 1 hora.

Tras la transferencia se separó el gel de la membrana. El gel se tiñó con azul de coomassie, y la membrana se bloqueó TBS-TWEEN (al 0,1%) con leche añadida al 5% p/v

III. MATERIALES Y MÉTODOS

durante 1 hora. Así se consiguió bloquear los sitios de unión de la membrana y reducir la posterior unión inespecífica de anticuerpos a las proteínas.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: "rabbit monoclonal anti-HSP70" (1:20.000, Stressgen); "mouse monoclonal anti-catalasa" (1:70.000, Sigma); "rabbit monoclonal anti-MnSOD" (1:5.000, Stressgen); "rabbit monoclonal anti-CuZnSOD" (1:1.000, Stressgen); "rabbit polyclonal anti-Gpx4" (1:1.000, Santa Cruz); "rabbit polyclonal anti-Gpx1" (2:3.000, Abcam); "mouse monoclonal anti- β -actina" (1:1000, Santa Cruz); "mouse polyclonal anti-GRX2" (1:1000, Abnova); H3K9ac (Cell Signaling): 1:1.000; H4K9ac (Cell Signaling): 1:1.000; H2AK5ac (Cell Signaling): 1:1000; H3K9me3 (Cell Signaling): 1:1.000, diluidos en TBS-TWEEN (0,1%) con leche o suero bovino fetal (en el caso del "mouse polyclonal anti-GRX2") al 1%. Se dejaron unas 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche en la cámara fría. Tras la incubación con el anticuerpo primario, se hacen 3 lavados de 5 minutos con TBS-TWEEN al 0,1% para eliminar el exceso de anticuerpo primario que haya podido quedar en la membrana y se incuba con el anticuerpo secundario "anti-mouse" (dilución 1:7.500) para anti- β -actina, anti-catalasa, anti-GRX2 y "anti-rabbit" como anticuerpo secundario (dilución 1:2.500) para anti-Gpx4, anti-Gpx1, anti-CuZnSOD y anti-MnSOD estos se diluyeron con TBS-TWEEN (al 0,1%) con leche añadida al 1% p/v y se vertieron sobre la membrana. Se incubaron durante 50 minutos a temperatura ambiente.

Finalmente, se hicieron 3 lavados con TBS-TWEEN al 0,1% durante 5 minutos. Añadimos el sustrato (luminol: ECL Western Blotting Detection Reagents, GE Healthcare, UK), 1 mL/membrana y se revelaron las membranas mediante un digitalizador de imagen (Fujifilm

LAS-1000). Posteriormente se analizaron los resultados con el programa informático Fujifilm Image Gauge 4.0.

9. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS ANTIOXIDANTES

9.1. Actividad Gpx mediante el kit Glutathione Peroxidase Assay kit (Cayman)

Fundamento:

Se basa en una reacción acoplada en la que se mide la desaparición del NADPH a 340nm. La Gpx detoxifica el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) utilizando el glutatión reducido (GSH) formándose glutatión oxidado (GSSG) y agua. La glutatión reductasa utiliza el NADPH para reducir el GSSG, formándose de nuevo GSH y $NADP^+$.

Procedimiento:

Preparación de la muestra:

Se sembraron los fibroblastos AD, BD, CD, AC, BC y CC, en placas de 30 cm² durante 6 días. Después de este período, se eliminó el medio de cultivo. Se lavaron 2 veces las placas con PBS y luego se eliminó el PBS de las placas. Se pusieron 600 µL de tripsina y se dejó en la estufa a 37°C durante 5 minutos. Posteriormente, se recogieron las células con 700 µL de medio que se vertieron en un eppendorf, para luego centrifugarlas a 1.500 xg durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después de estos 5 minutos se eliminó el sobrenadante y nos quedamos con el precipitado celular.

Se homogenizaron los precipitados celulares con tampón de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 7'5, 5 mM EDTA y 1mM DTT). Se centrifugaron a 10.000xg durante 15 minutos a 4°C. Se recogió el sobrenadante que es el que posteriormente usamos para el ensayo y se colocó en hielo. Fi-

III. MATERIALES Y MÉTODOS

nalmente, se midieron las proteínas totales en las muestras obtenidas por el método Lowry. Seguimos el protocolo que indica el kit y se mide la absorbancia a 340 nm en el espectrofotómetro a los 5, 10, 15 y 20 minutos después de haber iniciado la reacción.

Cálculos:

Se determinó el incremento de absorbancia entre dos puntos de la parte lineal de la curva y se determinó el cambio en la absorbancia durante ese tiempo usando la ecuación siguiente:

$$\Delta A_{340}/\text{min.} = \frac{A_{340}(\text{Tiempo2}) - A_{340}(\text{Tiempo1})}{\text{Tiempo2}(\text{min.}) - \text{Tiempo1}(\text{min.})}$$

Después se relativizaron los datos de las muestras respecto al "background" y a la concentración de proteínas totales. Finalmente se usó la siguiente fórmula para calcular la actividad Gpx:

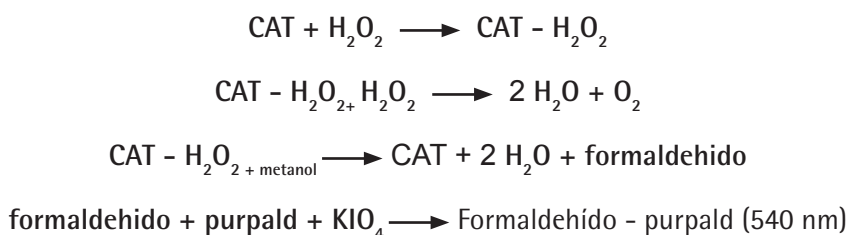
$$\text{Actividad GPx} = \frac{A_{340}/\text{min}}{0,00373 \text{ M}^{-1}} \times \frac{0,19\text{mL}}{0,02\text{mL}} \times \text{Dilución muestra} = \text{nmol/min/mL}$$

9.2. Actividad catalasa

Fundamento:

La reacción de la catalasa presenta una cinética de punto final donde se valora la actividad peroxidasa. El ensayo se basa en la formación de un intermedio de la reacción, que

en presencia de metanol como donante de hidrógeno forma agua y formaldehído. Éste último reacciona con el reactivo de Purpald (4-amino-3-hidrazino-4-mercapto-1,2,4-triazol), formándose un complejo que absorbe a 540 nm.



Procedimiento:

Se elaboraron los estándares con formaldehído 6 mM y tampón PFA (25 mM fosfato potásico, 1 mM EDTA, 1mg/mL BSA).

En una placa de 96 pocillos se añadieron los siguientes reactivos: 100 μL de tampón de ensayo (tampón fosfato potásico 100 mM pH 7), 30 μL de metanol y 20 μL de los patrones o de las muestras (para que la actividad sea reproducible, debe de estar entre 0,25-4 nmol/min/mL).

Se inició la reacción mediante la adición en todos los pocillos de 20 μL de H_2O_2 (la adición debe ser lo más rápida posible). Se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después se detuvo la reacción mediante la adición de 30 μL de KOH 10 M. Añadimos 30 μL de purpald (35 mM en HCl 0,5 M) e incubamos durante 10 minutos a temperatura ambiente. Añadimos 10 μL de KIO_4 . Lo incubamos durante 70 minutos a temperatura

III. MATERIALES Y MÉTODOS

ambiente. Analizamos la absorbancia a 540 nm en espectrofotómetro.

Cálculos:

Realizamos la medida de las absorbancias de las réplicas de estándares y de las muestras. Dibujamos la curva de absorbancias corregidas en función de la concentración final de PFA. Finalmente, calculamos la concentración final de PFA de las muestras utilizando la ecuación obtenida de la regresión lineal de la curva estándar e interpolando los valores de absorbancia de cada muestra.

$$\text{PFA} = [(\text{absorbancia muestra} - \text{ordena en origen}) / \text{pendiente}] \times (0,17\text{mL}/0,02\text{mL})$$

Calculamos la actividad catalasa usando la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad catalasa} = (\mu\text{M muestra}/20\text{min.}) \times \text{dilución muestral} = \text{nmol/nim/mL}$$

9.3. Actividades Superóxido dismutasa mediante el kit "superoxide dismutase assay" (Cayman Chemical):

Fundamento:

La SOD cataliza la detoxificación del anión superóxido como se muestra en la siguiente figura;



Este O_2^- se produce por la acción de una enzima que se añade al medio de reacción, la xantina oxidasa. El radical se detecta gracias a la adición de un detector de radicales libres, la sal de tetrazolio. Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima

necesaria para producir un 50% de la dismutación del radical superóxido.

En este protocolo podremos calcular la SOD total, la MnSOD y la CuZnSOD.

Procedimiento:

Preparación de las muestras:

Los precipitados celulares obtenidos de las muestras AD, BD, CD, AC, BC, CC, pLNCX y 24.2: se sonicaron en hielo con tampón 20 mM HEPES, pH 7,2, EGTA 1mM, 210mM manitol y 70 mM de sacarosa, se centrifugaron a 1.500xg, 5 minutos a 4°C. Posteriormente, se obtuvo el sobrenadante para el ensayo y se dejó en hielo. Éste se centrifugó a 10.000 xg durante 15 minutos a 4°C: El sobrenadante que nos quedó era el que contenía la enzima SOD citosólica, mientras que el precipitado contenía la enzima SOD mitocondrial. Este precipitado se lisó con tampón constituido por 20 mM HEPES pH 7,2, EGTA 1mM, 210mM manitol y 70 mM de sacarosa).

Preparación de la curva de calibrado:

Se preparó la curva de calibrado de la siguiente manera: Diluimos 20 μ L del SOD estándar con 1,95 mL de tampón de muestra diluido (2 mL de tampón de muestra con 18 mL de H₂O bidestilada) para obtener la solución de "SOD Stock". Rotulamos los eppendorf de A-G que se utilizarán para realizar la curva de calibrado. Finalmente, añadimos las cantidades de "SOD stock" y "sample buffer" que se presentan en la tabla (tabla III.5):

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Tubo	SOD Stock (μL)	Sample buffer (μL)	Actividad SOD final (U/mL)
A	0	1000	0
B	20	980	0,025
C	40	960	0,05
D	80	920	0,1
E	120	880	0,15
F	160	840	0,2
G	200	800	0,25

Tabla III.5. Resumen de las cantidades utilizadas para la curva de calibrado.

Posteriormente, se añadieron 200 μL del "radical detector" diluido (50 μL con 19,95 mL de tampón de ensayo) y 10 μL de los estándares en una placa de 96 pocillos. Se repitió la curva de los patrones. Para las muestras, se pusieron 200 μL del "radical detector" diluido y 10 μL de muestra en los pocillos. La reacción se inicia cuando se añaden 20 μL de xantina oxidasa diluida en todos los pocillos (estándares y muestras). La placa de 96 pocillos se agitó suavemente durante unos segundos para mezclar los reactivos y se cubrió con la tapa. Luego se incubó la placa en agitador durante 20 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia se leyó a 450 nm.

Cálculos:

Calculamos el cociente de absorbancia para cada punto de la recta patrón. Para ello se obtuvo el valor del patrón 0 y éste se dividió por cada valor del patrón. Se calculó la recta patrón de SOD poniendo en el eje de las X la actividad de SOD y en el de las Y el valor del

cociente de absorbancias y el cociente de absorbancia para cada muestra. Finalmente se interpoló en la recta patrón siguiendo la siguiente fórmula:

$$\text{SOD (U/mL)} = \frac{\text{cociente de abs. Muestra}-0.0}{\text{pendiente}} \times \frac{0,23\text{mL}}{0,01\text{mL}}$$

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS:

Para el análisis estadístico de los resultados, primero se realizó un análisis de la varianza. La hipótesis nula fue aceptada para todos los valores de aquellos grupos en los cuales F no fue significativa para un valor $p \leq 0.05$. Luego, el grupo de datos para los que F fue significativa fue analizado por el test de la t de Student. La simbología empleada en la presente tesis es la siguiente: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Para la realización de la estadística se utilizó el programa SPSS.

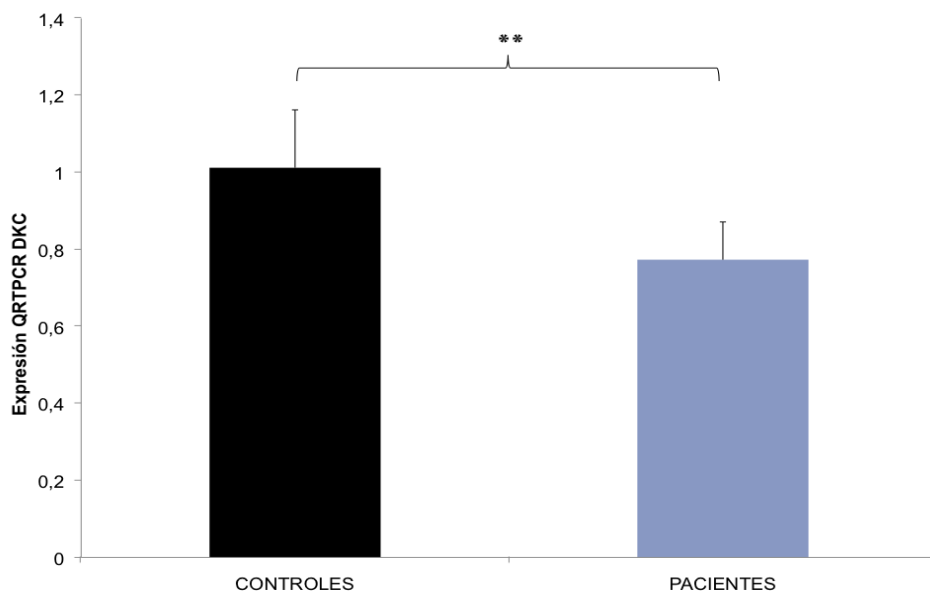
RESULTADOS

PACIENTES CON DISQUERATOSIS CONGÉNITA:

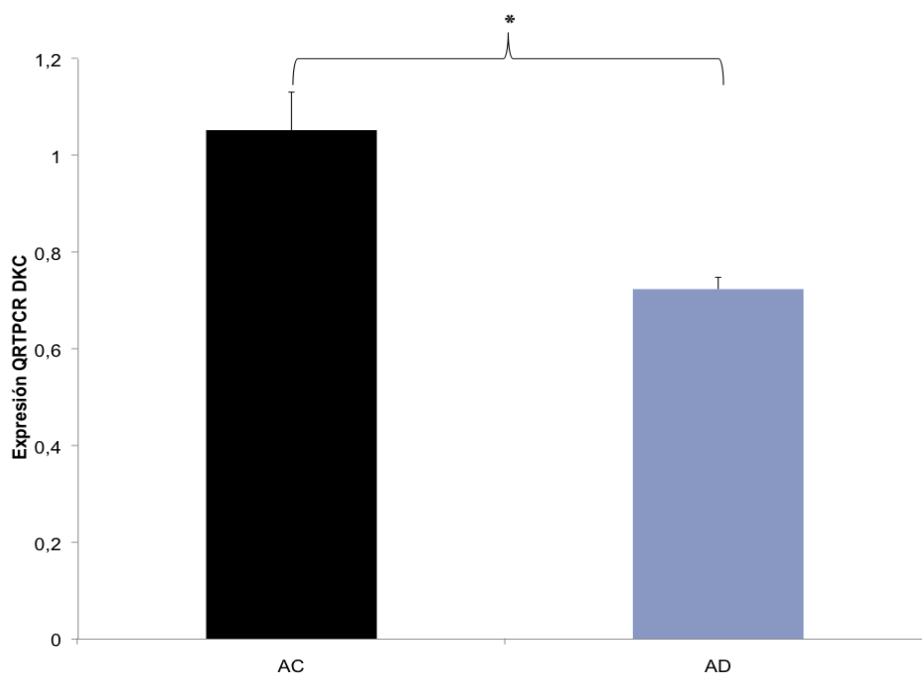
1. EXPRESIÓN DEL GEN *DKC1* EN PACIENTES CON DC LIGADA AL CROMOSOMA X

El análisis de la expresión del gen *DKC1*, que codifica para la disquerina, responsable de la forma ligada al cromosoma X, está disminuida en los fibroblastos de pacientes con DC respecto a controles sanos, concretamente en el caso de BD un 16% menos respecto a BC y un 38% menos en CD respecto a su control (CC). Incluso los fibroblastos obtenidos de la paciente AD, portadora de la enfermedad y por lo tanto con un fenotipo no tan acusado como el que presentan los otros dos pacientes, mostró una expresión de *DKC1* un 31% menor respecto a su control. La expresión de *DKC1* en el grupo de pacientes es un 24% menor que la de sus controles (figura IV.1).

A



B



IV. RESULTADOS

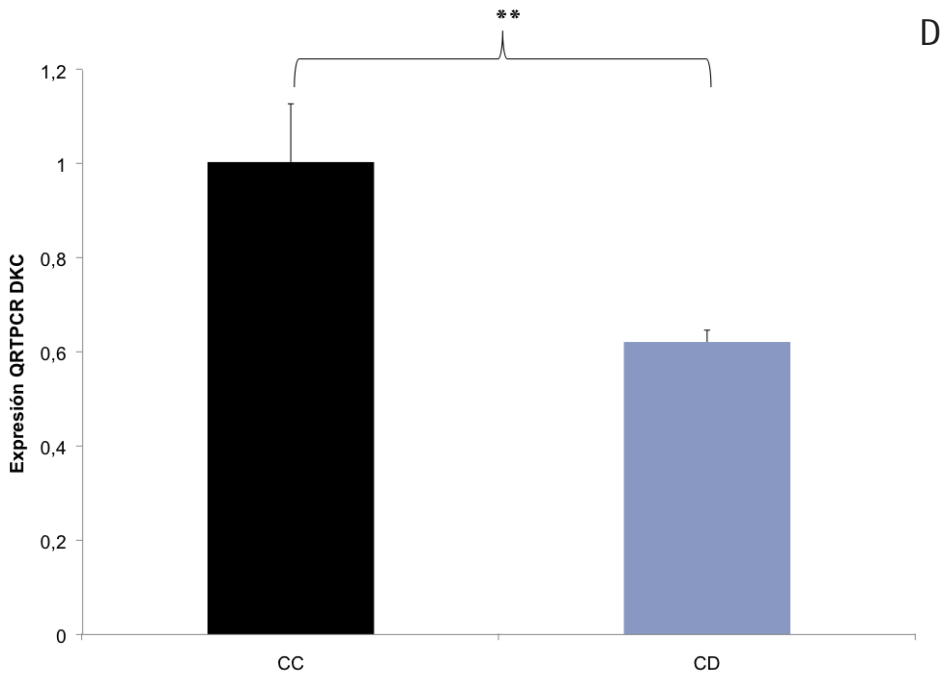
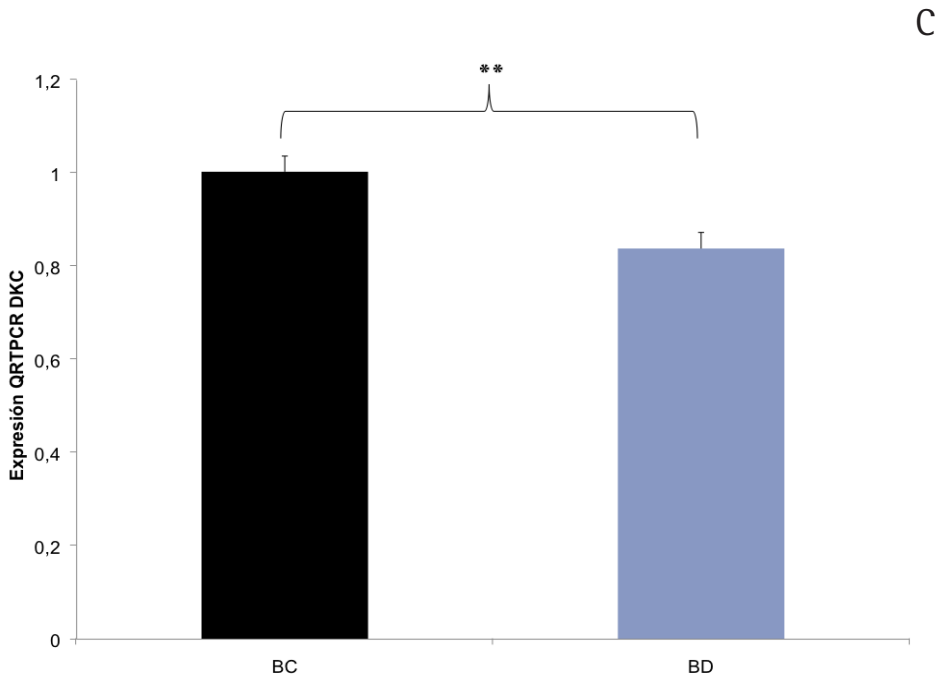


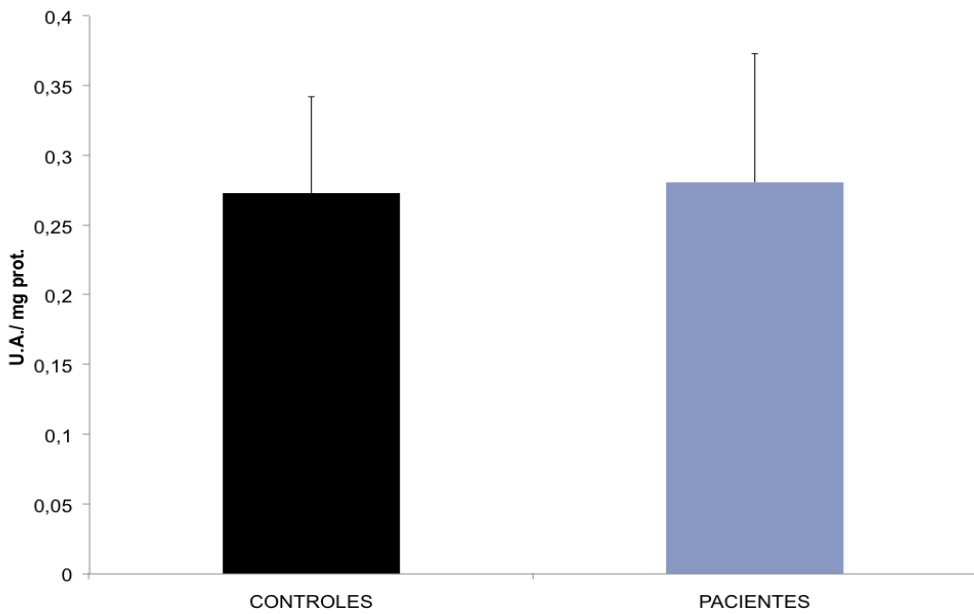
Figura IV.1. Expresión del gen DKC1 en líneas de fibroblastos de pacientes de X-DC determinados mediante qRT-PCR. A) Niveles de expresión del gen DKC1 en controles y pacientes de X-DC. B) Análisis de la expresión del gen DKC1 en el grupo AC y AD. C) Análisis de la expresión en el grupo BC y BD. D). Análisis de la expresión del gen DKC1 en el grupo CC y CD. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. La significación estadística se expresa como (*) $p < 0,05$ frente al control AC y como (**) $p < 0,001$ frente al resto de los controles. La expresión de DKC1 se representa en número de veces.

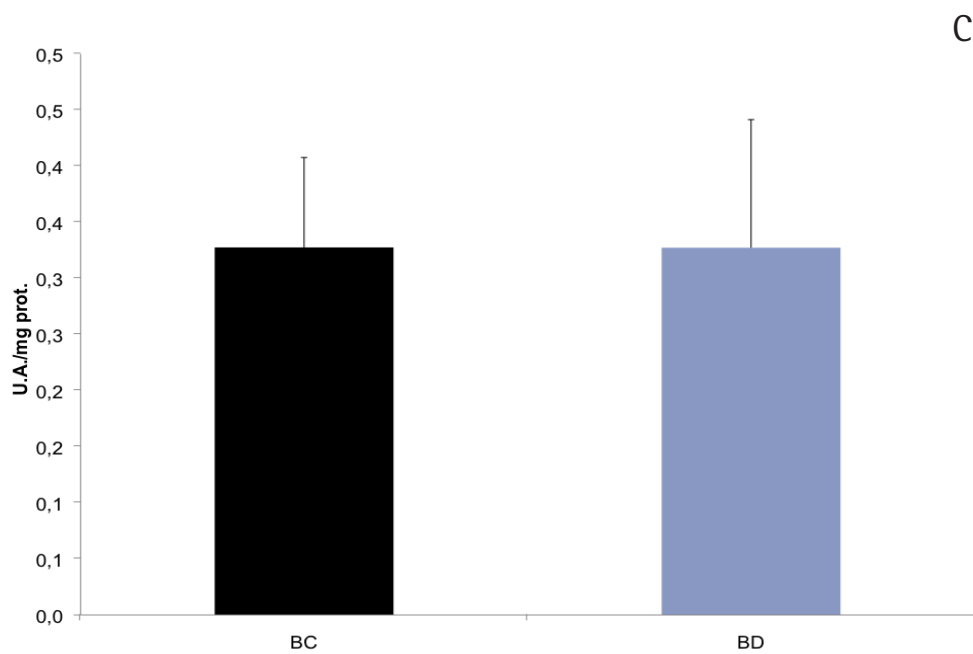
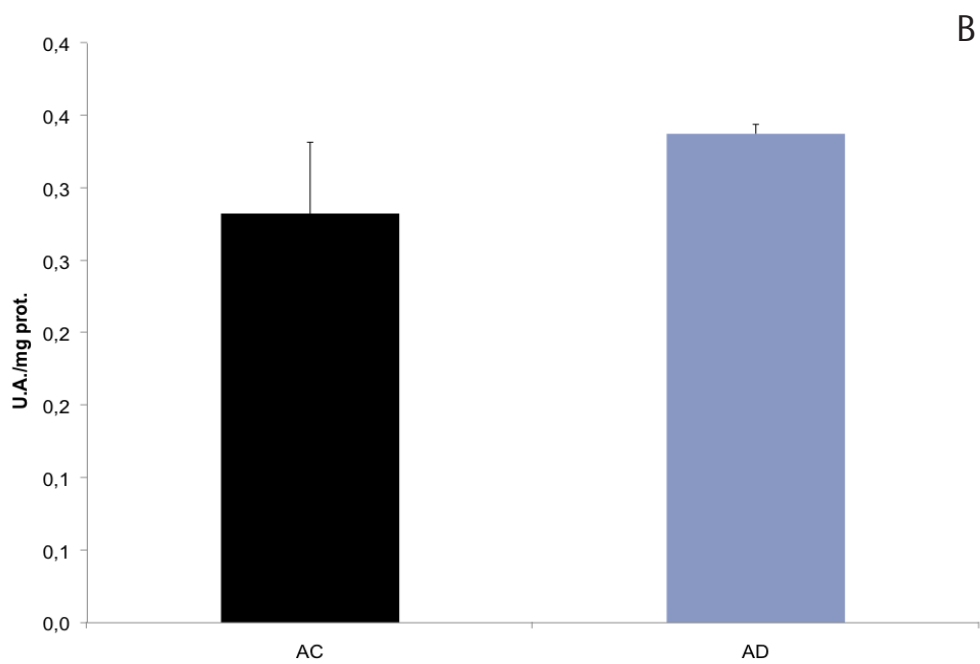
IV. RESULTADOS

2. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE RADICAL SUPERÓXIDO

La determinación de los niveles del radical superóxido en fibroblastos de pacientes de X-DC mediante el método fluorimétrico usando la sonda dihidroetidio, no mostró diferencias significativas con respecto a los fibroblastos de individuos control.

A





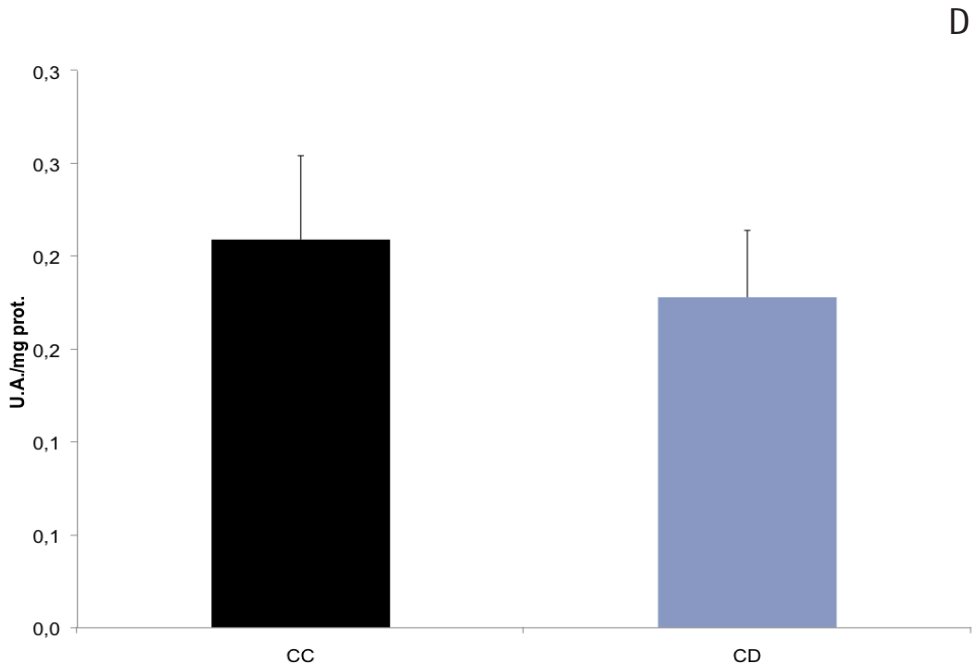


Figura IV.2. Análisis de los niveles del radical superóxido mediante detección con dihidroetidio. A) Niveles de radical superóxido en controles y pacientes de X-DC. B) Análisis de los niveles en el grupo AC y AD. C) Análisis de los niveles en el grupo BC y BD. D) Análisis de los niveles en el grupo CC y CD.

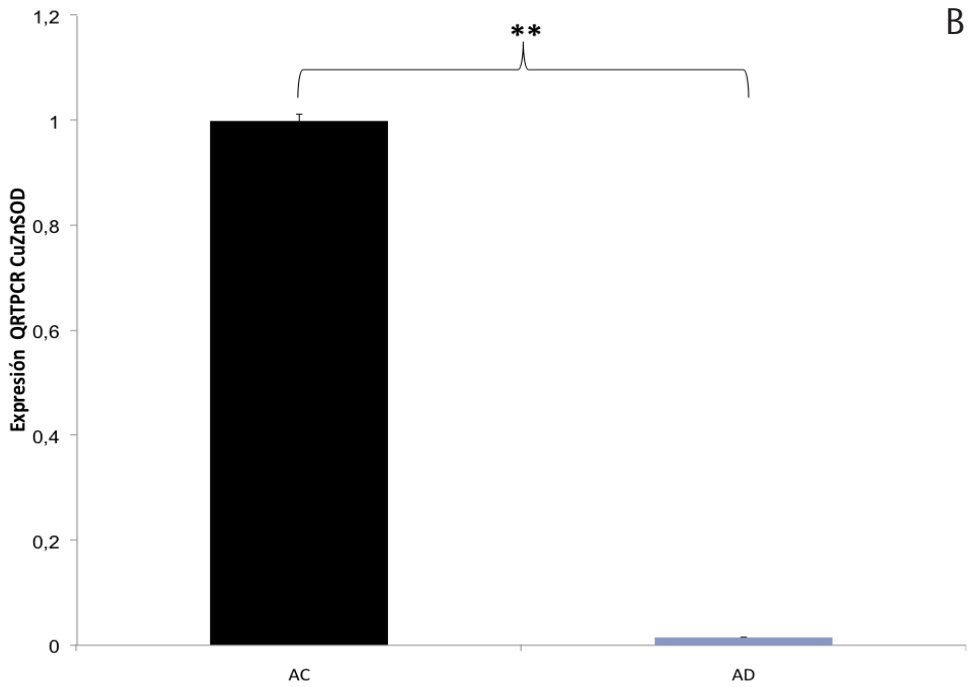
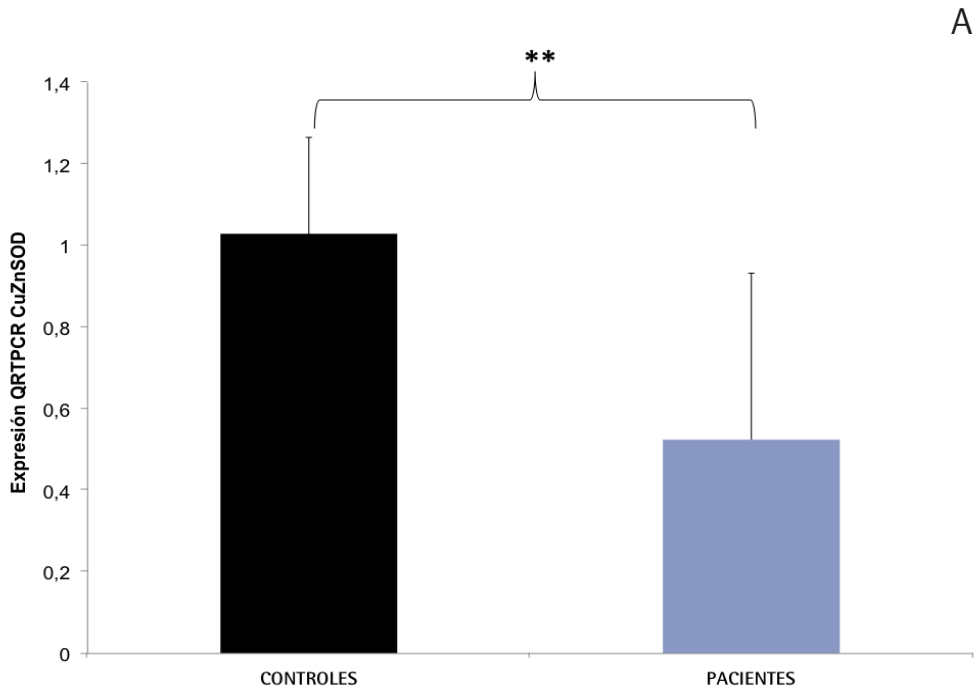
3 ESTUDIO DE LAS DEFENSAS ANTIOXIDANTES EN FIBROBLASTOS DE PACIENTES DE DISQUERATOSIS CONGÉNITA LIGADA AL CROMOSOMA X

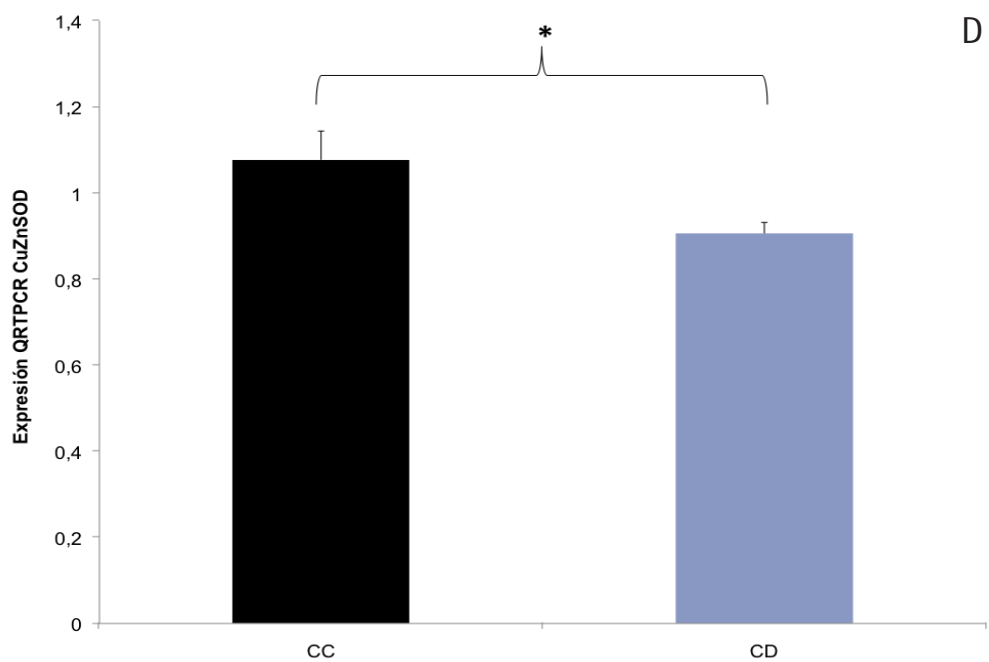
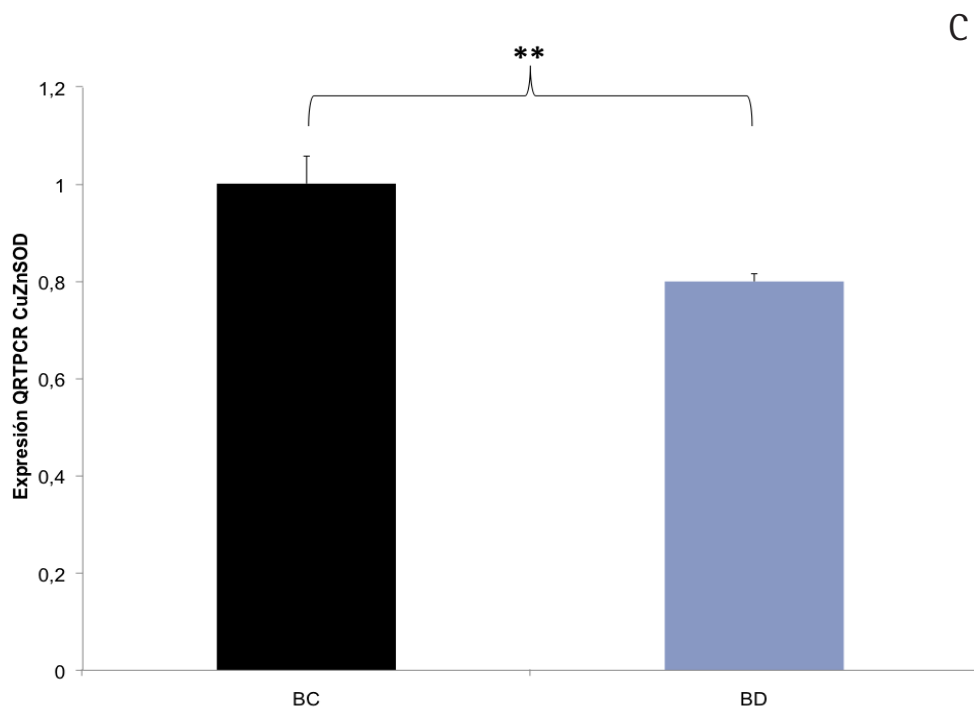
3.1. CuZnSOD: Estudio de la actividad enzimática y de la expresión mediante QRT-PCR y western blot:

La enzima CuZn superóxido dismutasa participa en el proceso de detoxificación del radical superóxido, transformándolo en peróxido de hidrógeno y oxígeno [96]. Esta enzima está codificada por el gen *SOD1*.

