

**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

**FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA**

**Departamento de Fisiología**



**ESTUDIO DEL PERFIL OXIDATIVO EN EL  
SÍNDROME DE KINDLER**

**TESIS DOCTORAL**

**Presentada por:**

**Fernando José Sánchez Carmen**

**Dirigida por:**

**Dr. Federico V. Pallardó Calatayud**

**Dra. Jelena Markovic**

**Dra. Nancy Judith Mora**

**Valencia, 2014**



D. FEDERICO PALLARDÓ CALATAYUD, Doctor en Medicina y Cirugía y Catedrático de Fisiología de la Universitat de València

y

Dña. Jelena Markovic, Doctora en Medicina y Cirugía por la Universitat de València

y

Dña. Nancy Judith Mora, Doctora en Medicina y Cirugía por la Universitat de València,

CERTIFICAN

Que D. Fernando J. Sánchez Carmen, licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado: "ESTUDIO DEL PERFIL OXIDATIVO EN EL SÍNDROME DE KINDLER" y reúne, según nuestro criterio, las condiciones necesarias para presentarlo y ser defendido ante la Comisión correspondiente para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firmamos la presente en València a 3 de febrero de 2014.

Fdo. Dr. Federico V. Pallardó

Fdo: Dra. Jelena Markovic

Fdo: Dra. Nancy J. Mora



## **Agradecimientos**

Deseo manifestar mi más sincero agradecimiento a aquellas personas que me han ayudado y apoyado en la realización de este trabajo, y muy especialmente al Prof. Federico Pallardó, por su permanente e imprescindible ayuda, y cuya amistad supone, para mí, un privilegio y un honor.

A Nancy Judith Mora, por iniciarme en el trabajo de un laboratorio de fisiología y a Jelena Markovic por su apoyo y ayuda, sobre todo con los trabajos de citometría de flujo y de imagen.

A la Dra. Marcela del Río (CIEMAT – Madrid), por las muestras de células de pacientes con Síndrome de Kindler. Sin su inestimable colaboración, este trabajo no habría sido posible.

Al personal de la UCIM por su ayuda en las técnicas analíticas: Sonia Priego, por su trabajo de microscopía confocal; Sergio Bañuls, por su ayuda con los cultivos celulares; a Francisco Dasí, por su trabajo con la RT-PCR; y a José Luís García, por su ayuda con los trabajos de Western-Blot.

A mis padres, a quienes este trabajo seguro que ilusiona incluso más que a mí.

A mis hijas, Laura y Amalia, por lo que significan para mí.

Y a Amalia, mi compañera de viaje, por estar siempre a mi lado.



# ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	9
1. INTRODUCCIÓN .....	11
1.1. SÍNDROME DE KINDLER.....	13
1.1.1. Identificación de las alteraciones génicas relacionadas con el SK .....	14
1.1.2. Funciones celulares de la kindlina .....	15
1.1.3. Discrepancias entre los mecanismos celulares propuestos y la sintomatología del SK .....	18
1.1.4. El estrés oxidativo como base de la heterogeneidad de patologías relacionadas con el SK .....	18
1.2. ESTRÉS OXIDATIVO .....	19
1.2.1. Concepto de radical libre y especies activadas .....	20
1.2.2. Génesis de especies oxidantes en las células .....	21
1.2.3. La mitocondria como productor de especies oxidantes .....	22
1.2.4. Antioxidantes fisiológicos .....	25
1.2.5. El Glutati6n .....	27
1.3. EL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL SÍNDROME DE KINDLER .....	30
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO .....	31
3. OBJETIVOS .....	35
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	39
4.1. APARATOS E INSTRUMENTAL CIENTÍFICO.....	41
4.1.1. Técnicas de cultivo celular .....	41
4.1.2. Espectrofotometría .....	43
4.1.3. Fluorimetría.....	43
4.1.4. Citometría de Flujo .....	43
4.1.5. Microscopía Confocal .....	43

4.1.6. Citometría de Imagen .....	43
4.1.7. Transferencia de proteínas por Western Blotting .....	44
4.1.8. Expresión de proteínas por RT-PCR .....	44
4.2. PRODUCTOS Y REACTIVOS .....	44
4.2.1. Fluorocromos .....	44
4.2.2. Determinación de proteínas .....	48
4.2.3. Enzimas .....	48
4.2.4. Otros reactivos .....	49
4.3. MODELOS EXPERIMENTALES .....	50
4.3.1. Tipos celulares .....	51
4.3.2. Determinaciones analíticas .....	52
4.3.2.1. Recuento de fibroblastos viables .....	52
4.3.2.2. Determinación del tamaño y complejidad celular por citometría de flujo .....	53
4.3.2.3. Cuantificación del contenido de ADN por citometría de flujo.....	54
4.3.2.4. Determinación espectrofotométrica de la concentración de GSH por medio de la reacción <i>glutación transferasa</i> .....	56
4.3.2.5. Determinación de la concentración de proteínas por el Método de <i>Lowry</i> .....	59
4.3.2.6. Determinación de los niveles de <i>peróxido de hidrógeno</i> por Citometría de Flujo .....	60
4.3.2.7. Determinación de anión superóxido mitocondrial por fluorimetría .....	62
4.3.2.8. Determinación de malondialdehído (MDA) por HPLC .....	62
4.3.2.9. Determinación del contenido mitocondrial por citometría de flujo .....	64
4.3.2.10. Determinación de la expresión de proteínas por Western Blotting .....	65
4.3.2.11. Determinación de la expresión de proteínas por PCR .....	68

4.3.2.12. Estudio de la distribución de las mitocondrias por microscopia confocal .....	72
4.3.2.13. Estudio del potencial de membrana mitocondrial mediante Citometría de Imagen .....	74
4.3.2.14. Análisis estadístico .....	77
5. RESULTADOS .....	79
5.1. Recuento de fibroblastos viables .....	82
5.2. El estudio de la muerte celular de fibroblastos por Citometría de Flujo muestra diferencias significativas entre las muestras de Kindler y el control .....	84
5.3. Las fases del ciclo celular presentan algunas diferencias significativas entre las muestras de Kindler y el control .....	87
5.4. El tamaño y la complejidad celular por citometría de flujo muestra resultados poco determinantes en los fibroblastos Kindler respecto del control .....	91
5.5. La determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno por citometría de flujo, mediante marcaje con dihidrorodamina, muestra un incremento significativo en las muestras FK .....	95
5.6. La determinación por fluorimetría del anión superóxido, mediante marcado con <i>Mitosox</i> , muestra niveles significativamente incrementados en las muestras FK .....	97
5.7. La determinación espectrofotométrica de la concentración de GSH muestra unos valores significativamente reducidos en las muestras FK.....	99
5.8. Los niveles de Malondialdehído (MDA) determinados por HPLC están significativamente incrementados en FK .....	101
5.9. La masa mitocondrial analizada por citometría de flujo mediante marcaje con " <i>mitotracker green</i> " muestra una disminución estadísticamente significativa en los fibroblastos Kindler .....	105
5.10. El análisis de las mitocondrias por microscopia confocal muestra diferencias en morfología y distribución entre los fibroblastos SK y los fibroblastos control, así como entre los queratinocitos QK y los queratinocitos control .....	107

5.11. El análisis de las mitocondrias mediante Citometría de Imagen muestra una significativa disminución del potencial de membrana mitocondrial en los fibroblastos Kindler .....	112
5.12. Expresión de proteínas mediante RT-PCR .....	117
5.13. Las enzimas relacionadas con los mecanismos de estrés oxidativo están disminuidas en Kindler .....	119
6. DISCUSIÓN .....	123
6.1. ANÁLISIS DE LOS NIVELES CELULARES DE ROS Y EL POSIBLE DAÑO CELULAR PRODUCIDO POR EL ESTRÉS OXIDATIVO .....	126
6.2. ANÁLISIS DE LOS SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE .....	128
6.2.1. Existe una disminución de los niveles de GSH celular en las muestras SK .....	128
6.2.2. Las enzimas relacionadas con los mecanismos de estrés oxidativo están disminuidas en el SK .....	129
6.3. ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA Y METABOLISMO DE LAS MITOCONDRIAS .....	132
6.3.1. Existe una disminución del potencial de membrana mitocondrial, posiblemente debido al incremento de ROS .....	132
6.3.2. La morfología mitocondrial de los fibroblastos de SK difiere de la obtenida en las muestras control .....	133
6.4. KINDLINAS Y SÍNDROME DE KINDLER .....	136
7. CONCLUSIONES .....	139
8. BIBIOGRAFÍA .....	143
ANEXO: Abreviaturas .....	159

## ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS y GRÁFICOS

<b>Figura 1:</b> Esquema de la estructura de la kindlina .....	15
<b>Figura 2.</b> Esquema de la matriz de adhesión celular .....	17
<b>Figura 3.</b> Proteínas involucradas en los procesos de fusión y fisión mitocondrial .....	23
<b>Figura 4.</b> Esquema de la cadena de transporte electrónico mitocondrial .....	24
<b>Figura 5.</b> Generación de los radicales libres derivados del oxígeno y actuación de antioxidantes .....	25
<b>Figura 6.</b> Estructura química y representación en 3D del glutatión .....	28
<b>Figura 7.</b> Ciclo redox del glutatión .....	29
<b>Figura 8:</b> Citometría de Flujo: variaciones en la complejidad celular y en el tamaño celular .....	53
<b>Figura 9:</b> Esquema de las diferentes fases del ciclo celular .....	55
<b>Figura 10:</b> Histogramas de las áreas correspondientes a las distintas fases del ciclo celular .....	56
<b>Figura 11:</b> Conjugación del GSH con el CDNB catalizado por la glutatión S-transferasa .....	57
<b>Figura 12:</b> Esquema del Citómetro de Imagen .....	75
<b>Figura 13:</b> Análisis por microscopía confocal de mitocondrias en fibroblastos control y Kindler de la Paciente 1, marcados con <i>MitoTracker green</i> y <i>Hoechst 33342</i> .....	108
<b>Figura 14:</b> Análisis por microscopía confocal de mitocondrias en fibroblastos control y Kindler de la Paciente 2, marcados con <i>MitoTracker green</i> y <i>Hoechst 33342</i> .....	109
<b>Figura 15:</b> Análisis por microscopía confocal de mitocondrias en queratinocitos control y Kindler de la Paciente 1, marcados con <i>MitoTracker green</i> y <i>Hoechst 33342</i> .....	111
<b>Figura 16:</b> Análisis por microscopía confocal de mitocondrias en queratinocitos control y Kindler de la Paciente 2 .....	112

<b>Figura 17:</b> Imágenes de fibroblastos teñidos con JC1 obtenidas por Citometría de Imagen .....	114
<b>Figura 21:</b> Expresión de proteínas por Western Blotting en fibroblastos de las pacientes 1 y 2 .....	121
<b>Figura 22.</b> Esquema de la ubicación putativa de las kindlinas dentro de la zona de adhesión de la membrana celular .....	137
<b>Tabla 1.</b> Principales especies activadas de oxígeno .....	20
<b>Tabla 2.</b> Isoformas de SOD .....	26
<b>Tabla 3:</b> Características de excitación y emisión de la DhR 123 .....	45
<b>Tabla 4:</b> Características de excitación y emisión del Yoduro de Propidio (IP) .....	45
<b>Tabla 5:</b> Características de excitación y emisión del <i>Mitotracker Green</i> .....	46
<b>Tabla 6:</b> Características de excitación y emisión del JC1 .....	47
<b>Tabla 7:</b> Características de excitación y emisión del <i>Mitosox</i> .....	48
<b>Tabla 8:</b> Condiciones estipuladas para el termociclado en RT-PCR .....	72
<b>Gráfico 1:</b> Recuento de fibroblastos viables .....	83
<b>Gráfico 2:</b> Muerte celular por citometría de flujo mediante el marcado con el fluorocromo Yoduro de Propidio .....	85
<b>Gráfico 3:</b> Tipo de Muerte celular por citometría de flujo mediante el marcado con el fluorocromo Yoduro de Propidio .....	86
<b>Gráfico 4:</b> Fase G0/G1 del Ciclo celular por citometría mediante el marcado con el fluorocromo Yoduro de Propidio .....	88
<b>Gráfico 5:</b> Fase S+M/G2 del ciclo celular por citometría mediante el marcado con el fluorocromo Yoduro de Propidio .....	90
<b>Gráfico 6:</b> Tamaño celular por citometría de flujo .....	92
<b>Gráfico 7:</b> Complejidad celular por citometría de flujo .....	94

<b>Gráfico 8:</b> Determinación de ROS por citometría mediante marcaje celular con dihidrorodamina .....	96
<b>Gráfico 9:</b> Determinación de Anión Superóxido por fluorimetría y marcaje con <i>Mitosox</i> .....	98
<b>Gráfico 10:</b> Determinación espectrofotométrica de la concentración celular de GSH, mediante su reacción con la glutatión-s-transferasa .....	100
<b>Gráfico 11:</b> Determinación cromatográfica de MDA en fibroblastos .....	102
<b>Gráfico 12:</b> Determinación cromatográfica de MDA en queratinocitos .....	104
<b>Gráfico 13:</b> Contenido mitocondrial por citometría de flujo mediante marcado con <i>Mitotracker green</i> .....	106
<b>Gráfico 14:</b> Potencial de membrana mitocondrial de fibroblastos por citometría de imagen (AMNIS) y marcado mediante JC1 .....	116
<b>Gráfico 15:</b> Expresión de proteínas por RT-PCR en fibroblastos de la paciente 1 .....	118
<b>Gráfico 16:</b> Expresión de proteínas por RT-PCR en fibroblastos de la paciente 2 .....	119



# RESUMEN

El Síndrome de Kindler (SK) es una rara genodermatosis cuyas manifestaciones principales son atrofia y envejecimiento prematuro de la piel, fotosensibilidad y carcinoma de piel, síntomas que comparte con otros síndromes (p. ej. Síndrome de Werner) en los que se ha demostrado la implicación del estrés oxidativo; sin embargo, en el SK no ha sido estudiado previamente. En el SK se ha identificado una alteración del brazo corto del cromosoma 20, donde se encuentra el gen KIND-1 que codifica la proteína kindlina-1. La pérdida de función de este gen conduce a una disminución de la síntesis de la proteína kindlina-1, produciendo, a su vez, una reducción de la adhesión de la interfase dermis-epidermis. No obstante, no se ha encontrado todavía la relación entre la pérdida de la función kindlina y otros síntomas de la enfermedad como la poiquilodermia, la fotosensibilidad o la carcinogénesis. Teniendo en cuenta dichos antecedentes, es factible suponer que exista un estrés oxidativo asociado al SK. Para poner a prueba esta hipótesis, se utilizarán queratinocitos y fibroblastos de piel provenientes de dos pacientes con SK y queratinocitos y fibroblastos de dos donantes sanos, como control.

En el presente trabajo de investigación se han estudiado diferentes parámetros de estrés oxidativo y de metabolismo y morfología mitocondrial en los dos modelos celulares de SK propuestos, con los que se ha intentado determinar el perfil oxidativo para esta enfermedad.

Los resultados obtenidos permiten afirmar que existe un mayor estrés oxidativo en fibroblastos y queratinocitos procedentes de pacientes con Síndrome de Kindler que en las muestras procedentes de sujetos sanos. Además, se han encontrado alteraciones en el contenido mitocondrial y en el

potencial de membrana mitocondrial, en las muestras de SK, que podrían justificar el desequilibrio oxidativo.

La confirmación de esta hipótesis podría abrir nuevas posibilidades terapéuticas en el tratamiento sintomático del Síndrome de Kindler; tal vez la utilización tópica de cremas y lociones con alto factor de protección solar y agentes antioxidantes podría ayudar a paliar los síntomas dermatológicos.

# **1.- INTRODUCCIÓN**



El Síndrome de Kindler (OMIM 173650; ORPHA 2908)<sup>1</sup> es una enfermedad rara caracterizada por causar un deterioro progresivo en la piel. Las manifestaciones clínicas más importantes del SK son atrofia cutánea, fotosensibilidad, poiquilodermia progresiva y ocasionalmente carcinomas de células escamosas. Muchos de estos síntomas ya se manifiestan en la infancia y suelen variar con la edad de los pacientes.

En los últimos años se han identificado alteraciones génicas en el brazo corto del cromosoma 20 asociadas a esta enfermedad. Se han planteado varios mecanismos moleculares, sin embargo, éstos no explican completamente la sintomatología observada en los pacientes. Por otra parte, el SK comparte ciertas características con otras patologías, como el Síndrome de Bloom (OMIM 210900; ORPHA 125) o de Werner (OMIM 277700; ORPHA 902) (Lanschuetzer *et al.*, 2003), considerados síndromes progeroides, donde la implicación del estrés oxidativo ha sido ampliamente contrastada. Sin embargo, no ha sido estudiado el estatus oxidativo en los pacientes que padecen síndrome de Kindler.

1)OMIM: On line database Mendelian Inheritance in Man; ORPHAN: portal of rare diseases and orphan drugs

### **1.1. Síndrome de Kindler.**

El SK es una genodermatosis autosómica recesiva que fue descrita por primera vez en 1954, por Theresa Kindler, en una paciente de 14 años que presentaba ampollas de origen traumático en zonas acras (manos, brazos, pies y piernas), fotosensibilidad y poiquilodermia (atrofia cutánea, telangiectasias y pigmentación reticular) (Kindler, 1954). Se trata de una enfermedad rara de la que se han descrito, desde 1954, menos de 150 casos

en la literatura (Ashton, 2004; Kaviarasan *et al.*, 2005; Ow and Tay, 2006; Lai-Cheong *et al.*, 2009).

Otros síntomas descritos para este síndrome son hiperqueratosis palmoplantar, ectropión, lesiones en la mucosa oral y conjuntival, estenosis esofágica, uretral, anal o vaginal, distrofia ungueal, fragilidad gingival y periodontitis, pseudosindactilia, afectación de la mucosa intestinal con colitis grave y melenas (Chien-Koon *et al.*, 2006; Lai-Cheong *et al.*, 2009). La aparición de las ampollas y la fotosensibilidad suelen remitir con la edad. También se ha descrito, en casos aislados más graves, carcinoma escamoso en paladar y labios y carcinoma celular transicional en vejiga (White *et al.*, 2005).

El diagnóstico del SK puede ser difícil, en los estadios tempranos, por su similitud clínica con la Epidermólisis Bullosa, pero la disminución de la aparición de ampollas y de la fotosensibilidad con la edad, así como el posterior desarrollo de atrofia progresiva de la piel y poiquilodermia ayudan al correcto diagnóstico. La lisis del colágeno o la disrupción del tejido elástico también son características de este síndrome; por ello, técnicas como la microscopía electrónica o la inmunohistoquímica con diversos marcadores, por ejemplo, de colágeno VII, han sido de gran utilidad en la diagnosis de la enfermedad (Lai-Cheong *et al.*, 2009).

### **1.1.1. Identificación de las alteraciones génicas relacionadas con el SK.**

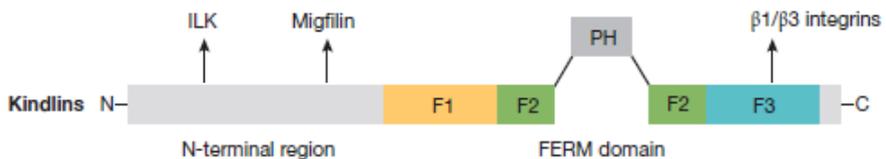
En el año 2003, dos grupos de investigadores identificaron, de manera independiente, las mutaciones asociadas al SK en el brazo corto del cromosoma 20 (locus 20p-12.3), donde se encuentra el gen KIND-1 que codifica la proteína kindlina-1 (Siegel *et al.*, 2003; Jobard *et al.*, 2003).

Hasta la fecha, se han descrito unas 37 mutaciones con pérdida de función en el gen KIND-1 (también conocido como FERMT-1). La pérdida de función de este gen conduce a una disminución de la síntesis de la proteína kindlina-1,

produciendo, a su vez, una reducción de la adhesión de la interfase dermis-epidermis. No obstante, no se ha encontrado todavía la relación entre la pérdida de la función kindlina y otros síntomas de la enfermedad como la poiquilodermia, la fotosensibilidad o la carcinogénesis (Hertz *et al*, 2006, Lai-Cheong *et al*, 2009).