En la figura IV.3.A. observamos que las células de los enfermos de X-DC presentan una menor expresión del gen *SOD1*. Cuando se analizó la expresión del gen *SOD1* para cada una de las líneas celulares de los pacientes, se observaron niveles disminuidos con respecto a sus controles (Figura IV.3.B, IV.3.C. IV.3.D). Los niveles de proteína CuZnSOD se analizaron por Western-Blot, encontrando niveles bajos de proteína para los fibroblastos de los pacientes AD y BD (figura IV.3.E). Estos resultados correlacionaron bien con la actividad CuZnSOD analizada para todas las líneas celulares. En concreto, se observó que la actividad CuZnSOD estaba significativamente disminuida en fibroblastos de pacientes con X-DC, siendo menor en los fibroblastos BD y CD comparando con sus respectivos controles. En el caso del paciente AD, los resultados de la actividad no presentan diferencias estadísticamente significativas, aunque sí que existe una tendencia a la baja en fibroblastos de pacientes frente a sus controles (figura IV.3.F), probablemente debido a que los fibroblastos del paciente AD son de una mujer portadora con un fenotipo menos grave.

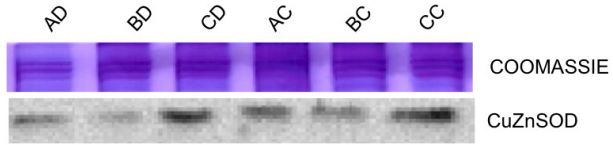
IV. RESULTADOS





IV. RESULTADOS

E



F

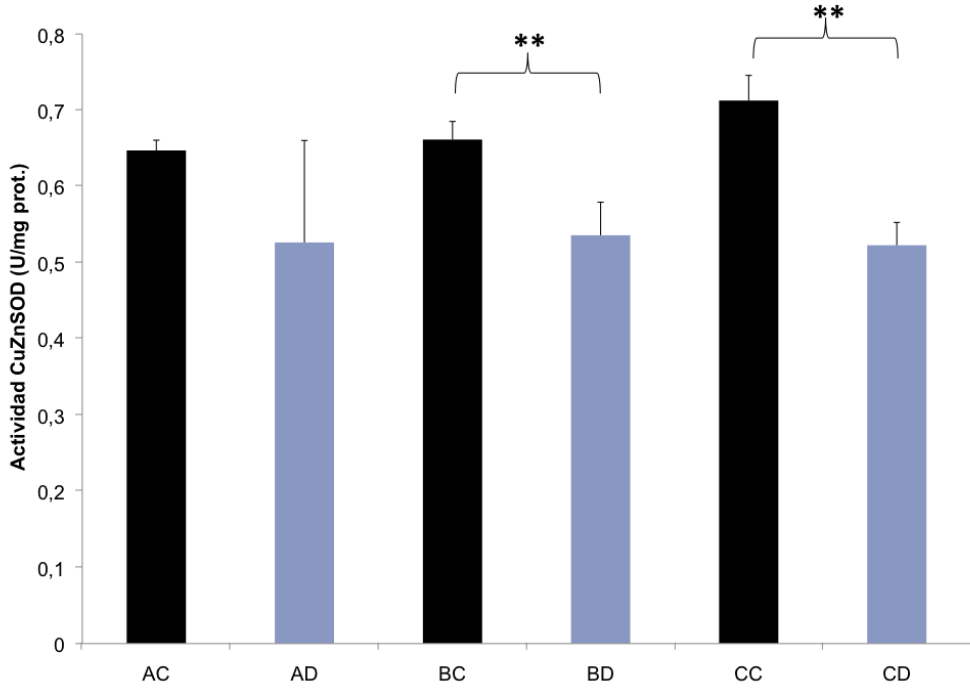


Figura IV.3. Estudio de la expresión y la actividad de la enzima CuZnSOD en X-DC. A) Niveles de expresión del gen CuZnSOD en controles y pacientes de X-DC. B) Análisis de la expresión en el grupo AC y AD. C) Análisis de la expresión en el grupo BC y BD. D) Análisis de la expresión en el grupo CC y CD. E). Estudio de los niveles de proteína mediante WB. F) Actividad enzimática determinada mediante el kit "superoxide dismutase assay" (Cayman Chemical). Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. La significación estadística se expresa como () $p < 0,05$ frente al control CC y como (**) $p < 0,001$ frente a los controles. La expresión de CuZnSOD se representa en número de veces.*

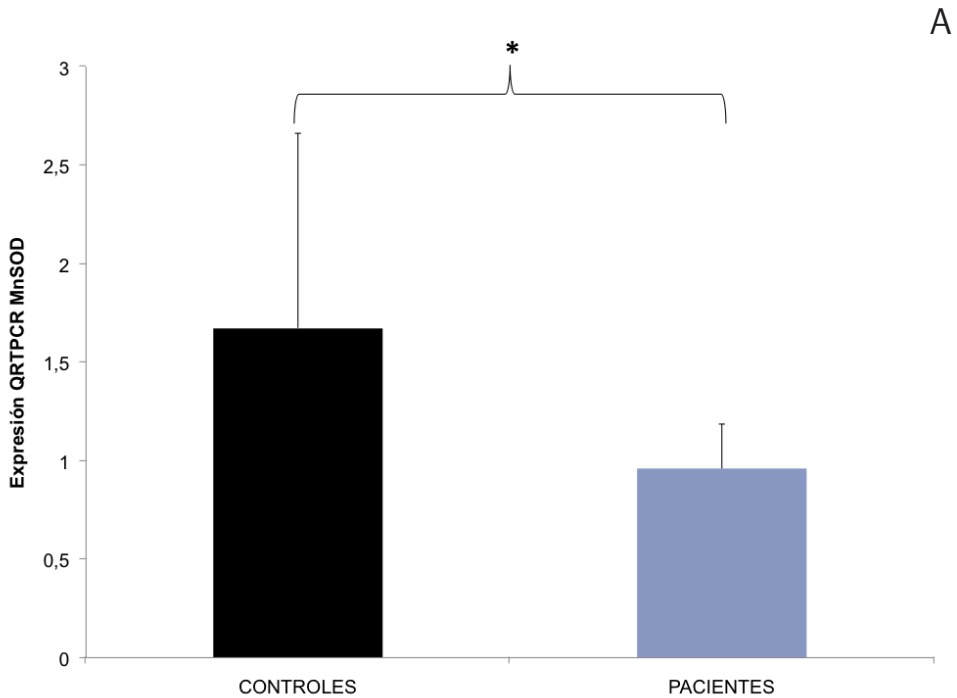
3.2 MnSOD: Estudio de la actividad enzimática y de la expresión mediante QRT-PCR y western blot:

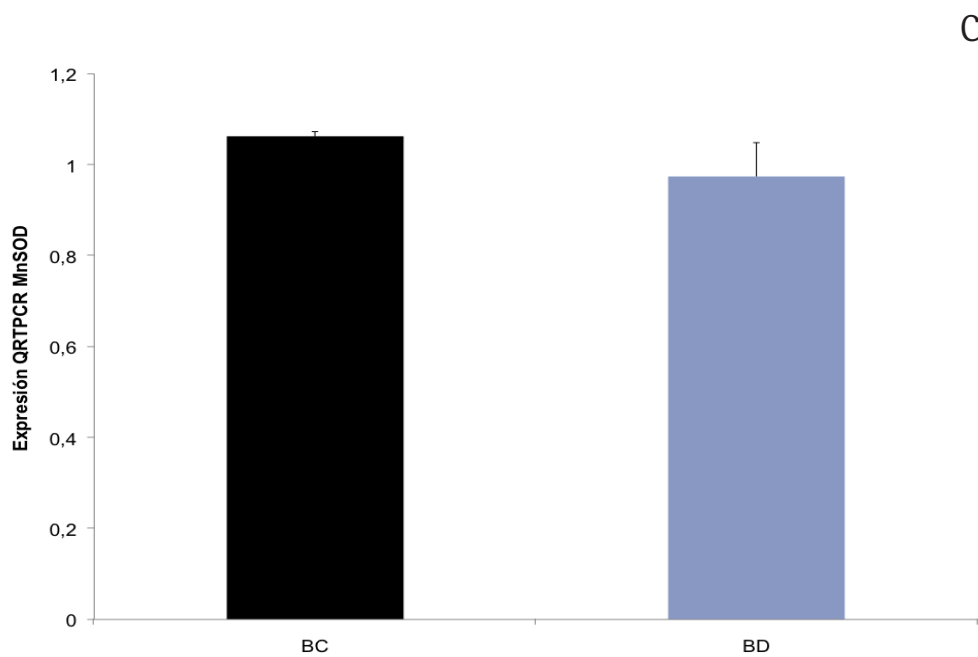
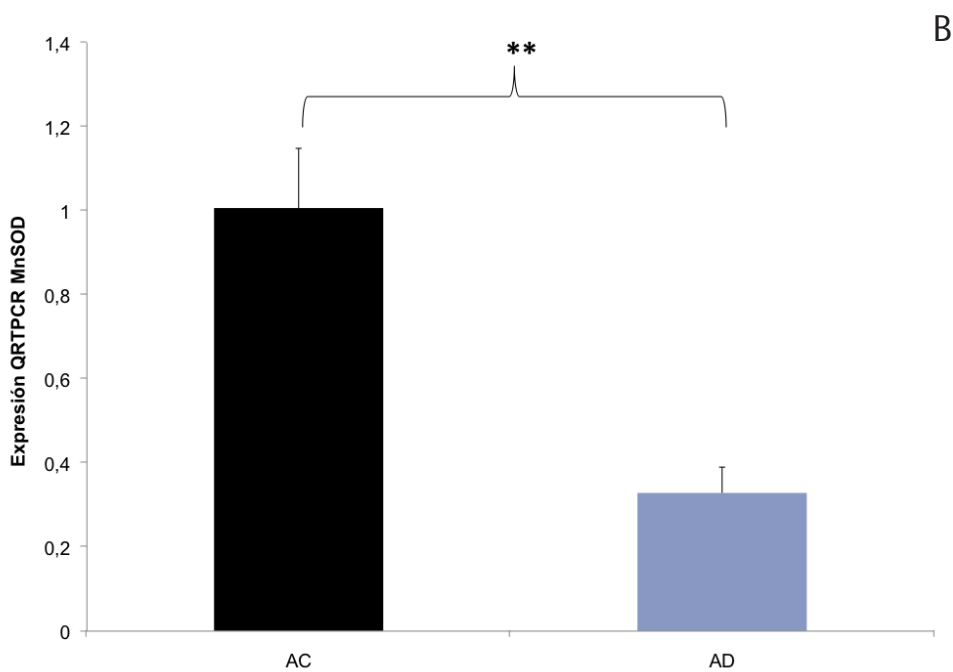
La enzima antioxidante inducible MnSOD tiene especial relevancia al encontrarse en la mitocondria donde tiene lugar la respiración celular, la cual es una gran generadora de radicales libres. Así, la ausencia o disminución de MnSOD en la célula incrementa el daño al ADN [97,98]. La enzima MnSOD es codificada por el gen SOD2.

Se analizaron los niveles de mRNA para el gen SOD2 por qRT-PCR. En este caso, se observa una menor expresión del gen de la MnSOD para los fibroblastos de pacientes cuando se estudió la expresión de todas las líneas celulares (Figura IV.4.A). Al estudiar cada una de las líneas independientemente, se observó baja expresión del gen SOD2 en los fibroblastos AD y CD respecto a los fibroblastos controles (figura IV.4.B). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los fibroblastos de pacientes BD con respecto a su control. Los niveles de proteína evaluados por Western blot resultaron ser menores en AD y en CD con respecto a sus controles (figura IV.4.E). Del mismo modo a como ocurre

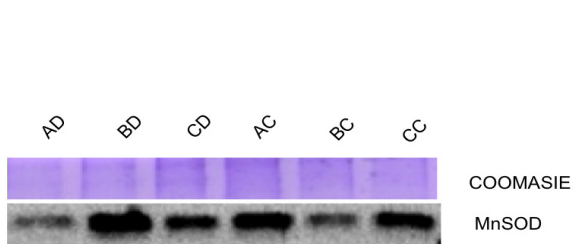
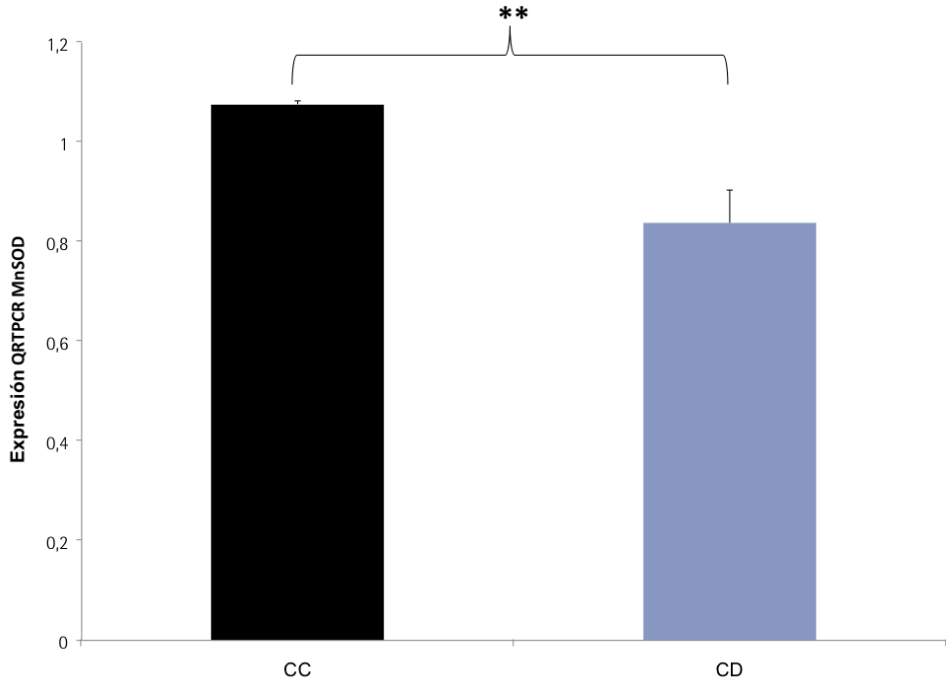
IV. RESULTADOS

con la expresión del gen *SOD2*, no se encontró una disminución de los niveles de proteína MnSOD en la línea BD (figura IV.4.E). El estudio de la actividad enzimática mostró que la actividad MnSOD en CD es mayor respecto a su control, mientras que en el caso de AD respecto a su control (AC) no se observaron diferencias significativas. Por el contrario, la línea BD mostró una menor actividad MnSOD respecto a su control (BC).





IV. RESULTADOS



F

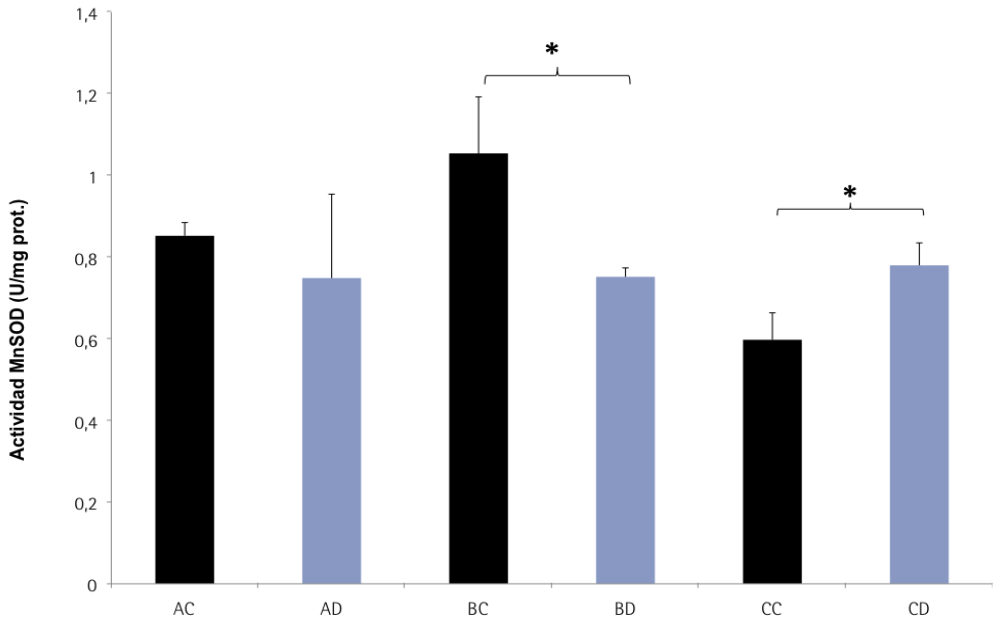
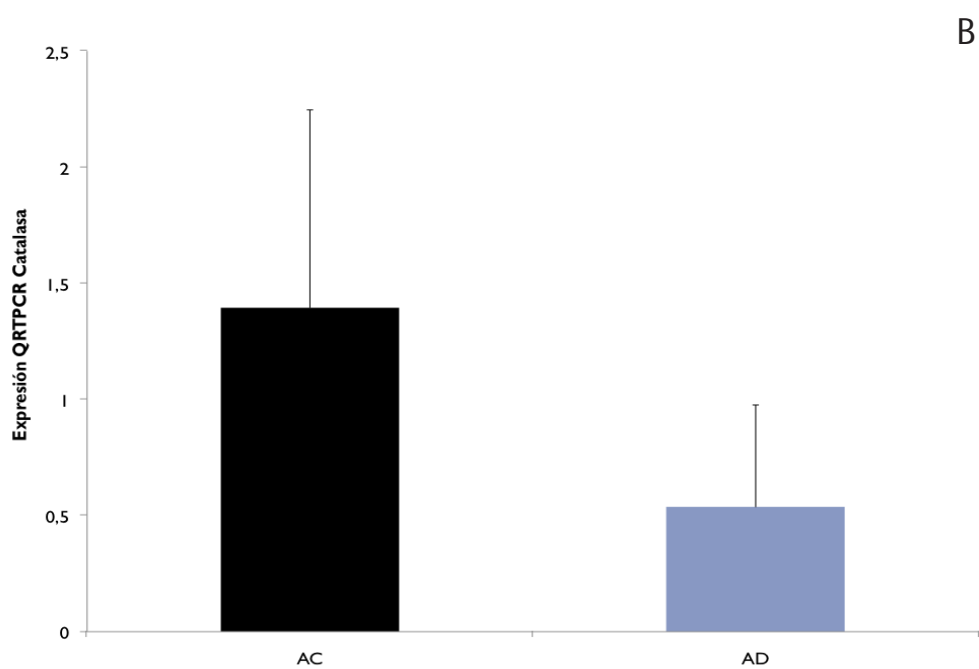
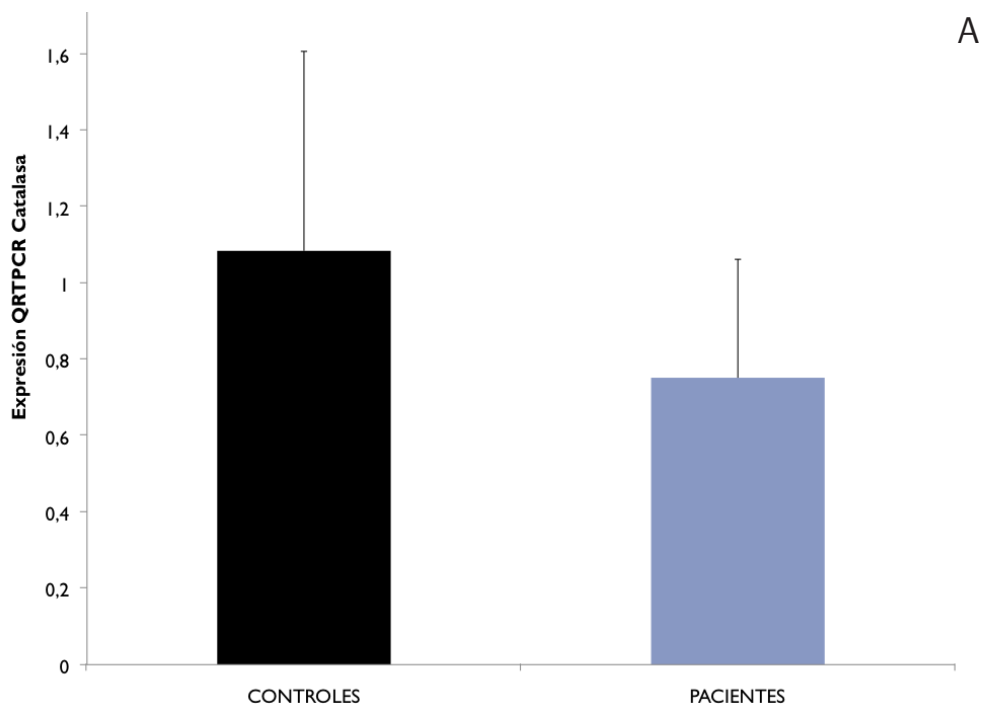


Figura IV.4. Estudio de la expresión y la actividad la enzima MnSOD en X-DC. A) Niveles de expresión del gen MnSOD en controles y pacientes de X-DC. B) Análisis de la expresión en el grupo AC y AD. C) Análisis de la expresión en el grupo BC y BD. D) Análisis de la expresión en el grupo CC y CD. E) Estudio de los niveles de proteína. F) Actividad enzimática determinada mediante el kit "superoxide dismutase assay" (Cayman Chemical). Los valores se expresan como $\text{media} \pm \text{desviación estándar}$. La significación estadística se expresa como (*) $p < 0,05$ frente a los controles y como (**) $p < 0,001$ frente a los controles. La expresión de MnSOD se representa en número de veces.

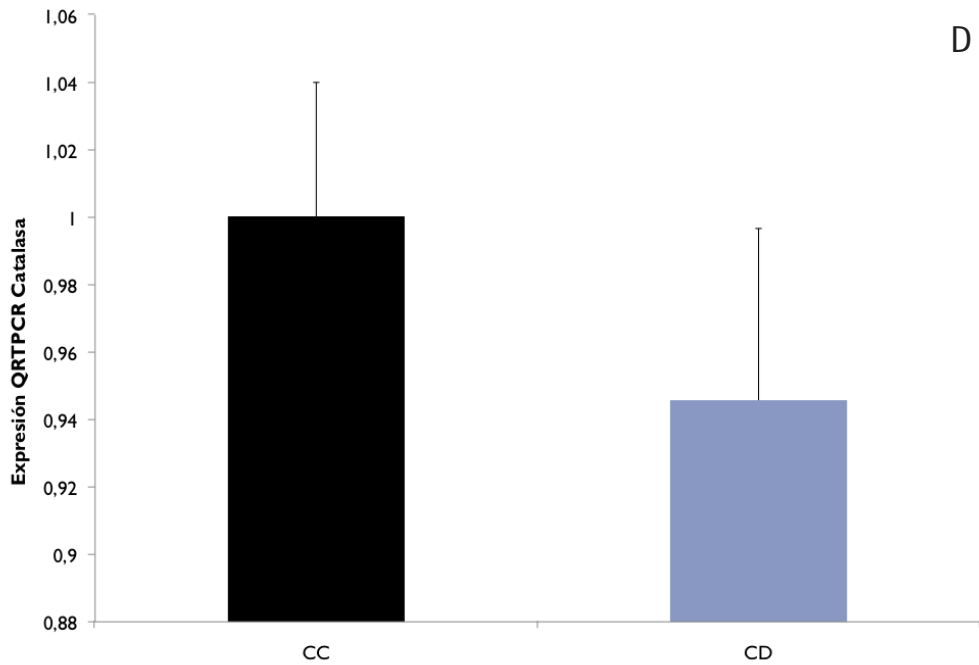
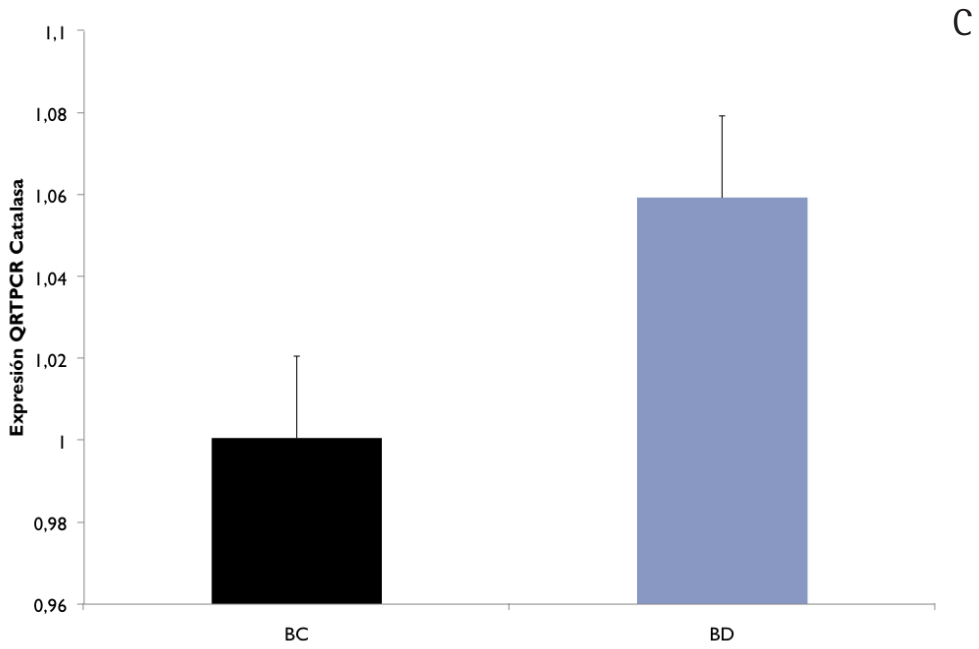
3.3 Catalasa: Estudio de la actividad enzimática y de la expresión mediante QRT-PCR y western blot:

La catalasa es una enzima que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua (Chance et al., 1979).

El estudio de la expresión del gen *CAT* no mostró diferencias significativas en la expresión entre los fibroblastos control y los fibroblastos de pacientes con X-DC (figura IV.5.A, IV.5.B IV.5.C y IV.5.D. Cuando se analizaron los niveles de proteína catalasa por Western blot, solo se observaron niveles disminuidos de catalasa en los fibroblastos del paciente AD (figura IV.5.E). El análisis de actividad enzimática catalasa mediante un método espectrofotométrico indicó que las líneas celulares de los pacientes AD y BD tenían actividades enzimáticas disminuidas en relación a sus respectivos controles (figura IV.5.F).



IV. RESULTADOS



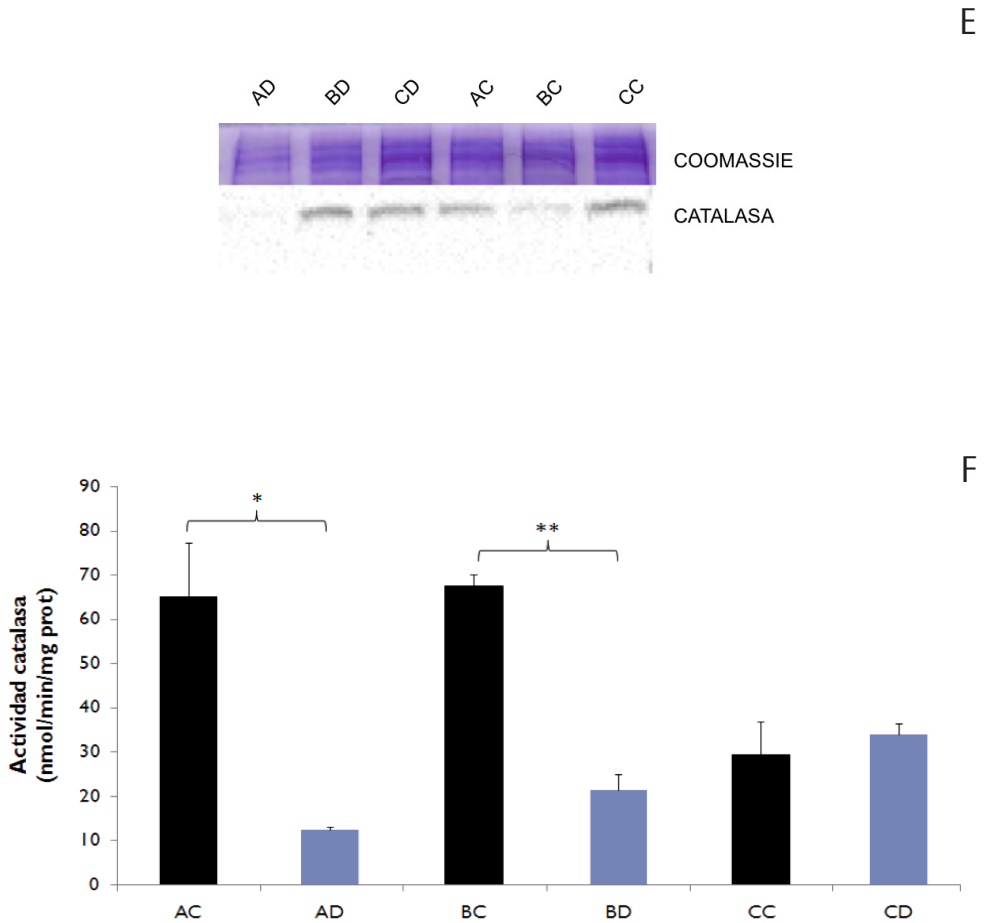


Figura IV.5. Estudio de la expresión y de la actividad de la enzima catalasa en X-DC. A) Niveles de expresión del gen catalasa en controles y pacientes de X-DC. B) Análisis de la expresión en el grupo AC y AD. C) Análisis de la expresión en el grupo BC y BD. D) Análisis de la expresión en el grupo CC y CD. E). Estudio de los niveles de proteína. F) Actividad enzimática. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. La significación estadística se expresa como (*) $p < 0,05$ frente al control AC y como (**) $p < 0,001$ frente al control BC. La expresión de catalasa se representa en número de veces.

3.4 Glutación peroxidasa: Estudio de la actividad enzimática y de la expresión mediante QRT-PCR y western blot:

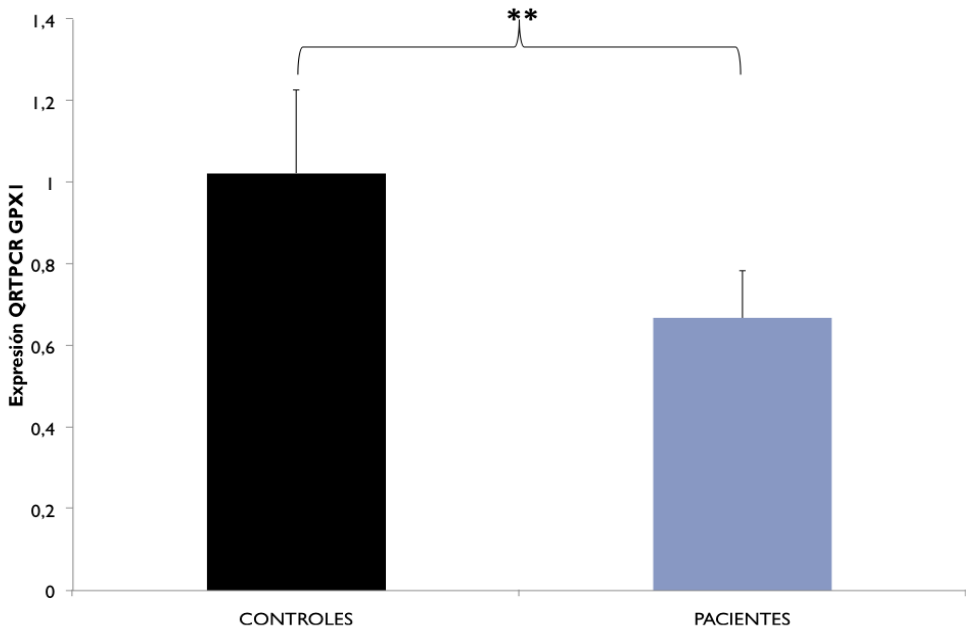
La enzima GPX cataliza la reacción de reducción de peróxido de hidrógeno, hidroperóxidos orgánicos y lipoperóxidos a expensas de glutación reducido, protegiendo a las células contra el estrés oxidativo [39]. Aquí estudiamos mediante qRT-PCR y Western blot dos formas: GPX1 y GPX4. La GPX1 es la más abundante y se encuentra en el citoplasma de la mayoría de las células de mamíferos, mientras que en el caso de la GPX4 se expresa en multitud de células de mamíferos, pero en menor cantidad. Además, GPX4 tiene preferencia por los lipoperóxidos [54].

El estudio de la expresión génica para el gen *GPX1* indicó diferencias significativas en su expresión entre los fibroblastos control y los fibroblastos de pacientes con X-DC (figura IV.6.A). El análisis individual de la expresión de *GPX1* para cada una de las líneas celulares indicó niveles disminuidos en la expresión de este gen para las tres líneas de X-DC (figura IV.6.B, IV.6.C y IV.6.D).

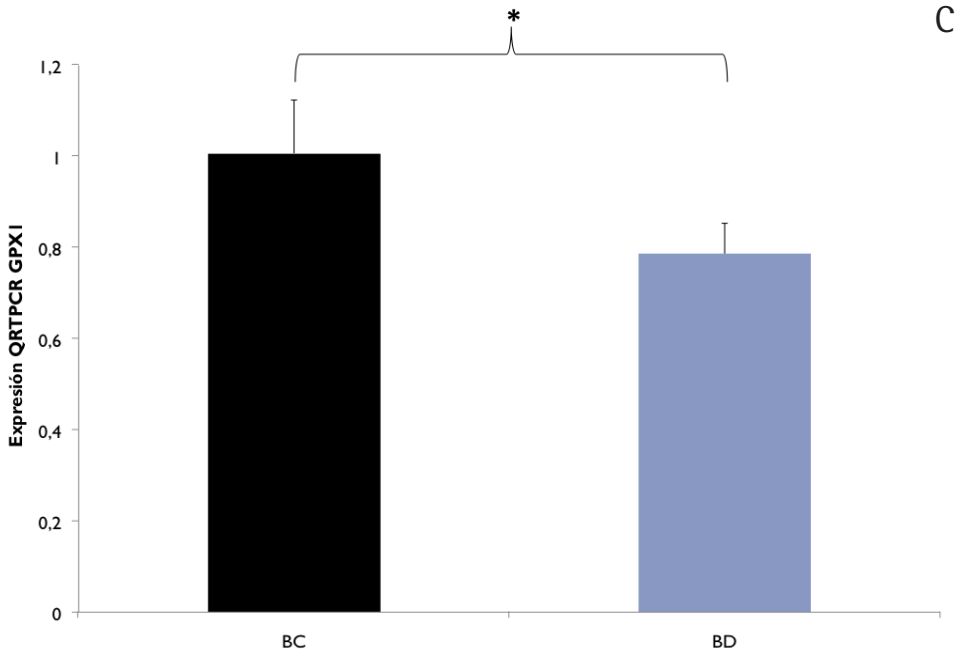
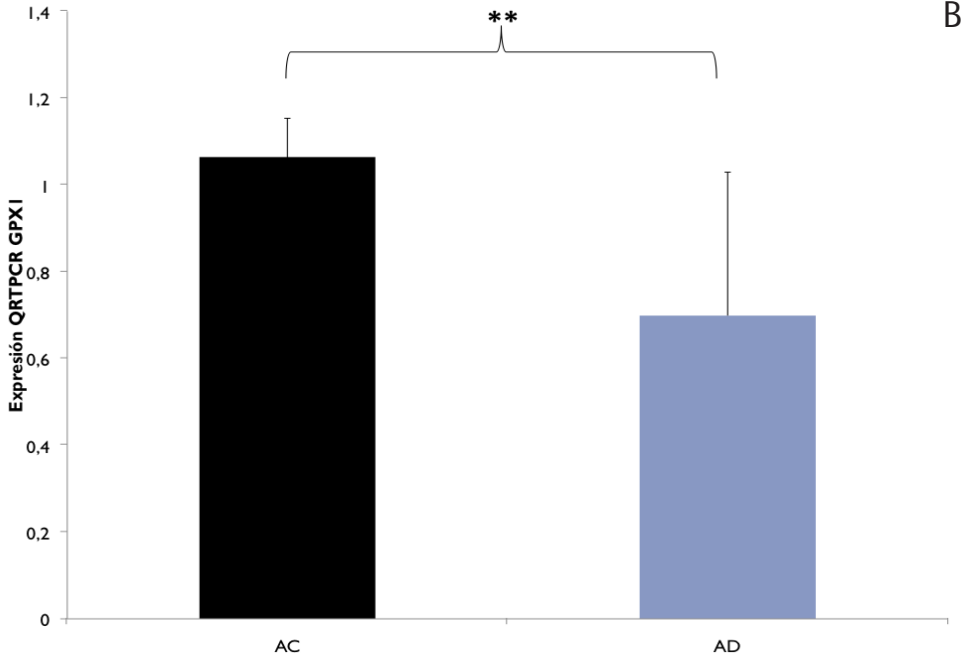
Cuando se analizó la expresión del gen *GPX4* para todas las líneas X-DC y se comparó con la de las líneas controles, se observó una disminución en la expresión para las líneas de fibroblastos provenientes de los pacientes (figura IV.6.E). Sin embargo, el análisis individualizado de cada una de las líneas celulares solo mostró una disminución significativa de la expresión del gen *GPX4* para la línea celular del paciente CD (figura IV.6.H), y observando solo una tendencia a la disminución para los pacientes AD y BD (figura IV.6.F y IV.6.G).

Cuando se analizaron los niveles de proteína para las enzimas glutatión peroxidasa 1 (Gpx1) y glutatión peroxidasa 4 (Gpx4) mediante Western blot, se observaron niveles disminuidos para ambas proteínas en las líneas celulares de X-DC con respecto a sus controles, con la excepción de los niveles de Gpx1 para la línea CD (figura IV.6.I).

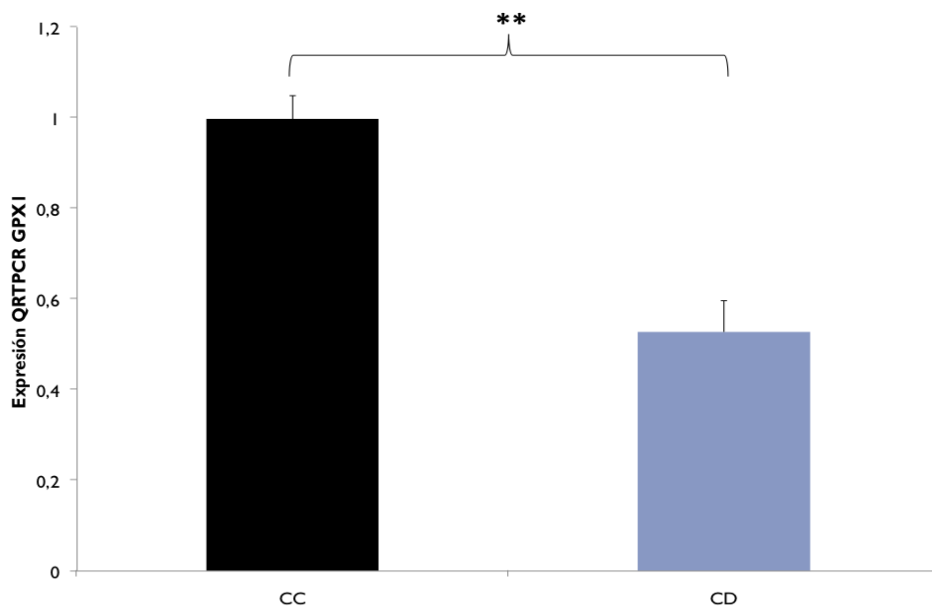
Sin embargo, cuando se analizó la actividad enzimática, con el que se determina la actividad glutatión peroxidasa total, se observó que esta actividad estaba claramente disminuida para todas las líneas celulares X-DC con respecto a sus controles (figura IV.6.J). Indicando que la defensa antioxidante frente a los peróxidos está afectada en los fibroblastos X-DC. Además, dado que la enzima antioxidante glutatión peroxidasa está disminuida esto podría estar relacionado con un aumento en la formación de lipoperóxidos en esta enfermedad.



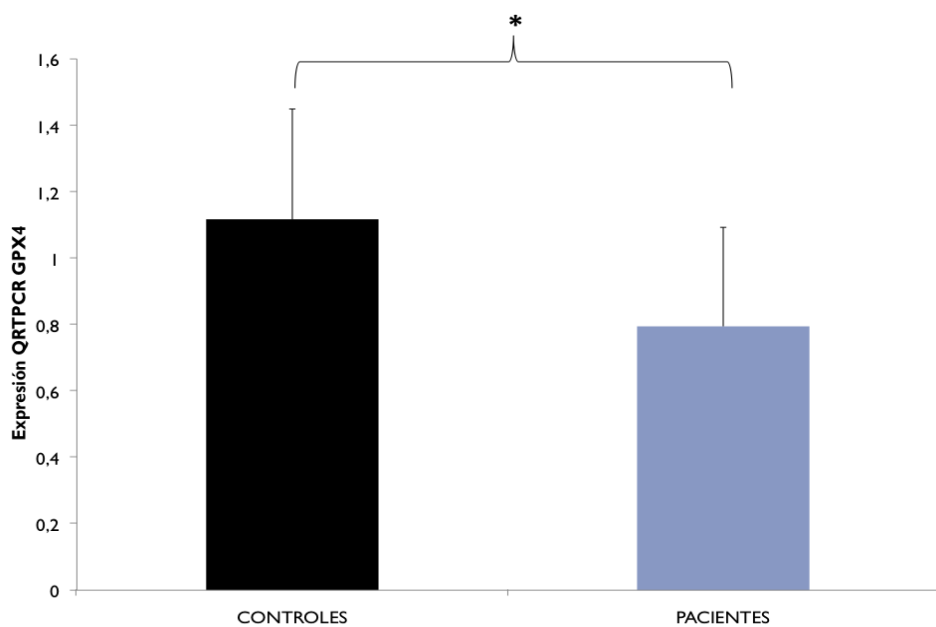
IV. RESULTADOS



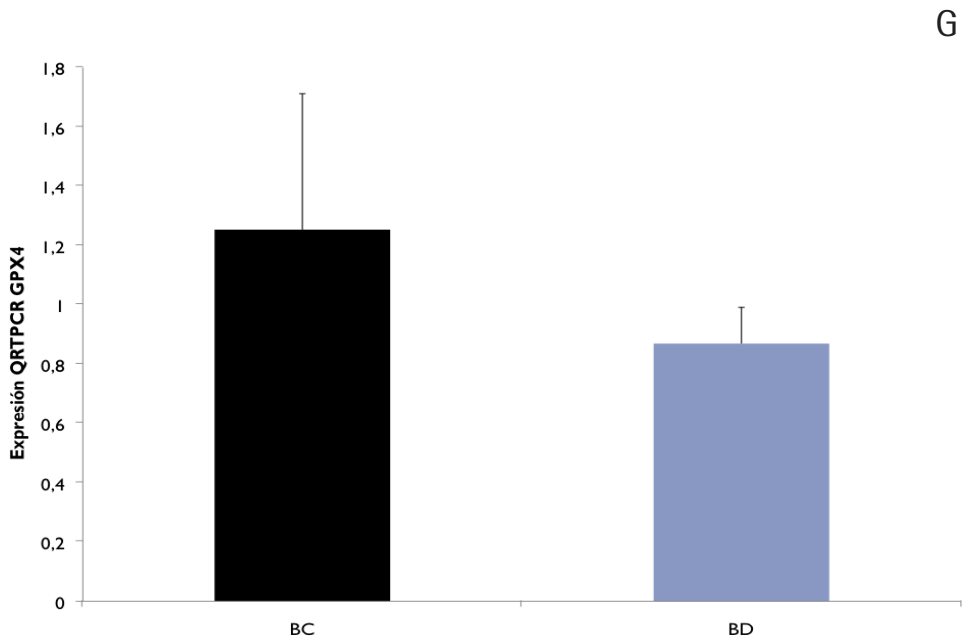
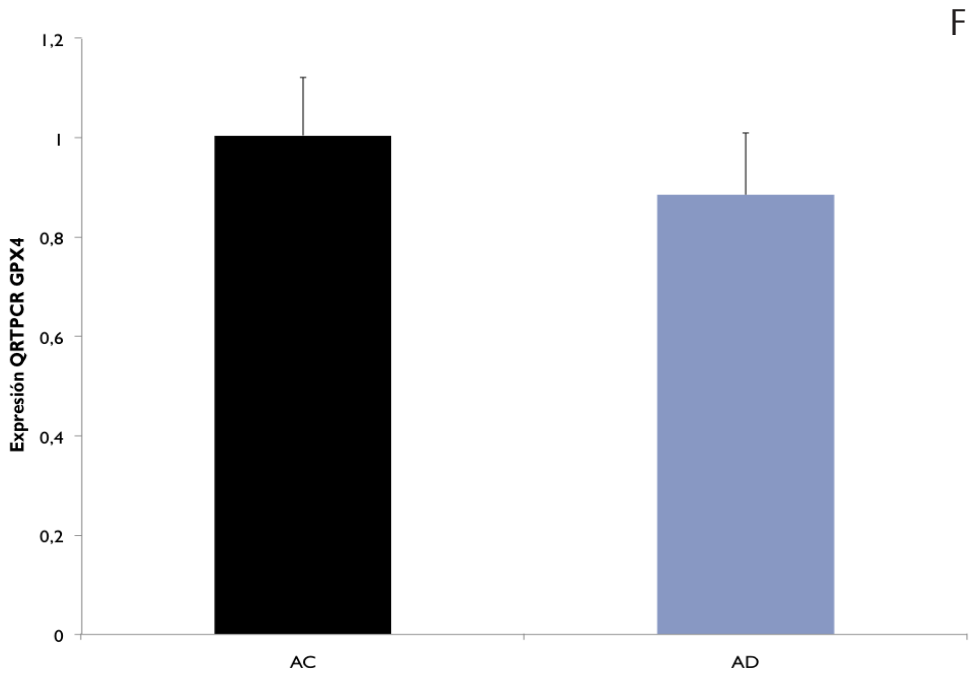
D



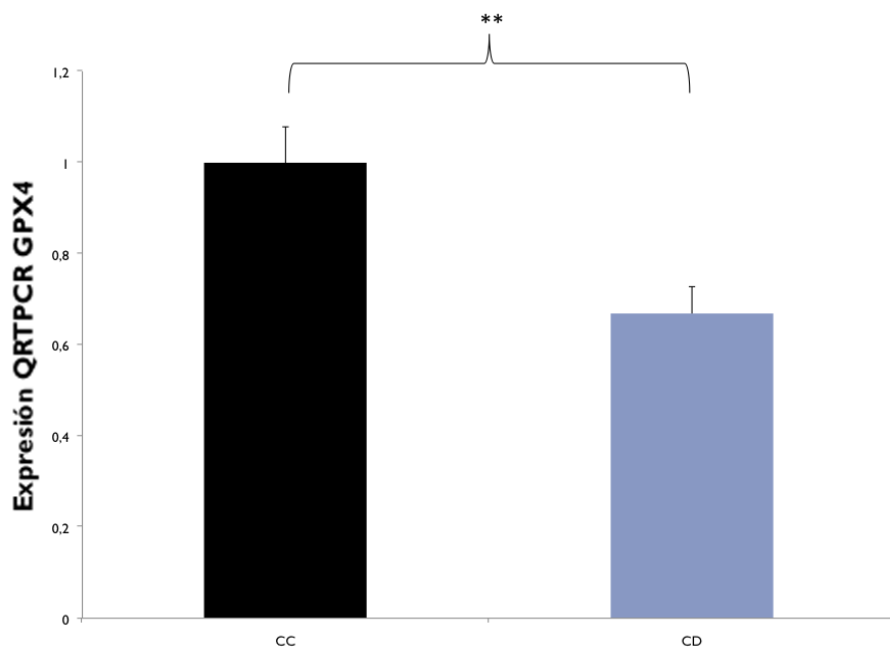
E



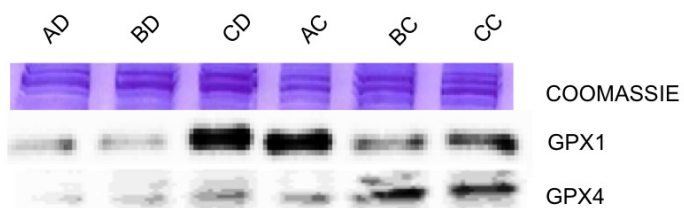
IV. RESULTADOS



H



I



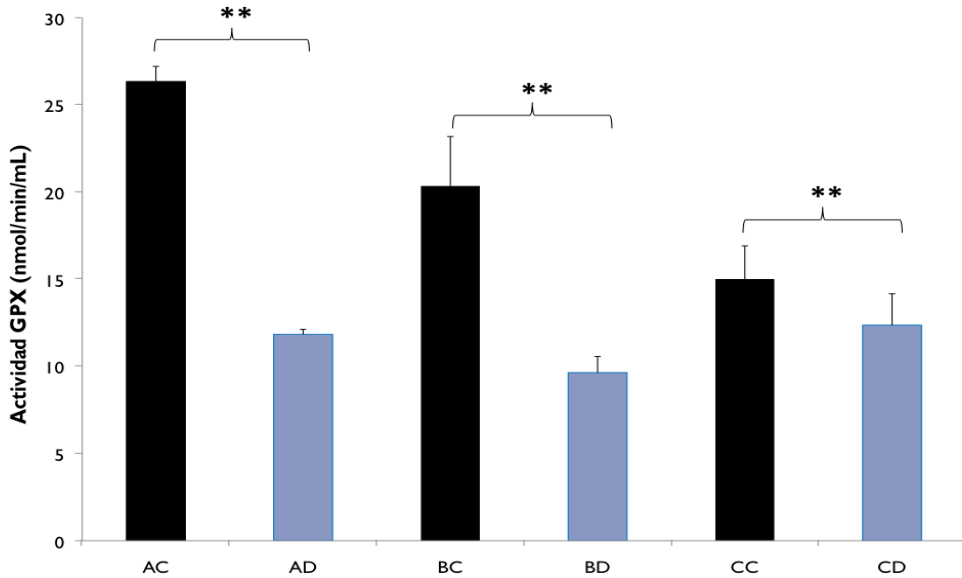


Figura IV.6. Estudio de la expresión y de la actividad de la enzima GPX en X-DC. A) Niveles de expresión del gen GPX1 en controles y pacientes de X-DC mediante qPCR. B) Análisis de la expresión de GPX1 en el grupo AC y AD mediante qPCR. C) Análisis de la expresión de GPX1 en el grupo BC y BD. D) Análisis de la expresión de GPX1 en el grupo CC y CD. E) Niveles de expresión del gen GPX4 en controles y pacientes de X-DC. F) Análisis de la expresión de GPX4 en el grupo AC y AD. G) Análisis de la expresión de GPX4 en el grupo BC y BD. H) Análisis de la expresión de GPX4 en el grupo CC y CD. I) Estudio de los niveles de proteína GPX1 y GPX4 mediante Western blot. J) Actividad enzimática de GPX total (Glutathione Peroxidase Assay kit (Cayman)). Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. La significación estadística se expresa como (*) $p < 0,05$ frente a los controles y como (**) $p < 0,001$ frente a los controles. La expresión de GPX se representa en número de veces.

4. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL ADN EN FIBROBLASTOS DE PACIENTES CON DISQUERATOSIS CONGÉNITA LIGADA AL CROMOSOMA X

Para evaluar el daño al ADN se analizó mediante microscopia confocal los niveles de γ -H2AX que detectan las roturas de doble cadena.

Así mismo, se analizaron los mecanismos de señalización del daño al ADN y algunas de las proteínas implicadas en la reparación. Para ello, se decidió analizar mediante PCR cuantitativa la expresión de los genes RAD51, RAD53, PARP y hOGG1 y LOX en las líneas celulares X-DC.

4.1. Determinación de γ -H2AX mediante microscopia confocal:

La variante H2AX está implicada en respuesta a daño al DNA por roturas de doble cadena. Contiene un residuo C-terminal conservado que se fosforila tras daño genotóxico y tiene un papel represor de la transcripción [99].

Los resultados presentados en la figura IV.7 indicaron mayores niveles de γ -H2AX en la línea procedente de pacientes cuando es comparada con otras dos líneas controles (control 1 y control 2). Estos resultados sugieren que existe un mayor daño al ADN por roturas de doble cadena en las líneas X-DC.

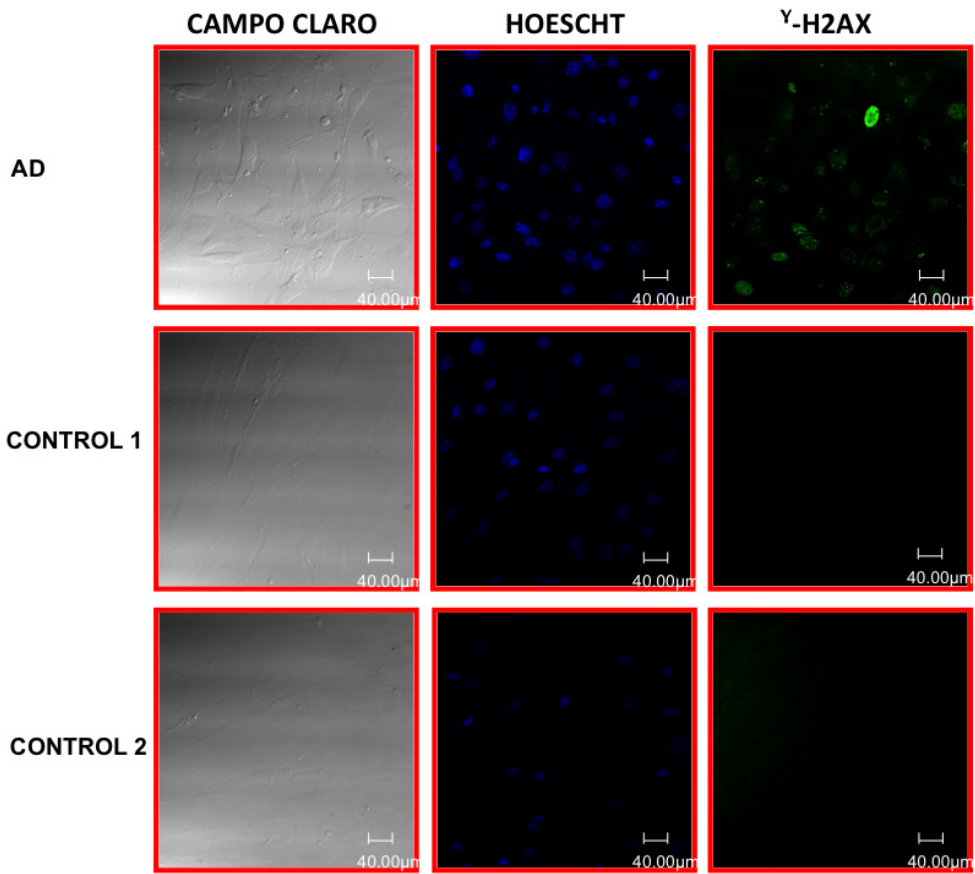


Figura IV.7. Distribución de γ -H2AX de las células AD respecto al Control 1 y Control 2.

Experimento representativo.

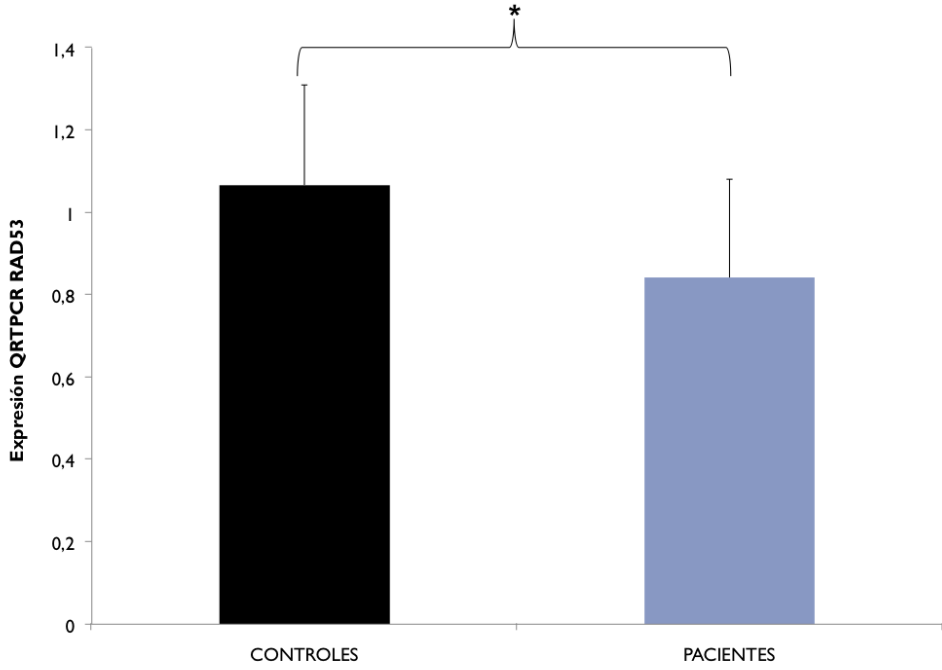
4.2. RAD53:

En respuesta al daño en el ADN, las células de mamíferos, adoptan unos puntos de control y de regulación en el ciclo celular, para detener la progresión del ciclo celular [100]. En los humanos uno de estos puntos de control está mediado por la quinasa *RAD53*, también conocida como Chk2, que es rápidamente fosforilada y activada en respuesta al daño al ADN, no solo en células normales sino también en células tumorales con ausencia o déficit funcional de p53 [101].

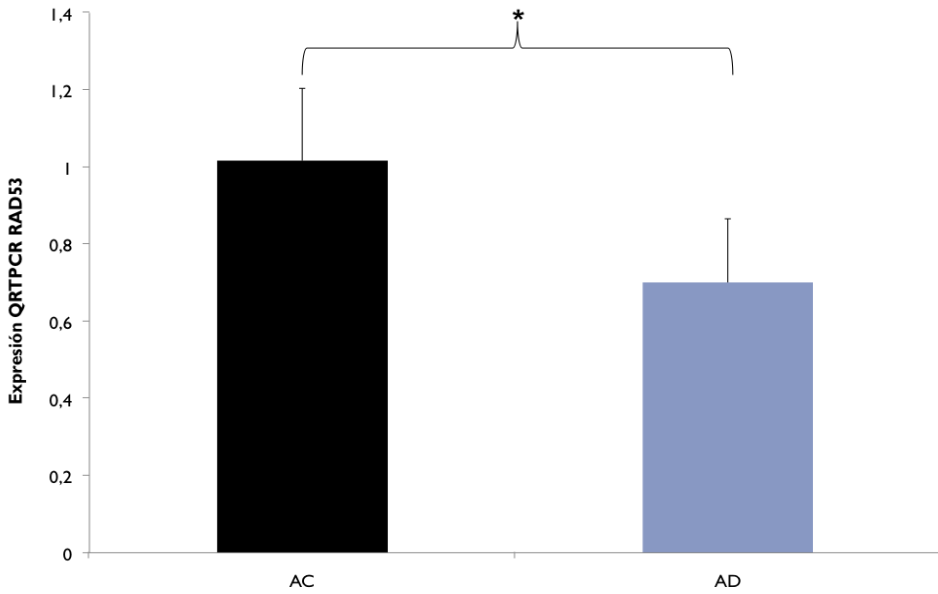
El estudio de la expresión del gen *RAD53* en las líneas celulares X-DC indicó que los niveles de este gen estaban reducidos con respecto a las líneas de fibroblastos control (figura IV.8.A). Cuando se analizaron los niveles de expresión de *RAD53* para cada una de las líneas X-DC, se observó que las líneas AD y CD mostraron valores estadísticamente inferiores de *RAD53* comparando con sus respectivas líneas control (figuras IV.8.B y IV.8.D). Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas para la línea celular BD (figura IV.8.C).

IV. RESULTADOS

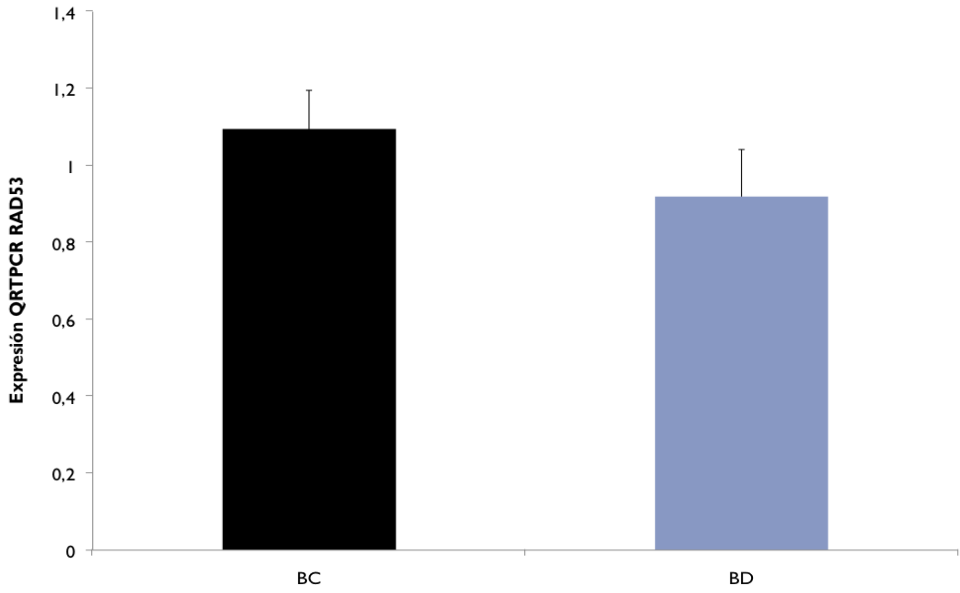
A



B



C



D

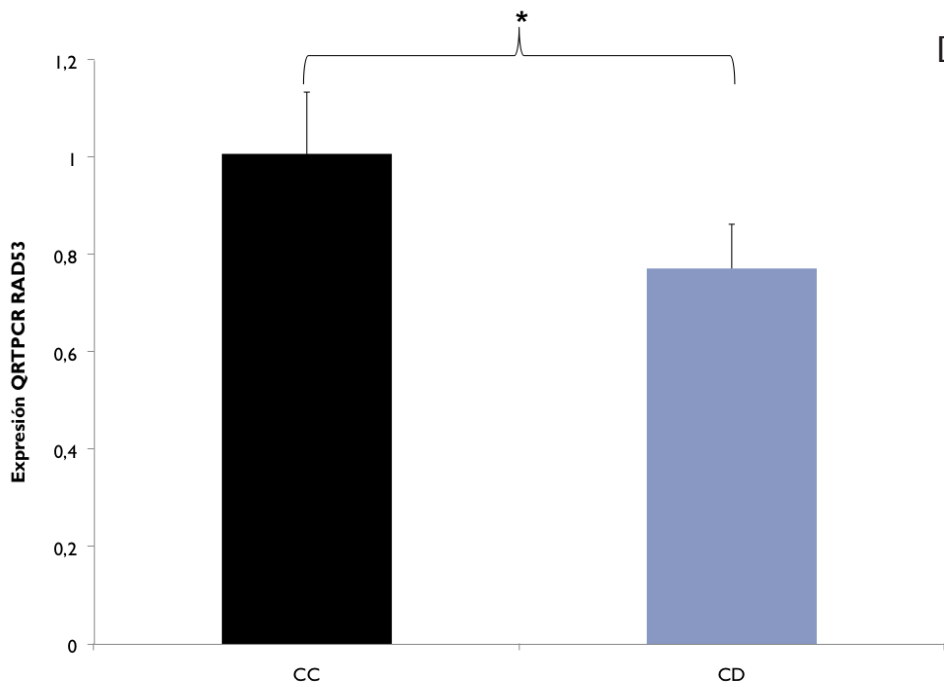
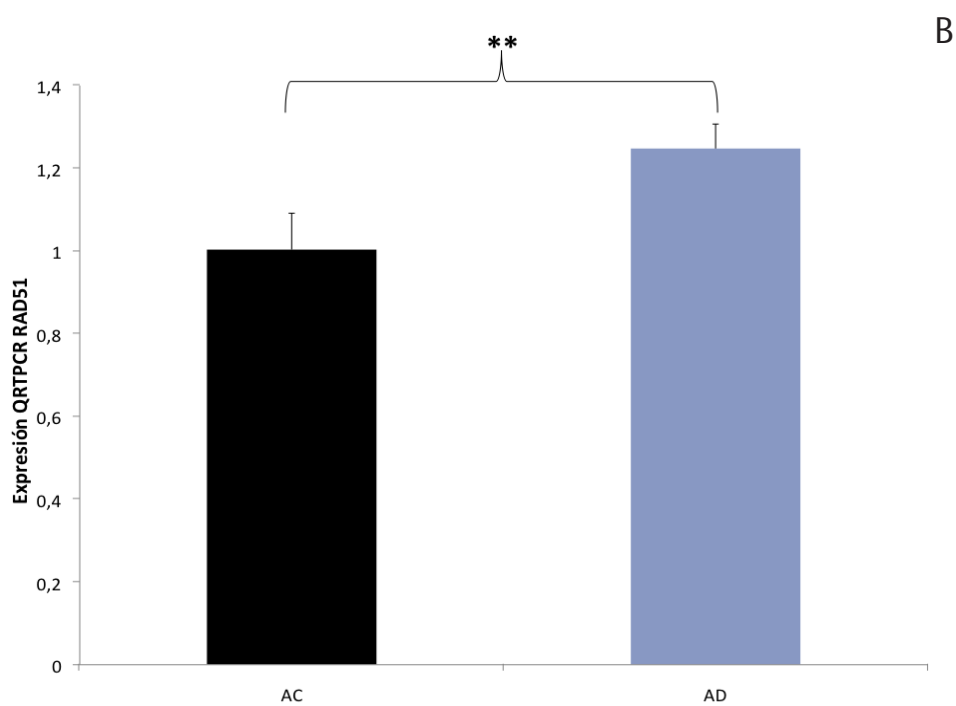
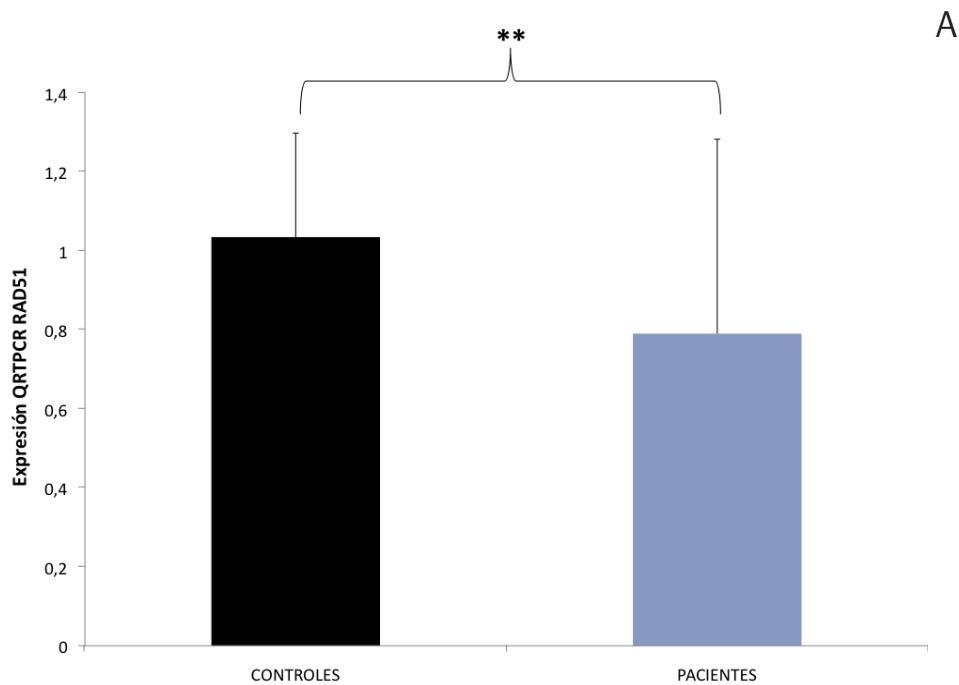


Figura IV.8. Expresión del gen RAD53 en líneas de fibroblastos de pacientes de X-DC determinados mediante qRT-PCR. A) Niveles de expresión del gen RAD53 en controles y pacientes de X-DC. B) Análisis de la expresión en el grupo AC y AD. C) Análisis de la expresión en el grupo BC y BD. D) Análisis de la expresión en el grupo CC y CD. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. La significación estadística se expresa como (*) $p < 0,05$ frente a los controles. La expresión de RAD53 se representa en número de veces.

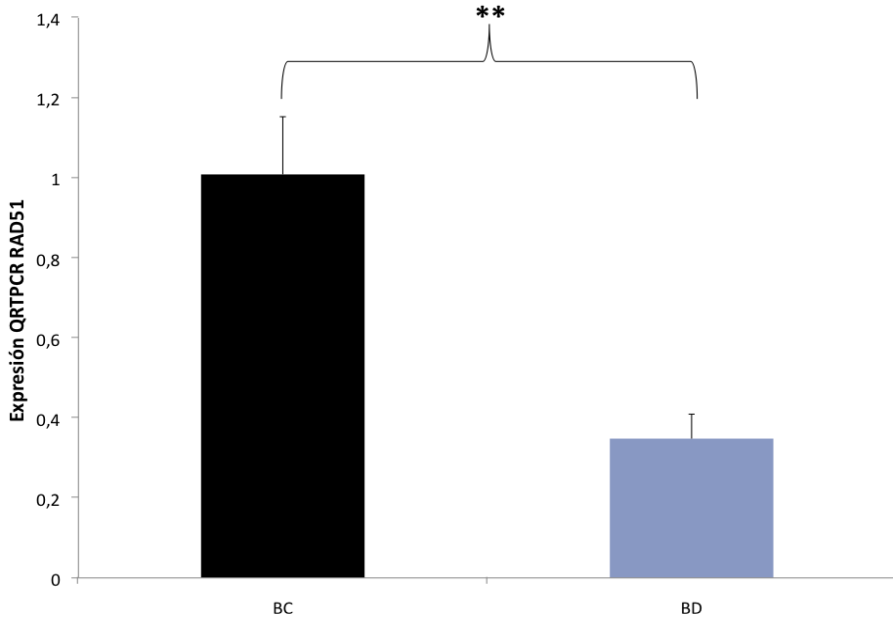
4.3 RAD51:

RAD51 es un gen que colabora en los mecanismos de reparación por recombinación homóloga del ADN [102]. Se encuentra en casi todos los orgánulos celulares y también en mitocondria donde se ha comprobado que puede mediar en la reparación del mtADN en condiciones de estrés oxidativo [103].

Como se puede observar en la figura IV.9, la expresión del gen RAD51 se encuentra disminuida en el análisis global de expresión de las líneas de fibroblastos de pacientes de X-DC (figura IV.9.A). El análisis individual de cada una de las líneas celulares mostró sin embargo, un patrón distinto en la expresión de RAD51. En el caso de la línea celular AD, se observaron niveles elevados de RAD51 con respecto a su control (figura IV.9.B). Sin embargo, en las líneas celulares BD (figura IV.9.C) y CD (figura IV.9.C) se observaron niveles más bajos de RAD51 con respecto a sus controles.