### 1.1.2. Funciones celulares de la kindlina

Se han podido identificar tres tipos de kindlinas en el genoma humano. Éstas son la kindlina-1, también conocida como kindlerin y FERMT1, nombre relacionado con uno de los dominios que posee, “fermitin family homolog” (Figura 1), la kindlina-2 (también conocida como FERMT2 o MIG-2, mitogen inducible gen-2) y la kindlina-3 (también denominada FERMT3). Todas estas proteínas presentan idéntica arquitectura de los dominios y una alta similitud en la secuencia (Ow and Tay, 2006; Larjava *et al.*, 2008).



**Figura 1:** Esquema de la estructura de la kindlina donde se pueden ver los dominios FERM y PH, las flechas indican las regiones de la kindlina que interactúan con otras proteínas como la  $\beta$ 1-integrina y la  $\beta$ 2-integrina, la ILK y la migfilina (Larjava *et al.*, 2008).

Los estudios de expresión con Northern blotting y cDNA han demostrado una alta expresión del gen KIND-1 en colon, riñón, pulmones, placenta, glándula adrenal y próstata y menores niveles de expresión en corazón, músculo esquelético, hígado, intestino delgado y una mínima expresión en fibroblastos de piel. La kindlina-1 se localiza de forma predominante en los queratinocitos

basales de la piel (Jobard *et al.*, 2003; Siegel *et al.*, 2003; Larjava *et al.*, 2008; Wiebe *et al.*, 2008).

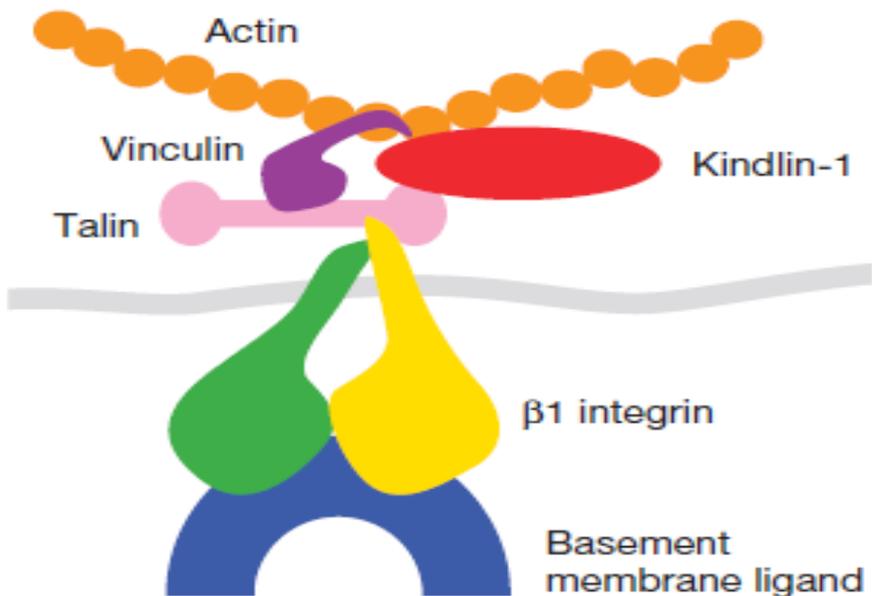
Estudios de inmunodetección revelan que esta proteína se encuentra, de manera preferente, en la unión dermo-epidérmica adyacente a la membrana basal inter-hemidesmosoma. Los hemidesmosomas son los complejos de unión que anclan la cara basal de las células epiteliales a la membrana basal. También se encuentran en la membrana plasmática de los queratinocitos basales, aunque en menor medida que en la membrana basal inter-hemidesmosoma (Aumailley *et al.*, 2006).

Las kindlinas constituyen una familia de proteínas de adhesión focal. Esta clase de proteínas no sólo cumplen un papel fundamental en la adhesión celular; también son importantes para la migración celular, la proliferación o muerte celular así como en la expresión génica. Se ha demostrado que, en la piel de enfermos con SK, los queratinocitos basales muestran múltiples anormalidades, como pérdida de la polaridad celular, fuerte reducción de la proliferación celular y gran tendencia a la apoptosis (Hertz, 2006). Además de las funciones de adhesión, numerosos estudios han demostrado que la kindlina-1 está implicada en los mecanismos de anclaje de la actina del citoesqueleto a la membrana plasmática celular (Has *et al.*, 2006). La actina del citoesqueleto es una estructura dinámica que participa en diversas funciones celulares que incluyen, entre otras, el mantenimiento de la polaridad y morfología celular, movilidad intracelular de orgánulos, movilidad celular y división celular (Revenu, *et al.*, 2004).

Por otra parte, las kindlinas son capaces de unirse a las integrinas y activarlas (Harburger, 2009). Las integrinas actúan como receptores de adhesión transmembrana que interaccionan con componentes de la matriz extracelular. A nivel intracelular, interaccionan con el citoesqueleto y con enzimas que generan cascadas de señalización que son integradas por la célula, pudiendo dar respuestas tan diversas como la proliferación, la migración, la diferenciación, la muerte o la activación de otras rutas. Las integrinas están

implicadas en muchos e importantes mecanismos del desarrollo embrionario, fisiología y fisiopatología, y su alteración se ha asociado a enfermedades inmunitarias, cardiovasculares y dermatológicas e incluso al cáncer (Smith, 2008; Meves, 2009).

En conjunto, los estudios sobre las posibles funciones de la kindlina-1 sugieren que esta proteína podría ser necesaria para el mantenimiento de la estabilidad de la unión dermo-epidérmica y que, al ser responsable de mantener unida a la actina con la matriz de adhesión celular, la kindlina también contribuiría al anclaje de las células epiteliales basales con la membrana basal (Figura 2). Sin embargo, los modelos propuestos para estos mecanismos son incapaces de explicar la mayoría de los síntomas observados en el SK.



**Figura 2.** Esquema de la matriz de adhesión celular mediada por las integrinas en la unión dermo-epidérmica y la relación con la kindlina-1 (Aumailley *et al.*, 2006).

### **1.1.3. Discrepancias entre los mecanismos celulares propuestos y la sintomatología del SK.**

En la actualidad, todavía no se conoce completamente la función fisiológica de la kindlina-1 ni el mecanismo molecular del SK. Aunque la familia de proteínas conocida como kindlinas ha sido descubierta hace relativamente pocos años, son numerosas las publicaciones que han intentado elucidar sus funciones.

La mayoría de estos estudios se han centrado en el papel de estas proteínas como activadores de las integrinas y en su función en la adhesión celular, ya sea con otras células o con la matriz extracelular. Sin embargo, aún quedan muchas cuestiones por resolver, sobre todo en relación al SK (Meves *et al.*, 2009), ya que las alteraciones encontradas en los queratinocitos no explican completamente la sintomatología observada en los pacientes.

La pérdida de funcionalidad de la kindlina-1 podría explicar algunas de las alteraciones de la piel observadas en estos pacientes, aunque los mecanismos que llevan a la formación de las ampollas aún no han sido dilucidados. Más aún, no se ha podido establecer todavía una relación entre la carcinogénesis o la fotosensibilidad con la pérdida de funcionalidad de la kindlina-1.

### **1.1.4. El estrés oxidativo como base de la heterogeneidad de patologías relacionadas con el SK.**

La fotosensibilidad, las alteraciones dermatológicas y la carcinogénesis son características que también aparecen en el *Síndrome de Werner* (que está considerado una progeria), enfermedad que se ha asociado al estrés oxidativo (Pagano *et al.*, 2005; Pallardó *et al.*, 2010). El SK también se ha relacionado con otros síndromes de envejecimiento prematuro y reparación de ADN defectuosa, como el Síndrome de Hutchinson-Gilford, el Xeroderma pigmentoso, el Síndrome de Cockaine o el Síndrome de Bloom (Lanschuetzer *et al.*, 2003), patologías en las que también se ha demostrado la implicación

del estrés oxidativo. Teniendo en cuenta estos antecedentes, es factible suponer la posibilidad de que en el SK también intervengan alteraciones debidas al estrés oxidativo. Sin embargo, revisada la bibliografía, en el SK todavía no ha sido estudiado.

## **1.2. Estrés Oxidativo**

El estrés oxidativo se puede definir como una alteración del equilibrio entre agentes pro-oxidantes y agentes antioxidantes, en favor de los primeros (Sies, 1986) y puede deberse a un exceso de agentes pro-oxidantes, a una deficiencia de agentes antioxidantes o a ambos factores a la vez.

Los agentes pro-oxidantes producen daño oxidativo a las distintas biomoléculas, esto es, a los lípidos, a las proteínas, a los ácidos nucleicos y a los glúcidos. El daño oxidativo a los lípidos de membrana constituye un factor importante en la disminución de la fluidez de las membranas (Shigenaga *et al.*, 1994). Por su parte, el daño oxidativo en las proteínas puede dar lugar a un cambio conformacional y, por tanto, a una pérdida o modificación de la función biológica (Stadman, 1992; Davies, 1987). El daño al DNA por radicales libres puede ocurrir por reacción con los residuos desoxirribosa o con las bases del DNA. En el primer caso, el daño no es crítico para la célula, siempre y cuando se rompa sólo una de las hebras del DNA. Esto permitirá actuar a las enzimas reparadoras (Breen and Murphy, 1995). Por su parte, la reacción con las bases del DNA es más habitual que la ruptura de las cadenas. Como resultado se forman radicales de las bases, las cuales sufren diversas reacciones que originan productos finales muy variados. La oxidación de la desoxiguanosina a 8-oxoguanosina es una de las lesiones más frecuentes y reviste gran importancia por su alto efecto mutagénico (Fraga *et al.*, 1990 ).

### 1.2.1. Concepto de radical libre y especies activadas.

Un radical libre es una especie atómica o molecular que posee, al menos, un electrón desapareado, que se representa por un punto ( $\bullet$ ). La presencia de electrones desapareados hace que estas especies sean muy reactivas, por lo que su vida media es extremadamente corta. Un radical se puede generar por ganancia o pérdida de un electrón o por rotura homolítica de un enlace covalente. La ganancia de un electrón es un proceso mucho más común en un sistema biológico que la rotura homolítica, que requiere una elevada energía procedente de altas temperaturas, luz UV o radiación ionizante (Cheeseman and Slater, 1993).

Se puede encontrar un gran número de especies derivadas del oxígeno que pueden ser muy reactivas o bien pueden ser capaces de dar lugar a estas especies reactivas. Teniendo en cuenta que algunas especies son auténticos radicales libres (como el radical hidroxilo,  $\text{HO}\bullet$ ), mientras que otras no lo son (como el peróxido de hidrógeno,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), es posible que el término más adecuado para denominarlas sea el de especies activadas de oxígeno (Halliwell, 1994). Sin embargo, el término más extendido es el de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Halliwell and Gutteridge, 1989; Go and Jones, 2008) (Tabla 1).

<b>Especie</b>	<b>Símbolo</b>
Radical superóxido	$\text{O}_2^{\bullet-}$
Radical hidropéroxido	$\text{HO}_2\bullet$
Peróxido de hidrógeno	$\text{H}_2\text{O}_2$
Radical hidroxilo	$\text{HO}\bullet$
Radical alcóxido	$\text{RO}\bullet$
Radical peróxido	$\text{ROO}\bullet$

**Tabla 1.** Principales especies activadas de oxígeno.

Dentro de las especies activadas del oxígeno, el radical ión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ), son las especies de mayor importancia en los sistemas biológicos. Además de las especies activadas de oxígeno, también existen especies activadas de nitrógeno, de azufre, radicales libres centrados en el carbono, etc.

### **1.2.2. Génesis de especies oxidantes en las células.**

Las especies activadas pueden tener un origen endógeno o exógeno (Freeman and Crapo, 1982; Frei, 1994). Algunas de ellas surgen a partir de reacciones secundarias no deseadas entre las biomoléculas o en la detoxificación de xenobióticos, pero otras especies activadas se generan *in vivo* con un fin determinado (Halliwell, 1991). El origen exógeno de las especies oxidantes se halla relacionado con la acción de radiaciones ionizantes, con las situaciones de hiperoxia o con distintos xenobióticos como es el caso de muchos agentes antineoplásicos y anestésicos, el humo del tabaco o los pesticidas, por ejemplo.

En el organismo se originan multitud de procesos en los que se generan especies oxidantes. En ocasiones, estas reacciones tienen como fin la generación de dichas especies, como es el caso del papel que desempeñan los fagocitos activados en la repuesta inmune, que producen  $O_2$  y  $H_2O_2$  (Babior, 1978). Sin embargo, existen multitud de reacciones en las que la génesis de estas especies reactivas responde a productos colaterales de las mismas. Así ocurre en la oxidación directa de moléculas por el oxígeno (Fridovich, 1986; Fridovich, 1989), en la acción de diversas enzimas, o en situaciones de hipoxia/re-oxigenación (Granger *et al.*, 1981; Saugstad, 1990). También son productores de especies oxidantes los sistemas de transporte electrónico del retículo endoplásmico (Forster *et al.*, 1993) y los microsomas o peroxisomas (Philpot, 1991). En circunstancias normales, la principal fuente de radicales libres y especies oxidantes en las células es la fuga de electrones hacia el

oxígeno molecular de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Cadenas *et al.*, 1977).

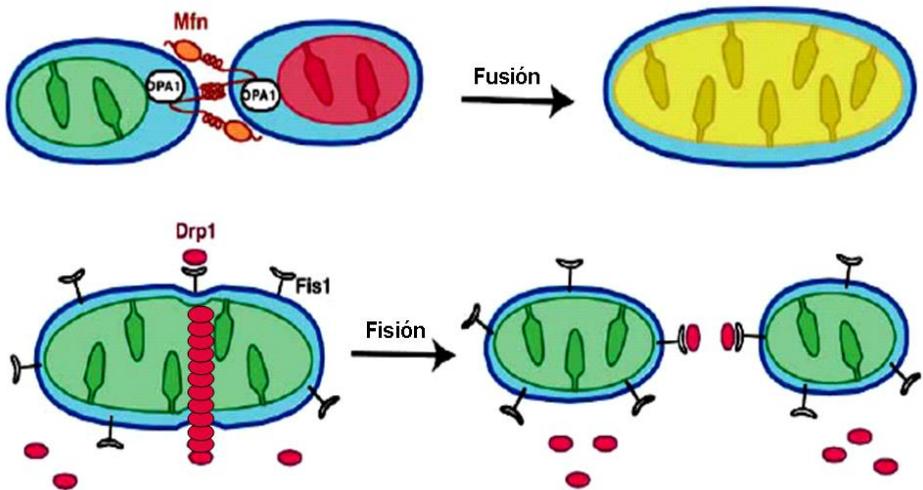
### **1.2.3. La mitocondria como productor de agentes oxidantes.**

La mitocondria es un orgánulo esencial para las células eucariotas que, en función de los diferentes tipos de tejidos en los que se encuentra, presenta diferencias substanciales en cuanto al número, estructura y función, lo que es un reflejo de la variabilidad de la demanda energética dentro de un organismo (Garesse and Vallejo, 2001). La mitocondria es un orgánulo caracterizado por la existencia de una doble membrana: una membrana mitocondrial externa y una membrana mitocondrial interna, que dividen dos compartimentos submitocondriales, el espacio intermembrana, que es el espacio encerrado por ambas membranas y la matriz mitocondrial, que es el espacio que encierra la membrana interna.

Las mitocondrias se encuentran en movimiento constante e interaccionan con otros orgánulos, como el núcleo, el retículo endoplasmático o incluso con otras mitocondrias (Krendel *et al.*, 1998; Bereiter-Hand *et al.*, 2008).

Las mitocondrias se organizan en filamentos y en redes mitocondriales. La morfología mitocondrial es regulada por procesos dinámicos de fusión y fisión así como por eventos de motilidad. Mediante estos procesos, los componentes mitocondriales están siendo continuamente distribuidos por todo el condrioma celular (Bereiter-Hand *et al.*, 2008, Westerman, 2008). La fusión mitocondrial es un proceso mediado a través de la acción de, al menos, tres GTPasas: las mitofusinas. Las mitofusinas 1 y 2 constituyen parte de la membrana mitocondrial externa y cuentan con dominios expuestos al citosol. Estas proteínas pueden unirse formando homodímeros o heterodímeros, los cuales se pueden formar entre mitocondrias adyacentes. De hecho, se ha sugerido que el extremo carboxilo de estas proteínas sería responsable de la unión de dos mitocondrias lo que provocaría la fusión de las mismas (Griffin and Chan, 2006). Otra proteína relacionada con la mitofusina 1 es la *optic atrophy type*

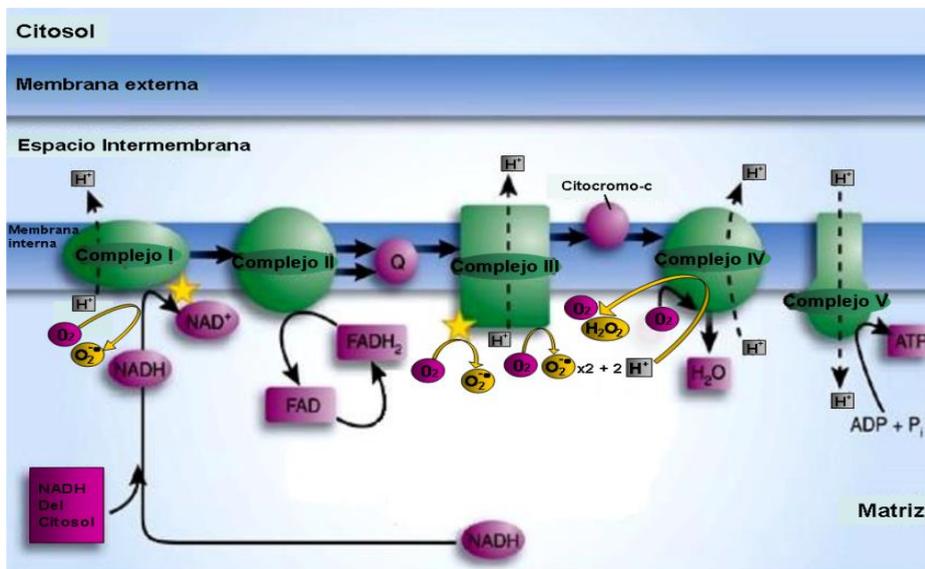
1 (OPA1); esta proteína reside en el espacio intermembrana, donde se asocia a la membrana interna (Bereiter-Hand *et al*, 2008, Westerman, 2008). Además, la proteína OPA1 se ha relacionado también con la estructuración de las crestas mitocondriales (Arnoult, 2007). Por su parte, la fisión o división mitocondrial está regulada por la proteína *dynamamin related protein 1* (DRP1), que se ubica en la membrana mitocondrial donde oligomeriza, formando una estructura circular alrededor del sitio de fisión (lugar por donde la mitocondria finalmente se constriñe) y por la proteína *fission 1* (FIS1), que es una proteína transmembrana que se encuentra anclada a la membrana mitocondrial externa por una región C-terminal (Chen and Chan, 2005) (Figura 3).



**Figura 3.** Proteínas involucradas en los procesos de fusión (esquema superior) y fisión (esquema inferior) mitocondrial (Chen and Chan, 2005).

La mitocondria es el mayor centro productor de especies oxidantes del organismo (Rickwood *et al.*, 1987; Orrenius *et al.*, 2007; Kakkar and Singh, 2007; Navarro and Boveris, 2007). Esta producción mitocondrial de especies oxidantes es, principalmente, responsabilidad de la cadena de transporte electrónico (Frei, 1994) (Figura 4). En la mitocondria se pueden producir tanto

especies reactivas del nitrógeno ( $\text{NO}\bullet$  por la acción de la *óxido nítrico sintasa* (NOS) mitocondrial) (Ghafourifar and Richter, 1997), como especies reactivas del oxígeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2\text{-}\bullet$ ) (Lenaz, 2001). Además, en la membrana mitocondrial externa se produce  $\text{H}_2\text{O}_2$  por la acción de monoamino oxidasas que catalizan la desaminación oxidativa de distintas aminas biógenas (Cadenas and Davies, 2000).



**Figura 4.** Esquema de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y los puntos de formación de especies reactivas del oxígeno (Frei, 1994).