C



D

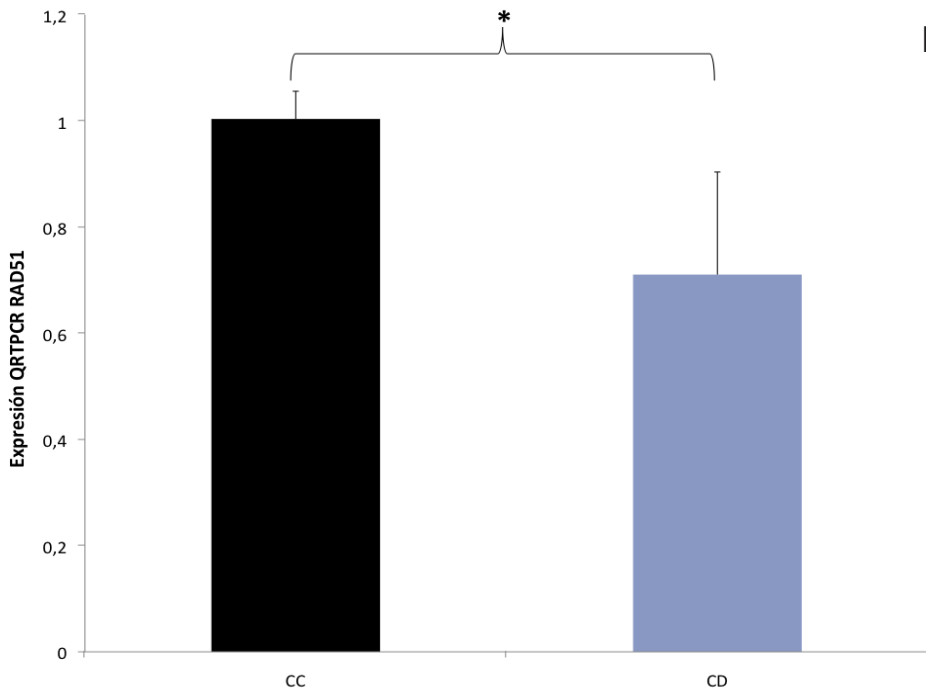


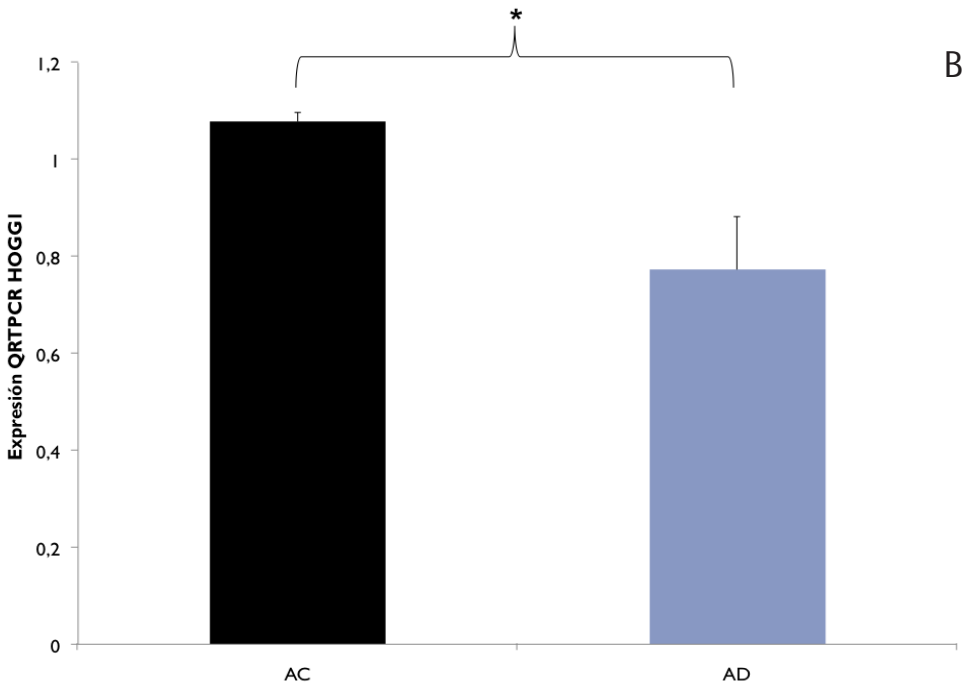
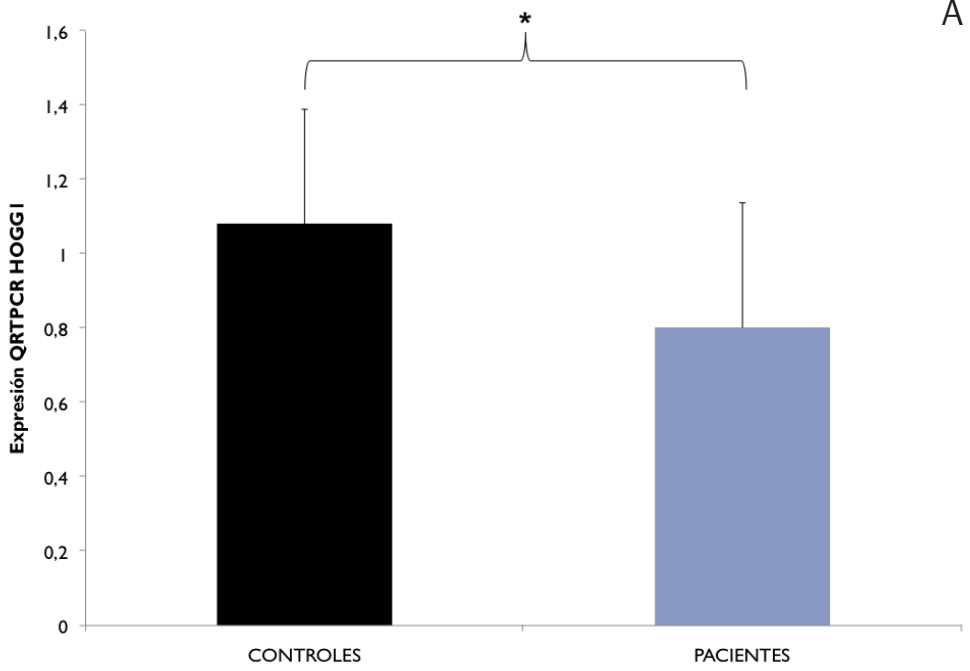
Figura IV.9. Expresión del gen RAD51 en líneas de fibroblastos de pacientes de X-DC determinados mediante qRT-PCR. A) Niveles de expresión del gen RAD51 en controles y pacientes de X-DC. B) Análisis de la expresión en el grupo AC y AD. C) Análisis de la expresión en el grupo BC y BD. D) Análisis de la expresión en el grupo CC y CD. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. La significación estadística se expresa como (*) $p < 0,05$ frente al control CC y como (**) $p < 0,001$ frente a los controles. La expresión de RAD51 se representa en número de veces.

4.4 Determinación de la 8-oxoguanina ADN glicosilasa (HOGG1):

Las ERO pueden ser productos del metabolismo celular, o bien son inducidas por exposición a radiación UV, radiación ionizante y/o carcinógenos ambientales [104]. Estas ERO pueden reaccionar con el ADN, produciendo lesiones en sus bases constituyentes. Entre estas posibles lesiones, la 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxoG) es la base oxidada encontrada más frecuentemente [105]. Estas lesiones suelen ser reparadas por la OGG1 a través de la ruta de reparación por escisión de bases "Base Excision Repair pathway" (BER).

En este experimento determinamos la expresión de OGG1 humana (hOGG1) en fibroblastos de pacientes con DC respecto a sus controles. En la figura IV.10.A se observa que existe una inhibición de la expresión de hOGG1 en las líneas celulares X-DC. El análisis individual de la expresión de hOGG1 de cada una de las líneas de fibroblastos de pacientes comparada con su línea celular control indicó niveles disminuidos para la expresión de hOGG1 en las líneas de los pacientes AD y BD respecto a sus controles (figura IV.10.B y IV.10.C), mientras que en el caso de los fibroblastos CD observamos también dicha tendencia, aunque en este caso no fue estadísticamente significativa (figura IV.10.D), posiblemente por la elevada desviación estadística de los controles (CC).

IV. RESULTADOS



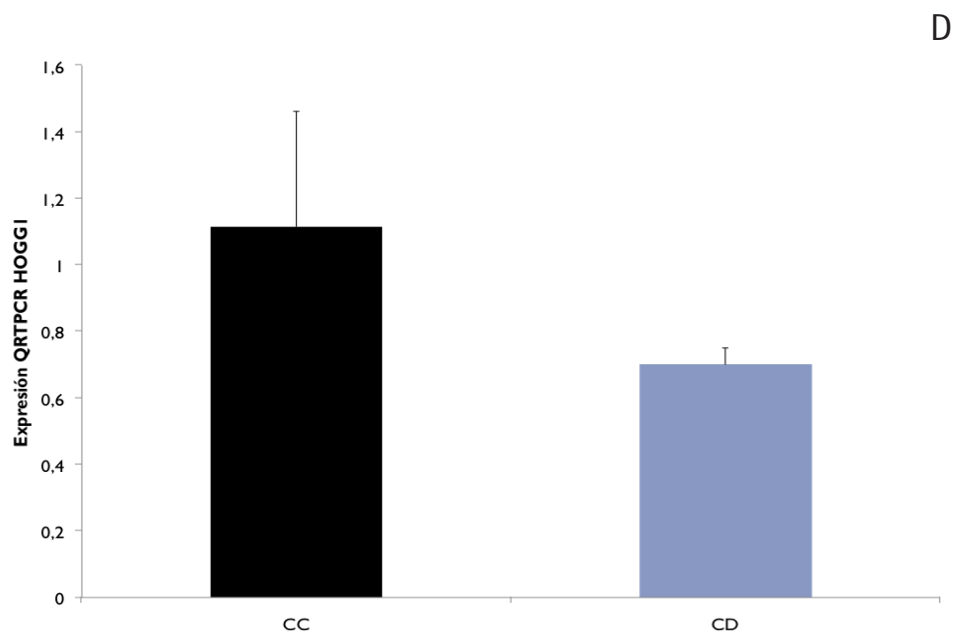
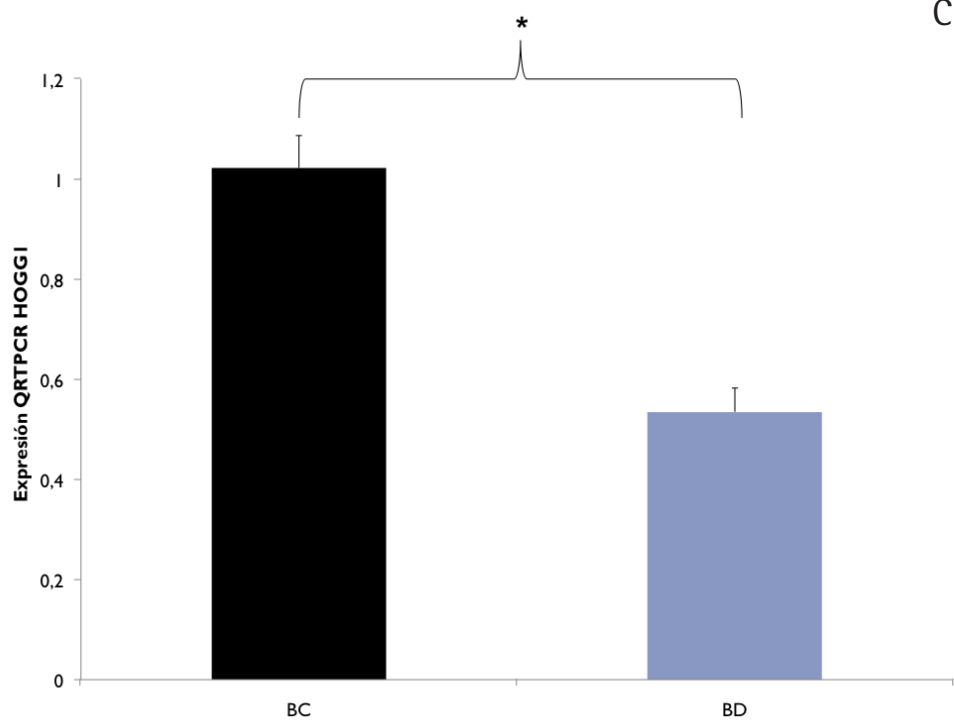


Figura IV.10. Expresión del gen HOGG1 en líneas de fibroblastos de pacientes de X-DC determinados mediante qRT-PCR. A) Niveles de expresión del gen HOGG1 en controles y pacientes de X-DC. B) Análisis de la expresión en el grupo AC y AD. C) Análisis de la expresión en el grupo BC y BD. D) Análisis de la expresión en el grupo CC y CD. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. La significación estadística se expresa como () $p < 0,05$ frente a los controles. La expresión de HOGG1 se representa en número de veces.*

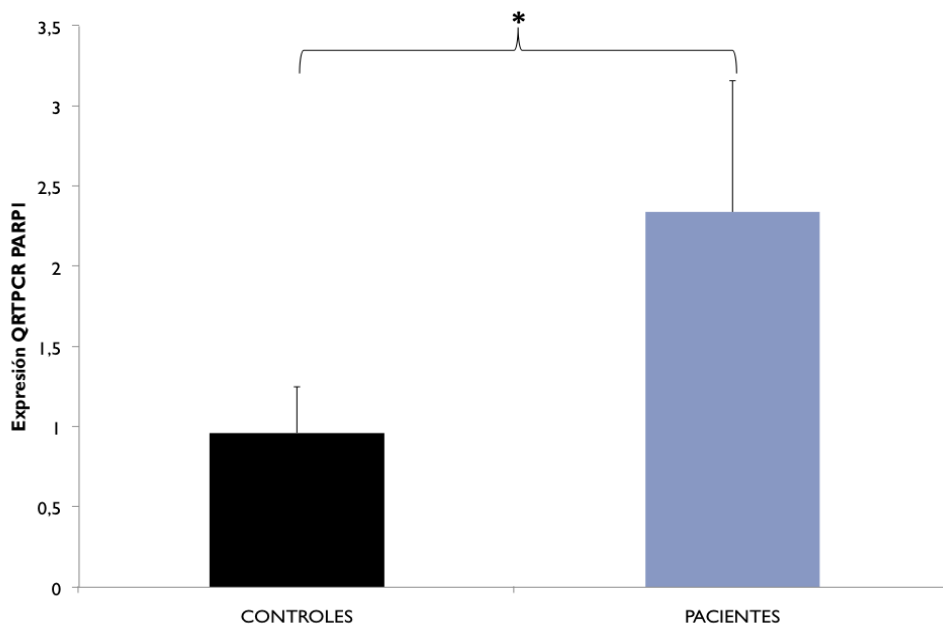
4.5. Determinación de PARP-1:

Una de las proteínas más importantes que participan en el proceso de reparación del ADN a través del mecanismo de unión de extremos no homólogos "non homologous end joining" (NHEJ) es la poli-(ADP-ribosa) polimerasa o PARP [106]. Dentro de la familia de las PARP encontramos a PARP1 y PARP2, que se activan en respuesta al daño al ADN, siendo PARP1 la mayoritaria de las dos.

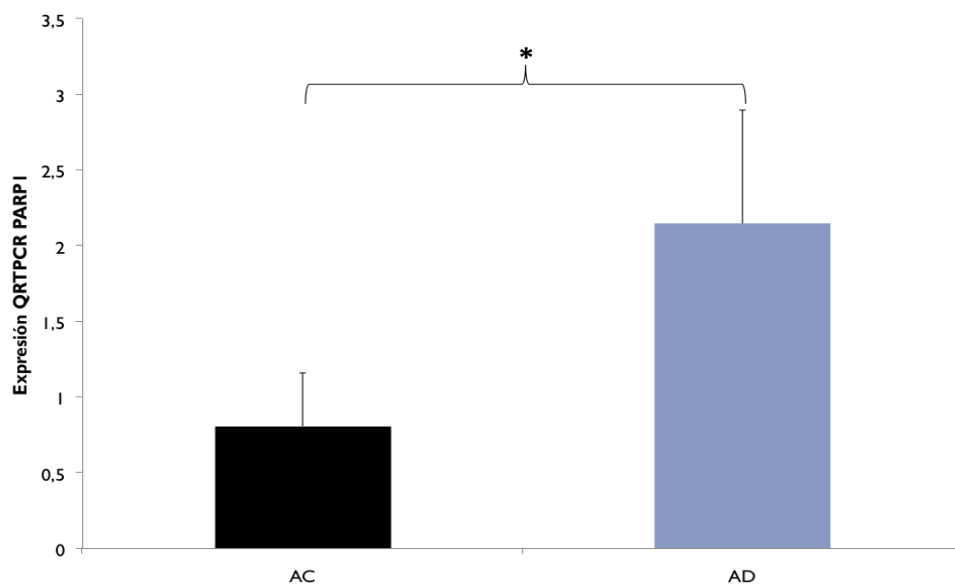
PARP1 se une al ADN dañado donde se activa junto a otras proteínas, que escinden las bases dañadas reparando el ADN y modulando la estructura de la cromatina [107].

La determinación de la expresión de *PARP1* en nuestro modelo se realizó a través de qRT-PCR cuantitativa. Como podemos ver en la figura IV.11.A se observó un aumento significativo de los niveles de *PARP1* en las líneas X-DC comparado con las líneas control, al igual que ocurre en el análisis de la expresión individual para cada las líneas AD y CD respecto a sus controles (figura IV.11.B y IV.11.D). Mientras que en el grupo de pacientes BD frente a BC, existe una tendencia pero no llega a ser estadísticamente significativa (figura IV.11.C).

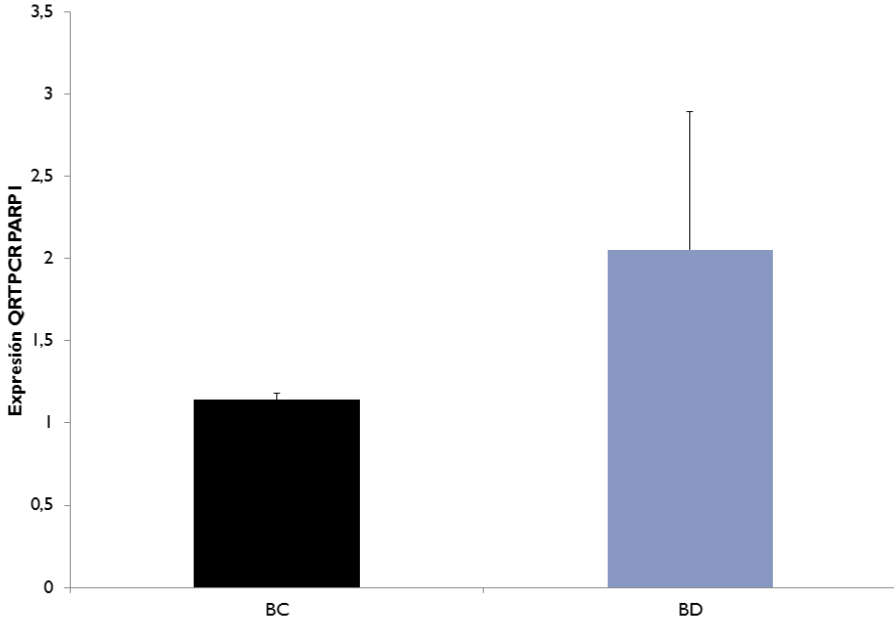
A



B



C



D

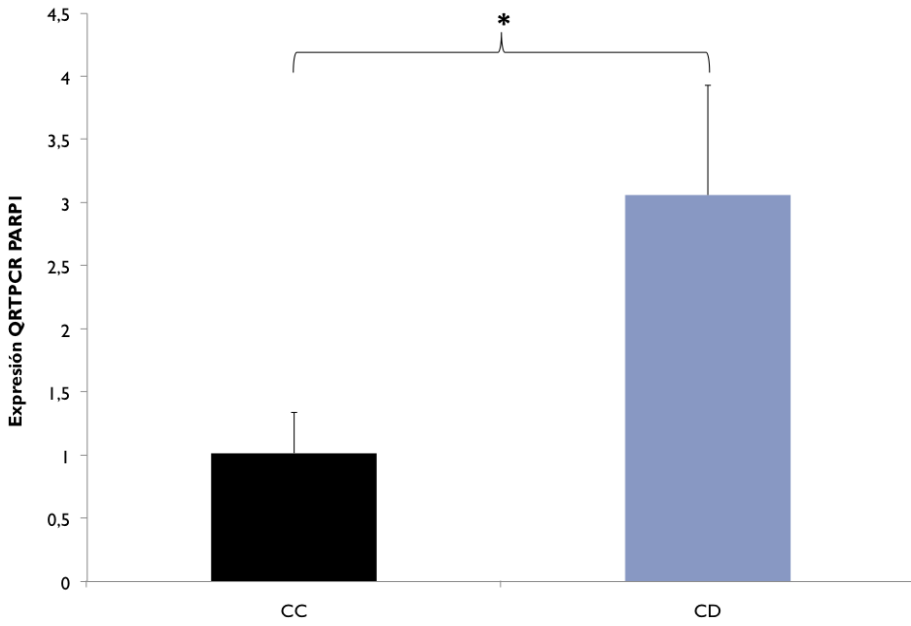


Figura IV.11. Expresión del gen PARP1 en líneas de fibroblastos de pacientes de X-DC determinados mediante qRT-PCR. A) Niveles de expresión del gen PARP1 en controles y pacientes de X-DC. B) Análisis de la expresión en el grupo AC y AD. C) Análisis de la expresión en el grupo BC y BD. D) Análisis de la expresión en el grupo CC y CD. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. La significación estadística se expresa como (*) $p < 0,05$ frente a los controles. La expresión de PARP1 se representa en número de veces.

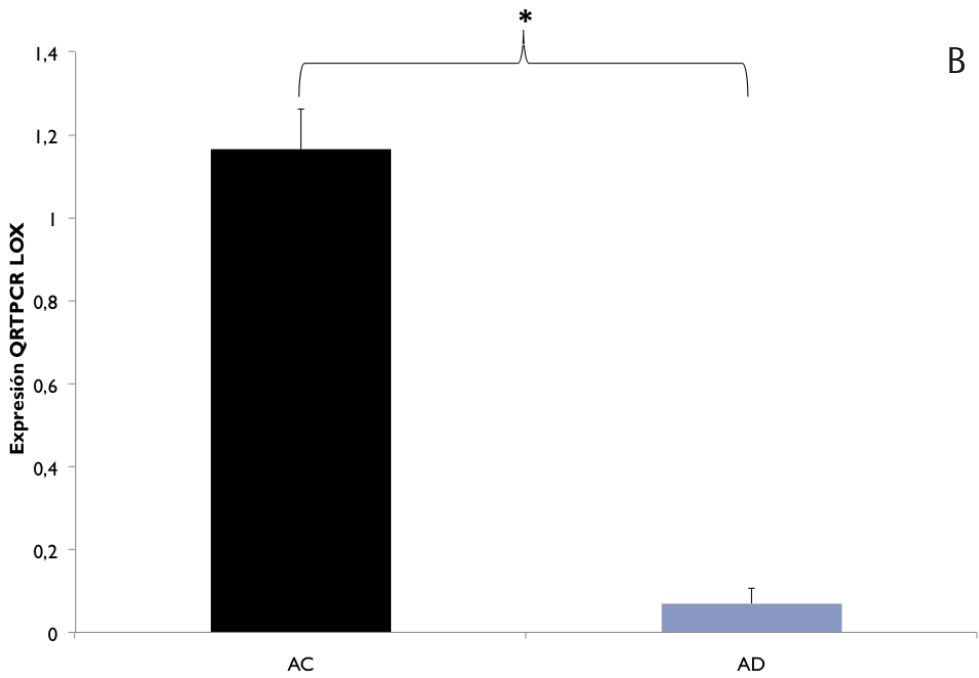
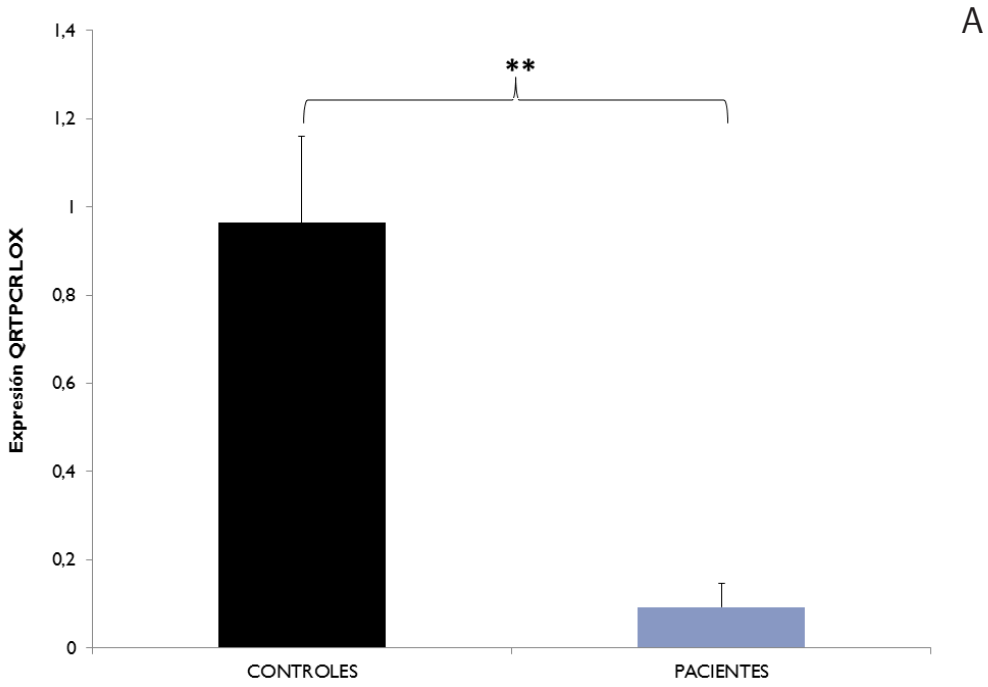
4.6. Determinación de lisina oxidasa (LOX):

La lisina oxidasa (LOX) es una enzima dependiente de cobre que cataliza la formación de aldehídos y de H_2O_2 en los precursores de la elastina y del colágeno de la matriz extracelular a partir de residuos de lisina [108]. La formación de estos aldehídos es necesaria para la estabilización de las fibras de colágeno así como para la integridad y elasticidad de la elastina.

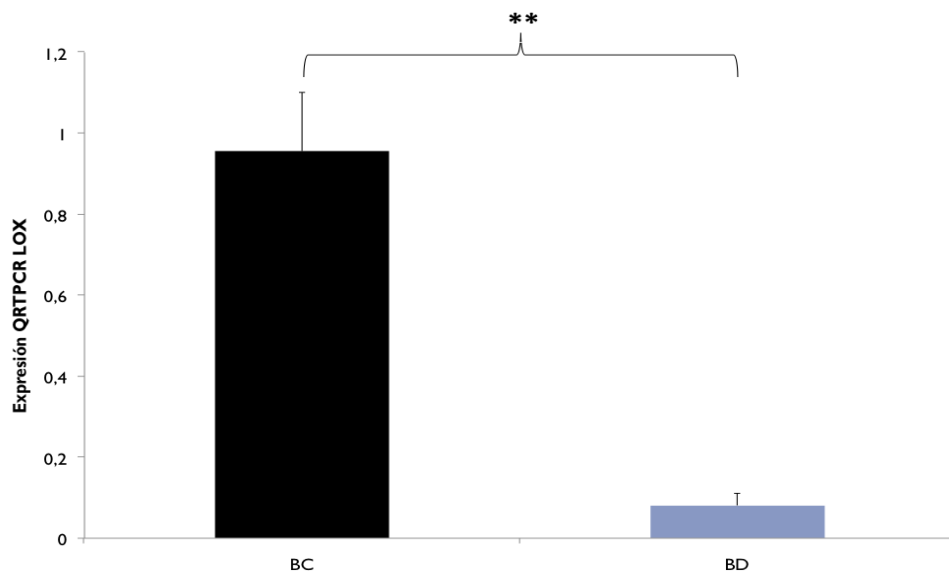
Dado que este gen ha sido descrito como un supresor tumoral [109,110], y además su expresión está disminuida durante el envejecimiento por fenómenos de metilación del gen [111], decidimos evaluar su expresión en las líneas celulares X-DC.

El análisis de la expresión del gen *LOX* en las células de los pacientes de X-DC indicó niveles muy bajos de *LOX* comparado con las líneas celulares control (figura IV.12.A). El análisis por qPCR del gen para cada una de las líneas celulares indicó que en todas las líneas AD, BD y CD hay una disminución significativa en la expresión de *LOX* respecto a sus controles (figura IV.12.B, IV.12.C y IV.12.D).

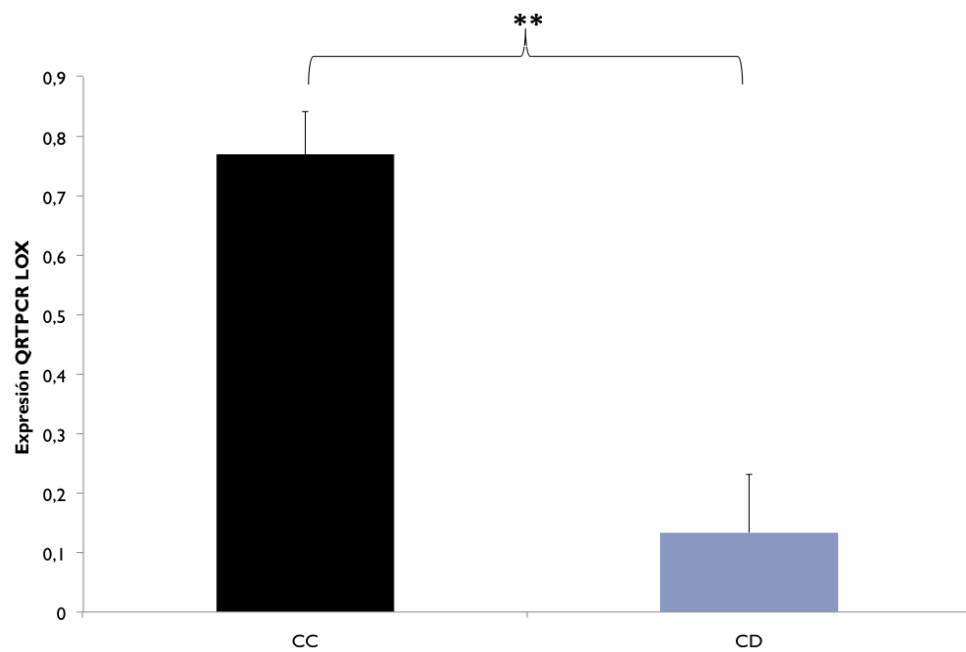
IV. RESULTADOS



C



D



IV. RESULTADOS

Figura IV.12. Expresión del gen LOX en líneas de fibroblastos de pacientes de X-DC determinados mediante qRT-PCR. A) Niveles de expresión del gen LOX en controles y pacientes de X-DC. B) Análisis de la expresión en el grupo AC y AD. C) Análisis de la expresión en el grupo BC y BD. D) Análisis de la expresión en el grupo CC y CD. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. La significación estadística se expresa como () $p < 0,05$ frente al control AC y como (**) $p < 0,001$ frente a los controles. La expresión de LOX se representa en número de veces.*

CÉLULAS DE PACIENTES CON DISQUERATOSIS CONGÉNITA LIGADA AL CROMOSOMA X TRANSFECTADAS CON EL INSERTO QUE RESTABLECE LA ACTIVIDAD TELOMERASA (24.2), Y LAS CÉLULAS TRANSFECTADAS CON EL VECTOR VACÍO (pLNCX)

Caracterización de las líneas celulares

El modelo de células que caracterizaremos en este apartado son células de pacientes con X-DC (número de referencia GM01774 del Coriell Cell Repositories) en el que se ha restaurado la actividad telomerasa mediante el inserto GSE24.2 (genetic supresor element 24.2) que codifica para el dominio pseudouridina sintasa de DKC. La expresión de este dominio incrementa la supervivencia contra el cisplatino y los inhibidores de la telomerasa. GSE24.2 activa el promotor de c-myc a través de NHEIII que consecuentemente activa el promotor de hTERT. Por lo tanto consideraremos que las células 24.2. son aquellas en las que se les ha restaurado la actividad telomerasa mientras que las pLNCX serán sus controles (transfectadas con el vector vacío), es decir células de una paciente (hombre, 7 años de edad; paciente) no reparadas.

1. ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

En el estudio de la proliferación celular a través del ensayo con BrdU, se observó que la proliferación de la línea celular que contiene el inserto 24.2 fue mayor que la línea con el vector vacío pLNCX (Figura IV.13).

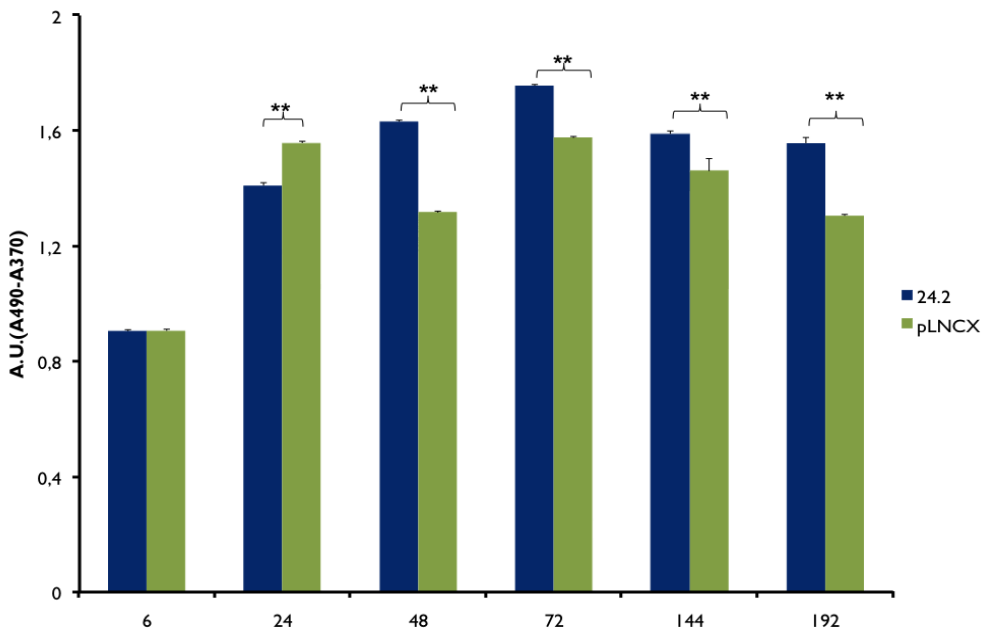


Figura IV.13. Estudio de la proliferación celular. Medida de BrdU en los fibroblastos transfectados. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. $n=3$ en grupo 24.2, y $n=3$ en grupo pLNCX. La significación estadística se expresa como (**) $p < 0,001$ frente a pLNCX.

Tras evaluar la capacidad de proliferación de las líneas celulares se decidió hacer los estudios en un tiempo donde ambos tipos celulares alcanzan la confluencia (144 horas).

2. ANÁLISIS DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO

La determinación de los niveles del radical superóxido en las células confluentes, ensayada con la sonda dihidroetidio, revela que los niveles de radical superóxido eran menores en la línea celular 24.2 comparada con la línea pLNCX (figura IV.14).

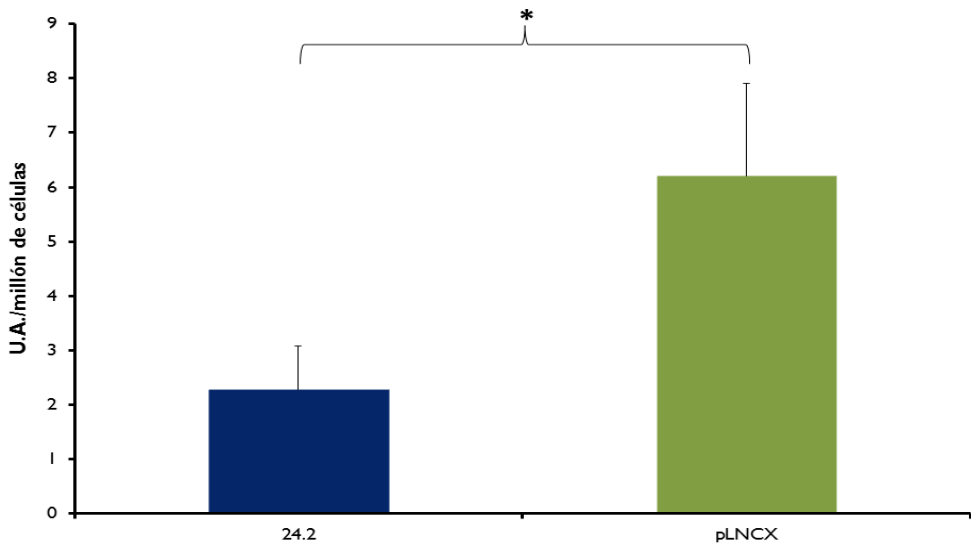


Figura IV.14. Niveles de radical superóxido determinados por fluorimetría con la sonda dihidroetidio en células confluentes. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. $n=2$ en grupo 24.2., y $n=2$ en grupo pLNCX. La significación estadística se expresa como (*) $p<0,05$ frente a pLNCX.

3. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE MALONDIALDEHÍDO (MDA)

El MDA, es un producto final obtenido de la hidrólisis ácida de los lipoperóxidos y está considerado como un buen marcador del daño oxidativo en las membranas biológicas [112].

En las células transfectadas pLNCX y 24.2 a confluencia, se ven diferencias significativas entre ambos, siendo mayores los niveles en pLNCX (figura IV.15).

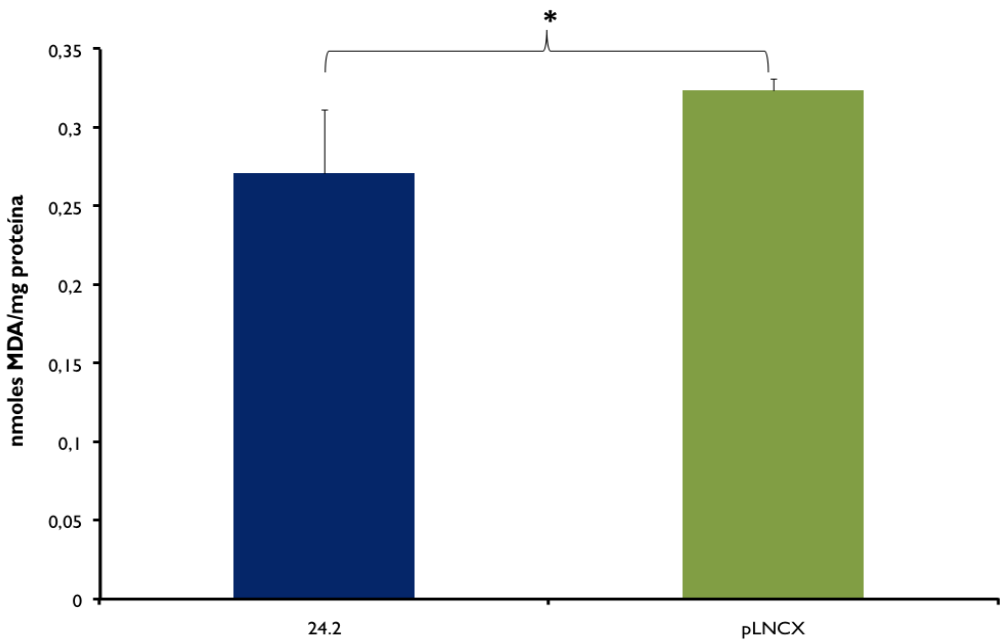
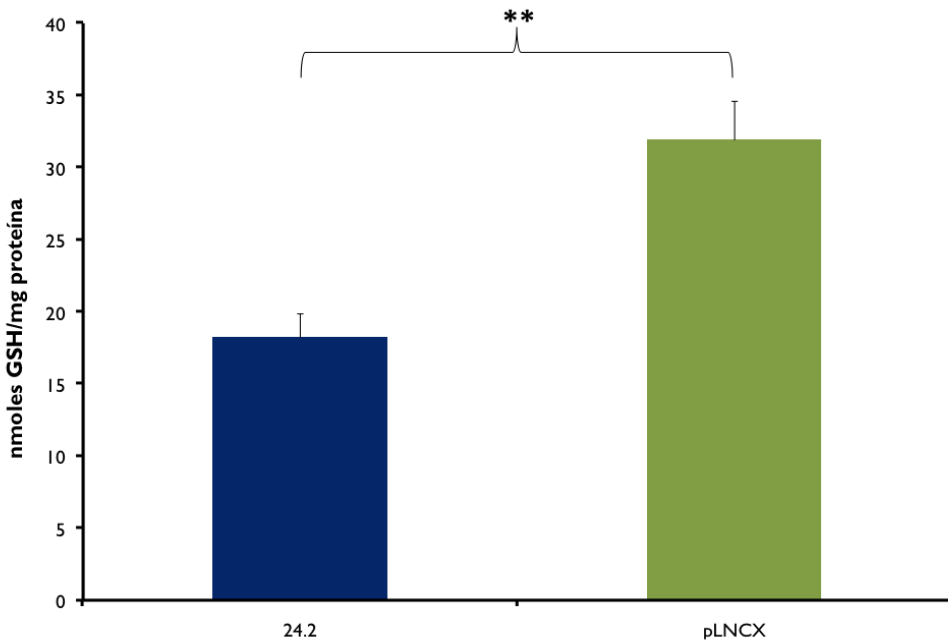


Figura IV.15. Niveles de MDA en células pLNCX y 24.2 confluentes. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. $n=5$ en grupo 24.2., y $n=4$ en grupo pLNCX. La significación estadística se expresa como (*) $p<0,05$ frente a pLNCX.

4. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE GSH CELULAR

La concentración de GSH celular fue analizada por el método enzimático de GSH transferasa a los 5 días, momento en el que las células llegaron a confluencia. Los resultados nos indican que los niveles de GSH celular en pLNCX son mayores que los de las células 24.2.



*Figura IV.16. Niveles de GSH celulares determinados mediante el método enzimático de la GSH transferasa a los 5 días. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. $n=3$ en grupo 24.2., y $n=2$ en grupo pLNCX. La significación estadística se expresa como (**) $p<0,01$ frente a pLNCX.*

Estos datos se confirmaron a través de la evaluación del contenido en GSH celular por microscopia confocal con la sonda específica de GSH, CMFDA (5-clorometilfluoresceína diacetato) (figura IV.17). El patrón de distribución del GSH en el interior de la célula indicó también una mayor concentración del GSH en los núcleos, marcados con Hoechst, de las células pLNCX que en las células 24.2, hecho que podría sugerir un mayor requerimiento de GSH nuclear en las células con déficit en el gen de la disquerina.

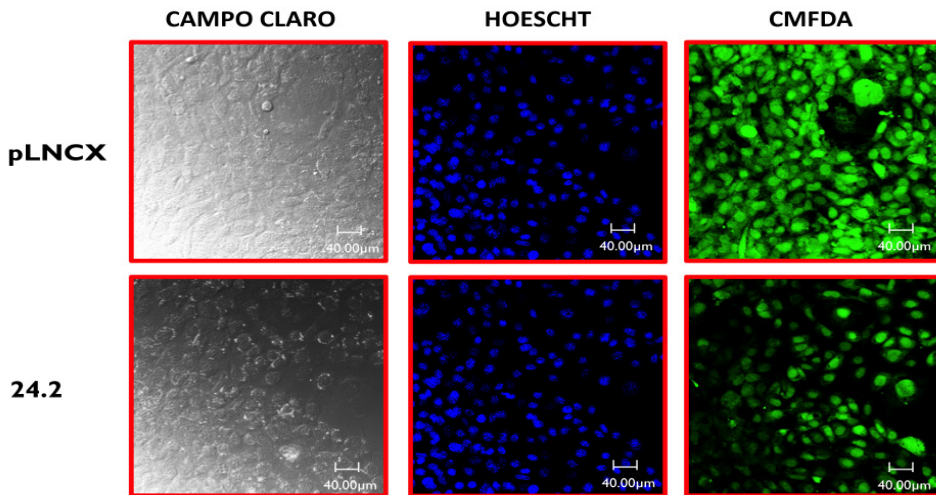
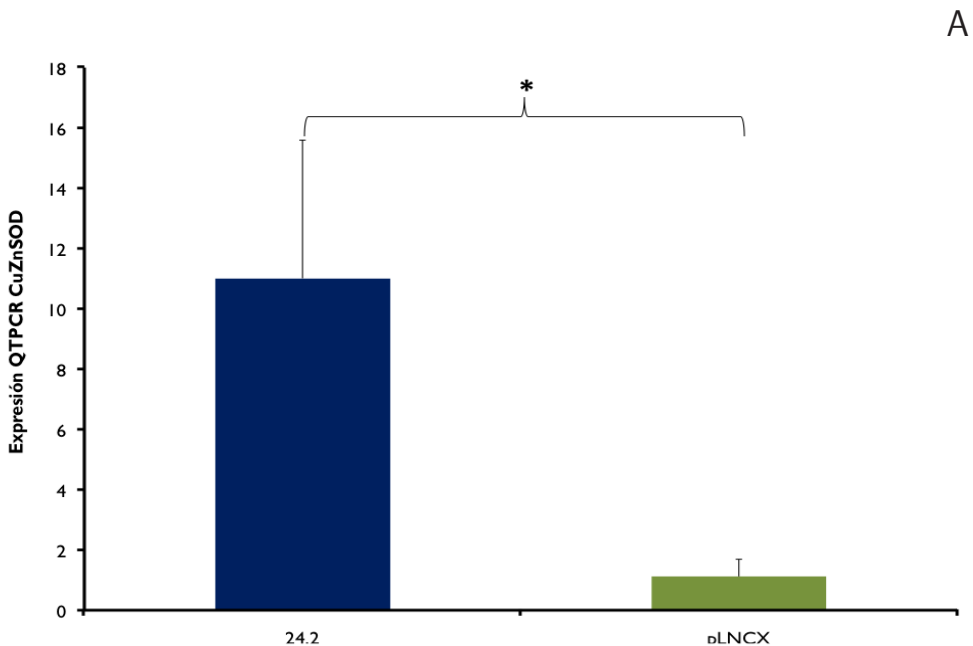


Figura IV.17. Distribución del contenido de GSH celular con la sonda CMFDA por microscopia confocal. Campos del microscopio confocal a máxima proyección. Experimento representativo.

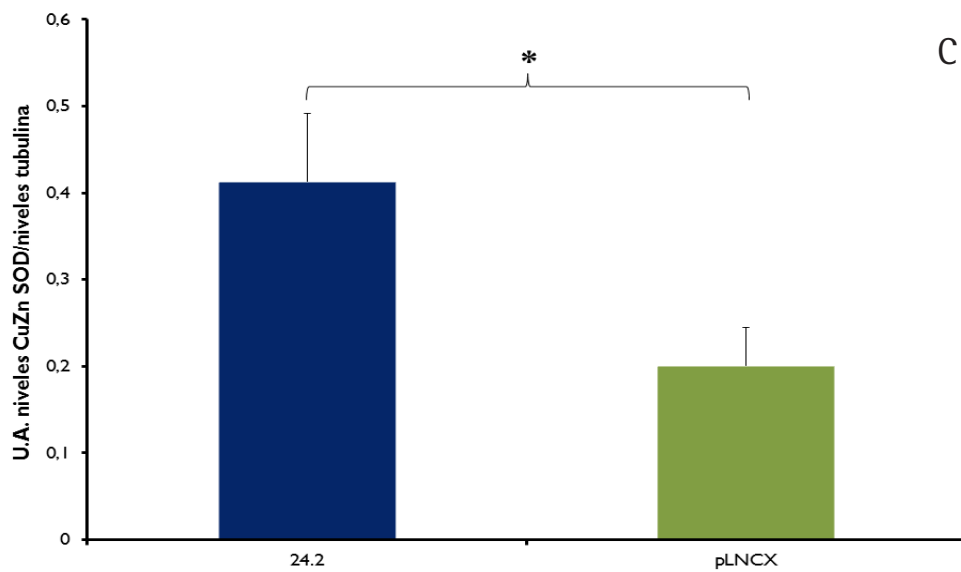
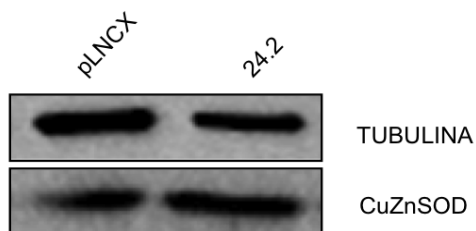
5. ESTUDIO DE LAS DEFENSAS ANTIOXIDANTES EN CÉLULAS DE PACIENTES DE DISQUERATOSIS CONGÉNITA TRANSFECTADAS 24.2. Y pLNCX

5.1. CuZnSOD: estudio de la actividad enzimática y de la expresión mediante qRT-PCR y western blot:

El estudio de la expresión del gen *SOD1*, mostró niveles significativamente mayores en la expresión en las células 24.2 comparada con las células pLNCX (figura IV.18.A). El análisis de los niveles de proteína evaluados por Western blot también indicaron niveles más elevados de CuZnSOD en las células 24.2 (figura IV.18.B y IV.18.C). El análisis de la actividad CuZnSOD indica que la actividad enzimática aumenta en las células al restablecer la actividad telomerasa con el inserto GSE24.2 (figura IV.18.D), hecho que confirma los resultados obtenidos por RT-PCR y Western blot..



B



C

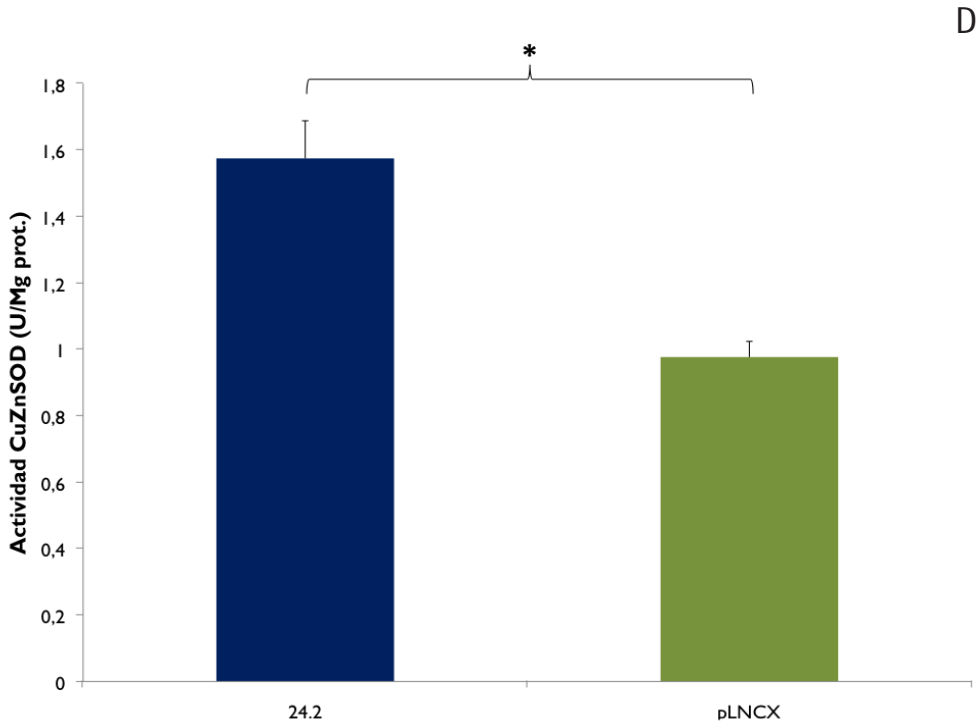
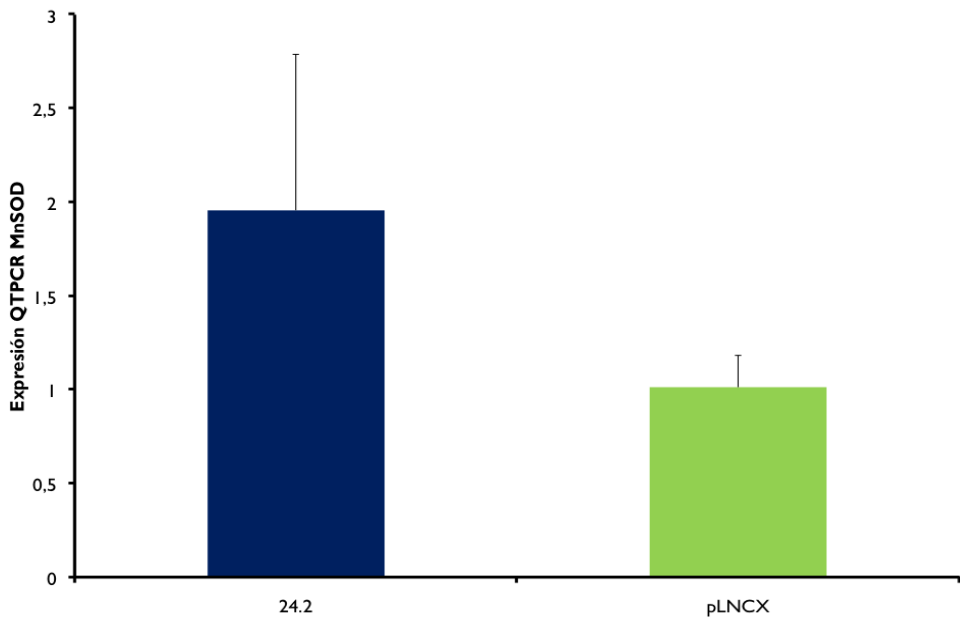


Figura IV.18. Estudio de los niveles y de la actividad de la enzima CuZnSOD en las líneas pLNCX y 24.2: A) Niveles de expresión del gen SOD1 en células pLNCX y 24.2. B) Western-blot de Cu/Zn SOD en células pLNCX y 24.2 (Western-blot representativo). C) Densitometría del Western-blot de Cu/Zn SOD en células pLNCX y 24.2 confluentes. D) Actividad de la Cu/Zn SOD en las células pLNCX y 24.2 confluentes. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. $n=2$ en grupo 24.2., y $n=2$ en grupo pLNCX. La significación estadística se expresa como (*) $p<0,05$ frente a pLNCX. La expresión de CuZnSOD se representa en número de veces.

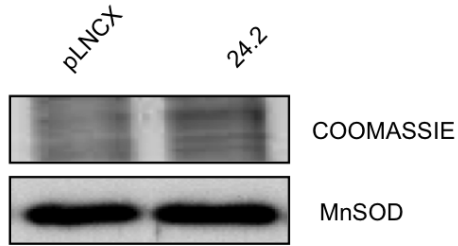
5.2. MnSOD: estudio de la actividad enzimática y de la expresión mediante qRT-PCR y western blot:

El estudio por qRT-PCR de la expresión del gen *SOD2* no mostró diferencias significativas entre las líneas celulares 24.2 y pLNCX (figura IV.19.A). Además, el estudio de los niveles de la enzima MnSOD mediante Western-blot indica que no existen diferencias en los niveles de MnSOD entre ambos tipos celulares (IV.19.B y IV.19.C). En cambio, el estudio de la actividad enzimática indicó que en las células 24.2 la actividad MnSOD es mayor que en las células pLNCX (figura IV.19.D), resultados que sugieren una regulación post-traduccional de ésta enzima.

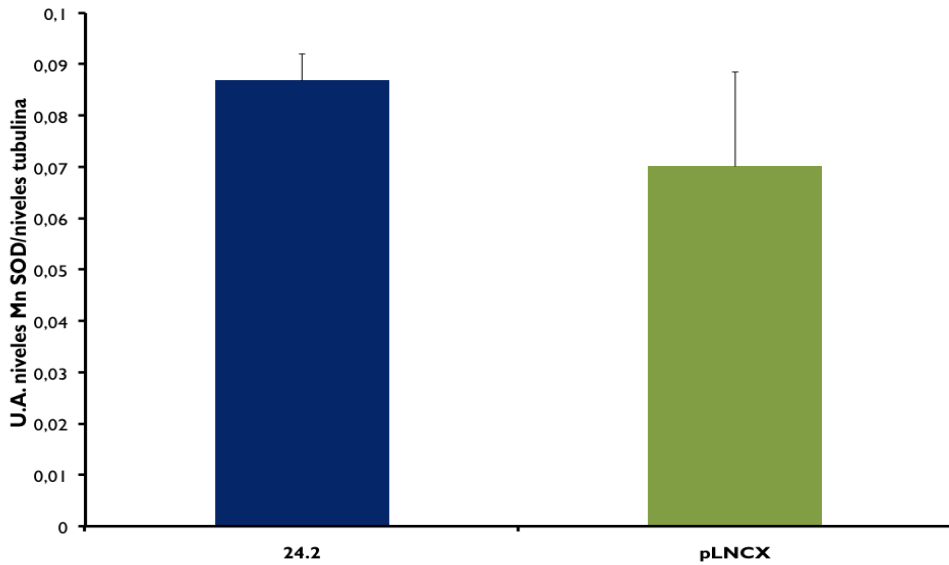


IV. RESULTADOS

B



C



D

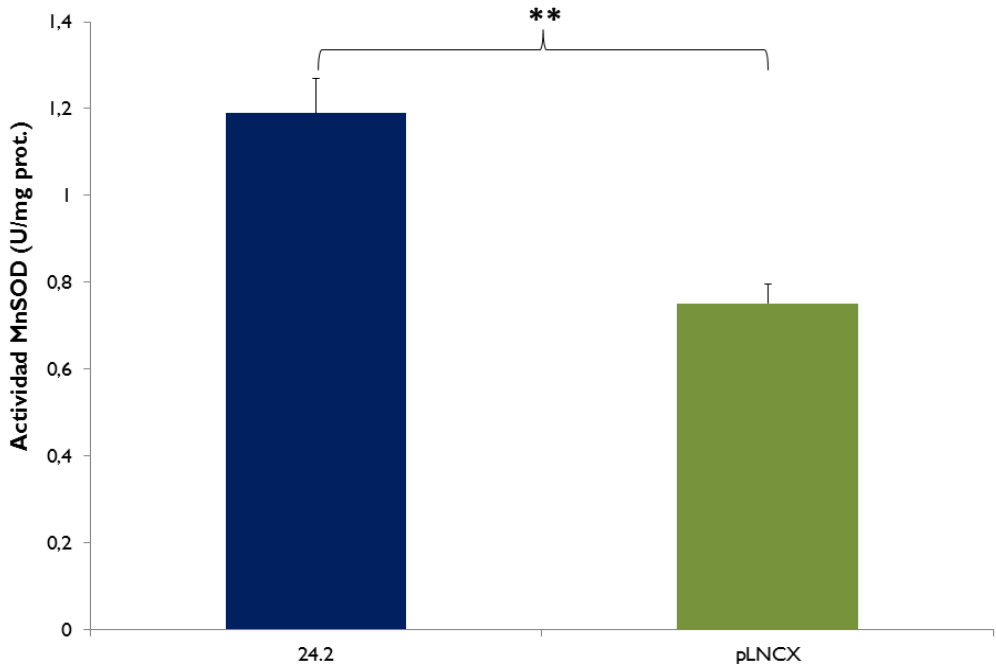
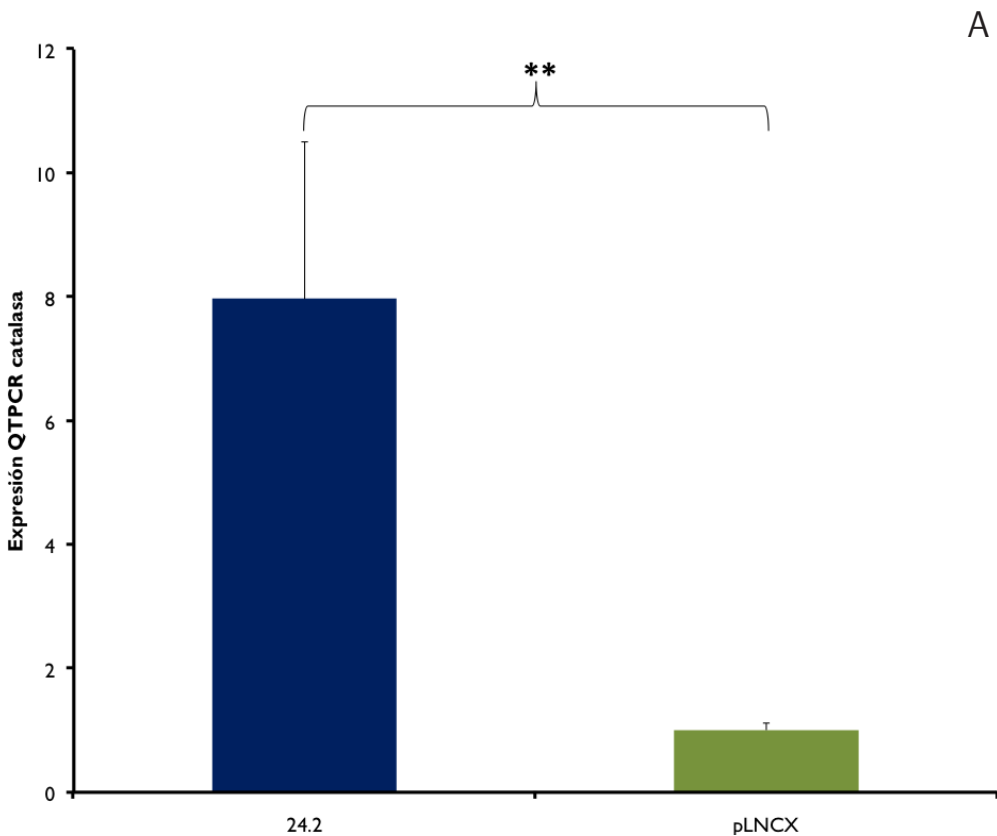


Figura IV.19. Estudio de los niveles y de la actividad de la enzima MnSOD en las líneas pLNCX y 24.2. A) Niveles de expresión del gen SOD2 en células pLNCX y 24.2. B) Western-blot de MnSOD en células pLNCX y 24.2 (Western-blot representativo). C) Densitometría del Western-blot de MnSOD en células pLNCX y 24.2 a confluencia. D) Actividad de la MnSOD en las células pLNCX y 24.2. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. $n=2$ en grupo 24.2., y $n=2$ en grupo pLNCX. La significación estadística se expresa como (**) $p<0,01$ frente a pLNCX. La expresión de MnSOD se representa en número de veces.

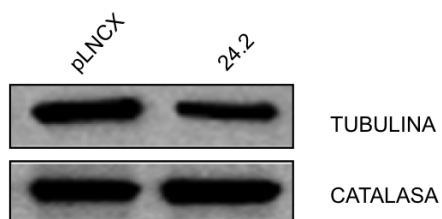
IV. RESULTADOS

5.3. Catalasa: estudio de la actividad enzimática y de la expresión mediante QRT-PCR y western blot:

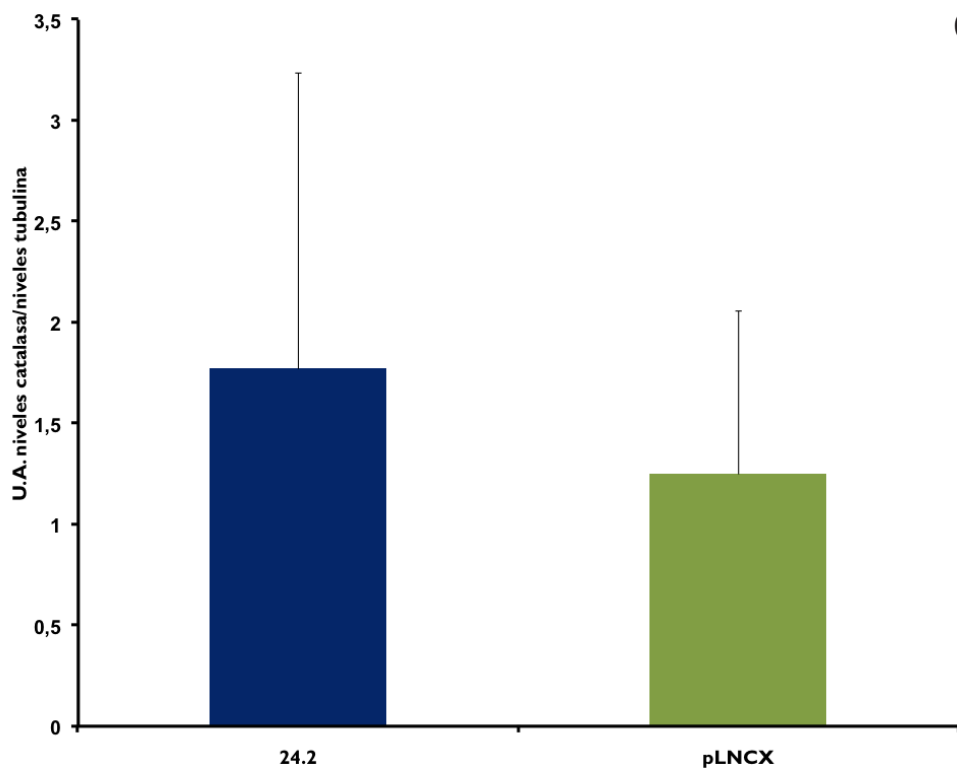
En la figura IV.20.A se ve como existen diferencias significativas en la expresión del gen *CAT*, observando mayores niveles en la línea 24.2. Sin embargo, el estudio de los niveles de proteína por Western blot, observados en la figura IV.20.B y IV.20.C indican que no existen diferencias significativas entre los dos tipos celulares. El estudio de la actividad catalasa indicó que se encuentra aumentada de manera significativa en las células con el inserto GSE24.2. (figura IV.20.D).

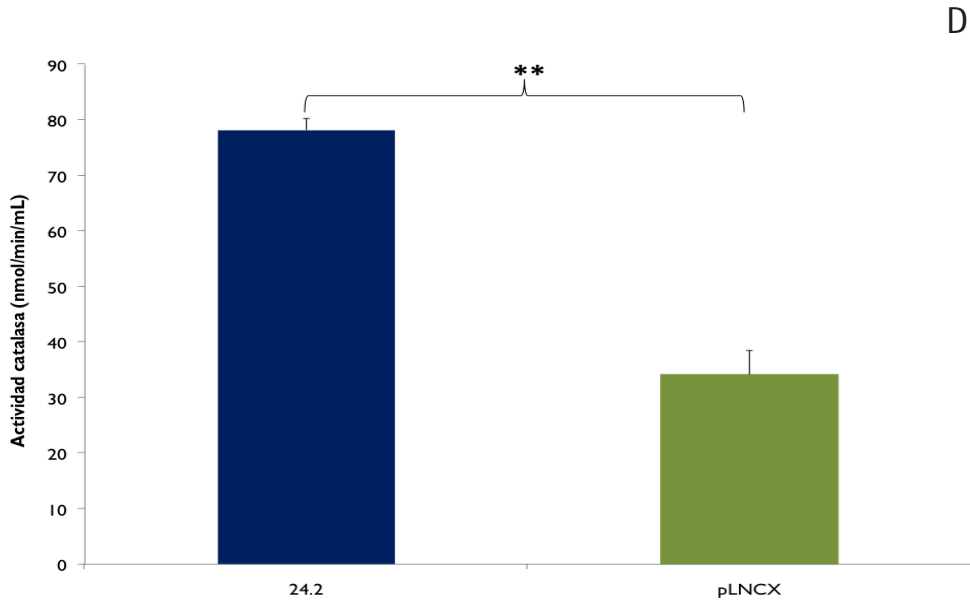


B



C





*Figura IV.20. Estudio de los niveles y de la actividad de la enzima catalasa. A) Niveles de expresión del gen catalasa en células pLNCX y 24.2. B) Western-blot de catalasa en células pLNCX y 24.2 (Western-blot representativo). C) Densitometría del Western-blot de catalasa en células pLNCX y 24.2 a confluencia. D) Actividad de la MnSOD en las células pLNCX y 24.2. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. $n=2$ en grupo 24.2., y $n=2$ en grupo pLNCX. La significación estadística se expresa como (**) $p<0,01$ frente a PLNCX. La expresión de catalasa se representa en número de veces.*

6. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL ADN

6.1. Determinación de γ -H2AX mediante western blot:

El estudio por western blot de los niveles de γ -H2AX en las líneas pLNCX y 24.2 muestra niveles menores de γ -H2AX en las células que contienen el inserto GSE24.2, respecto a aquellas con el vector vacío. Este resultado sugiere un menor daño en el ADN en aquellas células con el inserto GSE24.2.

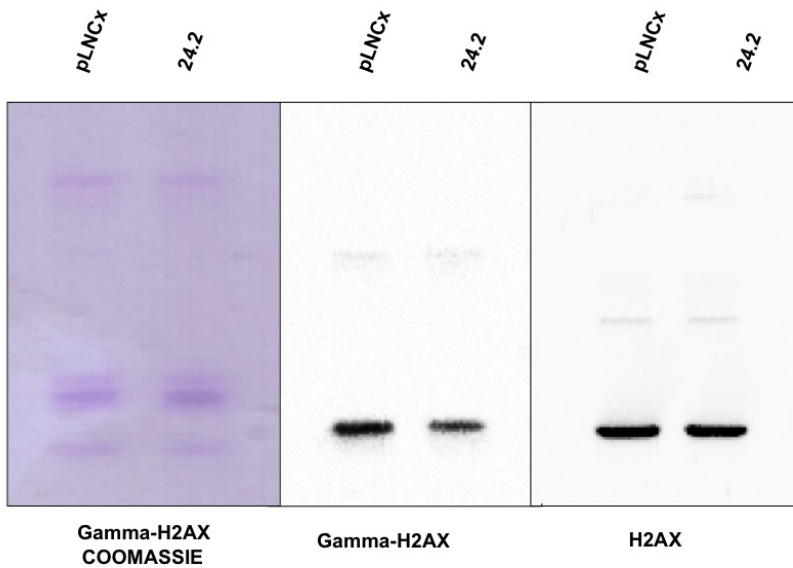


Figura IV.21. Estudio del γ -H2AX mediante western blot.

6.2. RAD53:

La expresión de la quinasa RAD53, que se activa en respuesta al daño al ADN, presenta niveles menores en las células con el inserto 24.2 respecto a aquellas transfectadas con el vector vacío pLNCX, como se ve en la figura IV.22.

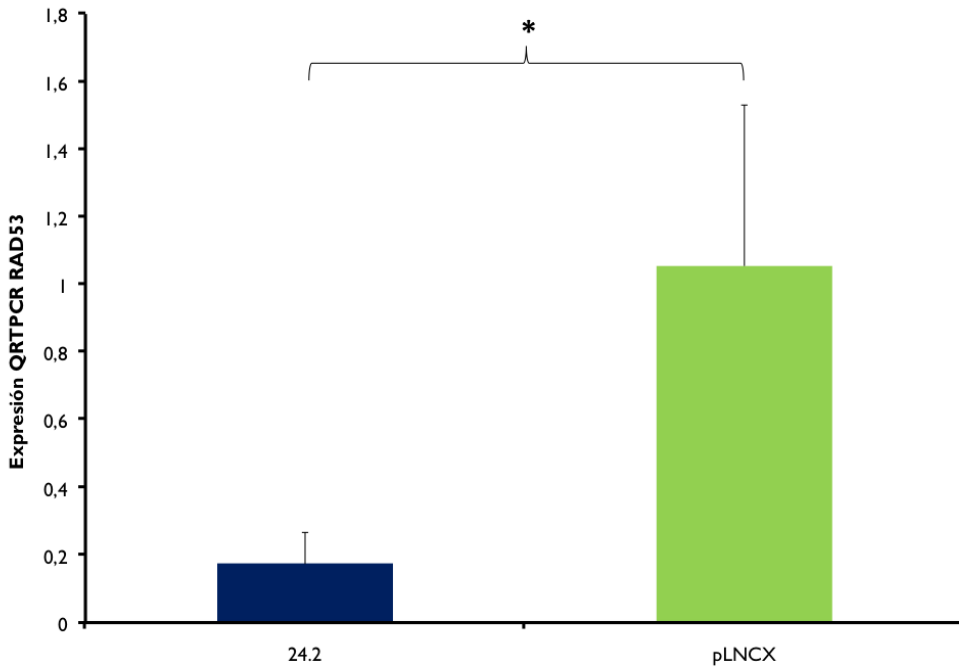
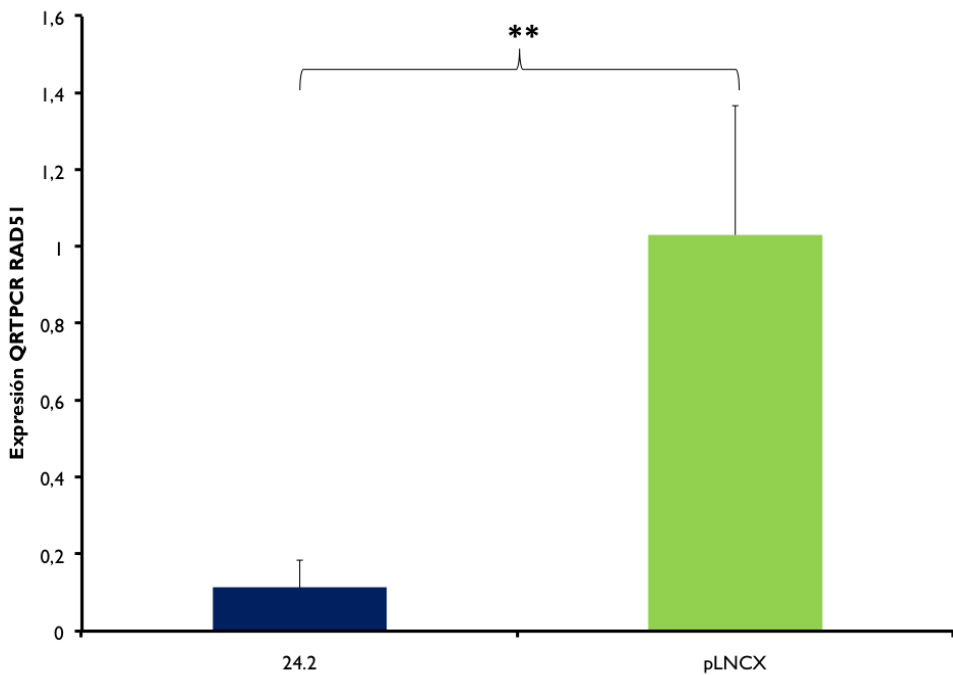


Figura IV.22. Estudio de la expresión del gen RAD53. Los valores se expresan como media ± desviación estándar. n=3 en grupo 24.2., y n=3 en grupo pLNCX. La significación estadística se expresa como () $p < 0,05$ frente a pLNCX. La expresión de RAD53 se representa en número de veces.*

6.3. RAD51:

En el análisis de la expresión del gen *RAD51* mediante QRT-PCR, se observan diferencias significativas entre los valores de 24.2 y pLNCX, siendo menor la expresión de RAD51 en las células 24.2.