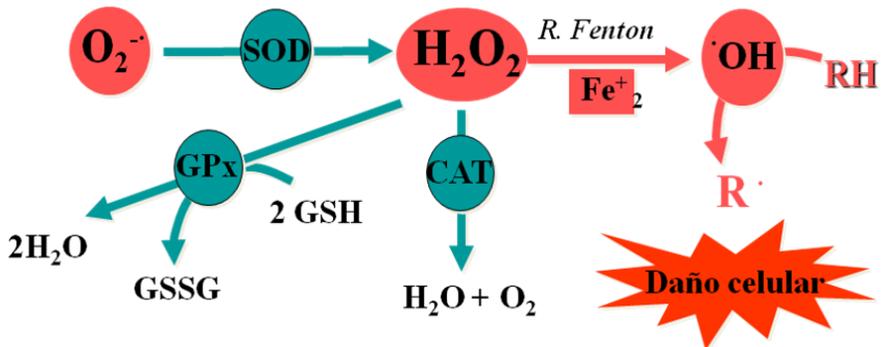
En la cadena respiratoria mitocondrial, hay fugas de electrones que no llegan al complejo IV (citocromo c oxidasa) y que producen reducciones parciales del oxígeno (Cadenas *et al.*, 1977; Frei, 1994). Por ejemplo, aunque los complejos I y III son considerados como los mayores productores de superóxido en la mitocondria, existen pruebas que señalan al complejo II como otro centro productor de superóxido (Cadenas and Davies, 2000). Por el contrario, el citocromo  $\text{a}_3$  del complejo IV retiene fuertemente todos los intermediarios del oxígeno parcialmente reducido unidos a su centro activo, hasta que el  $\text{O}_2$  es reducido completamente a  $\text{H}_2\text{O}$  (Benzi and Moretti, 1995)

(Figura 4). Por tanto, la citocromo c oxidasa no produce este radical y, además, exhibe cierta actividad superóxido dismutasa (Markossian *et al.*, 1978; Papa *et al.*, 1997).

La producción mitocondrial de especies activadas de oxígeno aumenta cuando el aporte de sustratos a la cadena respiratoria excede la demanda energética, es decir, cuando el cociente ATP/ADP es alto. En estas condiciones, aumentan la presión parcial de  $O_2$  y el grado de reducción de los transportadores redox de los complejos I, II y III, con el incremento consiguiente en la producción de especies activadas de oxígeno (Brand and Murphy, 1987; Skulachev, 1996).

#### 1.2.4. Antioxidantes fisiológicos.

Los seres vivos han desarrollado sistemas de defensa frente a la agresión por especies oxidantes. Cuando los agentes oxidantes superan la capacidad de las defensas antioxidantes, se produce un daño oxidativo (Sies, 1986).



**Figura 5.** Generación de los radicales libres derivados del oxígeno y actuación de antioxidantes.

Los sistemas antioxidantes pueden dividirse en dos grandes grupos: los antioxidantes enzimáticos y los no enzimáticos.

El grupo de los **antioxidantes enzimáticos** comprende aquellas enzimas que tienen como función la protección antioxidante:

**-Superóxido dismutasas.** Su función fisiológica es la eliminación de los radicales superóxido producidos en las reacciones del metabolismo aerobio (McCord and Fridovich, 1969; McCord *et al.*, 1971), por lo que está presente en todas las células aerobias, pero ausentes en las células anaerobias obligatorias. Hay descritas cuatro isoformas (Tabla 2) que difieren en el lugar de la célula en el que se encuentran (Fridovich, 1974).

<b>Isoforma</b>	<b>Ubicación</b>
Cu-Zn SOD	Citosol; espacio intermembrana mitocondrial
Mn SOD (2 tipos)	1) Matriz mitocondrial
	2) Bacterias (Vance <i>et al.</i> , 1972)
Fe SOD	<i>Escherichia coli</i> (Yost and Fridovich, 1973)

**Tabla 2.** Isoformas de SOD.

La actividad superóxido dismutasa cumple un papel fundamental en la defensa antioxidante ya que, aproximadamente, el 2% del oxígeno que consumimos se transforma, en la cadena de transporte electrónico mitocondrial, en radical superóxido (Boveris and Chance, 1973; Chance *et al.*, 1979). A pesar de que el radical superóxido es inestable en medio acuoso y espontáneamente se dismuta, la velocidad de dismutación no enzimática es relativamente baja en comparación con la reacción catalizada por la superóxido dismutasa, que incrementa esta velocidad unas 10.000 veces (Fridovich, 1974).

**-Catalasas.** Son un conjunto de hemoproteínas tetraméricas que catalizan la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular (Aebi, 1984). Intracelularmente se encuentran especialmente en los peroxisomas, probablemente para eliminar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado por las oxidasas localizadas en estos orgánulos (Halliwell, 1996).

**-Glutación peroxidasas.** Son las principales enzimas eliminadoras de peróxidos alquílicos y de peróxido de hidrógeno (Halliwell, 1996). Hay dos tipos de glutación peroxidasa y ambas requieren glutación reducido como dador de equivalentes reductores:

**-Glutación peroxidasa selenio dependiente:** Proteína tetramérica, con 4 átomos de selenio, que cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno y peróxidos orgánicos. Su centro activo contiene una cisteína en la que el azufre ha sido sustituido por selenio (Forstrom, 1978). Su actividad se ve muy afectada por el contenido en selenio de la dieta (Ketterer, 1986).

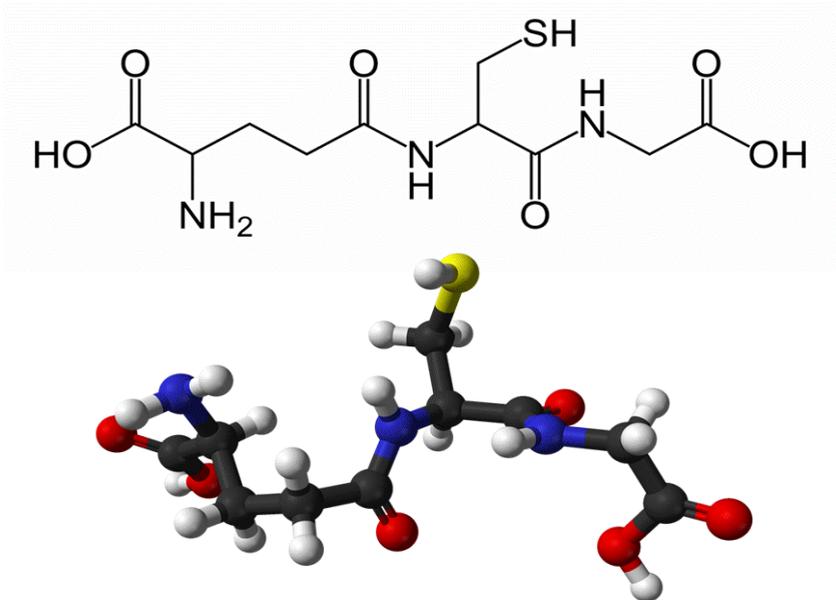
**-Glutación peroxidasa selenio independiente:** sólo tiene actividad frente a peróxidos orgánicos. La mayor parte de la actividad glutación peroxidasa se encuentra en el citosol, aunque también está presente en la matriz mitocondrial (Ketterer, 1986).

Los antioxidantes no enzimáticos son aquellas moléculas que pueden reaccionar directamente con las especies activadas de oxígeno o del nitrógeno, o bien con los productos de reacción de estas, sin que sea necesaria ninguna intervención enzimática. Entre los más importantes a nivel fisiológico destacan: el glutación, la vitamina C, la vitamina E, los  $\beta$ -carotenos o el ácido úrico.

La compartimentación celular de los antioxidantes, especialmente del glutación, es importante porque muchas de las especies oxidantes son muy reactivas y reaccionan preferentemente con aquellos componentes celulares cercanos a los lugares de generación de las mismas (Sastre *et al.*, 1996).

### **1.2.5. El glutación**

El glutación o  $\gamma$ -glutamil-cisteinil-glicina (Figura 6) es un tripéptido no proteínico que desempeña, entre otras, una importante función antioxidante en las células (Viña, 1990). La importancia de su función se evidencia al ser el tiol no proteico más abundante en las células de mamíferos (Hopkins, 1929; Sies, 1999).

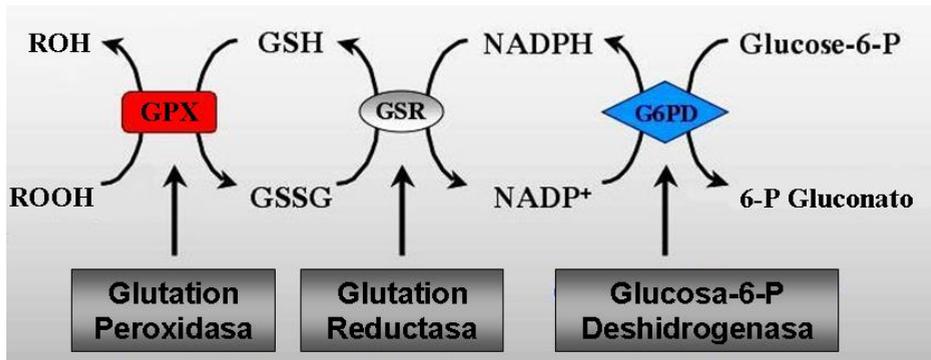


**Figura 6.** Estructura química y representación en 3D del glutatión ( $\gamma$ -glutamil cisteinil glicina). (Viña, 1990)

Muchas de sus funciones fisiológicas se deben a la presencia del grupo tío (-SH) de la cisteína, que es el grupo activo que participa en las reacciones redox del glutatión, y a la existencia del enlace  $\gamma$ -peptídico, que lo hace insensible a las peptidasas habituales de la célula. Este enlace sólo es hidrolizable por la enzima  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa situada en la membrana celular (Viña *et al.*, 1990). Por todo esto, el glutatión puede ejercer su papel protector cuando se presenta en su forma reducida (GSH), que es el estado habitual en el que se encuentra en los mamíferos. A su vez, dos moléculas de GSH pueden oxidarse cediendo un electrón cada una y combinándose entre sí, dando lugar a la forma disulfuro (GSSG).

El glutatión puede desempeñar su papel antioxidante mediante dos mecanismos distintos. En el primero, puede reaccionar directamente, sin intervención enzimática, con radicales libres y detoxificarlos (Kosower and

Kosower, 1978). De esta forma, participa en reacciones redox monoeléctricas que dan lugar a una molécula de glutatión oxidado (GSSG), compuesto por dos moléculas de GSH unidas por un puente disulfuro entre las dos cisteínas. En el segundo mecanismo, la acción antioxidante del glutatión tiene lugar cuando GSH reacciona frente a un agente pro-oxidante mediante la intervención de las enzimas glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa (Sies *et al.*, 1978; Akerboom *et al.*, 1982). La acción coordinada y conjunta del glutatión con estas enzimas se conoce como el ciclo redox del glutatión (Halliwell, 1996) y constituye uno de los mecanismos más efectivos de protección contra el estrés oxidativo (Figura 7).



**Figura 7.** Ciclo redox del glutatión. Enzimas del ciclo: (1) glutatión peroxidasa; (2) glutatión reductasa; (3) glucosa 6-P deshidrogenasa (Halliwell, 1991).

Entre las funciones del glutatión reducido (GSH), además de la protección celular frente al estrés oxidativo (Sies, 1986), se encuentra el mantenimiento del estatus tiólico de la membrana celular (Kosower and Kosower, 1983). Esta función resulta especialmente importante en las mitocondrias, ya que, al carecer de catalasa, dependen exclusivamente del GSH y de la glutatión peroxidasa para la detoxificación de peróxidos (Reed, 1990). El GSH mitocondrial procede del citosol, al no poseer las mitocondrias las enzimas necesarias para su síntesis (Griffith and Meister, 1985).

Este tripéptido constituye, en sí mismo, un reservorio de cisteína para la célula (Tateishi et al., 1974) y tiene la propiedad de mantener el estado redox, tioles/disulfidos, de la célula (Viña et al., 1983). Además, también participa en la detoxificación de xenobióticos (Orrenius and Moldeus, 1984), en la síntesis de DNA (Holmgren, 1979), en los procesos de captación de aminoácidos en algunos tejidos (Viña et al., 1989), en la regulación de la síntesis y degradación de proteínas (Ochoa, 1983), en la modulación de actividades enzimáticas (Pajares et al., 1992), en la homeostasis del calcio (Bellomo et al., 1982), en el ensamblaje del citoesqueleto (Burchill et al. 1978) y en la regulación de la proliferación celular (Pallardó et al, 2009).

### **1.3 El estrés oxidativo en el Síndrome de Kindler**

Si bien, en los últimos años, se han identificado alteraciones génicas asociadas a esta enfermedad y se han planteado varios mecanismos moleculares, no se ha podido explicar completamente la sintomatología observada en los pacientes con SK. Por otra parte, el SK comparte ciertas características con patologías como el Síndrome de Bloom o de Werner (Lanschuetzer *et al.*, 2003), en las que la implicación del estrés oxidativo ha sido ampliamente contrastada. El desarrollo de carcinomas, la fotosensibilidad o el envejecimiento prematuro de la piel también están estrechamente relacionados con situaciones de estrés oxidativo; sin embargo, en el SK aún no ha sido estudiado.

Teniendo en cuenta todos estos antecedentes, en el presente trabajo de investigación se estudiarán diferentes parámetros de estrés oxidativo en dos modelos celulares de SK. De esta manera, se intentará establecer un perfil oxidativo para esta enfermedad. Para ello, se utilizarán queratinocitos y fibroblastos de dos pacientes con SK y queratinocitos y fibroblastos provenientes de dos pacientes sanos como control.

## **2.- HIPÓTESIS DE TRABAJO**



## **2. HIPÓTESIS DE TRABAJO**

El Síndrome de Kindler presenta una sintomatología clínica asociada a carcinoma de piel y fotosensibilidad, así como a envejecimiento prematuro de la piel; algunas de estas características las comparte con otros síndromes, como por ejemplo, el Síndrome de Bloom o el Síndrome de Werner. En todas estas patologías existe una contrastada implicación del estrés oxidativo; sin embargo, en el Síndrome Kindler no ha sido estudiado previamente.

El presente trabajo pretende demostrar la existencia de estrés oxidativo asociado al Síndrome de Kindler, en el que podrían estar comprometidos los mecanismos de defensa antioxidante a nivel celular.



## **3.- OBJETIVOS**



### **3. OBJETIVOS**

El objetivo del presente trabajo será estudiar la posible implicación del estrés oxidativo a nivel celular en el Síndrome de Kindler.

Los objetivos específicos del trabajo son los siguientes:

1. Analizar los niveles celulares de ROS y el posible daño celular inducido por el estrés oxidativo.
2. Analizar los sistemas de defensa antioxidante, tanto no-enzimáticos (glutación) como enzimáticos (actividad génica y de proteínas).
3. Estudiar el metabolismo y la morfología mitocondrial dada la implicación de este orgánulo en la formación de ROS.



## **4.- MATERIALES Y MÉTODOS**



## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Aparatos e instrumental científico**

#### **4.1.1. Técnicas de cultivo celular**

- Cabinas de flujo laminar (Telstar- AV30/70 y Culair- BC100);
- Incubadores de CO<sub>2</sub> (Napco, Model 5415 IR CO2 SYSTEM);
- Instalación de criogenia: tanques de N<sub>2</sub> líquido y congeladores (-150°C);
- Congeladores:
  - #congelador -80°C (Thermo Heraeus- Electrón Corporation);
  - #congelador -20°C (Liebherr Premium);
- Equipo de esterilización:
  - #autoclave Selecta;
  - #estufa de secado (Heraeus Instruments- D6450 Hanau);
- Centrífugas:
  - #centrífuga termorregulable para tubos de 15 y 50 mL (Termo- Heraeus Multifuge 35RT Centrifugen);
  - #centrífuga termorregulable para eppendorf (Hettinch Zentrifugen- Rotina 35R);
- pH-metro (Crison- pH Meter GLP21);
- Bomba de vacío;
- Pipetas y micropipetas:
  - #pipetas automáticas;
  - #pipetas estériles desechables (TPP): 25mL, 10mL, 5mL y 2mL;
  - #micropipetas automáticas: 1000µl, 20-200µl, 2-20µl y 0,5-2µl;
- Material plástico estéril:

- #frascos de cultivo (TPP): 150cm<sup>2</sup>, 75cm<sup>2</sup> y 25cm<sup>2</sup>;
- #placas petri (TPP): 100mm, 30mm;
- # *chamber slides*, placas diseñadas especialmente para microscopía confocal (Nalgene Nunk Internacional);
- #cubetas de congelación (Nalgene);
- #microtubos de 0,2 y 0,5 mL

-Material de cultivo:

- #raspadores celulares estériles 25cm (Corning);
- #criotubos estériles 1,8mL (Nunc);
- #filtros de Nylon estériles 0,22 μm (Nalgene);

-Medios de cultivo y aditivos:

- #medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco-Invitrogen);
- #tripsina- EDTA (Gibco-Invitrogen);
- #suero bovino fetal (SBF, Gibco - Invitrogen);
- #solución salina equilibrada tampón fosfato (PBS, Gibco-Invitrogen);
- #solución tamponadora HEPES pH= 7.2 a 7.8 (Gibco-Invitrogen);
- #combinación de antibióticos, estreptomina/ penicilina (S/P, Sigma-Aldrich)
- #dimetil sulfoxido (DMSO, SIGMA).

-Instrumentos ópticos:

- #microscopio binocular (Nikon SE);
- #microscopio binocular invertido (Nikon Elipse TS100);

-Baños termostatizados:

- #baño húmedo con agitador (Selecta Heater- Unitronic 320 OR);
- #baño seco (Grant- QBA2);

-Vortex (Vortex Mixer Stuart SA8);

- Agitador magnético (Sturat- hotplate stirrer SB162-3);
- Equipo de purificación de agua (Millipore Milli-Q Integral-15);
- Balanzas de precisión (SALTER, HA-120M y SARTORIUS, PT 1200);

#### **4.1.2. Espectrofotometría:**

- Espectrofotómetro SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices) Sunnyvale, California, EE.UU.; software SoftMax Pro 4.3LS;
- Espectrofotómetro GeneQuantPro (Amersham Bioscience), Piscataway, New Jersey, EE.UU..

#### **4.1.3. Fluorimetría:**

- Fluorímetro SpectraMax GeminiXS (Molecular Devices) Sunnyvale, California, EE.UU., software SoftMax Pro 4.3LS.

#### **4.1.4. Citometría de flujo:**

- Citómetro de flujo. Citómetro Epics Elite, Coulter Electronics, Miami, EE.UU.. Equipado con láser de argón. El análisis de las muestras se realizó con el software E 11/94 versión 4.0 EPICS, provisto en el citómetro.

#### **4.1.5. Microscopía Confocal:**

- Microscopio confocal Leica TCS-SP2, unidad equipada con láser de argón y láser de helio-neón y microscopio invertido Leica DM1RB (Leica Microsystems), CMS, GMBH, Mannheim, Germany.

#### **4.1.6. Citometría de Imagen:**

- AMNIS IMAGE STREAM. Las imágenes adquiridas se analizaron utilizando el software proporcionado por el aparato, Ideas<sup>®</sup>3.0. (Amnis Corporation), Seattle, EE.UU.

#### **4.1.7. Transferencia de proteínas Western Blotting:**

- Membrana de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  (Schneider & Schuell, EE.UU.);
- Sistema Mini-protean II (BioRad, EE.UU.);
- Equipo de revelado: Cámara CCD.

#### **4.1.8. RT-PCR:**

- ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystem). Carlsbad, California, EE.UU..

### **4.2. Productos y reactivos**

#### **4.2.1. Fluorocromos:**

Las sustancias que tienen la propiedad de emitir un fotón de una longitud de onda determinada, cuando son excitadas por un fotón incidente de una longitud de onda característica, se conocen como fluorocromos. Si un componente de este tipo es iluminado a su longitud de onda absorbente y visualizado a través de un filtro que sólo permita pasar la luz de longitud de onda igual a la de la luz emitida, el componente aparece brillante sobre un fondo oscuro. La intensidad y el color de la luz es una propiedad característica del fluorocromo utilizado. Los colorantes fluorescentes usados para la tinción celular son detectados con ayuda del microscopio de fluorescencia. En estos microscopios, la luz incidente procedente de una fuente atraviesa un filtro que selecciona la longitud de onda capaz de excitar al fluorocromo antes de incidir sobre la muestra. La luz emitida por la muestra (reflejada y fluorescente) atraviesa un segundo filtro que selecciona la longitud de onda de emisión del fluorocromo. La utilización de diferentes combinaciones de fluorocromos hace posible analizar las diferentes estructuras subcelulares, o incluso diferentes fases del ciclo de vida celular (Mullins 1994; Mullins 1999).

- **Dihidrorodamina 123:** La dihidrorodamina es un fluorocromo utilizado para medir  $H_2O_2$  intracelular. Esta molécula difunde, de forma pasiva, a través de las membranas; una vez dentro de la célula, esta molécula es directamente oxidada a rodamina-123, la cual es excitable a 488nm y emite a 515nm. Una vez oxidada a rodamina-123, se localiza en las mitocondrias. La conversión de las moléculas no fluorescentes a moléculas fluorescentes depende completamente de los productos de oxidación y no requiere catálisis enzimática (información del producto - Molecular Probes Wardman 2007).

<b>Dihidrorodamina 123</b>	
$\gamma$ excitación (nm)	$\gamma$ emisión (nm)
488nm	515nm

**Tabla 3:** Características de excitación y emisión de la DhR 123.

- **Yoduro de propidio:** (Sigma) El yoduro de propidio (IP) es el fluorocromo más utilizado para la realización de determinaciones de contenido de ADN por citometría de flujo. Se intercala entre el ADN y el ARN uniéndose a las bases, en células no viables que han perdido la integridad de la membrana o en células permeabilizadas. El tratamiento previo con nucleasas permite una unión selectiva (información del producto - Sigma; Belloch *et al.*, 1994; Gong *et al.*, 1994). En nuestro caso, mediante la adición de RNA-asa, conseguimos un marcaje selectivo de DNA.

<b>IP</b>	
$\gamma$ excitación (nm)	$\gamma$ emisión (nm)
493	630

**Tabla 4:** Características de excitación y emisión del Ioduro de Propidio (IP).

- **Mitotracker:** (Molecular Probes) Es una sonda fluorescente específica para el marcaje de mitocondrias. Difunde fácilmente a través de la membrana plasmática, concentrándose en el interior de la mitocondria (información del producto - Molecular Probes). Este marcador es resistente a las variaciones en la funcionalidad mitocondrial y no afecta la funcionalidad celular.

<b>MitoTracker Green</b>	
<b>γ excitación (nm)</b>	<b>γ emisión (nm)</b>
490	516

**Tabla 5:** Características de excitación y emisión del *Mitotracker Green*.

- **5,5',6,6'tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazol-carbocianin ioduro:** (Molecular Probes) Este marcador, también conocido como JC1, es un catión lipofílico que detecta variaciones en el potencial de membrana mitocondrial sin afectar la viabilidad celular ni la respiración mitocondrial. Este fluorocromo se acumula selectivamente en el interior de las mitocondrias activas, atraídas solamente por el potencial de membrana mitocondrial. Los monómeros de JC1 (fluorescencia verde) entran en la mitocondria gracias al gradiente electroquímico; una vez acumulados selectivamente dentro de la mitocondria, se formarán agregados en forma de dímeros con fluorescencia naranja o roja, que será más intensa a mayor potencial de membrana mitocondrial. Es decir, que el fluorocromo puede virar del color verde (monómeros) al naranja (agregados) cuanto más polarizado se encuentre el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ), ya que el gradiente electroquímico de la mitocondria es responsable de la formación de los agregados de JC1. En condiciones normales, la mitocondria posee un potencial de membrana elevado. Cuando el

potencial de membrana es bajo (despolarización), el fluorocromo se encuentra formando monómeros (fluorescencia verde) que se distribuyen mayoritariamente en el citoplasma. La despolarización de la membrana mitocondrial se evidencia como una disminución en el cociente de intensidad de fluorescencia naranja/ intensidad de fluorescencia verde. Esta variación de la proporción entre fluorescencias sólo depende del potencial de membrana mitocondrial y es independiente de otros factores tales como el tamaño de la mitocondria, la forma o la densidad, factores que afectan el marcaje de otros fluorocromos. El uso de esta proporción de fluorescencias permite hacer comparaciones del potencial mitocondrial de diferentes muestras e incluso comparar poblaciones. Ambos colores pueden ser detectados tanto por citometría confocal como por fluorimetría o por citometría de flujo (información del producto - Molecular Probes; Cossarizza, 2006; Szilágyi *et al.*, 2006).

<b>JC1</b>		
	<b><math>\gamma</math> excitación (nm)</b>	<b><math>\gamma</math> emisión (nm)</b>
Monómeros	485	530
Agregados	535	490

**Tabla 6:** Características de excitación y emisión del JC1.

- ***MitoSOX<sup>TM</sup> Red mitochondrial superoxide indicator*** (Molecular Probes): El *MitoSOX* es un agente fluorogénico altamente selectivo en la detección de superóxido mitocondrial de células vivas. Una vez ha entrado en la mitocondria es oxidado por el anión superóxido intramitocondrial, exhibiendo entonces una fluorescencia roja. Su especificidad radica en que no puede ser oxidado por otros ROS ni por especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Robinson *et al.*, 2008).

<b><i>MitoSox</i></b>	
<b><math>\gamma</math> excitación (nm)</b>	<b><math>\gamma</math> emisión (nm)</b>
510	580

**Tabla 7:** Características de excitación y emisión del *MitoSox*.

#### **4.2.2. Determinación de proteínas**

Se utilizó el "*Protein Assay Kit*", basado en una modificación de Peterson del método de Lowry (*Total Protein Kit Micro Lowry -Peterson's Modification*, Sigma). El reactivo de Lowry contiene dodecilsulfato sódico, que facilita la disolución de las proteínas parcialmente insolubles y tartrato cúprico alcalino, que se une a las proteínas. Por su parte, el reactivo de Folin contiene fenol, que al interaccionar con el tartrato da lugar a un compuesto de color azul (Lowry *et al.*, 1951; información del producto - Sigma ).

#### **4.2.3. Enzimas**

- **Glutación S-transferasa:** La glutación S-transferasa (GST, Sigma) representa una familia multifuncional de enzimas que están involucradas, básicamente, en los procesos de defensa contra el estrés tóxico y oxidativo en los tejidos, incluyendo un grupo de proteínas que participa en los eventos de detoxificación de una amplia variedad de compuestos de origen biológico y químico. El glutación ( $\gamma$ -L-glutamyl-L-cisteinil-glicina, GSH), uno de los substratos naturales de la GST, participa como co-factor en múltiples reacciones del metabolismo animal, vegetal y en el transporte de aminoácidos hacia el interior de la célula. La reacción principal catalizada por la GST, es la conjugación al GSH de una amplia variedad de compuestos electrofílicos exógenos o endógenos. De esta forma, la enzima neutraliza los sitios activos del electrófilo y genera productos más

hidrosolubles y, por tanto, más fácilmente excretables (información del producto - Sigma).

- **Ribonucleasa A:** La ribonucleasa A (RNAsa-A, Sigma) consiste en una cadena polipeptídica simple que contiene 4 puentes disulfuro. Ésta es una endoribonucleasa que actúa sobre los grupos fosfato 3' de los nucleótidos de pirimidina (información del producto - Sigma).

#### 4.2.4. Otros reactivos

- IGEPAL (Sigma);
- Ácido perclórico (PCA, Merck/Scharlau);
- Cloro dinitrobenzeno (CDNB, Sigma);
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, Sigma);
- N-(2-hidroxiethyl)piperacina-N'-(2-ácido etanosulfónico) (HEPES, Sigma);
- Cloruro sódico (NaCl, Panreac);
- Fluoruro de sodio (NaF, Panreac);
- Sosa (NaOH, Panreac);
- Ácido clorhídrico (HCl 38%, Baker);
- Fosfato Potásico (KPI);
- Dimetilsulfóxido (DMSO);
- 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol (TRIS, Roche);
- Etanol absoluto (Baker);
- Metanol (Baker);
- Acetato sódico (NaAc, Panreac);
- Triton X-100 (Sigma);
- OrtoVanadato de sodio (OHNa vanadato, Sigma);
- Seroalbúmina bovina (BSA)
- Dodecilsulfato sódico (SDS,  $C_{12}H_{25}NaO_4S$ , Sigma/Aldrich);
- Bromofenol azul;
- 2-mercaptoetanol;
- Glicerol ( $C_3H_8O_3$ , Sigma);
- Cocktail inhibidor de proteasas (SIGMA);
- Glicina;
- Poliacridamina;

- Tween 20;
- Reactivo quimioluminiscente LumiGLOI® (Cell Signaling Technologies);
- Amersham RPN2106 ECL *Western Blotting Detection Reagent*.
- F12 (Gibco)
- Hyclon (Thermo Scientific)
- Factor de crecimiento
- Toxina colérica
- Adenina
- Hormona tiroidea
- Hidrocortisona
- Insulina
- Buffer de lisis de proteínas
- 

### **4.3. Modelos experimentales**

Puesto que el objetivo del presente trabajo es la caracterización del perfil de estrés oxidativo de queratinocitos y fibroblastos provenientes de biopsias de piel de pacientes con Síndrome de Kindler, se ha comparado este perfil con el de queratinocitos y fibroblastos de la piel de sujetos no enfermos (control).

Los fibroblastos se han cultivado, hasta confluencia, en placas de Petri de 6 cm de diámetro para cada tipo celular, en estufa a 37.5°C, en atmósfera con 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo utilizado ha sido DMEM + 10% de SBF+1% S/P.

Los queratinocitos se han cultivado, hasta confluencia, en frascos T75, previamente sembrados con fibroblastos embrionarios irradiados de ratón, en estufa a 37.5°C, en atmósfera con 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo utilizado ha sido DMEM + F12 al 30% (Gibco), Hyclon al 10% (Thermo Scientific) y los siguientes factores a 0.1%: Factor de crecimiento epidérmico, Toxina colérica, Adenina, Hormona tiroidea 3, Hidrocortisona e Insulina. Una vez llegados a confluencia, se añade tampón de lisis de proteínas y se extraen éstas.

### **4.3.1. Tipos Celulares**

En el presente trabajo se han utilizado queratinocitos y fibroblastos de piel obtenidos a partir de biopsias:

- Queratinocitos (QK1) y fibroblastos (FK1) de la piel de un paciente de sexo femenino de 6 años de edad con Síndrome de Kindler
- Queratinocitos (QN1) y fibroblastos (FN1) de la piel de un sujeto sano de sexo femenino y de 6 años de edad , que se han utilizado como control para QK1 y FK1.
- Queratinocitos (QK2) y fibroblastos (FK2) de la piel de un paciente de sexo femenino de 51 años de edad con Síndrome de Kindler
- Queratinocitos (QN2) y fibroblastos (FN2) de la piel de un sujeto sano de sexo femenino y de 50 años de edad , que se han utilizado como control para QK2 y FK2.

Todas las muestras celulares han sido remitidas por la Dra. Marcela del Río (Unidad de Medicina Regenerativa, División de Biomedicina Epitelial, Dpto. de Investigación Básica, Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas -CIEMAT-, Madrid).

La extracción de biopsias de piel para realizar estudios de estrés oxidativo fue aprobada por el Comité de Ética del Hospital del Mar (Barcelona).

El fibroblasto es un tipo de célula residente del tejido conectivo propiamente dicho. Sintetiza fibras y mantiene la matriz extracelular del tejido de muchos animales. Estas células proporcionan una estructura en forma de entramado a muy diversos tejidos y juegan un papel crucial en la curación de heridas, siendo las células más comunes del tejido conectivo. Se derivan de células primitivas mesenquimales y pluripotenciales. Son de forma alargada, y se caracterizan por presentar inhibición de crecimiento por contacto.

El queratinocito es la célula más abundante de la epidermis (80%) y es responsable de su función, mediante la síntesis de queratina y de citoquinas con función reguladora de las células epiteliales y dérmicas. Forman las 4 capas de la epidermis, migrando desde la capa basal hasta la capa córnea, donde ya han perdido el núcleo y los orgánulos, y se han convertido en "corneocitos" que dan resistencia y dureza a la epidermis. Su forma es poligonal en la capa basal y en la capa espinosa (escamosa o de Malpighi) y es aplanada en las capas granulosa y córnea.

### **4.3.2. Determinaciones analíticas**

#### **4.3.2.1. Recuento de fibroblastos viables.**

Se realiza el recuento de fibroblastos viables para cada tipo celular en confluencia, mediante cámara de Neubauer y Microscopía de Contraste de Fases, con el objeto de averiguar la existencia de diferencias significativas en la proliferación celular entre FK y FN.

El protocolo seguido fue:

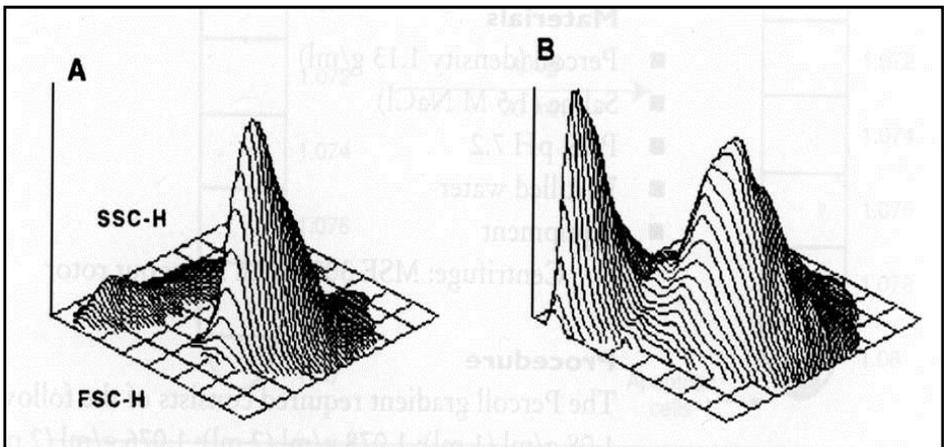
1. Se eliminó el medio de cultivo y se lavaron las muestras 2 veces con 2 mL de PBS.
2. Se añadió a cada placa 1 mL de tripsina y se incubó en estufa a 37.5°C, durante 2 minutos, hasta el despegado de los fibroblastos.
3. Se recolectó cada muestra con 4 mL de medio DMEM en un tubo.
4. Se centrifugaron las muestras a 1.500 rpm, durante 5 minutos, a 24°C.
5. Se eliminó el sobrenadante.
6. Se resuspendieron las muestras en 1 mL de medio DMEM.
7. Se tomó una parte alícuota (20 µL) de cada muestra para realizar el conteo en una cámara Neubauer.

#### 4.3.2.2. Determinación del tamaño y complejidad celular por citometría de flujo.

A continuación, se analizó el tamaño y complejidad celular por Citometría de Flujo. Las bases de esta aplicación provienen de la interacción de la célula con la luz del rayo láser. La luz dispersada ("*scattered light*") provee información sobre el tamaño y la estructura de la célula. Debido a la heterogeneidad esta luz dispersada en células individuales, se usa una escala exponencial (amplificadores logarítmicos) para el análisis:

- Tamaño celular: se relaciona con la intensidad de la luz dispersada en la dirección de avance ("*forward scatter*").
- Granularidad, refractividad, habilidad de las estructuras intracelulares de reflejar la luz: se relaciona con la intensidad de la luz dispersada en ángulo recto (90°) al rayo ("*side scatter*") (Figura 8).

Side scatter: MUESTRA CAMBIOS EN LA COMPLEJIDAD DE CÉLULAS  
Forward scatter: MUESTRA CAMBIOS EN EL TAMAÑO CELULAR



**Figura 8:** Muestra las variaciones en la complejidad celular (SSC-H, "*side scatter*") y en el tamaño celular (FSC-H, "*forward scatter*"). Los gráficos A y B corresponde a dos poblaciones de células.

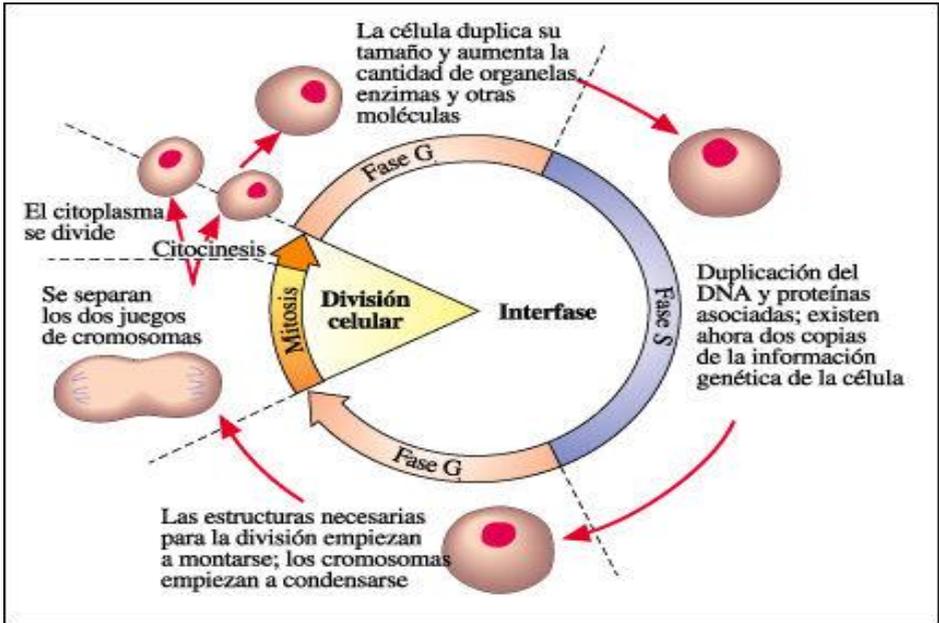
Los cambios en el tamaño celular debidos, por ejemplo, al hinchamiento que precede la necrosis o encogimiento anterior a la apoptosis, se reflejan en el

nivel del "*forward scatter*". Los cambios morfológicos producidos por la rotura de la membrana plasmática, condensación de cromatina, fragmentación nuclear y derramamiento de cuerpos apoptóticos alteran la propensión a dispersar luz lo que se detecta como cambios en "*side scatter*".

#### **4.3.2.3. Cuantificación del contenido de ADN por citometría de flujo.**

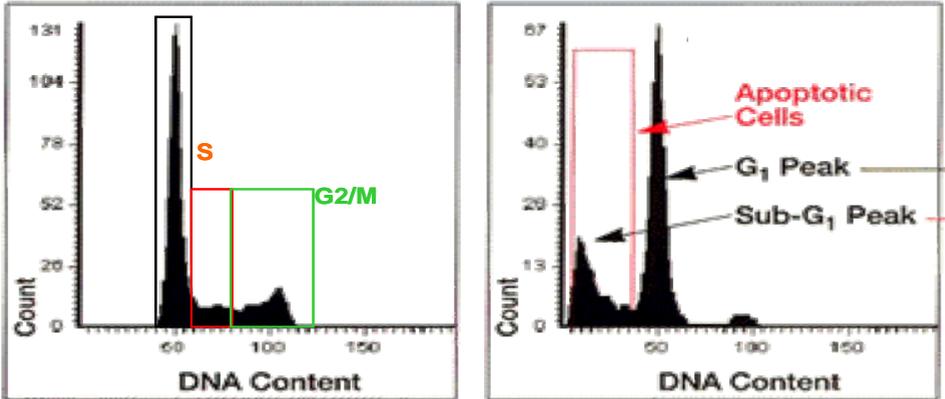
Existen diferentes fluorocromos capaces de unirse de forma estequiométrica a la doble cadena de ADN. La cuantificación de ADN permite realizar un seguimiento de la existencia o no de anomalías clonales de ADN (aneuploidias de ADN) y, por otra parte, permite conocer la distribución de una población celular determinada a lo largo de las distintas fases del ciclo celular (Figuras 9 y 10). El empleo combinado de cuantificación de ADN y marcaje para diferentes antígenos de células tumorales y/o oncoproteínas permite la identificación y cálculo selectivo del ciclo celular de la población neoplásica.

En el presente trabajo, se ha utilizado esta técnica mediante el fluorocromo "Yoduro de Propidio" para caracterizar las fases del ciclo celular.