*Figura IV.23. Estudio de la expresión del gen RAD51. Los valores se expresan como media ± desviación estándar. n=3 en grupo 24.2, y n=3 en grupo pLNCX. La significación estadística se expresa como (**) $p < 0,01$ frente a pLNCX. La expresión de RAD51 se representa en número de veces.*

IV. RESULTADOS

6.4. HOGG1:

La expresión del gen *HOGG1*, que repara lesiones del ADN, está elevada en las células en las que se ha reparado la actividad telomerasa respecto a aquellas transfectadas con el vector vacío, como se muestra en la figura IV.24.

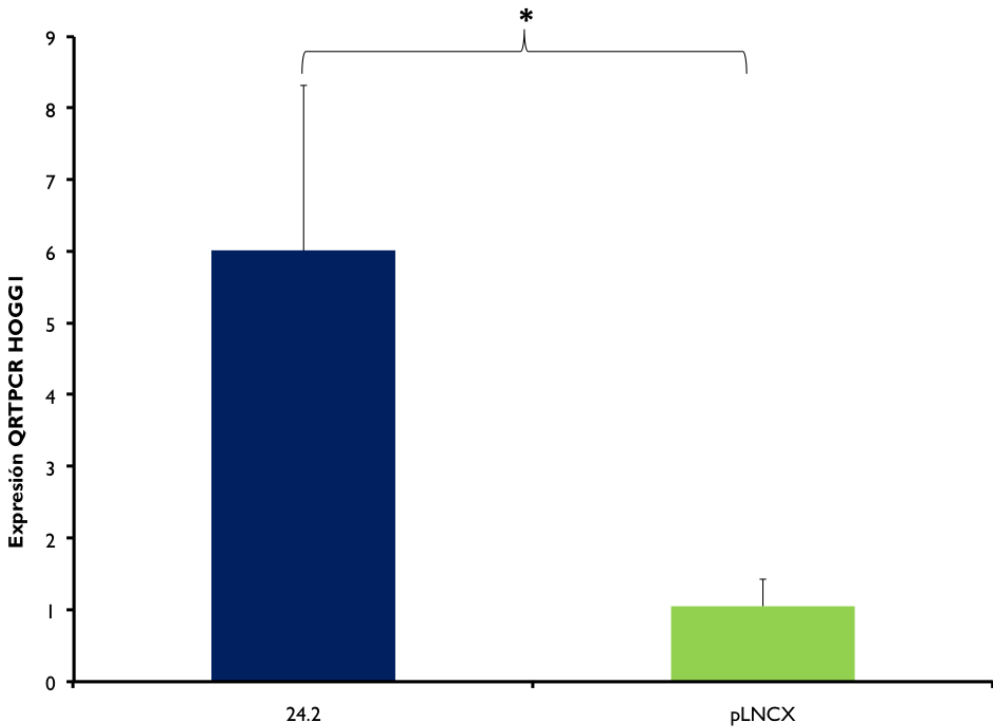


Figura IV.24. Estudio de la expresión del gen HOGG1. Los valores se expresan como media ± desviación estándar. n=3 en grupo 24.2., y n=3 en grupo pLNCX. La significación estadística se expresa como () $p < 0,05$ frente a pLNCX. La expresión de HOGG1 se representa en número de veces.*

6.5 PARP1:

PARP1 se activa en respuesta al daño al ADN. Aunque no se vieron diferencias significativas entre los dos tipos celulares, si que se puede ver una tendencia en la que las células 24.2. tiene mayores niveles que las pLNCX.

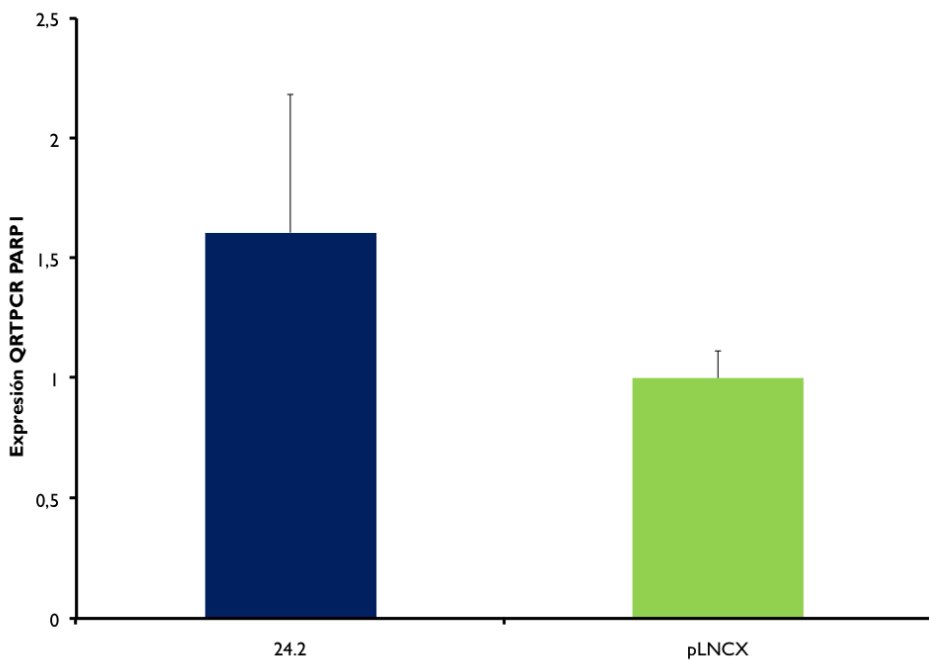


Figura IV.25. Estudio de la expresión del gen PARP1. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. $n=3$ en grupo 24.2., y $n=3$ en grupo pLNCX. La expresión de PARP1 se representa en número de veces.

ALTERACIONES EPIGENÉTICAS EN DISQUERATOSIS CONGÉNITA LIGADA AL CROMO-

SOMA X: pLNCX y 24.2

En esta parte de la tesis, estudiaremos si cambios en la actividad telomerasa (y en el perfil de estrés oxidativo) producen alteraciones en distintas modificaciones postraduccionales en las histonas y en consecuencia tendrían un efecto directo en la estructura de la cromatina.

1. El restablecimiento de la actividad telomerasa origina cambios en los niveles de acetilación de las histonas

Con el objetivo de comparar modificaciones postraduccionales en las histonas en los modelos celulares pLNCX (línea DC afectada) y 24.2 (línea con la actividad telomerasa restablecida), se analizaron los niveles de acetilación de la lisina 9 de la histona H3, lisina 8 de la histona H4 y lisina 5 de la histona H2B. Todas estas marcas son marcas de eucromatina y por lo tanto la modificación del balance normal para estas marcas debe producir una alteración en la proporción de cromatina en conformación de heterocromatina y eucromatina.

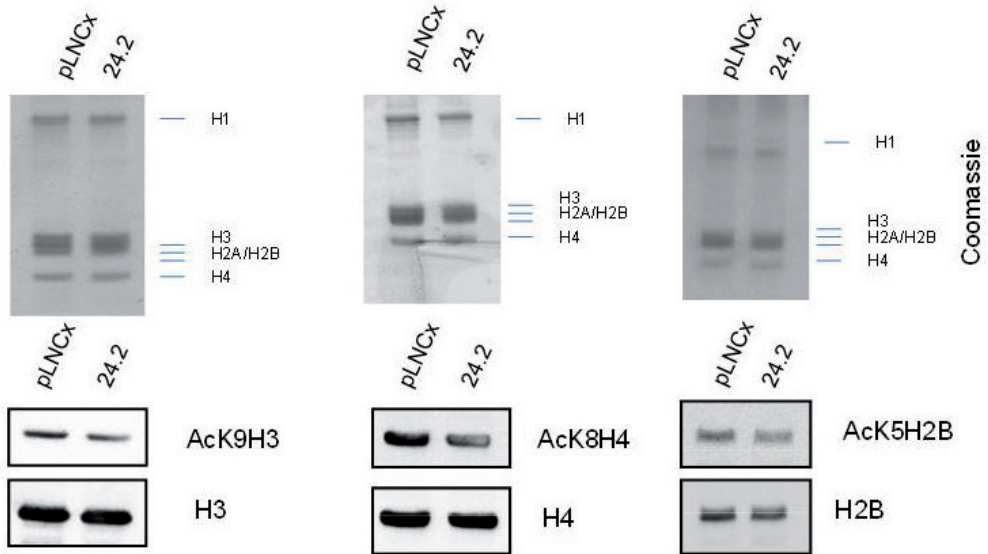


Figura IV.26. Análisis de los niveles de acetilación de Lisinas en las histonas H3, H4 y H2B obtenidas de células pLNCX y células 24.2. Experimento representativo.

Los resultados mostrados en la figura IV.26, indican que las histonas obtenidas de las células pLNCX (deficientes en telomerasa) presentan mayores niveles de acetilación en lisina 9 de la histona H3, lisina 8 de la histona H4, lisina 5 de la histona H2B que las células en las que se restauró la actividad telomerasa mediante la inserción del elemento génico supresor GSE24.2. Para ello se hicieron 3 experimentos del que se muestra en la figura IV.26 uno de ellos como experimento representativo.

2. El restablecimiento de la actividad telomerasa origina cambios en los niveles de metilación de las histonas

Para completar la información sobre la alteración en el patrón de modificaciones post-
raduccionales en nuestro modelo celular, se decidió analizar los niveles de metilación en
la lisina 9 de la histona H3. Los resultados obtenidos indicaron bajos niveles de meti-
lación en lisina 9 de la histona H3 en las células pLNCX, sugiriendo que podrían existir
pérdidas en dominios de heterocromatina, tal y como se había observado en las células
provenientes de Hutchinson-Gilford. Del mismo modo, se decidió confirmar estos resul-
tados evaluando los niveles de esta modificación mediante microscopia confocal. En la
figura IV.27.B se muestra el experimento representativo de los 3 que se realizaron medi-
ante western blot e inmunofluorescencia mediante microscopia confocal, que indicaron
menores niveles de metilación en la lisina 9 de la histona H3 para las células pLNCX.

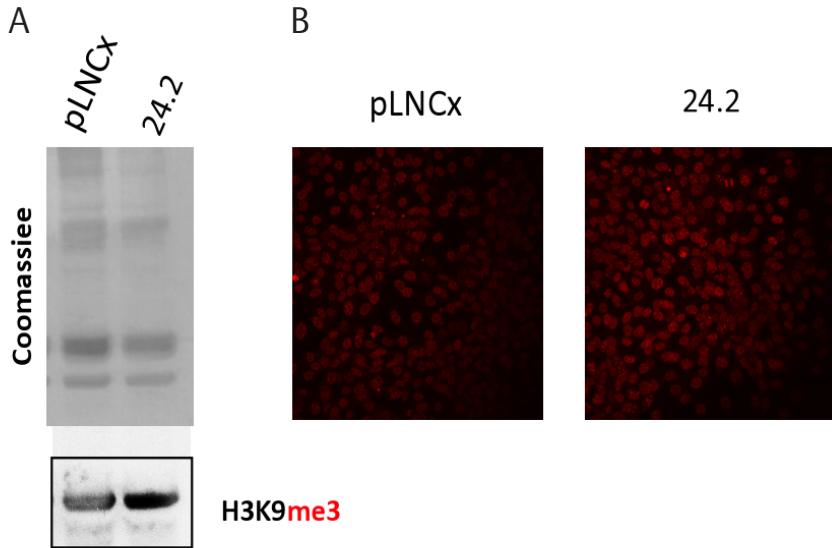


Figura IV.27. Análisis de los niveles de lisina trimetilada en la lisina 9 de la histona H3 de células pLNCx y células 24.2. A) Western blot. B) Inmunofluorescencia, evaluación mediante microscopía confocal. Experimento representativo.

3. El restablecimiento de la actividad telomerasa origina disminución en la carbonilación de la histona H1

Una modificación postraducciona poco caracterizada es la carbonilación de las histonas. Esta modificación puede producirse como consecuencia de un aumento en el estrés oxidativo [113]. Un aumento en el estrés oxidativo puede alterar el balance redox nuclear y producir carbonilación en multitud de proteínas nucleares. Tras una extracción ácida de histonas, se decidió evaluar el nivel de carbonilación de las histonas, demostrando en la figura IV.28 (experimento representativo de los 3 que se efectuaron) que la histona H1 estaba altamente carbonilada en las células pLNCX. Estos resultados, sugieren una alteración en el patrón normal de modificaciones postraduccionales y dado que los residuos con mayor probabilidad de carbonilación son los residuos Lys y Arg, ello produciría que las cargas positivas de estos aminoácidos quedarán enmascaradas con lo que el ADN podría estar mucho más descompactado alrededor del nucleosoma en las células pLNCX y por lo tanto este ADN sería mucho más susceptible al daño por las especies reactivas de oxígeno.

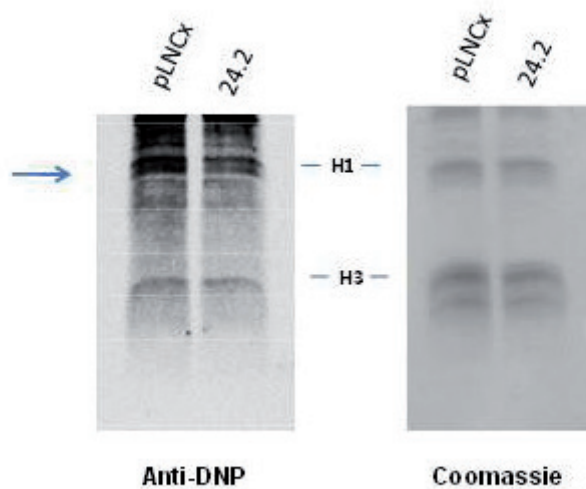


Figura IV.28. Análisis de los niveles de carbonilación de las histonas obtenidas de células pLNCX y células 24.2. Experimento representativo.

DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

Los telómeros se acortan con cada división celular, produciendo finalmente disfunción celular, envejecimiento e inestabilidad genética [114]. La telomerasa es un complejo enzimático con actividad transcriptasa inversa y cataliza la adición de las repeticiones teloméricas en los extremos de los cromosomas para mantener la longitud de los telómeros [115]. A diferencia de las células humanas germinales y líneas tumorales, la mayoría de las células somáticas humanas presentan niveles no detectables de actividad telomerasa limitados por una expresión disminuída de hTERT [116,117]. La prueba de que el acortamiento de los telómeros está implicado en la senescencia celular fue comprobado en distintos estudios que demostraron que la sobre-expresión de TERT (el componente catalítico del complejo telomerasa) podía activar la actividad telomerasa, mantener la longitud de los telómeros y extender la vida media de las células humanas sin apenas cambios fenotípicos celulares [118,119]. Varios estudios realizados para esclarecer el efecto del estrés oxidativo sobre los telómeros han demostrado que los telómeros son muy sensibles al daño por estrés oxidativo [8,15]. Por ejemplo, en la ataxia telangiectasia se ha encontrado una relación directa entre el estrés oxidativo crónico y el acortamiento telomérico [120]. Sin embargo, la relación entre el acortamiento telomérico, la regulación de la actividad telomerasa y el estrés oxidativo no ha sido estudiada extensamente en modelos celulares o animales.

La DC ha sido estudiada a nivel clínico y a nivel genético y molecular, pero muy poco se conoce sobre las características fisiopatológicas de la enfermedad relacionadas con el estrés oxidativo. En esta tesis hemos estudiado la posible relación entre la actividad telomerasa y el estrés oxidativo; ambos fenómenos relacionados con la inducción de la

senescencia [10,121]. Asimismo, hemos analizado los defectos en la respuesta antioxidante, así como la respuesta implicada en la reparación del ADN, y las modificaciones post-traduccionales globales en algunas de las histonas que conforman la cromatina.

El modelo de estudio utilizado ha consistido en líneas de fibroblastos de piel de pacientes con DC ligada al cromosoma X, en los que existen niveles bajos de expresión del gen *DKC1* (figura IV.1). Además, en esta tesis se ha utilizado una línea celular de X-DC (GM01774) en la que se ha restaurado la actividad telomerasa mediante transfección con un inserto GSE24.2 (genetic supresor element 24.2) que codifica para el dominio pseudouridina sintasa de *DKC* [21]. La expresión de este dominio incrementa la supervivencia contra el cisplatino y los inhibidores de la telomerasa. Además, el inserto GSE24.2 activa el promotor de c-myc a través de NHEIII que consecuentemente activa el promotor de hTERT.

- FIBROBLASTOS DE PACIENTES CON DC LIGADA AL CROMOSOMA

Westin y colaboradores recientemente han hipotetizado sobre como la vía p53/p21^{WAF1}^{CIP} puede estar sobre regulada como consecuencia de la generación de telómeros cortos en células DC [122]. Un hecho relevante es que la activación de p53 está asociada a un incremento de las ERO [123]. Sin embargo, el mecanismo por el que la vía p53/p21 en el contexto de la disfunción telómero/telomerasa lleva a un incremento en la concentración de los niveles de las ERO no está completamente clara.

Westin y colaboradores encontraron niveles elevados de superóxido en fibroblastos de pacientes con DC autosómica dominante con una deleción en el gen *TERC* [122].

Las determinaciones realizadas en esta tesis, indicaron que no había diferencias signifi-

V. DISCUSIÓN

cativas en los niveles de superóxido entre los fibroblastos de pacientes de X-DC y los fibroblastos de individuos control (figura IV.2). Resultado que sugiere que no hay un estrés oxidativo agudo en las células X-DC en las condiciones del cultivo celular utilizadas. Aunque los niveles de ERO en los fibroblastos X-DC en estado basal no fueron mayores que en los controles, se decidió analizar si las defensas antioxidantes en las células X-DC estaban alteradas, de forma que los fibroblastos X-DC no pudieran responder adecuadamente frente a un estímulo de estrés oxidativo externo. Los análisis indicaron que la expresión del gen que codifica para la enzima Cu/ZnSOD, su expresión proteica y su actividad fueron significativamente menores en fibroblastos provenientes de pacientes X-DC respecto a los controles (figura IV.3). Del mismo modo, también se observó una disminución en la expresión proteica de MnSOD y en su actividad (figura IV.4). Este hecho, ya indica una mayor susceptibilidad de las células X-DC a cualquier agresión por estrés oxidativo y por lo tanto una mayor sensibilidad al daño en sus componentes celulares. En este sentido, existen evidencias de que la disminución de MnSOD en la célula incrementa el daño al ADN, puesto que especies reactivas de oxígeno no detoxificadas podrían atacar a esta biomolécula [97,98].

El estudio de las enzimas antioxidantes en la vía de detoxificación de las ERO en X-DC consistió en evaluar las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa, enzimas implicadas en la eliminación del peróxido de hidrógeno. Los resultados obtenidos mostraron baja actividad catalasa para dos de las líneas celulares de pacientes X-DC (figura IV.5.F) además de una baja expresión y actividad glutatión peroxidasa (figura IV.6), resultados que ponían de manifiesto una baja defensa antioxidante en los fibroblastos de pacientes de X-DC.

Esta relación entre déficit de actividad telomerasa y algunos enzimas antioxidantes fue establecida previamente por Pérez-Rivero y colaboradores [20]. Estos autores mostraron una correlación directa entre la actividad telomerasa y la actividad antioxidante catalasa, observando que en fibroblastos MEF deficientes en actividad telomerasa ($TERC^{-/-}$) presentaban una baja actividad catalasa. Asimismo, observaron que al restablecer la actividad telomerasa mediante la transfección con un vector pBS-mTerc, aumentaban los niveles de catalasa [20].

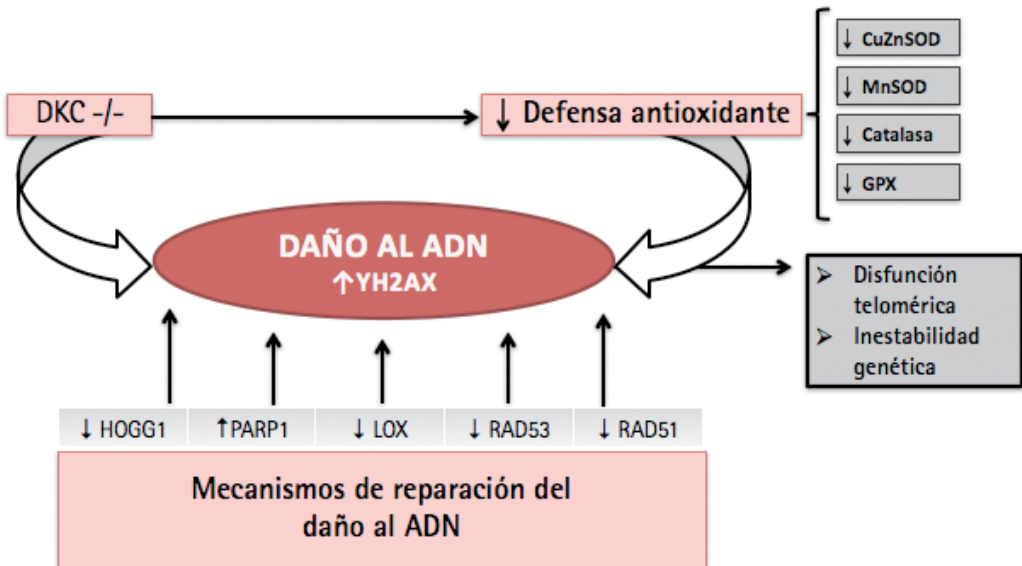
Por lo tanto, parece existir una relación entre las defensas antioxidantes y la actividad telomerasa. Sin embargo, tal como sugieren Westin y colaboradores, esta relación debe ser general a una disfunción telomérica, incluyendo tanto la actividad telomerasa como el acortamiento telomérico [122].

Este hecho contrasta con la hipótesis de la función secundaria extratelomérica de la proteína TERT en la mitocondria [124], por la que TERT mejora la función mitocondrial y atenúa el estrés oxidativo [11,125,126].

De hecho, Westin y colaboradores demuestran mediante el uso de un mutante de TERT, al que se le ha eliminado la secuencia de señalización de exportación a mitocondria, que los niveles de ERO se mantuvieron bajos, cosa que no ocurrió cuando se generó el mutante que inhibía la actividad TERT de elongación de los telómeros [122], condiciones en las que los niveles de superóxido se incrementaban considerablemente. Es interesante el hecho de que también se ha descrito que mutantes de TRF2 (una proteína de unión a los telómeros), en los que se produce un acortamiento telomérico muestran un aumento en la generación de ERO [127]. Este hecho por lo tanto indica que es la disfunción telomérica

V. DISCUSIÓN

en sí la que debe originar el estrés oxidativo y no las funciones extrateloméricas de TERT. Está claro que este déficit en la actividad telomerasa que da lugar a un acortamiento telomérico está relacionada con un aumento del estrés oxidativo en algunos modelos celulares y en fibroblastos de pacientes con DC autosómica recesiva. Así mismo, los estudios realizados en esta tesis con fibroblastos de X-DC indican que el déficit en proteína disquerina que lleva a la disfunción telomérica, produce una disminución de las defensas antioxidantes. Es decir, las células con disfunción telomérica presentan una mayor susceptibilidad al daño por ERO puesto que tienen una menor defensa antioxidante (esquema V.I.):



Esquema V.I.: Procesos que conllevan a la disfunción telomérica e inestabilidad genética estudiados en esta tesis.

Las ERO pueden inducir daño oxidativo al ADN en las células, sobre todo en células senescentes [54]. Si dicho daño no se repara de manera rápida y eficiente, puede causar cambios como deleciones, fusiones, translocaciones o aneuploidías, dando como resultado cáncer, o agravando enfermedades genéticas como la DC [128]. Además, se ha demostrado que las ERO pueden acelerar el acortamiento telomérico y contribuir a la formación de estructuras cromosómicas aberrantes o fusiones cromosómicas [23]. Los extremos teloméricos deben adoptar una estructura denominada "loop-telomérico" o T-loop, cuya estructura secundaria previene que los telómeros sean reconocidos como una estructura de ADN dañada [129].

Las respuestas inducidas por el daño al ADN incluyen la activación de diferentes rutas moleculares. En primer lugar, múltiples proteínas implicadas en los mecanismos de reparación del ADN se activan para reconocer el daño producido [105,130]. Un segundo punto de control es el que este daño causa al estimular mecanismos específicos que detienen el ciclo celular de la célula para que los sistemas de reparación de la célula corrijan el ADN dañado y así ésta pueda continuar con la división celular sin presentar alteraciones en el genoma. Un tercer punto de control es la apoptosis estimulada por el daño al ADN y que elimina las células dañadas irreversiblemente [131]. En el caso del acortamiento telomérico, cuando la estructura de T-loop se pierde, se inicia la activación de respuesta al daño del ADN [63]. En este caso comienzan toda una serie de eventos con el fin de señalar este daño y activar en última consecuencia la senescencia celular asociada al acortamiento telomérico [132]. En esta ruta intervienen la proteína 53BP1 que se une a la histona γ -H2AX dentro del telómero, a continuación se produce la activación de las

V. DISCUSIÓN

quinasas ATM/ATR, CHK1/CHK2, la proteína p53 y inhibidor de quinasa dependiente de ciclina regulado por p53 (CDKi), p21^{WAF/CIP}.

Por lo tanto, la activación de mecanismos de reparación del ADN, en condiciones de disfunción telomérica y menor defensa antioxidante, debe ser un proceso celular esencial para evitar el daño acelerado del material máspreciado en las células, el ADN.

La fosforilación de la histona H2AX, conocida como γ -H2AX, se utiliza como un marcador precoz de la respuesta celular al daño en el ADN [133]. Trabajos realizados en fibroblastos de modelos humanos y animales sugieren que el incremento en la respuesta al daño en el ADN puede contribuir a la patología de DC [134,135]. Así pues, para evaluar el daño al ADN en los fibroblastos de pacientes con X-DC analizamos los niveles de γ -H2AX, observando mayores niveles de γ -H2AX en las líneas de fibroblastos de pacientes (figura IV.7). Estos resultados coinciden con los observados por Kirwan y colaboradores realizados en fibroblastos de pacientes de X-DC y formas autosómicas dominantes [136]. Estos autores evaluaron el daño al ADN en fibroblastos de pacientes con DC que contenían mutaciones en *DKC1*, mediante el análisis del γ -H2AX por citometría, concluyendo que los pacientes con DC poseían mayores niveles de γ -H2AX con respecto sus controles. En consecuencia, pensamos que estas células acumulan daño en el ADN.

Este daño podría ser producido por especies reactivas de oxígeno, o bien por la propia inestabilidad genética de las células DC [137], por lo que el correcto funcionamiento de los mecanismos de reparación del ADN son esenciales en estas líneas celulares.

Recientemente, se ha especulado sobre la disfuncionalidad de los mecanismos de repara-

ción del ADN en DC [136]. Con el objetivo de evaluar esta hipótesis, en esta tesis se han estudiado distintas proteínas implicadas en algunos mecanismos de reparación del ADN. Cuando H2AX se fosforila, se activa la proteína RAD53 (Chk2) fosforilándose por mediación de las kinasas ATM/ATR. Esta fosforilación está relacionada con la activación de los puntos de control del ciclo celular para ayudar en la reparación del ADN a través de la regulación de cdk2/Ciclina B1 o bien a través de la fosforilación de p53, que produce a su vez la activación de p21 para detener el ciclo celular [138,139]. En este sentido RAD53 es una proteína esencial para el control de la integridad del genoma y en particular ha mostrado ser indispensable para la inducción de los puntos de control del ciclo celular tras el daño en el ADN en situaciones en las que existe disfunción telomérica [140]. Los resultados obtenidos en esta tesis indican bajos niveles de expresión de *RAD53* en las líneas de fibroblastos provenientes de los pacientes de X-DC (figura IV.8). Estos resultados sugieren que los puntos de control en el ciclo de replicación del ADN no se activarían de manera adecuada y en consecuencia la reparación del ADN en estos fibroblastos sería errónea. De hecho, todos estos componentes en las vías de reparación y control del ciclo celular como Atm, Chk2(Rad53), p53, p21 y p16/p19(ARF) juegan papeles importantísimos en el mantenimiento y renovación de las células madre hematopoyéticas en aquellos escenarios donde existe una disfuncionalidad telomérica [141], y en el caso particular de RAD53, aunque no tiene un papel directo en la defensa antioxidante o en la cobertura telomérica ("capping telomérico") tiene una importancia fundamental en el rescate de la detención del ciclo celular inducido por daño oxidativo en el ADN [142].

V. DISCUSIÓN

Este hecho debe contribuir a que las células X-DC tengan un ciclo celular alterado con fases S mucho más largas y un mayor número de células en fase G0 que fibroblastos provenientes de individuos sanos, tal y como ha sido descrito por otros autores [136].

La proteína RAD51 también tiene una importante función en la respuesta al daño del ADN participando en los mecanismos de recombinación homóloga. La replicación y la reconstitución de los telómeros durante las fases S/G2 del ciclo celular representan etapas críticas para la célula [143], produciendo señalización y, activación de proteínas implicadas en la reparación del ADN, tales como las proteínas kinasa DNA-dependientes (DNA-PKcs) y RAD51.

Aunque recientes estudios realizados por Kirwan et al. [136] no plantean ninguna duda sobre la implicación de la acumulación del daño en el ADN en la fisiopatología de la enfermedad, cuestionan la posible implicación de una disfuncionalidad de la respuesta al daño en el ADN en la enfermedad. Sin embargo, estos autores solo evalúan la formación de γ -H2AX y focis p53BP1 en distintos modelos celulares de DC (con mutaciones en TERT, TERC y DKC1) y en distintas condiciones de inducción al daño del ADN, pero no evalúan ninguna de las proteínas implicadas en los distintos mecanismos de reparación.

En el caso específico de RAD51 se ha demostrado que es esencial la formación del *T-loop*, permitiendo a continuación la generación de la estructura en *D-loop* por invasión de la estructura de simple cadena telomérica dentro del ADN telomérico (figura V.1) [143].

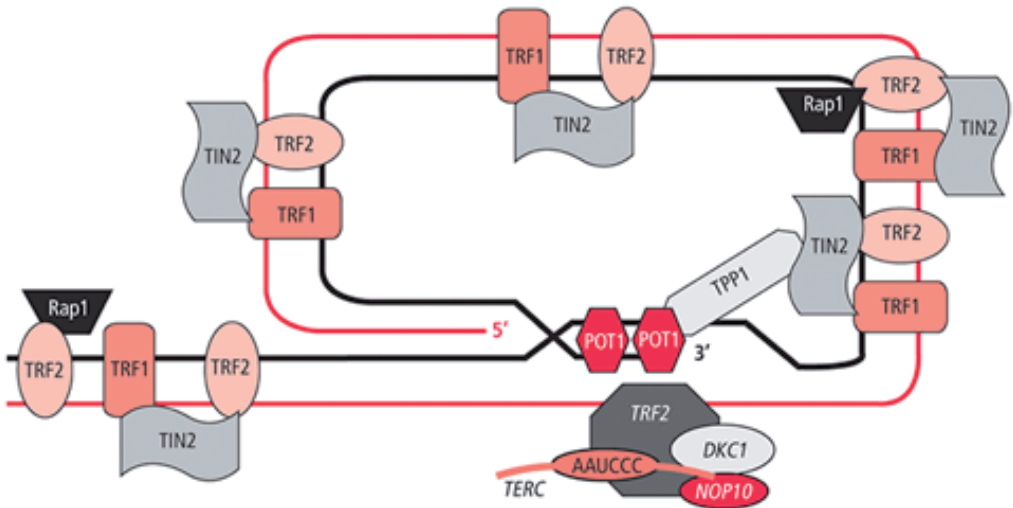


Figura V.1. Diagrama de la disposición de las proteínas del telosoma de los telómeros.

En esta localización, el ADN forma un bucle grande, denominado bucle-T (T-loop). La hebra 3' del ADN termina en forma de cadena sencilla, constituyendo el "saliente" (overhang) 3' del extremo del cromosoma. La presencia de cadenas sencillas de ADN libres podría activar los sistemas de reparación, comprometiendo de esa manera la estabilidad del telómero. Para que esto no suceda, el extremo 3' invade una zona posterior de doble cadena del cromosoma, hibridando consigo misma. Esta estructura, recibe el nombre de bucle-D (D-loop).
 Extraído de página web U.S. National Cancer Insitute.

Es por ello que RAD51 es esencial para llevar la recombinación homóloga del T-loop en los telómeros, dado que si este mecanismo falla o se forman T-loops inestables, se puede producir una delección de grandes segmentos teloméricos [144]. Pero se necesita una actividad óptima de RAD51. De hecho, en condiciones de inestabilidad telomérica la ac-

V. DISCUSIÓN

tividad de RAD51 podría contribuir a la formación de estructuras teloméricas aberrantes [145]. Los resultados indican que el balance global de expresión de *RAD51* es menor en las líneas de pacientes frente a la de sus controles, por lo que la capacidad de reparación del daño en el ADN por recombinación homóloga debe ser menor en los fibroblastos X-DC (figura IV.8).

Además de la implicación de RAD51 en los mecanismos de reparación de recombinación homóloga en los telómeros, también se ha descrito su implicación en la reparación del ADN mitocondrial cuando éste está dañado como consecuencia del estrés oxidativo [103], hecho que sugiere que ante un daño oxidativo en el ADN mitocondrial, las células de pacientes de X-DC tendrán una menor capacidad de reparación de las lesiones en el ADN mitocondrial (figura IV.9).

El daño oxidativo producido en el ADN es capaz de producir un gran número de productos, siendo la 8-oxodG el producto de oxidación mayoritario, tanto en el ADN nuclear como en el ADN mitocondrial. La reparación de la 8-oxodG se lleva a cabo mediante el reconocimiento y la escisión de la guanina oxidada por la ADN glicosilasa (OGG1). Esta enzima juega un papel fundamental en el mecanismo de reparación del ADN por escisión de bases [146] y también en la reparación de bases oxidadas en levaduras [147], en ratón [148] y en células de mamífero [149]. En humanos es la hOGG1 la que elimina la 8-oxodG [150].

En este trabajo hemos determinado la expresión de hOGG1 en fibroblastos de pacientes con DC respecto a sus controles, para incrementar el conocimiento sobre este mecanismo

de reparación esencial en situaciones de estrés oxidativo. En la figura IV.10 se observan niveles significativamente menores de hOGG1 en AD y BD con respecto a sus controles. Estos son los primeros resultados en los que se describe una menor expresión de hOGG1 no solo en X-DC, sino también en el resto de haplotipos de DC.

Es interesante saber que la expresión de hOGG1 se ha relacionado con la supervivencia celular frente al estrés oxidativo inducido por H_2O_2 [151], observándose mayor apoptosis en fibroblastos humanos en los que se silenció el gen hOGG1. Además se ha correlacionado la depleción de la glicosilasa hOGG1 con el acortamiento rápido de los telómeros en condiciones de estrés oxidativo. En este sentido, Wang y colaboradores [148], demostraron en un modelo animal con OGG1 inhibida y con unos niveles muy elevados de estrés oxidativo que, dichos animales sufrían un acortamiento rápido de los telómeros, coincidiendo con los resultados de von Zglinicki y colaboradores [18,23]. Estos últimos autores demostraron que el estrés oxidativo y la oxidación del telómero es uno de los principales causantes del acortamiento telomérico. Dichos autores también observaron que la reducción del estrés oxidativo, mediante el uso de antioxidantes, enzimas antioxidantes o bajas presiones parciales de oxígeno disminuían el acortamiento de los telómeros [152,153]. Es por ello, que los bajos niveles de hOGG1 observados en las líneas celulares AD y BD comparadas con sus controles deben contribuir a un mayor daño oxidativo en los telómeros y en consecuencia a un acelerado acortamiento de éstos.