**Figura 9:** Esquema de las diferentes fases del ciclo celular G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>; S; G<sub>2</sub> y M (tomado de Jonte, F; HUCA). La fase G<sub>1</sub> es el período entre el nacimiento de la célula y el comienzo de la replicación del ADN; cuando las células no se dividen quedan en fase G<sub>0</sub>. La fase S corresponde al periodo de duplicación del genoma, pasando de una dotación 1N a 2N; la fase G<sub>2</sub> corresponde al período de preparación para la mitosis (duplicación de centriolos, condensación de cromosomas y ruptura membrana nuclear); la fase M corresponde al momento de la mitosis. El conjunto G<sub>1</sub>-S-G<sub>2</sub> se denomina "interfase"

### G0/G1

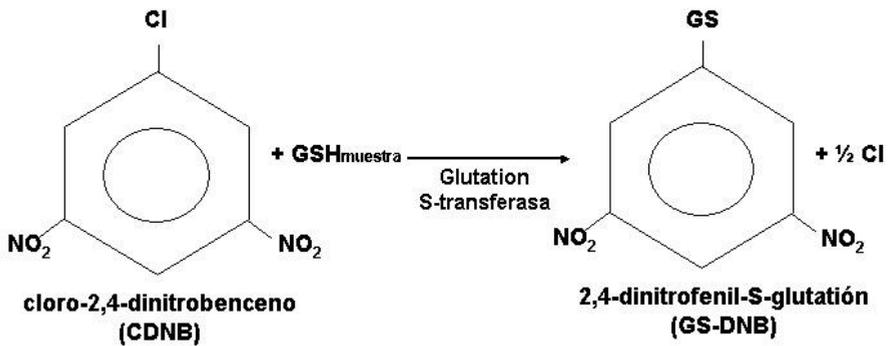


**Figura 10:** Histogramas donde se marcan las áreas correspondientes a las distintas fases del ciclo celular (G0/G1, S y M/G2). El histograma de la izquierda corresponde a una población control y el de la derecha a una población con una alta fracción de apoptosis (indicada en rojo).

#### 4.3.2.4. Determinación espectrofotométrica de la concentración de GSH en fibroblastos por medio de la reacción de la *glutación transferasa*.

El glutatión es el antioxidante celular más importante para el mantenimiento del estado redox (tioles/disulfidos) celular.

Se utilizó el método descrito por Brigelius (Brigelius *et al.*, 1983) que se basa en la determinación espectrofotométrica de la conjugación del GSH con el cloro-2,4-dinitrobenzono (CDNB). Esta reacción está catalizada por la glutatión S-transferasa (Figura 11). El aducto formado, 2,4-dinitrofenil-S-glutatión, presenta un máximo de absorción a 340nm.



**Figura 11:** Conjugación del GSH con el CDNB catalizado por la glutatión S-transferasa.

El protocolo seguido fue el siguiente:

1. Trabajando siempre sobre escamas de hielo, se eliminó el medio de cultivo y se lavaron las muestras 2 veces con 2 mL de PBS frío.
2. Para lisar las células se añadió a cada placa 100  $\mu$ L de PCA 6% en EDTA [0.2Mm].
3. Se raspó cada placa y se recogieron las muestras en tubos eppendorf.
4. La muestra se centrifugó a 15000rpm, durante 15 minutos, a 4°C.
5. Se extrajo y se midió el volumen de muestra ácida (sobrenadante) y se usó para la reacción enzimática.
6. Al precipitado se le agregó sosa [1N] (NaOH) en igual volumen al de la muestra ácida extraída (para la posterior determinación de proteínas) y se conservó a -20°C.

#### Determinación enzimática de GSH:

7. Se preparó CDNB a 2mg/mL en etanol absoluto.
8. Se preparó un tampón con KPI [0.2mM] + EDTA [2 mM], pH=7, atemperado a 24°C.

9. En una microcubeta se añadieron los siguientes reactivos:
  - 770  $\mu\text{L}$  del tampón preparado;
  - 80  $\mu\text{L}$  de la muestra ácida;
  - 10  $\mu\text{L}$  de CDNB.
10. Se realizó una primera medición espectrofotométrica a 340 nm (E1).
11. Se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de glutatión S-transferasa 500 U/mL en la microcubeta preparada con la muestra (esta solución se dializó previamente durante 6hs en tampón fosfato cambiando el tampón de diálisis cada 2hs).
12. Tras 45 minutos, se registró la variación de la absorbancia a 340nm (punto final de la reacción) E2. La diferencia E2-E1 es proporcional a la cantidad de GSH existente.

Cálculos:

Para calcular la concentración de GSH, se utilizó el coeficiente de absorción molar del 2,4-dinitrofenil-S-glutatión a 340nm:

$$\varepsilon = 9,6mM^{-1} * cm^{-1}$$

Para referenciar los niveles de GSH celular, según el número de células, se utilizó la siguiente ecuación:

$$\frac{\left( \frac{(A_{GSH\ Mtra} - A_{GSH\ Bco}) * VC}{\varepsilon} * VMA \right)}{N^{\circ} \text{ Células } (1 \times 10^6)} = \left[ \frac{\mu\text{mol GSH}}{1 \times 10^6 \text{ células}} \right]$$

Donde:

$A_{GSH\ Mtra}$  = Medida de absorbancia del GSH de la muestra (E2),

$A_{GSH\ Bco}$  = Medida de absorbancia del GSH blanco (E1),

$\varepsilon$ = Coeficiente de absorción molar del CDNB a 340nm,

VC= Volumen final en la cubeta,

VMAC= Volumen de muestra ácida añadido a la cubeta,

VMA= Volumen de muestra ácida obtenido,

Para referenciar los niveles de GSH celular, según la concentración de proteínas en [mg/mL], se utilizó la siguiente ecuación:

$$\frac{\left( \frac{A_{GSH\ Mtra} - A_{GSH\ Bco}}{\epsilon} * \frac{VC}{VMAC} * VMA \right)}{[mg\ proteina]} = \left[ \frac{\mu mol\ GSH}{mg\ proteina} \right]$$

Donde:

[mg proteína]= Concentración de proteína de la muestra en mg.

#### **4.3.2.5. Determinación de la concentración de proteínas por el método de Lowry.**

Se utilizó el "Total Protein Kit Micro Lowry" mencionado con anterioridad.

El procedimiento seguido fue

1. Previamente a la determinación de proteínas, se procedió a disolver el reactivo de Lowry en 40mL de H<sub>2</sub>O<sub>bidestilada</sub>.
2. Se recogió el precipitado de las muestras previamente centrifugadas, el cual contiene las proteínas al que se le había agregado sosa [1N] (NaOH) en igual volumen al de la muestra ácida extraída y que se conservó a -20°C hasta su utilización.
3. Se añadió la muestra (de 10 a 25 µL) a un tubo de ensayo y se completó con agua bidestilada hasta un volumen de 1mL.
4. Luego se preparó una recta patrón con seroalbúmina bovina (BSA) en cantidades comprendidas entre las concentraciones 0,01 y 0,1 mg/mL de igual forma que las muestras (10 a 25 µL y se completó con agua bidestilada hasta un volumen de 1mL).
5. Se preparó un blanco con 1mL de agua bidestilada.

6. Se añadió 1mL del reactivo de Lowry a cada tubo, se agitó vigorosamente y se incubó 20 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente.
7. Se añadieron 500 $\mu$ L del reactivo de Folin, se agitó vigorosamente y se incubó durante 30 minutos en oscuridad.
8. Se realizó una lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 660 nm.
9. Para calcular la concentración de proteínas, se resta a cada muestra la absorbancia del blanco y se valoran frente a la recta patrón construida con BSA, en cantidades comprendidas entre las concentraciones 0,01- 0,1 mg/mL.

#### **4.3.2.6. Determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno en fibroblastos por citometría de flujo.**

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular que permite la medición de la dispersión de la luz y la fluorescencia de células en suspensión que interfieren con una fuente de luz coherente. La intersección de cada célula con la luz láser provoca la emisión de una serie de señales luminosas que permite diferenciar poblaciones celulares de la muestra analizada, en función de su tamaño relativo, de la complejidad de sus membranas o bien por su reactividad con diversos fluorocromos. Este método permite analizar con rapidez un elevado número de muestras y proporciona datos cuantitativos y la posibilidad de análisis multiparamétricos en poblaciones celulares mediante un registro computarizado de los resultados (Darzynkiewicz *et al.*, 1999; Rieseberg *et al.*, 2001).

El estudio de las funciones biológicas de las especies reactivas del oxígeno (ROS), así como de sus efectos deletéreos, requiere de metodologías específicas y sensibles, especialmente si se intentan dilucidar los mecanismos relacionados con estos procesos (Tarpey *et al.*, 2004). Los marcadores fluorescentes son excelentes sensores de ROS debido a su alta sensibilidad y

por ser un sistema de captación de datos relativamente sencillo (Gomes *et al.*, 2005). La combinación de las técnicas de fluorescencia, mediante el uso de marcadores específicos, con la citometría de flujo constituye un método que permite la determinación de niveles celulares de ROS. Uno de los marcadores más utilizados para el estudio de los niveles de ROS celular es la dihidrorodamina, sobre todo aplicada al análisis por citometría de flujo.

Para la determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno por citometría de flujo se utilizó un marcaje con dihidrorodamina-123 (no fluorescente), cuya oxidación la transforma de rodamina (fluorescente) que puede ser cuantificada por Citometría de Flujo. El procedimiento utilizado fue el siguiente:

- Para recolectar las muestras, las placas se lavaron con PBS frío y se trataron con tripsina, recogiendo el medio en un tubo. Una vez despegadas las células, se recogieron con PBS.
- Las muestras se centrifugaron 5 minutos, a 1500 rpm y a temperatura ambiente.
- Se eliminó todo el sobrenadante, resuspendiendo cada muestra en PBS atemperado a una densidad de 400000 células/mL.
- Se añadió el fluorocromo (dihidrorodamina-123) a una concentración final de [1µg/mL].
- Posteriormente, se incubaron las muestras durante 30', a 37°C y protegidas de la luz.
- A continuación se analizaron las muestras por citometría de flujo. La adquisición de datos de las muestras se detuvo una vez analizados 11000 eventos.

#### **4.3.2.7. Determinación de anión superóxido mitocondrial por fluorimetría.**

Esta técnica analítica se realizó con el fluorocromo *Mitosox*, siguiendo el siguiente procedimiento:

- En placas de 24 pocillos, se sembraron los fibroblastos control y los fibroblastos Kindler, a una densidad de 20.000 células por cm<sup>2</sup>.
- El *Mitosox* se reconstituyó siguiendo las recomendaciones de la casa comercial y se agregaron 13µL de DMSO filtrado en 50µgr, a una concentración final de [5mM] (Molecular Probes información del producto).
- Se hizo una dilución 1:1000 en HBSS y se agregaron 500µL de solución por pocillo.
- Tras incubar las muestras durante 10 minutos a 37°C, se hicieron 3 lavados con HBSS a temperatura ambiente.

Finalmente se realizó la lectura de la fluorescencia mediante el Fluorímetro SpectraMax GeminiXS (Molecular Devices).

#### **4.3.2.8. Determinación de malondialdehído (MDA) por HPLC.**

El malondialdehído (MDA) es un indicador muy sensible y específico de la peroxidación lipídica, ya que los ácidos grasos peroxidados sufren un acortamiento de su cadena lateral liberando MDA. En el presente trabajo se ha seguido el método descrito por Young y colaboradores (Young *et al.*, 1991) para la determinación del MDA. Este método se basa en la hidrólisis de los lipoperóxidos presentes en la muestra y posterior formación de un aducto entre el ácido 2-tiobarbitúrico y el malondialdehído liberado (TBA-MDA<sub>2</sub>). Puesto que el ácido 2-tiobarbitúrico reacciona con distintos grupos carbonilos presentes en la muestra, además de con el malondialdehído, se realiza una separación por cromatografía líquida de alta eficacia ("High Performance Liquid Chromatography", HPLC) en fase reversa del aducto ácido 2-

tiobarbitúrico-malondialdehído del resto de las sustancias reaccionantes presentes en las muestras. Debido a que el malondialdehído proviene de los lipoperóxidos presentes en el medio y éstos se cuantifican según el aducto TBA-MDA<sub>2</sub>, sería más exacto referirse a los niveles de lipoperóxidos cuantificados como TBA-MDA<sub>2</sub> en lugar de niveles de MDA.

Para la determinación del MDA se ha seguido el siguiente procedimiento:

1. Por cada 50  $\mu\text{L}$  de muestra se añadieron 75  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  [0,44M] y 25  $\mu\text{L}$  de la solución de ácido 2-tiobarbitúrico. Se agitó, manteniéndolo 60 minutos en un baño a 95°C.
2. Luego se añadieron 150  $\mu\text{L}$  de solución neutralizante.
3. Se centrifugó a 10000g durante 5 minutos a 4°C y se inyectaron 50  $\mu\text{L}$  del sobrenadante obtenido en el HPLC.

Dado que el aducto ácido 2-tiobarbitúrico-malondialdehído es estable a pH neutro-básico por un máximo de 20 minutos, el protocolo debió realizarse con rapidez.

#### Técnica cromatográfica:

Todo el proceso se realizó a un flujo constante de 1mL/min. La elución del aducto TBA-MDA<sub>2</sub> se realizó en condiciones isocráticas, siendo la fase móvil una mezcla de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM pH=6,8 y acetonitrilo (70:30). El tiempo de retención del aducto TBA-MDA<sub>2</sub> fue de aproximadamente 5 minutos y el tiempo del cromatograma de unos 10 minutos. La detección del aducto TBA-MDA<sub>2</sub> se realizó con un detector ultravioleta visible a una longitud de onda de 532nm.

#### Cálculos:

El área del pico correspondiente al aducto TBA-MDA<sub>2</sub> se valoró frente a una recta patrón construida con MDA-bis. La construcción de la recta patrón incluyó un blanco y se realizó a partir de las siguientes soluciones de MDA-bis: 0.6  $\mu\text{M}$ ; 1.5  $\mu\text{M}$ ; 6.0  $\mu\text{M}$ ; 15.0  $\mu\text{M}$  y 60.0  $\mu\text{M}$ .

#### **4.3.2.9. Determinación del contenido mitocondrial por citometría de flujo.**

El citómetro de flujo permite analizar no sólo células en suspensión, sino que también se pueden analizar los orgánulos subcelulares. En función del fluorocromo utilizado, se pueden determinar diferentes orgánulos citoplasmáticos; en este caso se utilizó *Mitotracker Green* (MG) para identificar las mitocondrias, lo que permite obtener una cuantificación del contenido mitocondrial celular.

El procedimiento utilizado fue el siguiente:

1. El MG se reconstituyó en DMSO filtrado a una concentración final de [1mM], siguiendo las recomendaciones de la casa comercial (información del producto - Molecular Probes).
2. Las placas se lavaron con PBS y se trataron con tripsina. Una vez despegadas las células se recogieron con medio fresco en sendos tubos, uno para fibroblastos FN (control) y otro para fibroblastos FK.
3. Las muestras se centrifugaron 5 minutos, a 1500 rpm y a temperatura ambiente. Luego de eliminar el sobrenadante, los precipitados se resuspendieron en 1mL de PBS y se estimó la densidad celular.
4. Se trabajó con una alícuota de 400.000 células/mL PBS, que fue teñida con MG (Sigma) a una concentración final de [250nM], incubándolas a 37°C durante 30 minutos y protegidas de la luz.
5. Finalmente, se analizaron por citometría de flujo, utilizando el Citómetro EPICS ELITE; el ajuste de los parámetros utilizados se diseñó en la Unidad de Citometría de Flujo de la UCIM. El fluorocromo se excitó con un láser de argón a 488nm y la adquisición de las muestras se detuvo tras de pasar 15000 eventos.

#### **4.3.2.10. Determinación de la expresión de proteínas por *Western Blotting*.**

La transferencia de proteínas o "*blotting*" supone la inmovilización de proteínas sobre membranas sintéticas, seguido de la detección mediante sistemas especialmente diseñados para la tinción de "*blots*". El método más potente es el denominado "*Western Blot*" en el que las proteínas son separadas, en primer lugar, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y, posteriormente, se transfieren a una membrana mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular al gel.

Una proteína específica puede ser identificada y visualizada en un '*Western blot*' empleando técnicas de inmunodetección. Estas técnicas emplean la capacidad de reconocimiento de los anticuerpos a sus antígenos. En '*Western blot*' se emplea comúnmente el sistema de inmunodetección indirecta. En este método, se emplea un anticuerpo primario para localizar la proteína de interés. Un segundo anticuerpo, marcado con un enzima y contra la especie en la que se ha producido el primero, se emplea para localizar donde se formaron los complejos antígeno-anticuerpo. Este anticuerpo secundario se puede marcar de formas muy diversas con el fin de producir una señal detectable (por ejemplo, una señal sobre una película radiográfica o una mancha de color en el filtro).

En este trabajo, se ha utilizado la metodología de *Western Blotting* para analizar la expresión de actina y de otras proteínas asociadas al equilibrio redox:

-*tubulina*: control de carga

-*actina*: proteína globular componente del citoesqueleto de las células eucariotas

-*HSP 70*: integrante de la familia de "*Heat Shock Proteins*" o proteínas de choque térmico que aumentan su expresión en las células sometidas a estrés y ayudan a la célula a degradar las proteínas desnaturalizadas.

-*Mn SOD*: Integrante de la familia de las enzimas *superóxido-dismutasas* que catalizan la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno, constituyendo una importante defensa antioxidante. Se ubica en la matriz mitocondrial.

-*Cu/Zn SOD*: Integrante de la familia de las enzimas *superóxido-dismutasas* que se ubica en el citosol y el espacio intermembrana mitocondrial.

-*tiorredoxina*: familia de proteínas que participan en la reducción de los puentes disulfuro en proteínas sustrato.

-*catalasa*: enzima que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua.

-*glutación peroxidasa* (GPx1): interviene en la reducción del peróxido de hidrógeno mediante la oxidación del glutati6n produciendo GSSG y agua.

#### Procedimiento para la extracci6n total de prote6nas:

Trabajando siempre sobre hielo, se lavaron las placas con una soluci6n de PBS y ortovanadato, y luego se retiraron completamente todos los restos de medio y se utiliz6 un tamp6n de lisis TRIS/SDS/Glicerol:

- 83mL de TRIS (0,927gr: 100mL H<sub>2</sub>O<sub>bidestilada</sub> a pH= 6,8);
- 2gr SDS;
- 10mL de glicerol;
- Ortovanadato de sodio a una concentraci6n final de [200nM];
- Cocktail inhibidor de proteasas

Se utilizaron 80µL de tamp6n de lisis para la extracci6n de muestras de prote6nas totales.

- Luego se dejaron reposar durante 10 minutos sobre el hielo.
- Transcurrido el tiempo de incubaci6n, se rasparon con un "raspador de c6lulas" y se recogi6 cada muestra en tubos eppendorf.
- Las muestras recogidas se calentaron a 90°C durante 10 minutos.

- Por último, las muestras fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización.

Procedimiento para determinación de expresión de proteínas por electroforesis SDS/ PAGE:

El análisis de la expresión de proteínas se realizó mediante la técnica de *immunoblot*. Para ello, se utilizó la misma cantidad de proteínas en todas las muestras (10-15  $\mu\text{g}$ ). Previamente se prepararon los siguientes tampones y soluciones:

- TRIS pH=6.8;
  - TRIS pH= 8.8;
  - TRIS-glicina a pH= 8.3: TRIS [25mM], glicina [200mM], 0,1% SDS);
  - Tampón de transferencia a pH=8.3: TRIS [25mM]; glicina [192mM], metanol 20% v/v;
  - TBST: Tris/HCl [25 mM] a pH 7.5; NaCl [0.15M]; 0.05% (v/v) de Tween 20;
  - Solución de bloqueo: leche descremada comercial 5% (w/v) en TBST
- Las muestras se calentaron durante 5 minutos en *sample buffer* y luego se separaron mediante electroforesis SDS/PAGE.
  - Se utilizó un "*stacking gel*" de poliacridamina al 4% en una solución buffer de TRIS pH=6.8. Para la separación de las proteínas se utilizaron geles de 10-12% de poliacridamina con 0.1% de SDS, de acuerdo al protocolo estándar establecido por nuestro grupo, en tampón de TRIS pH= 8.8.
  - Los geles fueron sumergidos en un tampón de TRIS-glicina pH= 8.3 y se les aplicó una corriente eléctrica de voltaje constante (100V) durante, al menos, 2hr.
  - Luego de la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (poro de  $0.2\mu\text{m}$ ) durante 2hr a  $4^{\circ}\text{C}$  en un

tampón de transferencia de pH=8.3, para lo que se utilizó un sistema Mini-protean II (BioRad).

Para visualizar las proteínas se utilizó el siguiente protocolo:

- Bloqueo: Las membranas fueron incubadas en la solución de bloqueo durante 1hr a temperatura ambiente y sobre un agitador orbital;
- "*Immunostaining*": Las membranas se lavaron 3 veces por 5 minutos en TBST y luego fueron incubadas con los anticuerpos primarios diluidos en TBST: 5% de BSA a 4°C durante una noche. Cumplido el tiempo de incubación, las membranas se lavaron con TBST y se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario (conjugado con peroxidasa de rábano, Santa Cruz) durante 1hr a temperatura ambiente.