Múltiples interacciones coordinadas entre proteínas ocurren durante la ruta de reparación BER. En particular, existen evidencias que sugieren que la proteína OGG1 puede

V. DISCUSIÓN

interaccionar con otras proteínas de la ruta como XRCC1, la endonucleasa AP1, XPC, la histona acetiltransferasa p300/CBP, Rad52, etc [154-156].

Muy recientemente también se ha descrito una interacción directa entre la proteína PARP1 y la glicosilasa OGG1, observándose que ambas pueden modular su actividad mutuamente y que la actividad coordinada de ambas es necesaria para la reparación correcta del ADN oxidado [157].

La proteína PARP1 es un sensor de las roturas del ADN, mayoritariamente las roturas de hebra sencilla y que puede señalar el lugar de rotura mediante la poli(ADP-ribosil)ación de histonas, proteínas de reparación de daño en hebra sencilla, proteínas implicadas en el mecanismo BER y también a ella misma [71,158]. Una vez la hebra es reparada, las cadenas de PAR (poli-ADP-ribosa) son degradadas [159,160], y proteínas nucleares como las histonas, son a continuación marcadas por carbonilación para ser degradadas de forma eficiente por el proteasoma nuclear [135].

Los resultados obtenidos para la expresión de *PARP1* en las líneas de fibroblastos AD, CD indicaron un aumento significativo en la expresión de este gen respecto a sus controles y una tendencia en el caso de los fibroblastos BD (figura IV.11).

Por lo que se conoce hasta el momento, OGG1 y PARP1 se unen a XRCC1 y forman un complejo multiprotéico en las células [156,161], sugiriendo que la unión OGG1/PARP1 debe ser importante para reclutar otras proteínas de reparación al sitio del daño en el ADN. PARP1 debería entonces inhibir la actividad glicosilasa de OGG1, y entonces OGG1 debería abandonar este sitio de daño en el ADN, permitiendo que otras proteínas puedan acceder para facilitar la reparación [71,158,162].

Los datos obtenidos por Noren y colaboradores [157] sugieren que en condiciones de bajos niveles o baja actividad de OGG1, la actividad de PARP1 está desregulada produciendo también niveles bajos de poli(ADP-ribosil)ación en proteínas nucleares. Este hecho puede producir un reclutamiento erróneo de otras proteínas de reparación implicadas en BER y que por lo tanto llevarían a una acumulación de daño en el ADN. De hecho, se ha descrito en distintos polimorfismos que producen baja actividad de OGG1, que se induce una disminución de la actividad de PARP1 en las etapas iniciales de la ruta de reparación BER [163-167]. Los resultados obtenidos en esta tesis donde se observan bajos niveles de hOGG1 en pacientes X-DC (figura IV.10), están de acuerdo con la desregulación que se produciría en la actividad PARP1 y claramente apuntan a una pérdida de control en el mecanismo de reparación del ADN por BER en las células de pacientes de X-DC y aunque la expresión de PARP1 está aumentada (figura IV.11), según los planteamientos de Noren y colaboradores [157], sí que debe de estar afectada su capacidad de marcar los sitios de daño al ADN o su adecuado funcionamiento. En consecuencia, esta desregulación en los mecanismos de reparación del ADN, serían los que en último término podrían dar lugar a roturas de doble cadena en el ADN, hecho que está de acuerdo con los mayores niveles de γ -H2AX detectados en las líneas celulares X-DC. Además, PARP1 es un punto de conexión y de coordinación entre la reparación del ADN y las vías de eliminación de proteínas dañadas.

Además del daño al ADN, los ERO puede dañar a las proteínas citosólicas y nucleares, incluyendo las histonas. Por tanto, la mayoría de las proteínas dañadas deben de ser eliminadas para poder mantener la homeostasis celular. Sin embargo, la capacidad de

V. DISCUSIÓN

reparar el daño producido en dichas proteínas es limitado [168,169]. Ha sido demostrado por varios grupos de investigación que el proteasoma 20S es el responsable de la degradación de las proteínas oxidadas, sobre todo en el núcleo [170,171]. La activación del proteasoma nuclear se produce gracias a la activación mediada por PARP1 [172,173]. Esta activación proteosomal es necesaria para una rápida y efectiva eliminación de proteínas nucleares oxidadas y también de las histonas oxidadas producidas tras la reparación del ADN [171].

Bakondi y colaboradores [174] han observado que durante la senescencia celular se produce una disminución en la capacidad de activación del proteasoma 20S mediado por PARP1, lo que podría dar lugar a una deficiente eliminación de proteínas dañadas en el núcleo. Otros trabajos llevados a cabo por el grupo de Grune también han concluido que las células senescentes contienen gran cantidad de proteínas oxidadas y que el papel que desempeña el proteasoma nuclear es fundamental en la degradación de estas proteínas oxidadas [175,176].

La carbonilación de proteínas nucleares puede producirse como consecuencia de la acción de especies reactivas de oxígeno [177,178], pero también por mediación de enzimas como las proteínas de la familia Lisil oxidasa (LOX). Se ha demostrado que la LOX interactúa con proteínas nucleares como la histona H1 [179,180].

Por otra parte, la LOX es una enzima que cataliza la formación de aldehídos. Se ha visto que los aldehídos que se forman son necesarios para la estabilización de las fibras de colágeno así como para la integridad y elasticidad de la elastina [108]. Aunque inicialmente se le ha atribuido esta función, también se ha demostrado que LOX tiene funciones

intracelulares que incluyen la regulación y diferenciación celular, así como la migración y transcripción genética [179]. De hecho, la desregulación del gen *LOXL2* en células de cáncer de mama MDA-MB-231 produce grandes cambios en la expresión de genes asociados con el control del ciclo celular y el cáncer [181].

Los bajos niveles de LOX que hemos observado en las líneas celulares X-DC (figura IV.12) podrían contribuir por lo tanto la inestabilidad cromosómica descrita en DC. En efecto, se ha demostrado que niveles bajos de LOX producen un aumento en la condensación de cromatina en células COS-7, NRK-79 [182] y también en células NIH3T3 [183]. Este hecho por lo tanto debe contribuir a la formación de estructuras cromatínicas aberrante, a una desregulación en los mecanismos de marcaje de proteínas para su degradación a través de mecanismos mediados por el proteasoma independientes de ubiquitinación y a una mayor descompactación alrededor del nucleosoma en las células.

- FIBROBLASTOS DE PACIENTES CON DC LIGADA AL CROMOSOMA X TRANSFECTADAS CON EL INSERTO QUE RESTABLECE LA ACTIVIDAD TELOMERASA (24.2), Y LAS CÉLULAS TRANSFECTADAS CON EL VECTOR VACÍO (pLNCX)

Los fibroblastos provenientes de pacientes con X-DC en los que se ha restablecido la actividad telomerasa mediante el inserto GSE24.2 constituyen un buen modelo para estudiar si existe alguna correlación molecular entre el estrés oxidativo y las enfermedades relacionadas con defectos en la actividad telomerasa. De este modo, dado que en

V. DISCUSIÓN

el apartado anterior hemos observado en las líneas celulares provenientes de pacientes X-DC que existe una disminución de algunas de las enzimas antioxidantes, cabría esperar una recuperación de la respuesta antioxidantes tras recuperar la actividad telomerasa mediante GSE24.2.

Los primeros experimentos realizados en las líneas pLNCX y 24.2 consistieron en la caracterización de las líneas celulares, evaluando en primer lugar la proliferación celular. Al estudiar la síntesis de ADN con el método de la bromodeouixiridina (BdrU) se observó que la capacidad proliferativa de los fibroblastos 24.2 es significativamente mayor que la capacidad de pLNCX (figura IV.13). Este resultado coincide con resultados previos obtenidos en linfocitos [184] y en fibroblastos [185] de pacientes con DC en los que se observó acortamiento telomérico y defectos en la capacidad proliferativa como consecuencia de un déficit en la actividad telomerasa. Por otra parte, el estudio de la morfología celular en ambas líneas celulares no indicó diferencias entre ellas, al igual que ocurre en otros estudios donde no se observan cambios significativos en la morfología celular tras la transfección que permite recuperar la actividad telomerasa en células provenientes de pacientes de DC [119,185].

Evaluación de los parámetros de estrés oxidativo:

Después de estudiar los niveles de ERO en los fibroblastos transfectados a partir de la línea celular DC observamos que los niveles de radical superóxido en los fibroblastos pLNCX fueron significativamente mayores que en los fibroblastos 24.2 (figura IV.14). Estos resultados sugieren una mayor producción de ERO para los fibroblastos pLNCX o

bien una menor capacidad para detoxificar estas especies reactivas. Por lo tanto, este resultado sugiere que el restablecimiento de la actividad telomerasa con el inserto 24.2 mejora el perfil de estrés oxidativo de la línea celular X-DC. Además, estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en fibroblastos embrionarios de ratón deficientes en telomerasa donde se ha observado un incremento en la concentración de radical superóxido y H_2O_2 [20], así como en enfermedades que cursan con un envejecimiento prematuro como la ataxia-telangiectasia, donde se ha comprobado que en condiciones de estrés oxidativo moderado producidas por H_2O_2 se incrementa la tasa de acortamiento del telómero en los fibroblastos de pacientes [120].

Otro parámetro que se ha caracterizado para evaluar el estrés oxidativo en las líneas celulares pLNCX y 24.2, han sido los niveles de MDA, un producto de peroxidación lipídica. Los resultados obtenidos indican que los niveles de MDA en fibroblastos 24.2 fueron menores que los obtenidos para los fibroblastos pLNCX (figura IV.15), indicando que la recuperación de la actividad telomerasa por la inserción del elemento 24.2 disminuye el estrés oxidativo. De hecho, en otros modelos celulares de enfermedades con defectos en la actividad telomerasa como en la anemia aplásica [186] se han visto niveles elevados de MDA o como en el caso de la anemia de Fanconi la formación de aductos MDA-ADN [187].

Por otro lado, el análisis de niveles de GSH libre en ambas líneas celulares indicaron niveles más elevados de GSH en los fibroblastos pLNCX (figura IV.16 y IV.17), donde no ha sido restablecida la actividad telomerasa. Este resultado podría sugerir que los fibroblastos pLNCX están sintetizando más GSH como mecanismo antioxidante frente

V. DISCUSIÓN

a las ERO, similar al mecanismo descrito en células provenientes de ratones modelo de ataxia-telangiectasia deficiente, en los que ciertos tejidos con niveles elevados de estrés oxidativo presentan mayores niveles de GSH como mecanismo compensatorio para poder combatir con la sobreproducción de ERO [188]. Este resultado de niveles de GSH intracelulares elevados en la línea pLNCX parece contradecir un posible perfil oxidativo en la línea celular pLNCX, puede tener una posible respuesta molecular. El grupo de Perona, describió como el elemento GSE24.2 inducía el aumento de expresión de los componentes *TR* y *hTERT* a través de la sobreexpresión de *c-MYC* [21,189]. La implicación de *c-Myc* en procesos de supervivencia y senescencia celular es todavía un motivo de discusión científica [190], y lo mismo ocurre en su implicación en la respuesta antioxidante donde su participación no está completamente clara por interactuar con diferentes factores que pueden modular su actividad, como es el factor NEMO que puede estabilizar a *c-Myc* permitiendo la sobre-regulación de γ -GCS (γ -glutamilcisteína sintasa) [191]. Sin embargo, también se ha descrito como *c-Myc* regula la transcripción del gen *GCL* (glutamato cisteína ligasa, enzima necesaria para la síntesis del glutatión) a través de una ruta de fosforilación mediada por *ERK* [192,193] y todavía más interesante es como *c-Myc* puede interactuar con Nrf2 (factor nuclear derivado eritroide 2, factor de transcripción que responde al estrés oxidativo mediante el incremento de la expresión de determinadas enzimas antioxidantes) evitando su interacción con genes de fase II a través de las secuencias que contienen el elemento EpR, disminuyendo el tiempo de vida media de Nrf2 y por lo tanto desregulando la activación de genes como son *GCLM* y *GCLC* implicados en la síntesis de glutatión [194]. Por lo tanto, estas últimas observaciones

explicarían nuestros resultados en los que vemos como los niveles de GSH celulares son mayores en la línea pLNCX que los observados en las líneas 24.2, puesto que en la línea 24.2 tendríamos sobreexpresado c-Myc, que a su vez podría disminuir la capacidad de Nrf2 por activar la expresión de genes como *GCLM* y *GCLC* (glutamato cisteína ligasa, unidad modificadora y unidad catalítica respectivamente, primer heterodímero protéico que participa en la vía de síntesis del glutatión) y en último término la expresión de los enzimas responsables de la síntesis de GSH.

Con el objetivo de elaborar un perfil de estrés oxidativo y de defensas antioxidantes en aquellas líneas celulares en las que se ha restablecido la actividad telomerasa mediante la inserción del elemento GSE24.2, se estudió la expresión y actividad de estas enzimas antioxidantes en ambas líneas, pLNCX y 24.2.

El estudio del nivel de expresión del gen *SOD1* que codifica para la enzima CuZnSOD indicó que la introducción del inserto GSE24.2 y por tanto el restablecimiento de la actividad telomerasa produjo un aumento en la expresión del gen *SOD1* (figura IV.18.A). El estudio de los niveles de CuZnSOD por Western blot (figura IV.18.B y figura IV.18.C) así como la actividad enzimática fueron consistentes con éste resultado (figura IV.18.D), mostrando que la línea 24.2 tenía una mayor actividad enzimática que la línea celular pLNCX.

El estudio en ambas líneas celulares de los niveles de expresión del gen *SOD2* (figura IV.19.A) así como los niveles de proteína MnSOD (figura IV.19.B y IV.19.c), no mostraron diferencias significativas. Sin embargo, el estudio de la actividad enzimática MnSOD

V. DISCUSIÓN

indicó que la reactivación de la actividad telomerasa por el inserto GSE24.2 aumentaba también esta actividad enzimática (figura IV.19.D).

Por lo tanto, los resultados sugieren que el inserto GSE24.2 y por lo tanto el restablecimiento de la actividad telomerasa contribuye a un aumento en las actividades enzimáticas CuZnSOD y MnSOD de modo que ello explicaría por qué en la línea celular 24.2, existen menores niveles de radical superóxido (figura IV.14).

El análisis de los niveles de catalasa mostró una mayor expresión para el gen *CAT* en la línea celular 24.2 (figura IV.20.A), y aunque los niveles de proteína no mostraron una diferencia significativa entre los niveles de catalasa en ambas líneas celulares (figura IV.20.B y IV.20.C), la actividad sí que resultó ser mucho mayor para la línea celular 24.2 comparada con la pLNCX (figura IV.20.D). Estos resultados están de acuerdo con los que se han mostrado en los fibroblastos de los pacientes de X-DC del anterior apartado y también con los publicados previamente por Pérez-Rivero et al. [20] en los que MEFs knock-out para el componente Terc de la telomerasa producía una disminución en la actividad catalasa, así como un aumento en los niveles de superóxido y H_2O_2 y también con los estudios de Westin y colaboradores, en los que la introducción de CuZnSOD y catalasa pegiladas (enzimas permeables a la membrana celular) disminuían los niveles de ERO en células de pacientes de DC [122].

Por lo tanto, estos estudios sugieren que las defensas antioxidantes están disminuidas en pacientes de X-DC. Estas defensas podrían estar disminuidas como consecuencia de una baja expresión génica como ocurre para CuZnSOD tanto en el caso de las líneas celulares X-DC (figura IV.3) y pLNCX (figura IV.18) o bien por inhibición de la actividad enzimática

como ocurre en el caso de MnSOD (figura IV.4 y figura IV.19) y catalasa (figura IV.5 y figura IV.20), para las líneas X-DC o pLNCX, respectivamente. La expresión de los componentes TR y hTERT, así como el restablecimiento de la actividad telomerasa con el elemento GSE24.2 en la línea transfectada pLNCX o bien la recuperación de la actividad telomerasa con la sobreexpresión de Terc en MEFs *Knock-out* para este componente del complejo telomerasa, descrito por Pérez-Rivero et al [20], indican que se pueden recuperar los niveles de enzimas antioxidantes mediante esta estrategia de recuperación de la actividad telomerasa. Este incremento de los niveles antioxidantes tras la introducción del elemento GSE24.2 debe ser independiente a Nrf2 y también de c-Myc, por los motivos apuntados anteriormente [194]. Además, c-Myc no debería estar implicado vía Nrf2/Keap1 en esta respuesta antioxidante, puesto que regula genes antioxidantes con dominios ARE y EpER (dominios de determinados genes citoprotectores que desencadenan la respuesta antioxidante y electrófila frente a daños por ERO) como son los genes de la hemoxygenasa-1, peroxiredoxina 1 y tioredoxinas [195,196] y no en enzimas antioxidantes como son la catalasa, las glutatión peroxidasas y las superóxido dismutasas. Esta relación tal y como la hemos abordado en el apartado anterior parece indicar una relación entre el déficit de actividad telomerasa y enzimas antioxidantes y apoyaría los planteamientos de Pérez-Rivero et al. [20]. Además, al igual que estos autores cuyos experimentos demostraron que al restablecer la actividad telomerasa mediante la transfección con un vector pBS-mTerc, aumentaban los niveles de catalasa, los resultados obtenidos en esta tesis indican que un aumento de la actividad telomerasa como conse-

V. DISCUSIÓN

cuencia de la inserción del elemento génico GSE24.2, produce también un aumento de la actividad catalasa, CuZnSOD y MnSOD en las líneas celulares transfectadas.

En consecuencia, los indicios de que un déficit en la actividad telomerasa contribuye a una bajada en las defensas antioxidantes que hemos observado en los estudios con las líneas celulares de pacientes con X-DC, se confirman con estos estudios realizados con las líneas transfectadas pLNCX y 24.2. Además, los resultados obtenidos con las líneas pLNCX y 24.2, sugieren que el elemento GSE24.2 es un candidato terapéutico que puede restablecer las defensas antioxidantes celulares a través de un mecanismo independiente de la ruta c-Myc/Nrf2.

La sobre-regulación de la actividad telomerasa puede evitar el acortamiento de telómeros y restablecer la proliferación celular en pacientes con DC. De este modo, se ha descrito como la elongación de telómeros juega un papel importante regulando las respuestas a agentes capaces de dañar el ADN o que generan estrés oxidativo, dando una ventaja a estas células para sobrevivir [197-199].

Con el objetivo de contrastar los resultados obtenidos para daño en el ADN en los fibroblastos provenientes de pacientes con DC, se analizaron los niveles de γ -H2AX en las líneas pLNCX y 24.2. Como ocurre cuando comparamos las líneas AD, BD y CD con sus respectivos controles, en el estudio anterior, la línea deficiente en el gen *DKC1* y por lo tanto en actividad telomerasa mostró niveles más elevados de γ -H2AX indicando un mayor daño en el ADN (figura IV.21). Sin embargo, la inserción del elemento GSE24.2, produjo la disminución de este marcador de daño sugiriendo por lo tanto, un menor daño en el ADN, como consecuencia de una mayor defensa antioxidante, o bien una

activación de los mecanismos de reparación. El déficit en actividad telomerasa puede producir un incremento de las roturas de doble cadena en *S. cerevisiae* [200] y también en el caso de telómeros disfuncionales en células de mamíferos [65].

Como hemos indicado en el anterior apartado, cuando H2AX se fosforila se produce la activación de RAD53 para ejercer el control del ciclo celular y así ayudar en la reparación del ADN, antes de que se pase a la siguiente fase del ciclo celular. Por lo tanto, RAD53 es una proteína esencial para el control de la integridad del genoma a través de la inducción de los puntos de control del ciclo celular cuando se daña al ADN en situaciones en las que existe disfunción telomérica [140]. Los resultados obtenidos para estas líneas celulares indican que la expresión de RAD53 disminuyó con el inserto GSE24.2 (figura IV.22). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en el apartado anterior, donde la expresión de RAD53 resultó ser menor en las líneas celulares control que en las líneas X-DC (figura IV.8). Este hecho sugiere un correcto control del ciclo celular tras la recuperación de la actividad telomerasa mediante el inserto 24.2, puesto que la sobreexpresión de RAD53 lleva a la parada de ciclo celular incluso en ausencia de daño al ADN [139].

En consecuencia, esta recuperación del control del ciclo celular y la capacidad proliferativa de las células 24.2 deben contribuir a que los fenómenos de reparación del ADN actúen de forma coordinada y en tiempos muchos más cortos a lo largo de todas las etapas del ciclo celular.

Como se ha descrito en el apartado correspondiente al estudio de la respuesta de reparación al ADN en las líneas celulares AD, BD y CD, RAD51 está implicado en el mecanismo

V. DISCUSIÓN

de recombinación homóloga de reparación de las roturas de doble cadena del ADN. En condiciones de inestabilidad telomérica la hiperactividad de RAD51 podría contribuir a la formación de estructuras teloméricas aberrantes [144,145], al igual que su disminución [143]. Los resultados indican que la expresión de RAD51 en la línea 24.2 fue menor que en la línea pLNCX, sugiriendo una disminución de la actividad de la ruta de recombinación homóloga debido probablemente a que los niveles de roturas de doble cadena en el ADN son menores que en la línea pLNCX. Por lo tanto, estos resultados deben interpretarse de otra forma a los obtenidos para las líneas de fibroblastos provenientes de pacientes de X-DC, donde los niveles de RAD51 resultaron ser menores que en los controles, indicando por lo tanto un silenciamiento de RAD51 en condiciones donde existe daño en el ADN evidenciado por un aumento en los niveles de γ -H2AX. Este hecho indica un déficit en el mecanismo de recombinación homóloga en pacientes de X-DC (figura IV.9). Sin embargo, en el caso del estudio de las líneas celulares pLNCX y 24.2 debe interpretarse que la activación de RAD51 debe estar disminuida en las líneas con actividad telomerasa restablecida puesto que el daño al ADN es mucho menor tal y como se observa en los niveles de γ -H2AX (figura IV.23). Este resultado es coherente si se toma en consideración que una hiperactivación de RAD51 a nivel telomérico podría llevar a la formación de aberraciones teloméricas [144,145], por lo tanto el control de RAD51 en cada una de las regiones cromosómicas es fundamental. A este hecho debe contribuir también la recuperación de la capacidad proliferativa de la línea celular 24.2, tal y como hemos visto en el estudio de incorporación de BrdU (figura IV.13) y en la disminución de los niveles de la proteína de control de ciclo RAD53 (figura IV.22).

Como se ha planteado en esta tesis el estrés oxidativo y la oxidación del telómero es uno de los principales causantes del acortamiento telomérico, de modo que una atenuación del estrés oxidativo mediante el uso de antioxidantes, enzimas antioxidantes o bajas presiones parciales de oxígeno disminuyen el acortamiento de los telómeros [152,153]. Por lo tanto, en condiciones de estrés oxidativo en las que se puede producir oxidación del ADN, cobra especial relevancia la glicosilasa hOGG1 encargada de la eliminación de la 8-oxodG y más aún porque la presencia de 8-oxodG en los telómeros inhibe la actividad telomerasa [201].

Nuestros resultados indican que la expresión de hOGG1 aumentó significativamente en la línea 24.2 en comparación con la línea celular pLNCX (figura IV.24), sugiriendo que la introducción del elemento GSE24.2 contribuye a la recuperación de esta actividad enzimática. Este resultado correlaciona bien con el descrito previamente por Hironaka et al. [202] donde encontraban que en hígado de ratones que sobreexpresaban C-Myc o TGF- β -C-Myc existía un aumento de enzimas del mecanismo de reparación por escisión de bases como hOGG1. De este modo la sobreexpresión de genes implicados en la reparación del ADN de productos oxidados, como es la glicosilasa hOGG1 debe estar relacionado con el hecho de la sobreexpresión de c-myc, y esto puede ser producido ya que c-Myc puede generar un estado oxidativo crónico consistente con los resultados obtenidos por el grupo de Thorgeirsson [203] o tal y como hemos descrito una desregulación de Nrf2 [195,196]. Además, se ha demostrado que la introducción del compuesto Wy-14,643 en la dieta de los animales (conocido por incrementar el nivel de especies reactivas de oxígeno en el hígado) [204], produjo en los ratones que sobreexpresan c-Myc,

V. DISCUSIÓN

un aumento en los genes implicados en las reparaciones de las lesiones oxidativas del ADN [205]. Por lo tanto, la introducción del inserto GSE24.2 que produce un aumento de la expresión de c-Myc debe inducir la sobreexpresión de hOGG1, que a su vez contribuirá a la disminución de los niveles de 8-oxodG.

Continuando con los estudios de los genes de reparación, nuestros resultados indican que el gen *PARP1* muestra una tendencia a la sobre-expresión en la línea 24.2 comparada con la línea pLNCX (figura IV.25). Estos últimos años, algunos resultados han demostrado que la sobre-regulación de c-Myc promueve la vía de reparación del ADN mediada por PARP1 [206]. Como hemos desarrollado anteriormente, la introducción del elemento GSE24.2 induce un aumento de c-Myc [21]. Los resultados de Pyndiah et al. plantean que la sobre-expresión de c-Myc suprime la activación transcripcional del gen que codifica para la proteína adaptadora BIN1 (bridging integrator 1), una proteína que inactiva PARP1 [207]. Este hecho explicaría porque se produce una tendencia a la elevación de la expresión de *PARP1* en las líneas 24.2. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la introducción del elemento GSE24.2 debería contribuir a la activación de los mecanismos de reparación del ADN o al menos los sensores de daño al ADN implicados en el mecanismo de reparación por BER y por el NHEJ.

En X-DC se ha observado un aumento de los niveles de PARP1 en las líneas de fibroblastos AD, CD con respecto a sus controles y una tendencia en el caso de los fibroblastos BD (figura IV.11). Sin embargo, en las líneas 24.2 y pLNCX aunque se observó una tendencia al aumento de PARP1 en las primeras, este no resultó ser significativo (figura IV.25). Por otra parte, hemos descrito como en las líneas X-DC la expresión de *hOGG1* estaba

disminuida con respecto a los controles (figura IV.10). En este sentido, hemos observado como la recuperación de la actividad telomerasa mediante el inserto GSE24.2 producía un aumento de la expresión de *hOGG1* (figura IV.24), mecanismo que probablemente está mediado por c-Myc.

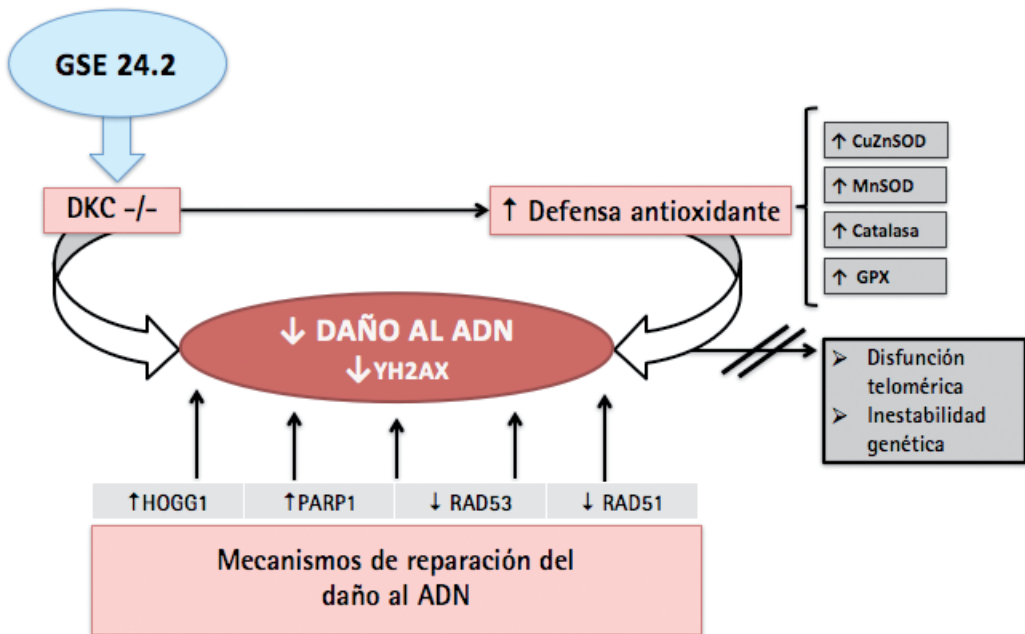
En esta discusión se ha planteado la interacción de OGG1/PARP como mecanismo relevante en el reclutamiento de proteínas de reparación en el sitio de daño al ADN [156,161]. En el caso de las células 24.2, la introducción del elemento GSE24.2 produce el aumento de c-Myc y en consecuencia la sobreexpresión de *hOGG1*. Sin embargo, PARP1 no aumentó de forma considerable en la línea celular 24.2, por lo que no se debería inhibir completamente la actividad glicosilasa de OGG1, permitiendo tal y como proponen David *et al.* la reparación del daño en el ADN [71,158,162], y más concretamente las lesiones de ADN producidas por daño oxidativo [203].

Como hemos descrito anteriormente, los datos obtenidos por Noren y colaboradores [157], sugieren que en condiciones de bajos niveles o baja actividad de OGG1, la actividad de PARP1 está desregulada produciendo niveles bajos de poli(ADP-ribosil)ación en proteínas nucleares. Este hecho debe producir un reclutamiento erróneo de otras proteínas de reparación implicadas en BER y que por lo tanto llevarían a una acumulación de daño en el ADN. De hecho, se ha descrito que distintos polimorfismos que producen baja actividad de OGG1 disminuyen la actividad de PARP1 en las etapas iniciales de la ruta de reparación BER [163-167]. Los resultados obtenidos en esta tesis muestran como hay bajos niveles de *hOGG1* tanto en las líneas celulares X-DC como en la línea transfectada pLNCX, así como la desregulación que se produciría en la actividad PARP1, claramente

V. DISCUSIÓN

apuntan a una desregulación en el mecanismo de reparación del ADN por BER en las células de pacientes de X-DC. Además plantea la posibilidad de que en condiciones fisiopatológicas en las que la actividad telomerasa está disminuida exista una disminución en los niveles de la glicosilasa OGG1, así como una desregulación en los mecanismos de reparación del ADN.

Por lo tanto el aumento de la actividad telomerasa, junto con la sobreexpresión de enzimas antioxidantes y enzimas implicados en la reparación del ADN, mediada por la introducción del elemento GSE24.2, debe prevenir el daño al ADN y por lo tanto disminuir la inestabilidad genética asociada a X-DC, disminuyendo las fusiones teloméricas y por lo tanto previniendo los cánceres asociados a esta enfermedad rara (esquema V.II)



Esquema V.II: Rutas de señalización celular mediadas por el inserto GSE24.2 que inducen la recuperación de la disfunción telomérica y disminuyen la inestabilidad genética estudiados en esta tesis.

- ALTERACIONES EPIGENÉTICAS EN LA DC LIGADA AL CROMOSOMA X

Los telómeros y la estructura adoptada por éstos protegen los extremos de los cromosomas de la degradación y también de los mecanismos de reparación del ADN que pueden reconocer estas estructuras como roturas en el ADN [208]. Como hemos descrito, la incapacidad de las ADN polimerasas para replicar completamente los extremos de los cromosomas lineales, acortan la longitud de éstos con cada división celular, hecho que puede llevar a fusiones cromosómicas e inestabilidad genética [209].

Estos últimos años, se ha mostrado como los cromosomas teloméricos en mamíferos contienen características de heterocromatina incluyendo marcas en histonas correspondientes a heterocromatina como tri-metilación de la lisina 9 en la histona H3 y la lisina 20 en la histona H4 [210], así como la presencia de la proteína HP1 (proteína heterocromatina 1) [211,212] y la metilación de CpGs (pares de citosina y de guanina enlazados por fosfatos) en regiones de ADN subteloméricas [213].

Mucho se ha aprendido estos últimos años sobre como la cromatina telomérica afecta a la estructura de los telómeros, la regulación de su longitud y función estudiando distintos modelos murinos [214]. Y existen evidencias por las que alteraciones en la cromatina de los telómeros en células humanas con el envejecimiento tiene consecuencias biológicas que pueden llevar a la desregulación de la cromatina en todo el cromosoma [215].

V. DISCUSIÓN

Existen evidencias de cómo la estabilidad del telómero contribuye a la estabilidad completa del cromosoma [216]. La relación entre los telómeros, la senescencia celular y el envejecimiento está bien aceptado por la comunidad científica, sin embargo todavía no está claro como una señal producida como consecuencia del acortamiento telomérico es trasladada al núcleo (implicando multitud de respuesta entre ellas las de control del ciclo celular, apoptosis y reparación del ADN) y todo ello impacta en la célula a escala global. En este sentido, un trabajo muy relevante del grupo de Karlseder apunta a que esta señalización de acortamiento telomérico representa una generación de daño al ADN crónico que a su vez lleva a la desestabilización de la cromatina de los cromosomas como consecuencia de alteraciones en las marcas epigenéticas y también como consecuencia de la desestabilización de las rutas de biosíntesis de histonas [217].

Las modificaciones postraduccionales en histonas modulan la conformación de la cromatina, permitiendo la apertura (eucromatina) o compactación (heterocromatina) de ésta [218].

Los resultados obtenidos en las células pLNCX muestran unos niveles elevados de acetilación de las histonas H3, H4 y H2B en los residuos lisina 9, 8 y 5 de las anteriores histonas respectivamente (figura IV.26) y bajos niveles en la metilación de la lisina 9 de H3 (figura IV.27), lo cual apunta a una cromatina poco compacta en las células con déficit en actividad telomerasa. Estos resultados sugieren que la cromatina estaría mucho más abierta en las células pLNCX y en consecuencia el ADN podría ser mucho más susceptible al ataque por ERO [219]. De hecho, algunas de estas marcas como la hiperacetilación de la lisina 9 de la histona H3 han sido implicadas en la respuesta al daño en el ADN [220].

Además, las aberraciones cromatínicas y la descompactación del ADN mediada por la hiperacetilación de histonas facilita la producción de roturas de doble cadena en el ADN y en consecuencia fusiones cromosómicas, que explicarían la inestabilidad genética observada en las células provenientes de pacientes X-DC [221].

Asimismo, hemos investigado también la carbonilación de las histonas puesto que nuestro grupo ha descrito recientemente la importancia de la eliminación de estas histonas como mecanismo imprescindible durante la proliferación celular [135]. Los resultados en las líneas celulares de estudio indican niveles elevados de carbonilación de la histona H1 en las células pLNCX (figura IV.28). Ello sugiere que las células sufren un mayor estrés oxidativo o que las histonas no pueden ser detoxificadas correctamente dentro del núcleo. El aumento de la carbonilación de H1 puede afectar la compactación de la cromatina y por lo tanto la integridad del genoma, coincidiendo con lo descrito por Luxford et al. [222]. Concretamente, en la línea celular pLNCX los niveles elevados de H1 carbonilada podrían deberse a un aumento del estrés oxidativo y también a una disminución de la capacidad de eliminación de estas histonas mediante el proteasoma nuclear. Como hemos visto en los resultados anteriores, existe una desregulación de PARP1 en las células pLNCX (figura IV.11, IV.25) y ello puede producir la inactivación del proteasoma nuclear dificultando el reciclaje de las histonas carboniladas [174,223]. Por lo tanto, la introducción del inserto GSE24.2, que disminuye los niveles de estrés oxidativo, aumenta las defensas antioxidantes e incrementa la expresión de *PARP1*. Esto debe contribuir a una disminución de la oxidación también a nivel nuclear y por supuesto a la

V. DISCUSIÓN

eliminación de H1 carbonilada, hecho que explicaría la disminución de los niveles de H1 carbonilada en la línea celular 24.2.

La alteración de la cromatina es un fenómeno característico de las células senescentes que ocurre durante el envejecimiento [92]. En síndromes progeroides como el de Hutchinson-Gilford, se producen cambios globales en las modificaciones post-traduccionales de las histonas, como la disminución de marcas de heterocromatina (H3K27me3 y H3K9me3) dando lugar a una alteración en la estructura de la cromatina está acelerada [87].

En otra progeria como en el Síndrome de Werner, se ha descrito un acortamiento telomérico acelerado debido a una disminución en los niveles de hTERT [87]. En células de pacientes de Werner también se ha observado que la elevada inestabilidad génica debida a la aparición de aberraciones cromatínicas y como la inducción de la expresión de la actividad telomerasa induce la disminución del número de metafases encontradas en algunos cromosomas aberrantes [94]

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

La principal limitación de este estudio es que las células que se han utilizado pertenecen a pacientes con disqueratosis congénita (enfermedad rara), habiendo por tanto un número limitado de muestras para su estudio. Otra dificultad añadida es la complejidad del crecimiento de estas células *in vitro*, ya que su crecimiento es lento y llegan a senescencia muy rápidamente.