#### Detección:

Finalmente, se lavaron las membranas con TBST y, para la detección de proteínas, se utilizó un reactivo quimioluminiscente, siguiendo las especificaciones de la casa comercial (Cell Signaling Technologies). El revelado se realizó con una cámara CCD. También se utilizó un sistema alternativo de revelado consistente en colocar la membrana sobre un film fotográfico y exponerlo a la luz. Se obtiene así un revelado del bandeo correspondiente a la expresión de proteínas de la membrana. En ambos casos, las imágenes obtenidas se almacenaron en formato digital tipo Tif.

#### **4.3.2.11. Determinación de la expresión génica de proteínas por PCR.**

La RT-PCR o "Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real" es una técnica de amplificación del DNA que permite la cuantificación de la expresión génica de determinadas proteínas. En el presente trabajo, se ha estudiado la expresión génica de:

- hOGG1*: proteína implicada en la reparación del DNA alterado por estrés oxidativo

-*RAD 51*: proteína implicada en la reparación de la ruptura de la doble cadena de ADN.

-La glutamato-cisteín-ligasa (GCL): enzima que interviene en la biosíntesis del glutatión; está compuesta por dos subunidades:

-*GCLC*: es la subunidad catalizadora que lleva a cabo toda la actividad enzimática.

-*GCLM*: es la subunidad moduladora que aumenta la eficiencia catalítica de la GCLC.

-*Catalasa*.

-*Cu/Zn SOD*.

-*Mn SOD*.

-*GPX1*.

#### Obtención de las muestras:

- Se eliminó el medio de cultivo y se lavó la placa un par de veces con PBS.
- Se agregó tripsina para levantar las células y se recogieron en sendos tubos.
- Las muestras se centrifugaron a 4°C, a 1500 rpm durante 6 minutos.
- Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 1mL de PBS frío.
- Se realizó una nueva centrifugación.
- Por último, se eliminó el sobrenadante y el precipitado resultante se almacenó a -80°C hasta el momento de su utilización.

#### Obtención del RNA total:

Para la obtención del RNA total de cada muestra, se empleó el kit PARISTM (Ambion). Se emplearon los tampones provistos por el kit y se siguieron las indicaciones de la casa comercial.

- Se agregaron 250 $\mu$ L de "*Cell Disruption Buffer*" a cada muestra. De este volumen, se separaron 83 $\mu$ L para determinaciones de proteínas y los 167 $\mu$ L restantes se utilizaron para la extracción de RNA.
- A estas alícuotas se les agregó 167 $\mu$ L de "*Lysis Binding Solution*" con 2 $\mu$ -mercaptoetanol y mezcló mediante agitación vigorosa. Luego se les agregó 167 $\mu$ L de etanol 100% y se homogeneizó la solución nuevamente.
- Se colocó el volumen del preparado en columnas que se centrifugaron 1 minuto a 10000rpm. Se realizaron 3 lavados de estas columnas con las soluciones provistas por el kit y un último lavado con las columnas vacías para eliminar posibles restos de solución de lavado.
- Por último, se eluyó la muestra con "*Elution Buffer*" precalentado a 95°C y se dejó decantar entre 2-10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se recuperó el RNA de las muestras de acuerdo con las instrucciones del kit PARISTM (Ambion).

#### Cuantificación y comprobación de pureza del RNA:

La cuantificación y determinación de la pureza del RNA extraído se realizó mediante espectrofotometría, para lo cual se utilizó el espectrofotómetro GeneQuantPro (Amersham Bioscience) disponible en la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina. La comprobación de la pureza del RNA se hizo mediante la relación de las medidas  $\lambda=260\text{nm}$  y  $\lambda=280\text{nm}$ .

Para la determinación se utilizaron unos 3 $\mu$ L de muestra, recogidos con un capilar. Primero se realizó la medición del blanco y, seguidamente, se midió la absorbancia de cada una de las muestras extraídas, a  $\lambda=260\text{nm}$  y a  $\lambda=280\text{nm}$ . De esta forma, el software calcula automáticamente los valores correspondientes a la concentración del RNA extraído y el cociente entre las mediciones de absorbancia:

$$\frac{\lambda(260nm)}{\lambda(280nm)} \geq 2,0$$

Los valores iguales o superiores a 2.0 indican que el RNA obtenido es de buena calidad, puro y limpio de proteínas.

#### Protocolo de RT-PCR:

La reacción de RT-PCR se llevó a cabo en dos pasos. Primero se realizó la transcripción inversa, mediante la cual se obtuvo el cDNA. En el segundo paso, el cDNA sintetizado se amplificó mediante PCR. De esta forma, se evaluó la expresión relativa de los genes estudiados en el presente trabajo. Para ello, se utilizó la RT-PCR disponible en la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina (ABI 7900HT, Applied Biosystems).

Para la transcripción inversa, se utilizó el *High Capacity cDNA- Reverse Transcription Kit* (AB Applied Biosystems) y se siguieron las especificaciones de la casa comercial:

- Se preparó el master mix 2X.
- Se agregó master mix a cada muestra de RNA obtenido: se colocaron 10 $\mu$ L de master mix 2X por pocillo en una placa de 96 pocillos y se agregaron 250ngr RNA total en 10 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O libre de RNAsas, correspondiente a cada muestra extraída. Se centrifugó brevemente la placa.
- Se colocó la placa en el termociclador, siguiendo las indicaciones del producto (Tabla 6).

	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Temperature (°C)	25	37	85	4
Time	10 min	120 min	5 sec	∞

**Tabla 8:** Condiciones estipuladas para el termociclado.

La amplificación del cDNA sintetizado se llevó a cabo con el *kit TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems), lo que permite cuantificar el producto de la reacción de la PCR mediante el incremento de fluorescencia. La PCR se realizó en placas de 96 pocillos, donde se colocaron 2µL de cDNA. Se tomó, como control interno, el RNA de la proteína ribosomal 18S rRNA, dado que este RNA se expresa a un nivel constante en muchos tejidos y líneas celulares cultivadas en diferentes condiciones fisiológicas. Las condiciones de amplificación fueron:

2 minutos a 85°C, para conseguir un efecto "hot-start", 94°C durante 2 minutos y, a continuación, 94°C durante 45 segundos, 30 segundos a la temperatura de anillado y 68°C durante 1 minuto. Esto último se repite por 40 ciclos. Por último, existe un periodo de extensión final de 5 minutos a 72°C.

Para la cuantificación de las curvas de amplificación, se utilizó el programa *Sequence Detection System 9700* (Applied Biosystem). De esta manera, se obtuvo la expresión de los genes estudiados.

#### **4.3.2.12. Estudio de la distribución de las mitocondrias por microscopia confocal.**

Los colorantes fluorescentes usados para la tinción celular pueden ser detectados con ayuda del microscopio de fluorescencia. En estos microscopios, la luz incidente procedente de una fuente atraviesa un filtro que selecciona la longitud de onda capaz de excitar al fluorocromo. La luz emitida por la muestra (reflejada y fluorescente) atraviesa un segundo filtro que

selecciona la longitud de onda de emisión del fluorocromo. La microscopía de fluorescencia confocal posee un sistema óptico que no ilumina toda la preparación a la vez, sino que en cada momento sólo ilumina un pequeño punto a una cierta profundidad de la muestra. Este sistema cuenta con fuentes de iluminación de gran intensidad, generalmente haces láser, cuya luz pasa a través de un juego de diafragmas y de un sistema de captación de imagen electrónico, que permite la obtención de imágenes de finas secciones ópticas. La luz fluorescente emitida por el punto seleccionado es detectada, mientras que la que procede de otras regiones de la muestra queda fuera de foco en el diafragma y no se detecta. La imagen digital en un microscopio confocal se forma al almacenar, en una matriz numérica, las intensidades luminosas medidas en cada uno de los puntos del barrido. A partir de series de secciones ópticas de este tipo, obtenidas a diferentes profundidades, resulta posible reconstruir una imagen tridimensional de la muestra. De esta forma, se obtiene un aumento notable en la resolución, ya que reduce el blanqueado de la fluorescencia (Dailey *et al.*, 1999; Földes-Papp *et al.*, 2003; Ronneberger *et al.*, 2008).

Este sistema constituye una herramienta de gran utilidad para examinar estructuras subcelulares, como las mitocondrias, a través de la combinación con marcadores fluorescentes específicos. Las mitocondrias se organizan en filamentos y en redes mitocondriales resultantes de la actividad de procesos de fusión y fisión, y se encuentran en movimiento constante e interaccionando con otros orgánulos, como el núcleo, el retículo endoplasmático (Rizzuto *et al.*, 1998) o con otras mitocondrias. Durante su movimiento a través de los elementos del citoesqueleto (tales como la actina), se fusionan con otras mitocondrias formando filamentos, o éstas se disgregan produciendo mitocondrias aisladas, las cuales, a su vez, se dirigen en distintas direcciones para volverse a fusionar con otras mitocondrias (Krendel *et al.*, 1998).

En el presente trabajo, se utilizó la metodología de microscopía confocal para analizar la distribución de las mitocondrias (marcaje con *Mitotracker green*). El análisis de las muestras se realizó con el software provisto por el microscopio. La preparación de las muestras para este análisis se realizó mediante el siguiente procedimiento:

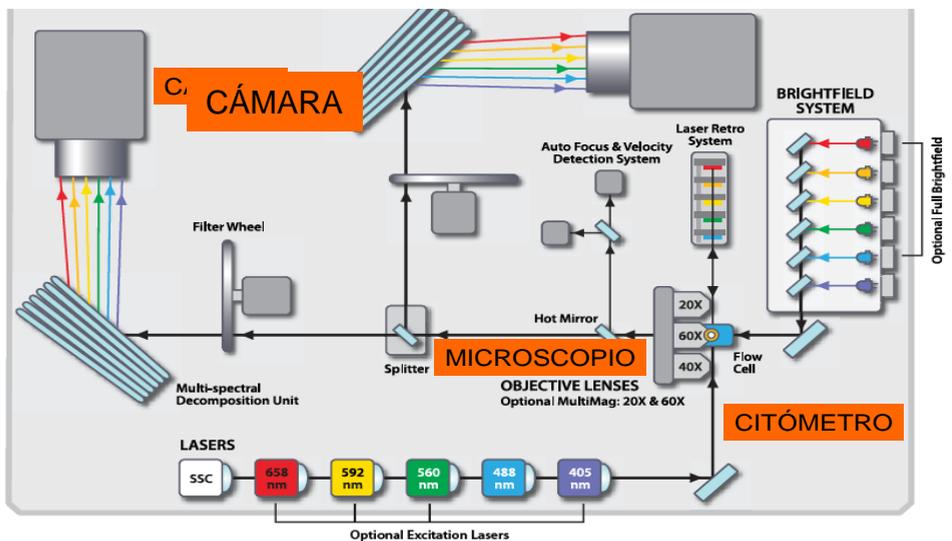
- Se reconstituyó el *Mitotracker* en DMSO filtrado a una concentración final de [1mM], siguiendo las recomendaciones de la casa comercial (Molecular Probes información del producto).
- Las células se sembraron en "*chamber slides*", placas diseñadas especialmente para microscopía confocal, con pocillos de 2cm<sup>2</sup> y se tiñeron con *Mitotracker* a una concentración final de [250nM].
- Se incubaron las muestras a 37°C durante 30 minutos y protegidas de la luz.
- Luego se agregó *Hoechst 33342* a una concentración final de [2µg/mL] y se incubó por 10 minutos más a 37°C y en condiciones de oscuridad.
- La disposición de las mitocondrias fue analizada por microscopia confocal.

#### **4.3.2.13. Estudio del potencial de membrana mitocondrial mediante Citometría de Imagen.**

La citometría de imagen es una nueva técnica analítica que cuenta con el poder visual de la microscopia de fluorescencia y el rigor estadístico de la citometría de flujo, combinados en una plataforma única (Figura 12). Esta combinación del análisis cuantitativo de imagen con la citometría de flujo tiene numerosas posibilidades experimentales. Mediante este nuevo sistema, es posible medir la cantidad y el movimiento de las moléculas en las células, localizar múltiples marcadores dentro o en la superficie de las células, cuantificar poblaciones morfológicamente distintas, etc. El AMNIS está acompañado por un software de análisis, específicamente diseñado para el

estudio de los datos obtenidos, que dispone de un amplio abanico de herramientas estadísticas.

En el presente trabajo, la plataforma *ImageStream* se ha usado para el estudio del nivel de potencial de membrana mitocondrial, mediante el teñido con el Fluorocromo JC1 (Molecular probes). Se ha medido el ratio entre los agregados definidos por la fluorescencia naranja, acumulados en las mitocondrias activas, y monómeros con fluorescencia verde. Además, mediante esta nueva tecnología, se obtuvieron 4 imágenes de cada célula analizada: "side scatter", imagen en campo claro, emisión verde y emisión naranja (1000 células por muestra). Usando el software IDEAS 3.0 proporcionado por el aparato, se analizaron las diferencias en la morfología y la distribución mitocondrial.



**Figura 12:** Esquema del AMNIS IMAGE STREAM

El procedimiento realizado para la obtención de datos fue el siguiente:

- El JC1 se disolvió a una concentración de [20µg/mL], se colocó una alícuota en un tubo y luego se agregó gota a gota medio de cultivo,

mientras se mantenía sobre el agitador a máxima velocidad, (Cossarizza *et al*, 2001).

- Para recolectar las muestras, las placas se lavaron con PBS frío y se trataron con tripsina, recogiendo el medio. Una vez despegadas, las células se recogieron con PBS.
- Las muestras se centrifugaron 5 minutos, a 1500 rpm y a temperatura ambiente.
- El precipitado se resuspendió en el medio y las células se contaron en una cámara Neubauer.
- Para la tinción, se utilizó una alícuota de 100000 células en 125 $\mu$ L, luego se agregaron 125 $\mu$ L de la solución de JC1 en el medio, siendo la concentración final de [3 $\mu$ g/mL].
- Las muestras se incubaron durante 30 minutos en oscuridad a 37°C.
- Luego se lavaron con PBS para eliminar restos del fluorocromo. La adquisición y el análisis de las muestras se realizó con en el citómetro AMNIS Image Stream.

#### Adquisición y análisis de las muestras:

Las muestras se han analizado mediante tecnología *Amnis Image stream*, un citómetro unido al microscopio de fluorescencia equipado con un láser de 488nm y CCD camera. Se han adquirido 1000 eventos por muestra caracterizados por 4 fotografías cada uno: "*Side Scatter*", transmisión, fluorescencia verde y fluorescencia naranja. La fluorescencia verde se ha captado en el canal 3 con un espectro de emisión entre 500-560nm, mientras que para la fluorescencia naranja se ha elegido el canal 4 con el espectro de emisión 560-595nm.

Como medida del nivel de potencial de membrana mitocondrial, se ha usado la ratio entre la intensidad media de la fluorescencia naranja, que representa la cantidad de agregados formados dentro de mitocondria, como la

consecuencia directa de su potencial de membrana, y la intensidad media de la fluorescencia media verde, que proviene de los monómeros del fluorocromo remanentes en el citosol. La intensidad media de la fluorescencia roja se obtuvo usando el "*feature*" (uno de los algoritmos diseñados para esta plataforma) corregido: Threshold (M4, Ch4, 30%) lo que permitió eliminar la interferencia de la fluorescencia verde (monómeros) al canal de emisión de los agregados.

#### **4.3.2.14. Análisis estadístico**

Se optó por un análisis no paramétrico de los datos, tras poner a prueba la normalidad de los mismos. Para ello, se utilizó el test para pares de muestras independientes de Mann-Whitney. En todos los casos, se trabajó con un nivel de significancia del 95% ( $p \leq 0.05$ ). Los valores representados son media y desviación estándar. Para cada determinación analítica se realizaron, al menos 3 experimentos.



## **5.- RESULTADOS**



## 5. RESULTADOS

Tal como se ha indicado, el objetivo del presente trabajo es determinar la implicación del estrés oxidativo en el Síndrome de Kindler (SK) a nivel celular.

Para llevar adelante este objetivo se han utilizado:

- Queratinocitos (QK1) y fibroblastos (FK1) de la piel de un paciente de sexo femenino de 6 años de edad con Síndrome de Kindler (Paciente 1)
- Queratinocitos (QN1) y fibroblastos (FN1) de la piel de un sujeto sano de sexo femenino y de 6 años de edad , que se han utilizado como control para QK1 y FK1.
- Queratinocitos (QK2) y fibroblastos (FK2) de la piel de un paciente de sexo femenino de 51 años de edad con Síndrome de Kindler (Paciente 2)
- Queratinocitos (QN2) y fibroblastos (FN2) de la piel de un sujeto sano de sexo femenino y de 50 años de edad , que se han utilizado como control para QK2 y FK2.

Los resultados que se exponen a continuación suponen la puesta a punto de una serie de pruebas analíticas que pretenden comprobar la existencia o ausencia de una alteración en el equilibrio redox de los fibroblastos y queratinocitos sometidos a estudio.

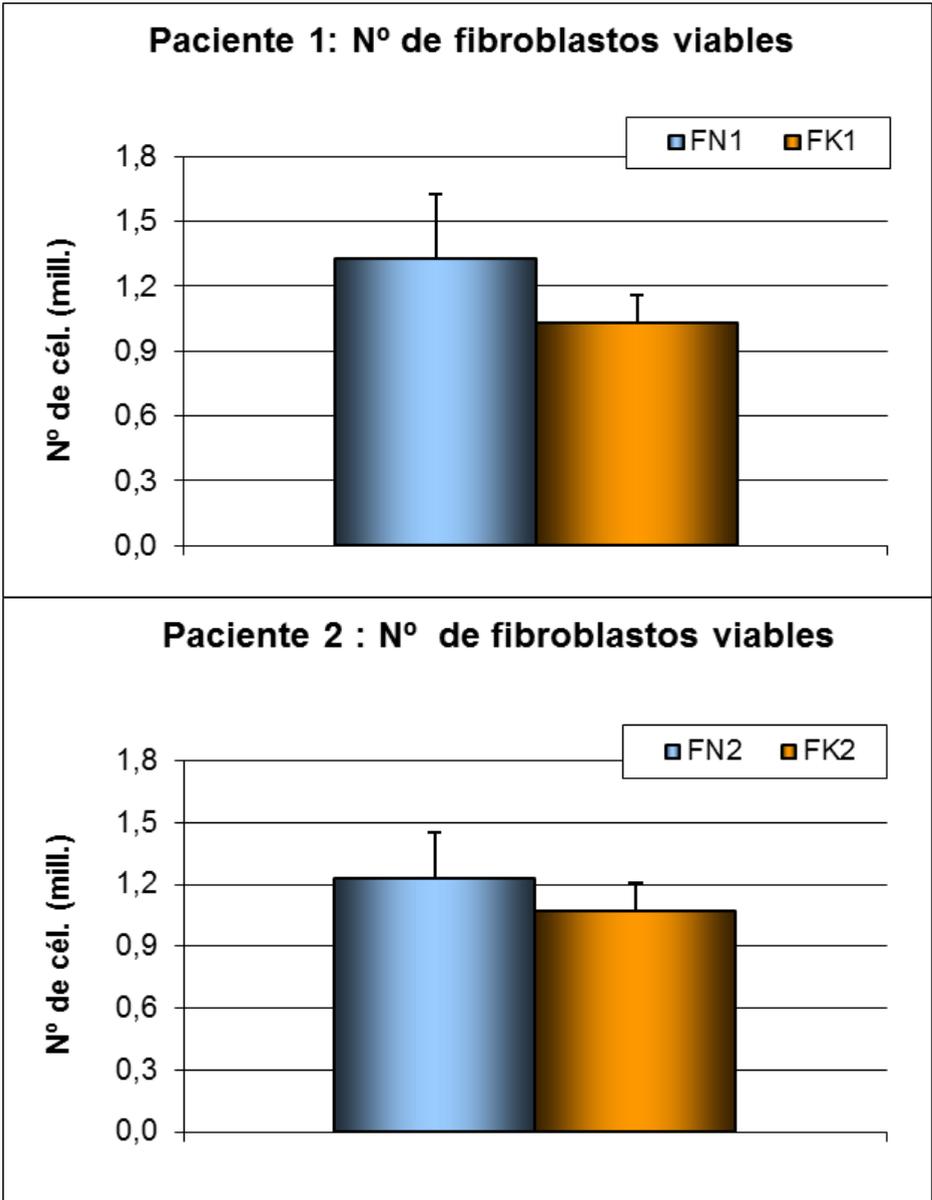
Los gráficos que a continuación se presentan muestran la media de los resultados obtenidos, y la barra situada encima de cada columna representa la desviación estándar. Cada experimento se ha repetido, al menos, 3 veces. Aquellos casos en los que las diferencias halladas entre las muestras control y las muestras procedentes de un paciente con SK son estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), se han marcado con un asterisco (\*).

**Limitaciones del estudio:** Es necesario señalar que este estudio sufre limitaciones relacionadas con la naturaleza del propio síndrome a estudiar. Como ya se indicó con anterioridad, el Síndrome de Kindler es una enfermedad rara de la que se han publicado no más de 150 casos en la literatura científica, por lo que resulta extraordinariamente difícil obtener muestras viables que permitan la obtención de resultados analíticos. Por otra parte, el cultivo de queratinocitos de enfermos con SK tiene complicaciones adicionales. Además de la variabilidad de las distintas líneas utilizadas, este cultivo se realizó sobre una matriz de fibroblastos. Esto genera un fondo potencial de mayor variación en los resultados, ya que trabajamos con dos líneas celulares distintas en la misma muestra. Los queratinocitos crecen con bastante dificultad, por lo que es necesario utilizar como "feeder" los fibroblastos, que aportan el microambiente necesario.

Por todo ello, y dada la baja disponibilidad de células y el bajo número de casos disponibles, no ha sido posible aplicar todas las técnicas analíticas planteadas a las muestras de queratinocitos.

### **5.1. El recuento de fibroblastos viables muestra una leve disminución en los fibroblastos de Kindler.**

El recuento de fibroblastos viables muestra una disminución del número de células en las muestras FK, respecto del control, tal como se puede apreciar en el Gráfico 1, tanto en el paciente 1 como en el paciente 2. Sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas en ninguno de los dos pacientes estudiados.

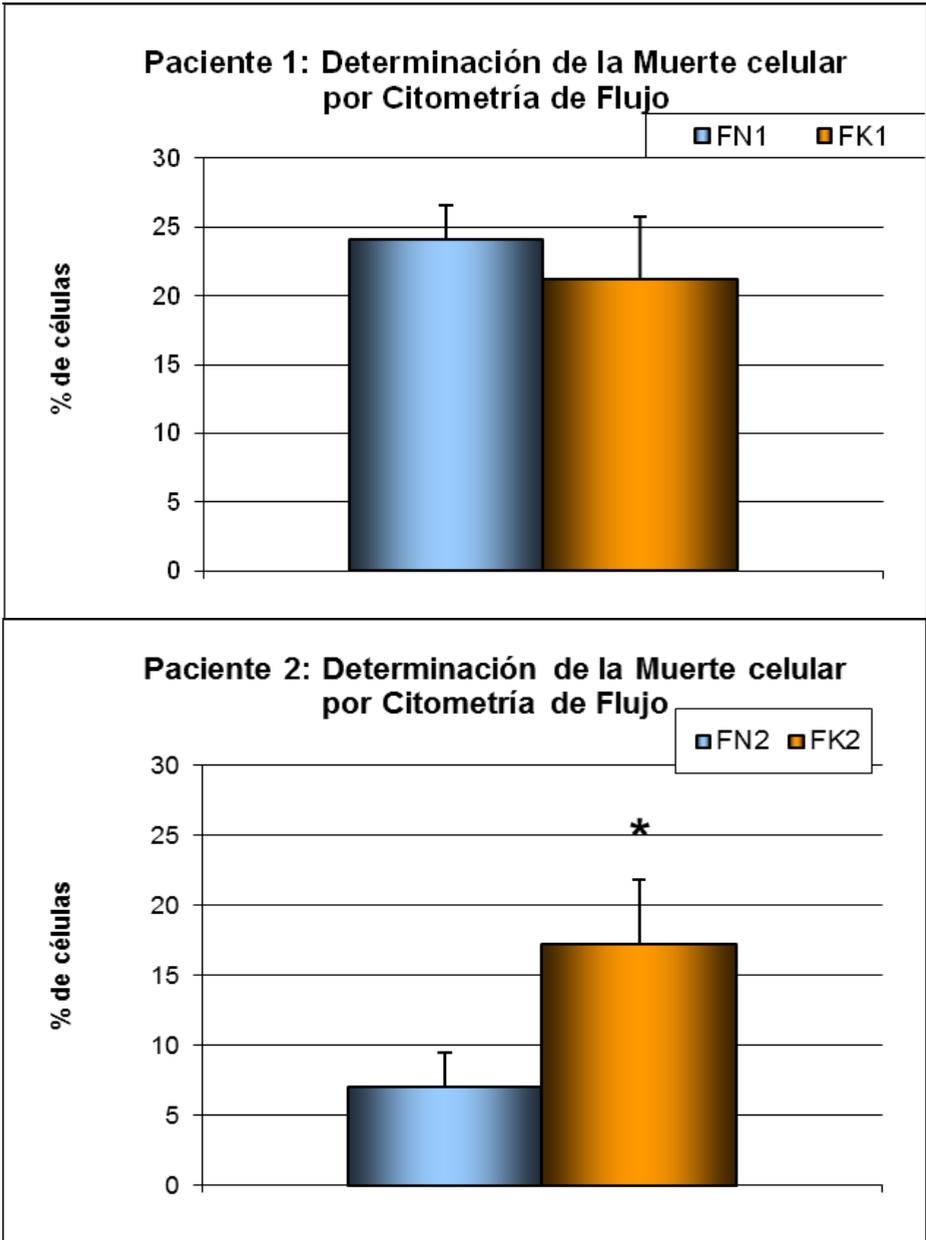


**Gráfico 1: Recuento de fibroblastos viables.**

La gráfica representa la media del resultado obtenido en 4 experimentos. Se muestra el número de fibroblastos hallados (en millones) en cada tipo celular FN (control) y FK (fibroblastos Kindler), tras 15 días de crecimiento. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas.

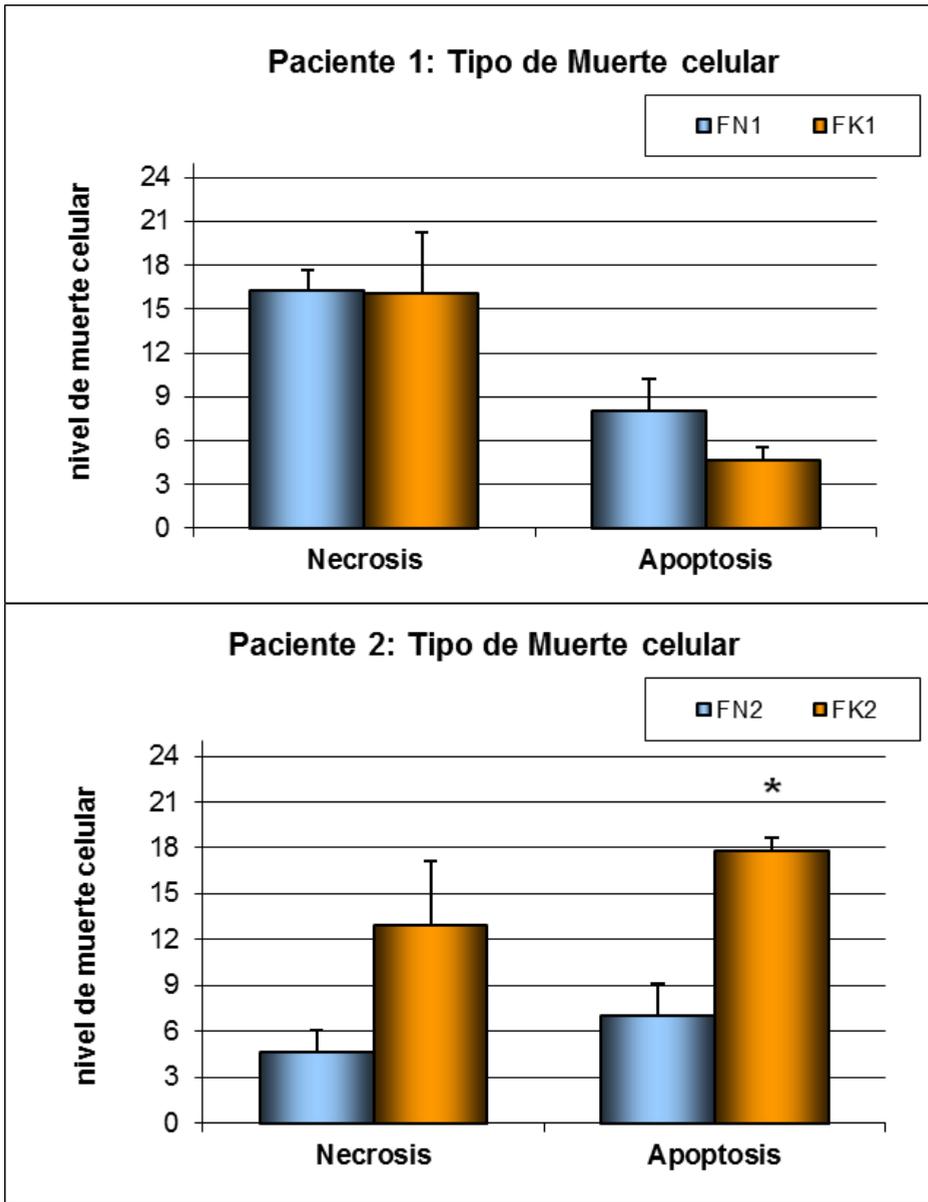
## **5.2. El estudio por Citometría de Flujo de la muerte celular de fibroblastos muestra diferencias significativas entre las muestras de Kindler y el control.**

En el gráfico 2, se muestran los resultados obtenidos del estudio del porcentaje de fibroblastos hallados en estado de muerte celular frente a los fibroblastos viables, encontrando diferencias significativas entre FN y FK, únicamente, en las muestras procedentes de la paciente 2 (mujer adulta), mientras que en la paciente 1 no se encuentran diferencias significativas. En el gráfico 3, se muestran los resultados del análisis del tipo de muerte celular, también por Citometría de Flujo, diferenciando la muerte por necrosis de la muerte por apoptosis y apreciando un incremento significativo de la muerte celular por apoptosis en la paciente 2.



**Gráfico 2: Muerte celular por citometría de flujo mediante el marcado con el fluorocromo Yoduro de Propidio.**

La gráfica representa la media, del resultado obtenido en 4 experimentos, del porcentaje de células en muerte celular. Se aprecia un aumento significativo en las muestras procedentes de la paciente 2.



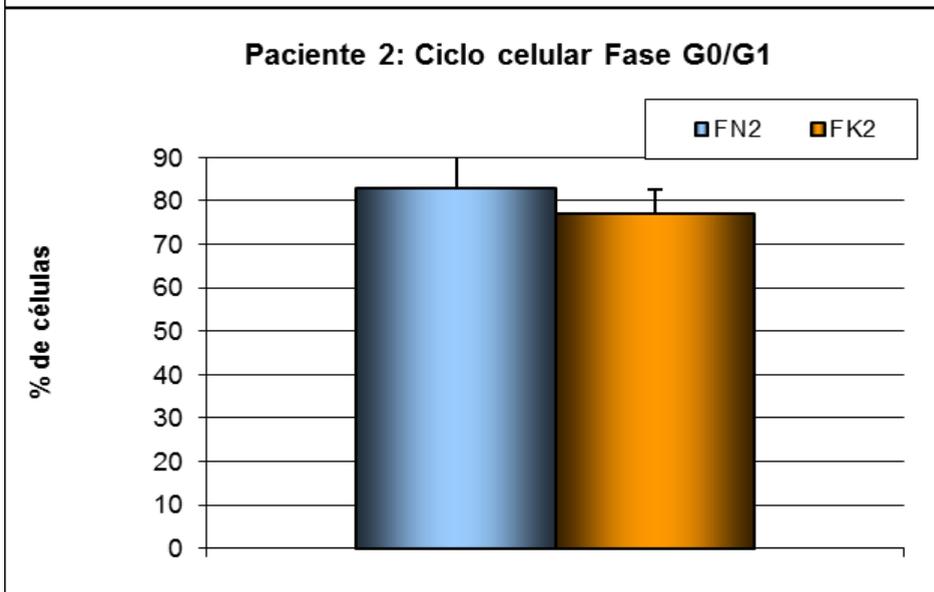
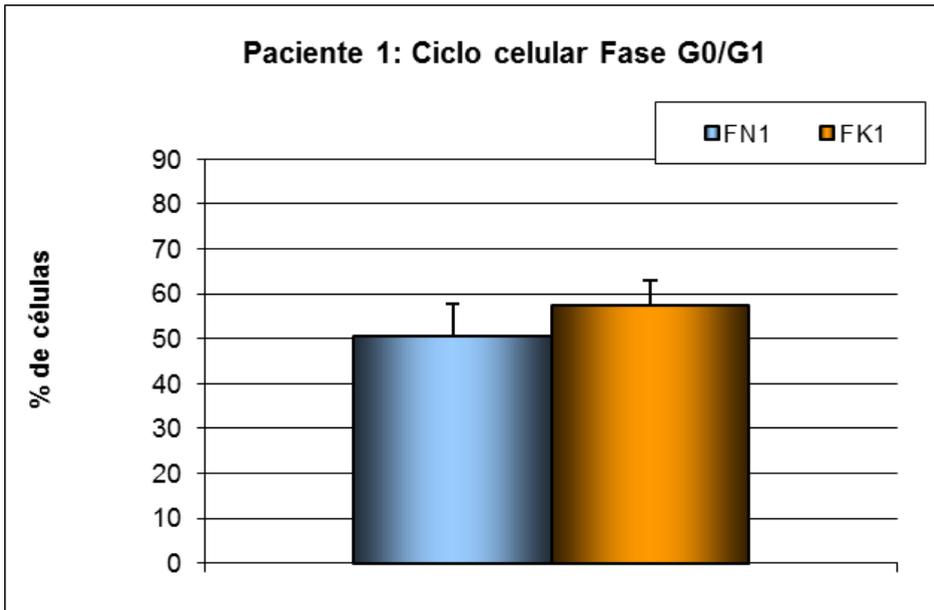
**Gráfico 3: Muerte celular por citometría de flujo mediante el marcado con el fluorocromo Yoduro de Propidio.**

Las gráficas representan la media, del resultado obtenido en 4 experimentos, del porcentaje de células según el tipo de muerte celular. Se aprecia un incremento significativo de la muerte celular por apoptosis en la paciente 2.

### **5.3. Las fases del ciclo celular presentan algunas diferencias significativas entre las muestras de Kindler y el control.**

El análisis del ciclo celular por citometría de flujo, mediante el marcado de las células con Yoduro de Propidio, muestra algunas diferencias estadísticamente significativas entre las células FN y las células FK, en algunas de las fases celulares estudiadas.

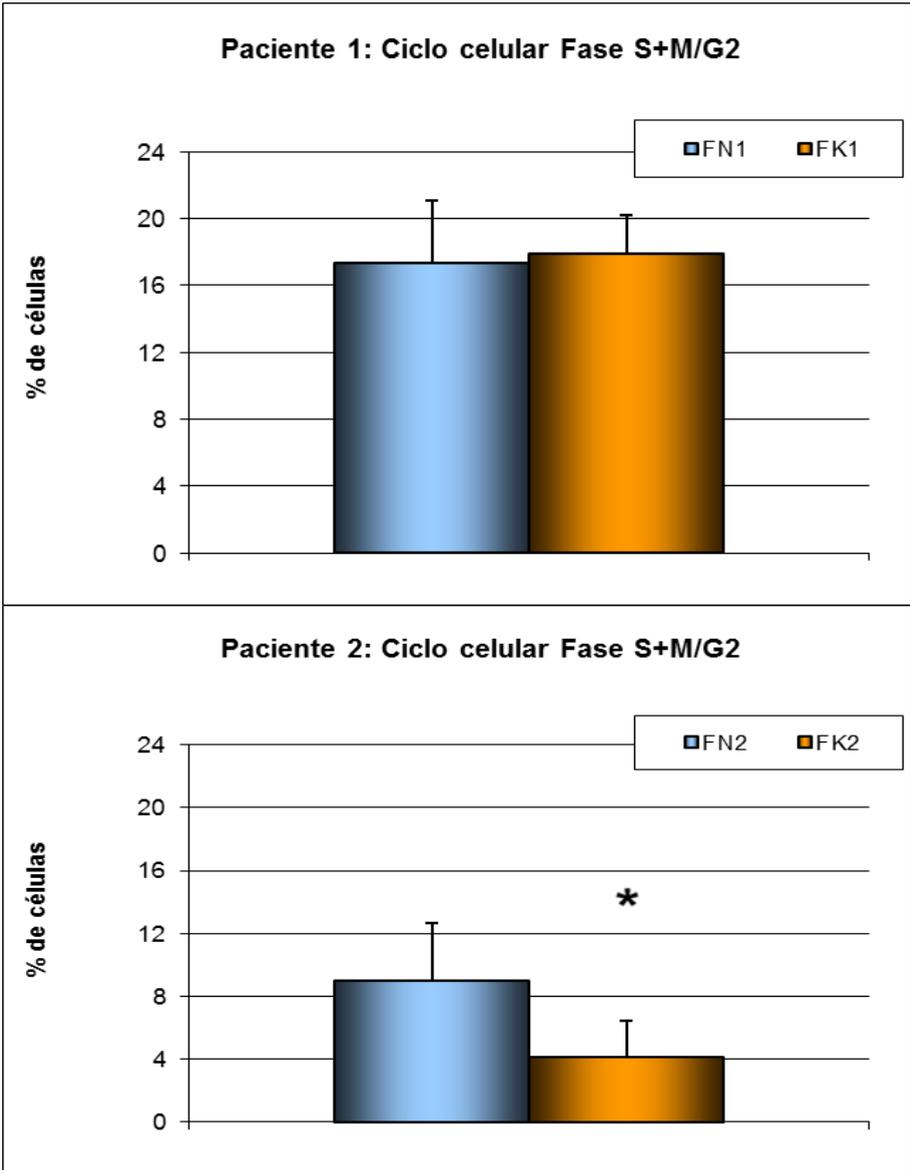
En el Gráfico 4, se muestran los resultados obtenidos para la fase G0/G1, en la que no se aprecian diferencias significativas entre FN y FK en las células de ninguna de las pacientes.



**Gráfico 4: Fase G0/G1 del Ciclo celular por citometría mediante el marcado con el fluorocromo Yoduro de Propidio.**

La gráfica representa la media, del resultado obtenido en 4 experimentos, del porcentaje de células en la fase G0/G1, obtenidos para la cepa FN y FK. No se aprecian diferencias significativas entre FN y FK.

En el Gráfico 5, se muestran los resultados obtenidos para las fases S+M/G2 (fases de proliferación celular). Se evidencia, en la paciente 2 (mujer adulta), una disminución del porcentaje de células en fase S+M/G2, tanto en las muestras control como en las muestras Kindler, siendo esta disminución, en la paciente (FK2), estadísticamente significativa respecto de los resultados en FN2.