CONCLUSIONES

- I. Los pacientes con X-DC presentan una disminución de la defensa antioxidante y por lo tanto mayor de la defensa antioxidante y por lo tanto mayor susceptibilidad de éstos al estrés oxidativo. Esta disminución de la defensa antioxidante junto con la menor actividad telomerasa contribuye a la aceleración del acortamiento telomérico.
- II. En células de pacientes X-DC existe un mayor daño al ADN que debe de ser consecuencia de una menor defensa antioxidante y de la pérdida de control de los mecanismos de reparación del ADN. debido a la pérdida de control y capacidad de reparación. Esto junto con la disminución de la protección antioxidante favorece la evolución de procesos neoplásicos y aplasia medular asociados a esta enfermedad.
- III. La recuperación de la actividad telomerasa mediante el inserto GSE24.2 rescata la defensa antioxidante celular y la capacidad de reparación del daño producido al ADN en estas células. El inserto previene así el daño al ADN hecho que debe disminuir la inestabilidad genética asociada a X-DC, las fusiones teloméricas y la patogenia asociada a la X-DC.
- IV. Las células en las que no se ha recuperado la actividad telomerasa (pLNCX) presentan una alteración en la regulación epigenética respecto a las células con la actividad recuperada (24.2). Estos cambios sugieren que la cromatina de los pacientes adquiere una conformación similar a la de las células senescentes y se encuentra desregulada, hecho que debe afectar al control génico y también contribuir a la sensibilidad al daño inducido por estrés oxidativo.

- V. El incremento de la carbonilación de la histona H1 indica un defecto en la detoxificación nuclear de las histonas o un aumento en el estrés oxidativo nuclear lo cual contribuiría a una menor compactación de la cromatina y al aumento de la inestabilidad genómica.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Goldman F, et al. The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Nature* 2001;413:432-435
- [2] Du HY, Pumbo E, Ivanovich J, et al. TERC and TERT gene mutations in patients with bone marrow failure and the significance of telomere length measurements. *Blood* 2009;113:309-316
- [3] Dokal I. Dyskeratosis congenita. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011;2011:480-486
- [4] Mitchell JR, Wood E, Collins K. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* 1999;402:551-555
- [5] Savage SA, Dokal I, Armanios M, et al. Dyskeratosis congenita: the first NIH clinical research workshop. *Pediatr Blood Cancer* 2009;53:520-523
- [6] Heiss NS, Knight SW, Vulliamy TJ, et al. X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. *Nat Genet* 1998;19:32-38
- [7] Dokal I. Dyskeratosis congenita in all its forms. *Br J Haematol* 2000;110:768-779
- [8] Houben JM, Moonen HJ, van Schooten FJ, Hageman GJ. Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress? *Free Radic Biol Med* 2008;44:235-246
- [9] Olovnikov AM. Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory. *Exp Gerontol* 1996;31:443-448
- [10] Aubert G, Lansdorp PM. Telomeres and aging. *Physiol Rev* 2008;88:557-579

- [11] Ahmed S, Passos JF, Birket MJ, et al. Telomerase does not counteract telomere shortening but protects mitochondrial function under oxidative stress. *J Cell Sci* 2008;121:1046-1053
- [12] Gilson E, Geli V. How telomeres are replicated. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:825-838
- [13] Oganessian L, Bryan TM. Physiological relevance of telomeric G-quadruplex formation: a potential drug target. *Bioessays* 2007;29:155-165
- [14] Kawanishi S, Oikawa S. Mechanism of telomere shortening by oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1019:278-284
- [15] Sitte N, Saretzki G, von Zglinicki T. Accelerated telomere shortening in fibroblasts after extended periods of confluency. *Free Radic Biol Med* 1998;24:885-893
- [16] Oikawa S, Kawanishi S. Site-specific DNA damage at GGG sequence by oxidative stress may accelerate telomere shortening. *FEBS Lett* 1999;453:365-368
- [17] Oikawa S, Tada-Oikawa S, Kawanishi S. Site-specific DNA damage at the GGG sequence by UVA involves acceleration of telomere shortening. *Biochemistry* 2001;40:4763-4768
- [18] von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci* 2002;27:339-344
- [19] Borrás C, Esteve JM, Vina JR, et al. Glutathione regulates telomerase activity in 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 2004;279:34332-34335
-

BIBLIOGRAFÍA

- [20] Perez-Rivero G, Ruiz-Torres MP, Diez-Marques ML, et al. Telomerase deficiency promotes oxidative stress by reducing catalase activity. *Free Radic Biol Med* 2008;45:1243-1251
- [21] Machado-Pinilla R, Sanchez-Perez I, Murguia JR, Sastre L, Perona R. A dyskerin motif reactivates telomerase activity in X-linked dyskeratosis congenita and in telomerase-deficient human cells. *Blood* 2008;111:2606-2614
- [22] Yaar M, Eller MS, Gilchrist BA. Fifty years of skin aging. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2002;7:51-58
- [23] von Zglinicki T, Saretzki G, Docke W, Lotze C. Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp Cell Res* 1995;220:186-193
- [24] Vina J, Saez GT, Wiggins D, et al. The effect of cysteine oxidation on isolated hepatocytes. *Biochem J* 1983;212:39-44
- [25] Boveris A, Oshino N, Chance B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 1972;128:617-630
- [26] Fridovich I. Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 1986;247:1-11
- [27] Fridovich I. Superoxide dismutases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1986;58:61-97
- [28] Korycka-Dahl M, Richardson T. Initiation of oxidative changes in foods. *J Dairy Sci* 1980;63:1181-1198

- [29] Liochev SI, Fridovich I. The role of O₂⁻ in the production of HO₂: in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 1994;16:29-33
- [30] Fenton HJH. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J Chem Soc Trans* 1894;65:899-911
- [31] Haber F, Weiss J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc Roy Soc* 1932;147:332-351
- [32] Ayouaz A, Raynaud C, Heride C, Revaud D, Sabatier L. Telomeres: hallmarks of radiosensitivity. *Biochimie* 2008;90:60-72
- [33] Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 2005;120:483-495
- [34] Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982;47:412-426
- [35] Schardinger F. Über das verhalten der kulmilch gegen methylenblau und seine verwendung zur unterscheidung von ungekochter und gekochter milch. *Z Untersuchung Nahrungs Genussmittel* 1902;5 1113-1121
- [36] Ibrahim B, Stoward PJ. The histochemical localization of xanthine oxidase. *Histochem J* 1978;10:615-617
- [37] Derbre F, Ferrando B, Gomez-Cabrera MC, et al. Inhibition of Xanthine Oxidase by Allopurinol Prevents Skeletal Muscle Atrophy: Role of p38 MAPKinase and E3 Ubiquitin Ligases. *PLoS One* 2012;7:e46668
- [38] Moorhouse PC, Grootveld M, Halliwell B, Quinlan JG, Gutteridge JM. Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers. *FEBS Lett* 1987;213:23-28
-

BIBLIOGRAFÍA

- [39] Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979;59:527-605
- [40] Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:1865-1879
- [41] Henle ES, Han Z, Tang N, et al. Sequence-specific DNA cleavage by Fe²⁺-mediated fenton reactions has possible biological implications. *J Biol Chem* 1999;274:962-971
- [42] Requena JR, Fu MX, Ahmed MU, et al. Lipoxidation products as biomarkers of oxidative damage to proteins during lipid peroxidation reactions. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11 Suppl 5:48-53
- [43] Vilar-Rojas C, Guzman-Grenfell AM, Hicks JJ. Participation of oxygen-free radicals in the oxido-reduction of proteins. *Arch Med Res* 1996;27:1-6
- [44] Kasai H, Tanooka H, Nishimura S. Formation of 8-hydroxyguanine residues in DNA by X-irradiation. *Gann* 1984;75:1037-1039
- [45] Di Leonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev* 1994;8:2540-2551
- [46] Hoeijmakers JH. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med* 2009;361:1475-1485
- [47] McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969;244:6049-6055

- [48] McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem* 1969;244:6056-6063
- [49] McCord JM. Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science* 1974;185:529-531
- [50] Fridovich I. Superoxide radicals, superoxide dismutases and the aerobic lifestyle. *Photochem Photobiol* 1978;28:733-741
- [51] Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science* 1978;201:875-880
- [52] Fridovich I. Superoxide dismutases: defence against endogenous superoxide radical. *Ciba Found Symp* 1978:77-93
- [53] Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 2002;33:337-349
- [54] Muller FL, Lustgarten MS, Jang Y, Richardson A, Van Remmen H. Trends in oxidative aging theories. *Free Radic Biol Med* 2007;43:477-503
- [55] Tolbert NE, Essner E. Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes. *J Cell Biol* 1981;91:271s-283s
- [56] Halvey PJ, Hansen JM, Johnson JM, et al. Selective oxidative stress in cell nuclei by nuclear-targeted D-amino acid oxidase. *Antioxid Redox Signal* 2007;9:807-816

BIBLIOGRAFÍA

- [57] Vina J, Gimeno A, Sastre J, et al. Mechanism of free radical production in exhaustive exercise in humans and rats; role of xanthine oxidase and protection by allopurinol. *IUBMB Life* 2000;49:539-544
- [58] Fujii N, Hayashi T, Hirshman MF, et al. Exercise induces isoform-specific increase in 5'AMP-activated protein kinase activity in human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;273:1150-1155
- [59] Goodarzi AA, Block WD, Lees-Miller SP. The role of ATM and ATR in DNA damage-induced cell cycle control. *Prog Cell Cycle Res* 2003;5:393-411
- [60] Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 2003;3:155-168
- [61] Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 2001;276:42462-42467
- [62] Ward IM, Chen J. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem* 2001;276:47759-47762
- [63] d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 2003;426:194-198
- [64] Herbig U, Jobling WA, Chen BP, Chen DJ, Sedivy JM. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell* 2004;14:501-513
- [65] Takai H, Smogorzewska A, de Lange T. DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol* 2003;13:1549-1556

- [66] Downey M, Durocher D. gammaH2AX as a checkpoint maintenance signal. *Cell Cycle* 2006;5:1376-1381
- [67] Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 2009;461:1071-1078
- [68] Paques F, Haber JE. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999;63:349-404
- [69] Chen Z, Yang H, Pavletich NP. Mechanism of homologous recombination from the RecA-ssDNA/dsDNA structures. *Nature* 2008;453:489-484
- [70] Boiteux S, Radicella JP. The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys* 2000;377:1-8
- [71] Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, de Murcia G. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:517-528
- [72] Szabo C, Pacher P, Swanson RA. Novel modulators of poly(ADP-ribose) polymerase. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27:626-630
- [73] Meyer-Ficca ML, Meyer RG, Jacobson EL, Jacobson MK. Poly(ADP-ribose) polymerases: managing genome stability. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:920-926
- [74] Szabo C. Poly(ADP-ribose) polymerase activation by reactive nitrogen species-relevance for the pathogenesis of inflammation. *Nitric Oxide* 2006;14:169-179
- [75] Hellsten Y, Frandsen U. Adenosine formation in contracting primary rat skeletal muscle cells and endothelial cells in culture. *J Physiol* 1997;504 (Pt 3):695-704
-

BIBLIOGRAFÍA

- [76] Hellsten Y, Frandsen U, Orthenblad N, Sjodin B, Richter EA. Xanthine oxidase in human skeletal muscle following eccentric exercise: a role in inflammation. *J Physiol* 1997;498 (Pt 1):239-248
- [77] Johnson CA, Goddard JP, Adams RL. The effect of histone H1 and DNA methylation on transcription. *Biochem J* 1995;305 (Pt 3):791-798
- [78] Shen CC, Wertelecki W, Driggers WJ, LeDoux SP, Wilson GL. Repair of mitochondrial DNA damage induced by bleomycin in human cells. *Mutat Res* 1995;337:19-23
- [79] Suter B, Livingstone-Zatchej M, Thoma F. Mapping cyclobutane-pyrimidine dimers in DNA and using DNA-repair by photolyase for chromatin analysis in yeast. *Methods Enzymol* 1999;304:447-461
- [80] Giulivi C, Cadenas E. The role of mitochondrial glutathione in DNA base oxidation. *Biochim Biophys Acta* 1998;1366:265-274
- [81] Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:10771-10778
- [82] Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T, Tanaka M. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet* 1989;1:642-645
- [83] Sohal RS, Allen RG, Nations C. Oxygen free radicals play a role in cellular differentiation: an hypothesis. *J Free Radic Biol Med* 1986;2:175-181

- [84] Allen RG, Balin AK. Oxidative influence on development and differentiation: an overview of a free radical theory of development. *Free Radic Biol Med* 1989;6:631-661
- [85] Sadikovic B, Andrews J, Carter D, Robinson J, Rodenhiser DI. Genome-wide H3K9 histone acetylation profiles are altered in benzopyrene-treated MCF7 breast cancer cells. *J Biol Chem* 2008;283:4051-4060
- [86] Romero DL, Mounho BJ, Lauer FT, Born JL, Burchiel SW. Depletion of glutathione by benzo(a)pyrene metabolites, ionomycin, thapsigargin, and phorbol myristate in human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997;144:62-69
- [87] Shumaker DK, Dechat T, Kohlmaier A, et al. Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:8703-8708
- [88] Lim SO, Gu JM, Kim MS, et al. Epigenetic changes induced by reactive oxygen species in hepatocellular carcinoma: methylation of the E-cadherin promoter. *Gastroenterology* 2008;135:2128-2140, 2140 e2121-2128
- [89] Chia N, Wang L, Lu X, et al. Hypothesis: environmental regulation of 5-hydroxymethylcytosine by oxidative stress. *Epigenetics* 2011;6:853-856
- [90] Strakovsky RS, Pan YX. In utero oxidative stress epigenetically programs antioxidant defense capacity and adulthood diseases. *Antioxid Redox Signal* 2011;17:237-253
-

BIBLIOGRAFÍA

- [91] Rajendran R, Garva R, Krstic-Demonacos M, Demonacos C. Sirtuins: molecular traffic lights in the crossroad of oxidative stress, chromatin remodeling, and transcription. *J Biomed Biotechnol*;2011:368276
- [92] Oberdoerffer P, Sinclair DA. The role of nuclear architecture in genomic instability and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:692-702
- [93] Oberdoerffer P, Michan S, McVay M, et al. SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. *Cell* 2008;135:907-918
- [94] Crabbe L, Jauch A, Naeger CM, Holtgreve-Grez H, Karlseder J. Telomere dysfunction as a cause of genomic instability in Werner syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:2205-2210
- [95] Shechter D, Dormann HL, Allis CD, Hake SB. Extraction, purification and analysis of histones. *Nat Protoc* 2007;2:1445-1457
- [96] Amstad P, Peskin A, Shah G, et al. The balance between Cu,Zn-superoxide dismutase and catalase affects the sensitivity of mouse epidermal cells to oxidative stress. *Biochemistry* 1991;30:9305-9313
- [97] Xu Y, Krishnan A, Wan XS, et al. Mutations in the promoter reveal a cause for the reduced expression of the human manganese superoxide dismutase gene in cancer cells. *Oncogene* 1999;18:93-102
- [98] Zhang HJ, Yan T, Oberley TD, Oberley LW. Comparison of effects of two polymorphic variants of manganese superoxide dismutase on human breast MCF-7 cancer cell phenotype. *Cancer Res* 1999;59:6276-6283

- [99] Li B, Carey M, Workman JL. The role of chromatin during transcription. *Cell* 2007;128:707-719
- [100] Elledge SJ. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 1996;274:1664-1672
- [101] Tominaga K, Morisaki H, Kaneko Y, et al. Role of human Cds1 (Chk2) kinase in DNA damage checkpoint and its regulation by p53. *J Biol Chem* 1999;274:31463-31467
- [102] Krejci L, Altmannova V, Spirek M, Zhao X. Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Res* 2012;40:5795-5818
- [103] Sage JM, Gildemeister OS, Knight KL. Discovery of a novel function for human Rad51: maintenance of the mitochondrial genome. *J Biol Chem* 2010;285:18984-18990
- [104] Barnes DE, Lindahl T. Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Annu Rev Genet* 2004;38:445-476
- [105] Fortini P, Pascucci B, Parlanti E, et al. 8-Oxoguanine DNA damage: at the cross-road of alternative repair pathways. *Mutat Res* 2003;531:127-139
- [106] Rouleau M, Patel A, Hendzel MJ, Kaufmann SH, Poirier GG. PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nat Rev Cancer* 2010;10:293-301
- [107] Schreiber V, Ame JC, Dolle P, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *J Biol Chem* 2002;277:23028-23036
-

BIBLIOGRAFÍA

- [108] Csiszar K. Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2001;70:1-32
- [109] Siddikuzzaman, Grace VM, Guruvayoorappan C. Lysyl oxidase: a potential target for cancer therapy. *Inflammopharmacology* 2011;19:117-129
- [110] Contente S, Yeh TJ, Friedman RM. Tumor suppressive effect of lysyl oxidase proenzyme. *Biochim Biophys Acta* 2009;1793:1272-1278
- [111] So K, Tamura G, Honda T, et al. Multiple tumor suppressor genes are increasingly methylated with age in non-neoplastic gastric epithelia. *Cancer Sci* 2006;97:1155-1158
- [112] Wong SH, Knight JA, Hopfer SM, et al. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin Chem* 1987;33:214-220
- [113] Wondrak GT, Cervantes-Laurean D, Jacobson EL, Jacobson MK. Histone carbonylation in vivo and in vitro. *Biochem J* 2000;351 Pt 3:769-777
- [114] Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* 2005;6:611-622
- [115] Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, et al. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 1997;277:955-959
- [116] Broccoli D, Young JW, de Lange T. Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:9082-9086
- [117] Counter CM, Gupta J, Harley CB, Leber B, Bacchetti S. Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood* 1995;85:2315-2320

- [118] Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998;279:349-352
- [119] Jiang XR, Jimenez G, Chang E, et al. Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. *Nat Genet* 1999;21:111-114
- [120] Tchirkov A, Lansdorp PM. Role of oxidative stress in telomere shortening in cultured fibroblasts from normal individuals and patients with ataxia-telangiectasia. *Hum Mol Genet* 2003;12:227-232
- [121] Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000;408:239-247
- [122] Westin ER, Aykin-Burns N, Buckingham EM, et al. The p53/p21(WAF/CIP) pathway mediates oxidative stress and senescence in dyskeratosis congenita cells with telomerase insufficiency. *Antioxid Redox Signal* 2011;14:985-997
- [123] Johnson TM, Yu ZX, Ferrans VJ, Lowenstein RA, Finkel T. Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:11848-11852
- [124] Bollmann FM. The many faces of telomerase: emerging extratelomeric effects. *Bioessays* 2008;30:728-732
- [125] Haendeler J, Drose S, Buchner N, et al. Mitochondrial telomerase reverse transcriptase binds to and protects mitochondrial DNA and function from damage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:929-935
-

BIBLIOGRAFÍA

- [126] Martin-Ruiz C, Saretzki G, Petrie J, et al. Stochastic variation in telomere shortening rate causes heterogeneity of human fibroblast replicative life span. *J Biol Chem* 2004;279:17826-17833
- [127] Karlseder J, Broccoli D, Dai Y, Hardy S, de Lange T. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* 1999;283:1321-1325
- [128] Eyfjord JE, Bodvarsdottir SK. Genomic instability and cancer: networks involved in response to DNA damage. *Mutat Res* 2005;592:18-28
- [129] Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, et al. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 1999;97:503-514
- [130] Ide H, Kotera M. Human DNA glycosylases involved in the repair of oxidatively damaged DNA. *Biol Pharm Bull* 2004;27:480-485
- [131] Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 2004;73:39-85
- [132] Jacobs JJ, de Lange T. Significant role for p16INK4a in p53-independent telomere-directed senescence. *Curr Biol* 2004;14:2302-2308
- [133] Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, et al. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* 2000;10:886-895
- [134] Gu BW, Bessler M, Mason PJ. A pathogenic dyskerin mutation impairs proliferation and activates a DNA damage response independent of telomere length in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:10173-10178

- [135] Garcia-Gimenez JL, Ledesma AM, Esmoris I, et al. Histone carbonylation occurs in proliferating cells. *Free Radic Biol Med* 2012
- [136] Kirwan M, Beswick R, Walne AJ, et al. Dyskeratosis congenita and the DNA damage response. *Br J Haematol* 2011;153:634-643
- [137] Nelson ND, Bertuch AA. Dyskeratosis congenita as a disorder of telomere maintenance. *Mutat Res* 2012;730:43-51
- [138] Sanchez Y, Desany BA, Jones WJ, et al. Regulation of RAD53 by the ATM-like kinases MEC1 and TEL1 in yeast cell cycle checkpoint pathways. *Science* 1996;271:357-360
- [139] Sun Z, Fay DS, Marini F, Foiani M, Stern DF. Spk1/Rad53 is regulated by Mec1-dependent protein phosphorylation in DNA replication and damage checkpoint pathways. *Genes Dev* 1996;10:395-406
- [140] Nalapareddy K, Choudhury AR, Gompf A, et al. CHK2-independent induction of telomere dysfunction checkpoints in stem and progenitor cells. *EMBO Rep* 2010;11:619-625
- [141] Ju Z, Zhang J, Gao Y, Cheng T. Telomere dysfunction and cell cycle checkpoints in hematopoietic stem cell aging. *Int J Hematol* 2011;94:33-43
- [142] Liu J, Cao L, Chen J, et al. Bmi1 regulates mitochondrial function and the DNA damage response pathway. *Nature* 2009;459:387-392
- [143] Verdun RE, Karlseder J. The DNA damage machinery and homologous recombination pathway act consecutively to protect human telomeres. *Cell* 2006;127:709-720
-

BIBLIOGRAFÍA

- [144] Wang RC, Smogorzewska A, de Lange T. Homologous recombination generates T-loop-sized deletions at human telomeres. *Cell* 2004;119:355-368
- [145] Gauthier LR, Granotier C, Hoffschir F, et al. Rad51 and DNA-PKcs are involved in the generation of specific telomere aberrations induced by the quadruplex ligand 360A that impair mitotic cell progression and lead to cell death. *Cell Mol Life Sci* 2012;69:629-640
- [146] Sung JS, Demple B. Roles of base excision repair subpathways in correcting oxidized abasic sites in DNA. *FEBS J* 2006;273:1620-1629
- [147] Lu J, Liu Y. Deletion of Ogg1 DNA glycosylase results in telomere base damage and length alteration in yeast. *EMBO J* 2009;29:398-409
- [148] Wang Z, Rhee DB, Lu J, et al. Characterization of oxidative guanine damage and repair in mammalian telomeres. *PLoS Genet* 2010;6:e1000951
- [149] Rhee DB, Ghosh A, Lu J, Bohr VA, Liu Y. Factors that influence telomeric oxidative base damage and repair by DNA glycosylase OGG1. *DNA Repair (Amst)* 2011;10:34-44
- [150] Klungland A, Bjelland S. Oxidative damage to purines in DNA: role of mammalian Ogg1. *DNA Repair (Amst)* 2007;6:481-488
- [151] Youn CK, Song PI, Kim MH, et al. Human 8-oxoguanine DNA glycosylase suppresses the oxidative stress induced apoptosis through a p53-mediated signaling pathway in human fibroblasts. *Mol Cancer Res* 2007;5:1083-1098
- [152] Richter T, von Zglinicki T. A continuous correlation between oxidative stress and telomere shortening in fibroblasts. *Exp Gerontol* 2007;42:1039-1042
-

- [153] Serra V, von Zglinicki T, Lorenz M, Saretzki G. Extracellular superoxide dismutase is a major antioxidant in human fibroblasts and slows telomere shortening. *J Biol Chem* 2003;278:6824-6830
- [154] Hill JW, Hazra TK, Izumi T, Mitra S. Stimulation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by AP-endonuclease: potential coordination of the initial steps in base excision repair. *Nucleic Acids Res* 2001;29:430-438
- [155] D'Errico M, Parlanti E, Teson M, et al. New functions of XPC in the protection of human skin cells from oxidative damage. *EMBO J* 2006;25:4305-4315
- [156] Marsin S, Vidal AE, Sossou M, et al. Role of XRCC1 in the coordination and stimulation of oxidative DNA damage repair initiated by the DNA glycosylase hOGG1. *J Biol Chem* 2003;278:44068-44074
- [157] Noren Hooten N, Kompaniez K, Barnes J, Lohani A, Evans MK. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) binds to 8-oxoguanine-DNA glycosylase (OGG1). *J Biol Chem* 2011;286:44679-44690
- [158] Burkle A. DNA repair and PARP in aging. *Free Radic Res* 2006;40:1295-1302
- [159] Isabelle M, Moreel X, Gagne JP, et al. Investigation of PARP-1, PARP-2, and PARG interactomes by affinity-purification mass spectrometry. *Proteome Sci* 2010;8:22
- [160] Godon C, Cordelieres FP, Biard D, et al. PARP inhibition versus PARP-1 silencing: different outcomes in terms of single-strand break repair and radiation susceptibility. *Nucleic Acids Res* 2008;36:4454-4464
-

BIBLIOGRAFÍA

- [161] Masson M, Niedergang C, Schreiber V, et al. XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol Cell Biol* 1998;18:3563-3571
- [162] David SS, O'Shea VL, Kundu S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* 2007;447:941-950
- [163] Hill JW, Evans MK. Dimerization and opposite base-dependent catalytic impairment of polymorphic S326C OGG1 glycosylase. *Nucleic Acids Res* 2006;34:1620-1632
- [164] Wilson DM, 3rd, Kim D, Berquist BR, Sigurdson AJ. Variation in base excision repair capacity. *Mutat Res* 2011;711:100-112
- [165] Hill JW, Evans MK. A novel R229Q OGG1 polymorphism results in a thermolabile enzyme that sensitizes KG-1 leukemia cells to DNA damaging agents. *Cancer Detect Prev* 2007;31:237-243
- [166] Dherin C, Radicella JP, Dizdaroglu M, Boiteux S. Excision of oxidatively damaged DNA bases by the human alpha-hOgg1 protein and the polymorphic alpha-hOgg1(Ser326Cys) protein which is frequently found in human populations. *Nucleic Acids Res* 1999;27:4001-4007
- [167] Yamane A, Kohno T, Ito K, et al. Differential ability of polymorphic OGG1 proteins to suppress mutagenesis induced by 8-hydroxyguanine in human cell in vivo. *Carcinogenesis* 2004;25:1689-1694
- [168] Jung T, Catalgol B, Grune T. The proteasomal system. *Mol Aspects Med* 2009;30:191-296

- [169] Ugarte N, Petropoulos I, Friguet B. Oxidized mitochondrial protein degradation and repair in aging and oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2010;13:539-549
- [170] Giulivi C, Pacifici RE, Davies KJ. Exposure of hydrophobic moieties promotes the selective degradation of hydrogen peroxide-modified hemoglobin by the multi-catalytic proteinase complex, proteasome. *Arch Biochem Biophys* 1994;311:329-341
- [171] Widmer R, Kaiser B, Engels M, Jung T, Grune T. Hyperammonemia causes protein oxidation and enhanced proteasomal activity in response to mitochondria-mediated oxidative stress in rat primary astrocytes. *Arch Biochem Biophys* 2007;464:1-11
- [172] Ullrich O, Reinheckel T, Sitte N, et al. Poly-ADP ribose polymerase activates nuclear proteasome to degrade oxidatively damaged histones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:6223-6228
- [173] Mayer-Kuckuk P, Ullrich O, Ziegler M, Grune T, Schweiger M. Functional interaction of poly(ADP-ribose) with the 20S proteasome in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;259:576-581
- [174] Bakondi E, Catalgol B, Bak I, et al. Age-related loss of stress-induced nuclear proteasome activation is due to low PARP-1 activity. *Free Radic Biol Med* 2011;50:86-92
- [175] Jung T, Hohn A, Catalgol B, Grune T. Age-related differences in oxidative protein-damage in young and senescent fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 2009;483:127-135
-

BIBLIOGRAFÍA

- [176] Jung T, Engels M, Klotz LO, Kroncke KD, Grune T. Nitrotyrosine and protein carbonyls are equally distributed in HT22 cells after nitrosative stress. *Free Radic Biol Med* 2007;42:773-786
- [177] Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997;272:20313-20316
- [178] Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Science* 1992;257:1220-1224
- [179] Giampuzzi M, Oleggini R, Di Donato A. Demonstration of in vitro interaction between tumor suppressor lysyl oxidase and histones H1 and H2: definition of the regions involved. *Biochim Biophys Acta* 2003;1647:245-251
- [180] Kagan HM, Williams MA, Calaman SD, Berkowitz EM. Histone H1 is a substrate for lysyl oxidase and contains endogenous sodium borotritide-reducible residues. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;115:186-192
- [181] Herranz N, Dave N, Millanes-Romero A, et al. Lysyl oxidase-like 2 deaminates lysine 4 in histone H3. *Mol Cell* 2012;46:369-376
- [182] Mello ML, Alvarenga EM, Vidal Bde C, Di Donato A. Chromatin supraorganization, mitotic abnormalities and proliferation in cells with increased or down-regulated lox expression: Indirect evidence of a LOX-histone H1 interaction in vivo. *Micron* 2011;42:8-16
- [183] Mello ML, Russo P, Russo J, Vidal BC. Entropy of Feulgen-stained 17-beta-estradiol-transformed human breast epithelial cells as assessed by restriction enzymes and image analysis. *Oncol Rep* 2009;21:1483-1487

- [184] Knudson M, Kulkarni S, Ballas ZK, Bessler M, Goldman F. Association of immune abnormalities with telomere shortening in autosomal-dominant dyskeratosis congenita. *Blood* 2005;105:682-688
- [185] Westin ER, Chavez E, Lee KM, et al. Telomere restoration and extension of proliferative lifespan in dyskeratosis congenita fibroblasts. *Aging Cell* 2007;6:383-394
- [186] Ahamed M, Kumar A, Siddiqui MK. Lipid peroxidation and antioxidant status in the blood of children with aplastic anemia. *Clin Chim Acta* 2006;374:176-177
- [187] Patel KJ. Fanconi anemia and breast cancer susceptibility. *Nat Genet* 2007;39:142-143
- [188] Kamsler A, Daily D, Hochman A, et al. Increased oxidative stress in ataxia telangiectasia evidenced by alterations in redox state of brains from *Atm*-deficient mice. *Cancer Res* 2001;61:1849-1854
- [189] Machado-Pinilla R, Carrillo J, Manguan-Garcia C, et al. Defects in mTR stability and telomerase activity produced by the *Dkc1* A353V mutation in dyskeratosis congenita are rescued by a peptide from the dyskerin TruB domain. *Clin Transl Oncol* 2012;14:755-763
- [190] Greenwood E. The many faces of MYC. *Nat Rev Cancer* 2002;2:485
- [191] Kim BY, Kwak SY, Yang JS, Han YH. Phosphorylation and stabilization of c-Myc by NEMO renders cells resistant to ionizing radiation through up-regulation of gamma-GCS. *Oncol Rep* 2011;26:1587-1593
- [192] Benassi B, Fanciulli M, Fiorentino F, et al. c-Myc phosphorylation is required for cellular response to oxidative stress. *Mol Cell* 2006;21:509-519
-

BIBLIOGRAFÍA

- [193] Burdo J, Schubert D, Maher P. Glutathione production is regulated via distinct pathways in stressed and non-stressed cortical neurons. *Brain Res* 2008;1189:12-22
- [194] Levy S, Forman HJ. C-Myc is a Nrf2-interacting protein that negatively regulates phase II genes through their electrophile responsive elements. *IUBMB Life* 2010;62:237-246
- [195] Hybertson BM, Gao B, Bose SK, McCord JM. Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. *Mol Aspects Med* 2011;32:234-246
- [196] Baird L, Dinkova-Kostova AT. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch Toxicol* 2011;85:241-272
- [197] Gonzalez-Suarez E, Samper E, Flores JM, Blasco MA. Telomerase-deficient mice with short telomeres are resistant to skin tumorigenesis. *Nat Genet* 2000;26:114-117
- [198] Blasco MA. Telomeres in cancer and aging: lessons from the mouse. *Cancer Lett* 2003;194:183-188
- [199] Blasco MA. Telomeres and cancer: a tale with many endings. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13:70-76
- [200] Meyer DH, Bailis AM. Telomerase deficiency affects the formation of chromosomal translocations by homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 2008;3:e3318

- [201] Szalai VA, Singer MJ, Thorp HH. Site-specific probing of oxidative reactivity and telomerase function using 7,8-dihydro-8-oxoguanine in telomeric DNA. *J Am Chem Soc* 2002;124:1625-1631
- [202] Hironaka K, Factor VM, Calvisi DF, Conner EA, Thorgeirsson SS. Dysregulation of DNA repair pathways in a transforming growth factor alpha/c-myc transgenic mouse model of accelerated hepatocarcinogenesis. *Lab Invest* 2003;83:643-654
- [203] Factor VM, Kiss A, Woitach JT, Wirth PJ, Thorgeirsson SS. Disruption of redox homeostasis in the transforming growth factor-alpha/c-myc transgenic mouse model of accelerated hepatocarcinogenesis. *J Biol Chem* 1998;273:15846-15853
- [204] Rusyn I, Kadiiska MB, Dikalova A, et al. Phthalates rapidly increase production of reactive oxygen species in vivo: role of Kupffer cells. *Mol Pharmacol* 2001;59:744-750
- [205] Rusyn I, Denissenko MF, Wong VA, et al. Expression of base excision repair enzymes in rat and mouse liver is induced by peroxisome proliferators and is dependent upon carcinogenic potency. *Carcinogenesis* 2000;21:2141-2145
- [206] Ganesan S. MYC, PARP1, and chemoresistance: BIN there, done that? *Sci Signal* 2011;4:pe15
- [207] Pyndiah S, Tanida S, Ahmed KM, et al. c-MYC suppresses BIN1 to release poly(ADP-ribose) polymerase 1: a mechanism by which cancer cells acquire cisplatin resistance. *Sci Signal* 2011;4:ra19
- [208] Flores I, Blasco MA. The role of telomeres and telomerase in stem cell aging. *FEBS Lett* 2010;584:3826-3830
-

BIBLIOGRAFÍA

- [209] Wang X, Baumann P. Chromosome fusions following telomere loss are mediated by single-strand annealing. *Mol Cell* 2008;31:463-473
- [210] Garcia-Cao M, O'Sullivan R, Peters AH, Jenuwein T, Blasco MA. Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. *Nat Genet* 2004;36:94-99
- [211] Sharma GG, Hwang KK, Pandita RK, et al. Human heterochromatin protein 1 isoforms HP1(Hsalpha) and HP1(Hsbeta) interfere with hTERT-telomere interactions and correlate with changes in cell growth and response to ionizing radiation. *Mol Cell Biol* 2003;23:8363-8376
- [212] Koering CE, Pollice A, Zibella MP, et al. Human telomeric position effect is determined by chromosomal context and telomeric chromatin integrity. *EMBO Rep* 2002;3:1055-1061
- [213] Gonzalo S, Jaco I, Fraga MF, et al. DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 2006;8:416-424
- [214] Blasco MA. The epigenetic regulation of mammalian telomeres. *Nat Rev Genet* 2007;8:299-309
- [215] Michishita E, McCord RA, Berber E, et al. SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature* 2008;452:492-496
- [216] Conrad MN, Wright JH, Wolf AJ, Zakian VA. RAP1 protein interacts with yeast telomeres in vivo: overproduction alters telomere structure and decreases chromosome stability. *Cell* 1990;63:739-750

- [217] O'Sullivan RJ, Kubicek S, Schreiber SL, Karlseder J. Reduced histone biosynthesis and chromatin changes arising from a damage signal at telomeres. *Nat Struct Mol Biol* 2010;17:1218-1225
- [218] Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001;293:1074-1080
- [219] Pleshakova OV, Kutsyi MP, Sukharev SA, Sadovnikov VB, Gaziev AI. Study of protein carbonyls in subcellular fractions isolated from liver and spleen of old and gamma-irradiated rats. *Mech Ageing Dev* 1998;103:45-55
- [220] Tjeertes JV, Miller KM, Jackson SP. Screen for DNA-damage-responsive histone modifications identifies H3K9Ac and H3K56Ac in human cells. *EMBO J* 2009;28:1878-1889
- [221] Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 1997;324 (Pt 1):1-18
- [222] Luxford C, Morin B, Dean RT, Davies MJ. Histone H1- and other protein- and amino acid-hydroperoxides can give rise to free radicals which oxidize DNA. *Biochem J* 1999;344 Pt 1:125-134
- [223] Catalgol B, Wendt B, Grimm S, et al. Chromatin repair after oxidative stress: role of PARP-mediated proteasome activation. *Free Radic Biol Med* 2010;48:673-680