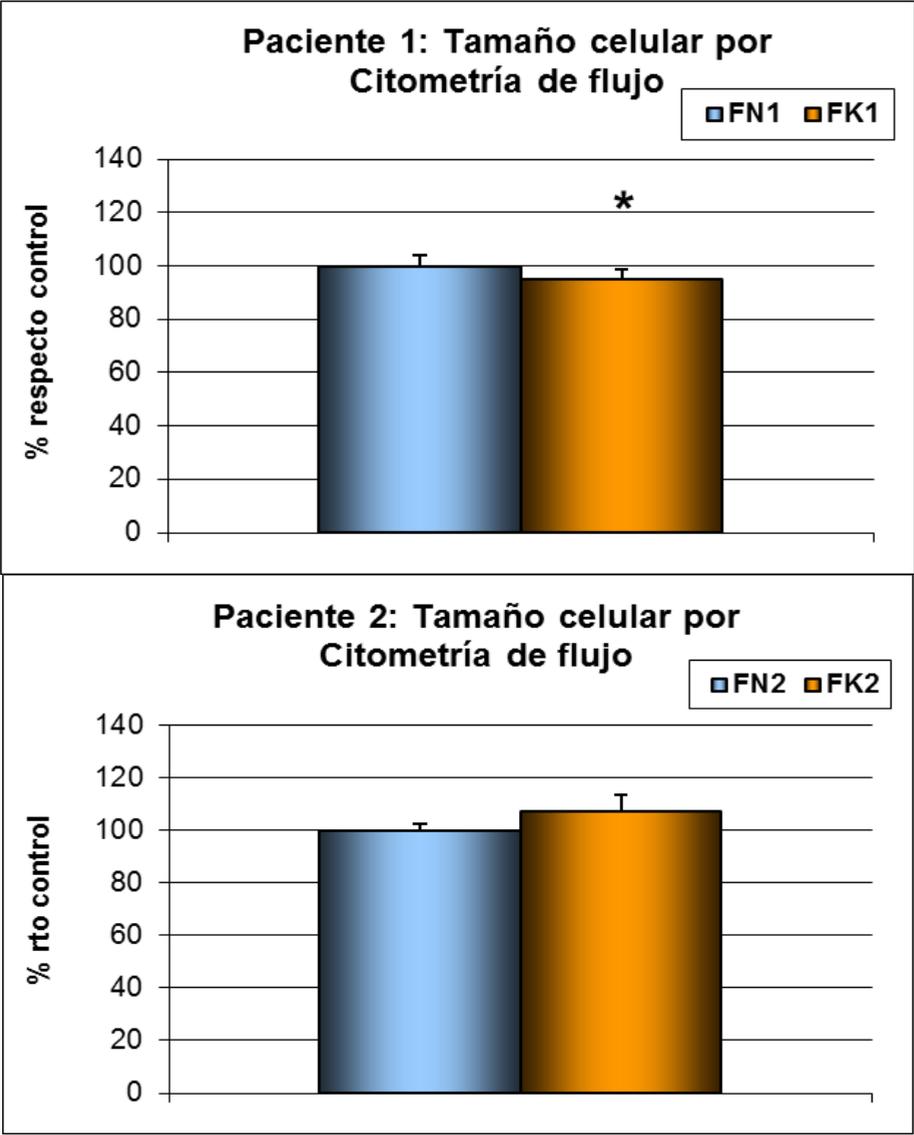


**Gráfico 5: Fase S+M/G2 del ciclo celular por citometría mediante el marcado con el fluorocromo Yoduro de Propidio.**

La gráfica representa la media, del resultado obtenido en 4 experimentos, del porcentaje de células en la fase S+M/G2, obtenidos para la cepa FN y FK. Se aprecia una disminución, estadísticamente significativa, en la paciente (FK2), respecto de los resultados en FN2.

#### **5.4. El tamaño y la complejidad celular por citometría de flujo muestra resultados poco determinantes en los fibroblastos Kindler respecto del control.**

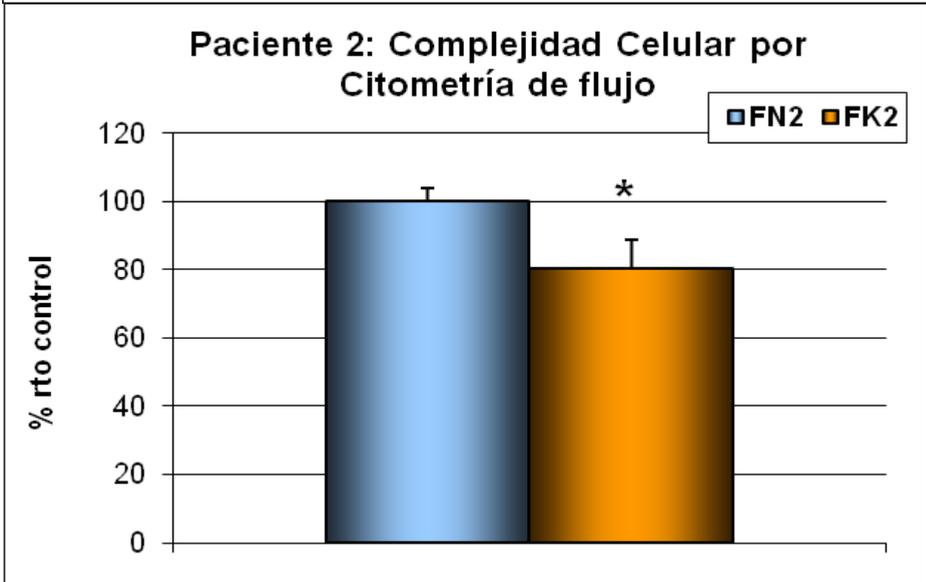
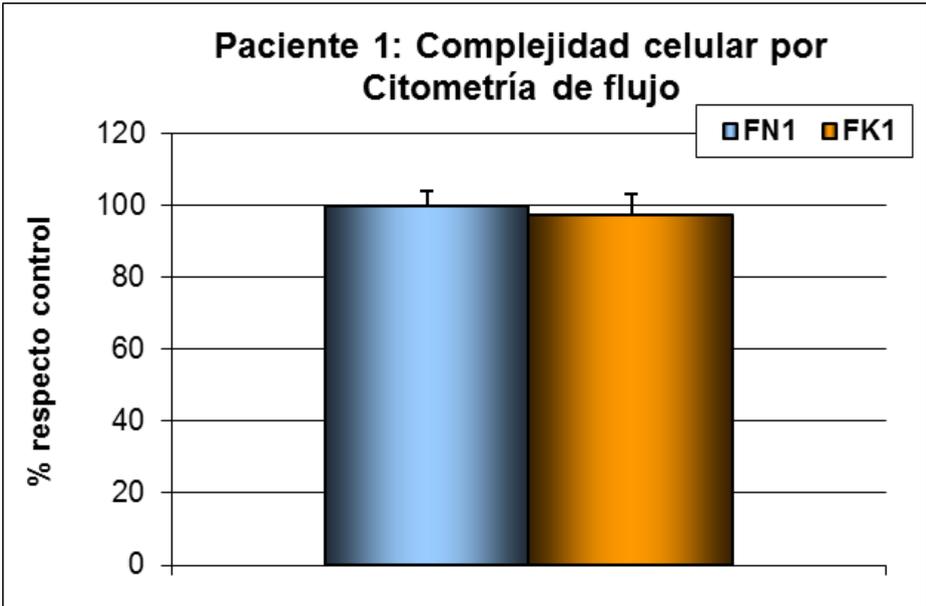
Los resultados obtenidos demuestran una disminución estadísticamente significativa (alrededor de un 10%) del tamaño celular en los fibroblastos FK respecto de los fibroblastos control (FN) en la paciente 1; sin embargo, la paciente 2 no muestra diferencias significativas (Gráfico 6).



**Gráfico 6: Tamaño celular por citometría**

La gráfica representa la media, del resultado obtenido en 4 experimentos, del porcentaje de cambio del tamaño de los fibroblastos FK respecto de las muestras control (FN), considerado como 100%. Se aprecia una disminución del tamaño celular en los fibroblastos FK respecto de los fibroblastos control (FN) en la paciente 1.

Por otra parte, la complejidad celular no muestra diferencias estadísticamente significativas en la paciente 1, pero sí las muestra, de manera evidente, en la paciente 2, con una disminución cercana al 20%. El Gráfico 7 representa el porcentaje de cambio de los FK con respecto a FN.

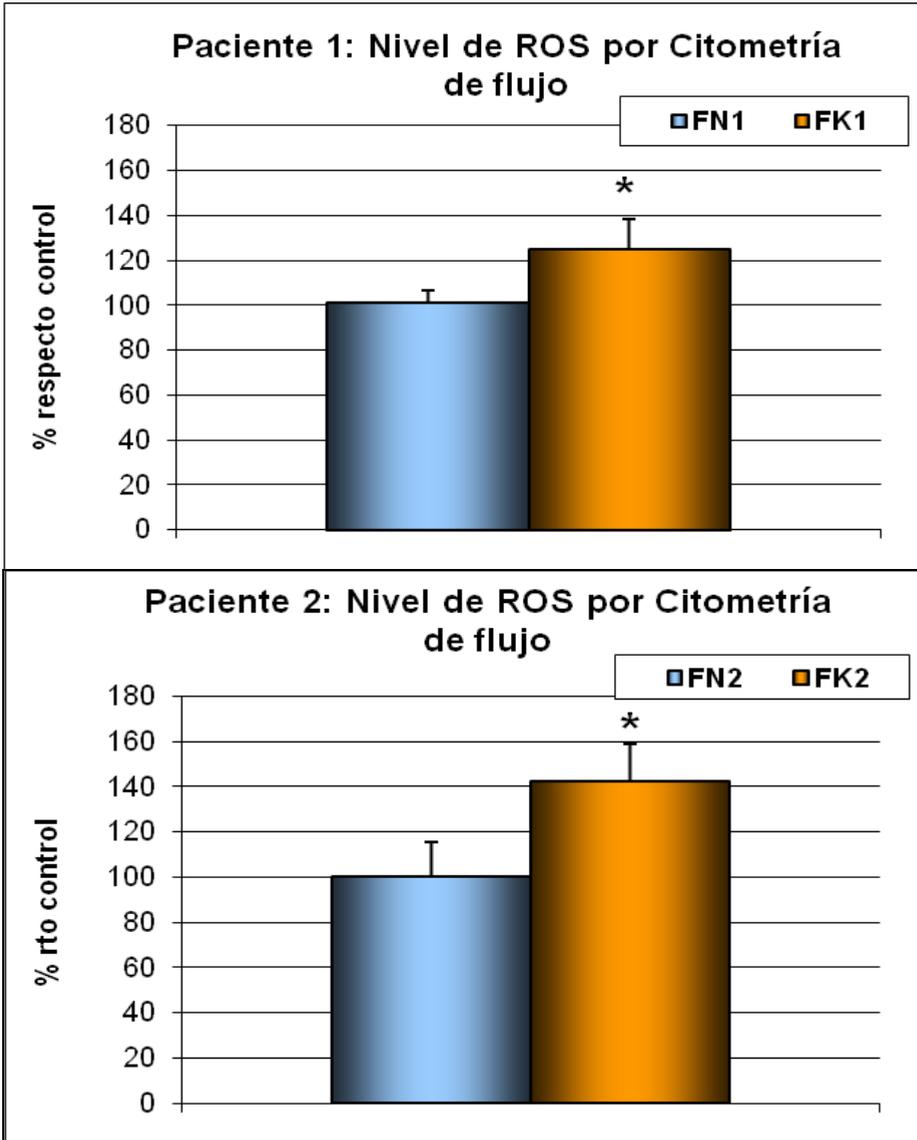


**Gráfico 7: Complejidad celular por citometría.**

La gráfica representa la media, del resultado obtenido en 4 experimentos, de la diferencia porcentual en la complejidad celular de los fibroblastos FK respecto de las muestras FN, considerado FN como 100%. Se aprecia una disminución del 20% (aprox.) en los FK de la paciente 2.

### **5.5. La determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno por citometría de flujo, mediante marcaje con dihidrorodamina, muestra un incremento significativo en las muestras FK.**

Los niveles de peróxido de hidrógeno (ROS) mostraron un incremento significativo en las muestras FK respecto del control, tanto en la paciente 1 como en la paciente 2. Se consideró al control como 100% y los valores en FK representan un incremento del 25% en la Paciente 1 y del 42% en la Paciente 2. El Gráfico 8 muestra los resultados.

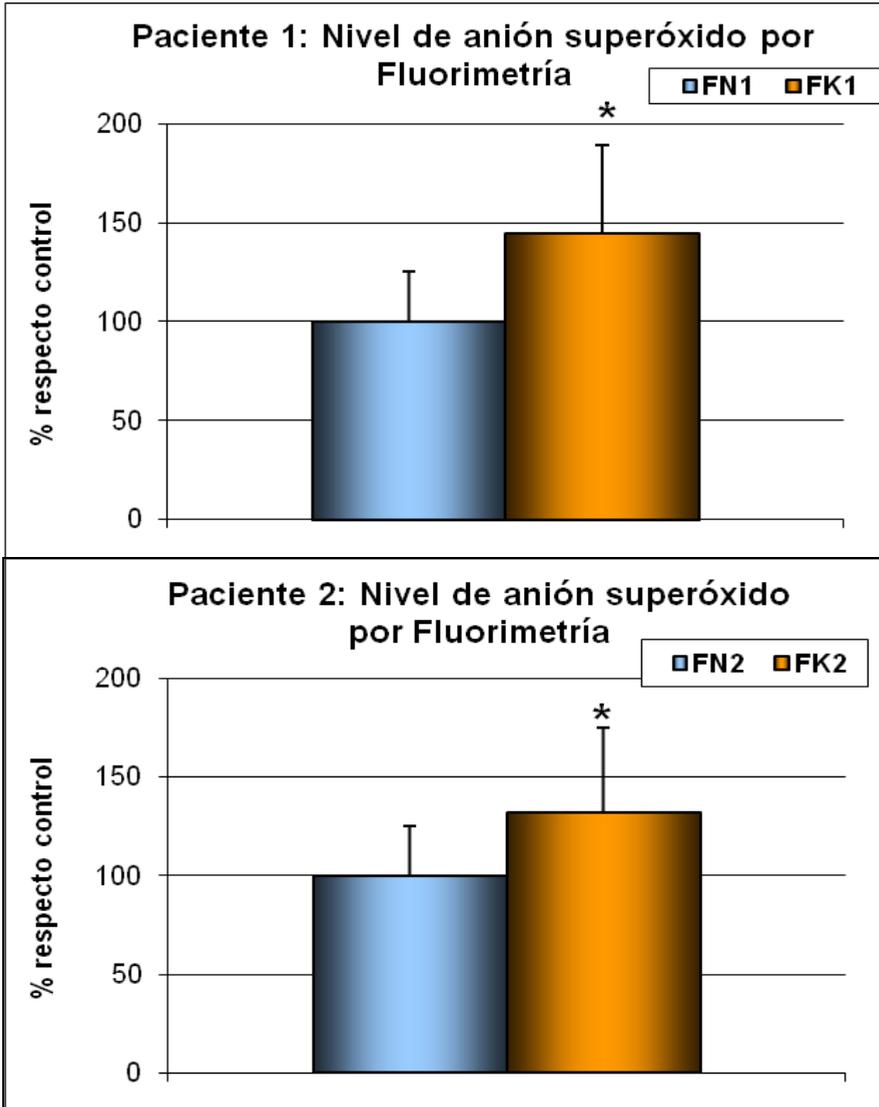


**Gráfico 8: Determinación de ROS por citometría mediante marcaje celular con dihidrorodamina.**

La gráfica representa la media, del resultado obtenido en 4 experimentos, de los niveles de ROS en FK expresado como el porcentaje respecto de las muestras control (FN). Se aprecia un aumento significativo de los niveles de ROS tanto en la paciente 1 como en la paciente 2.

### **5.6. La determinación por fluorimetría del anión superóxido, mediante marcado con *Mitoxox*, muestra niveles significativamente incrementados en las muestras FK.**

La determinación fluorimétrica, mediante marcaje celular con *Mitoxox*, de la concentración de anión superóxido, mostró niveles significativamente incrementados en las muestras FK, tanto en la paciente 1 como en la paciente 2. El Gráfico 9 muestra los resultados obtenidos, donde FK presenta un incremento de casi un 50% respecto del control (se consideró el control como 100%) en la paciente 1, y de un 30% en la paciente 2.

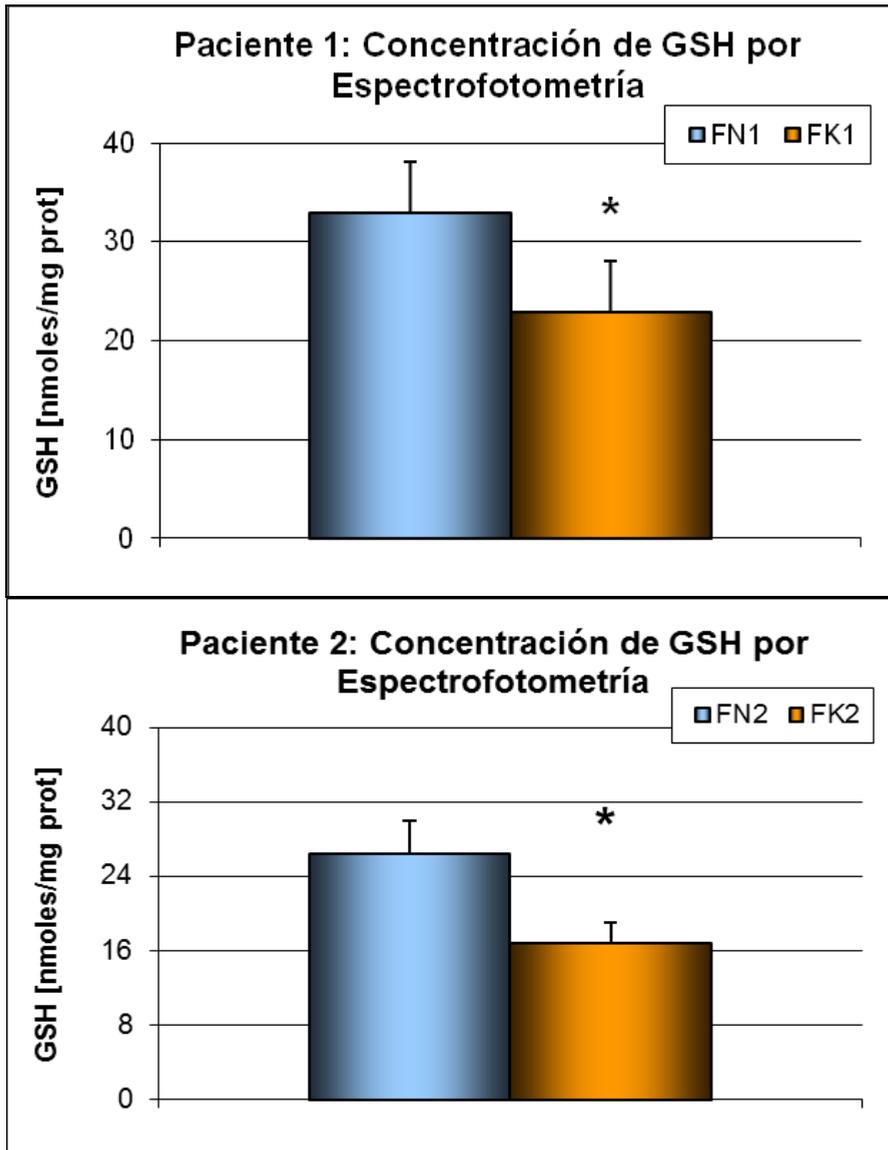


**Gráfico 9: Determinación de Anión Superóxido por fluorimetría y marcaje con MitoSox.**

La gráfica representa la media del resultado obtenido en 4 experimentos y muestra el porcentaje de los niveles de anión superóxido en FK respecto de las muestras control (FN). Se aprecia un incremento de casi un 50% respecto del control en la paciente 1, y de un 30% en la paciente 2.

### **5.7. La determinación espectrofotométrica de la concentración de GSH muestra unos valores significativamente reducidos en las muestras FK.**

La determinación espectrofotométrica de la concentración de GSH, mediante su reacción con la glutatión-s-transferasa, mostró niveles reducidos estadísticamente significativos, de alrededor del 30%, en las muestras FK en relación a los valores obtenidos para el control (FN), tanto en la paciente 1 como en la paciente 2. El Gráfico 10 muestra las concentraciones obtenidas de GSH expresadas como [nmoles/mg de proteína].

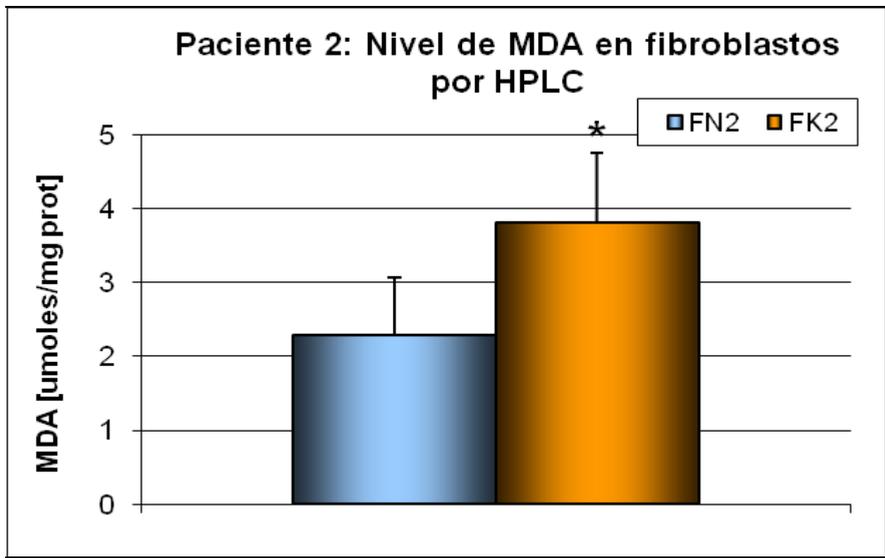
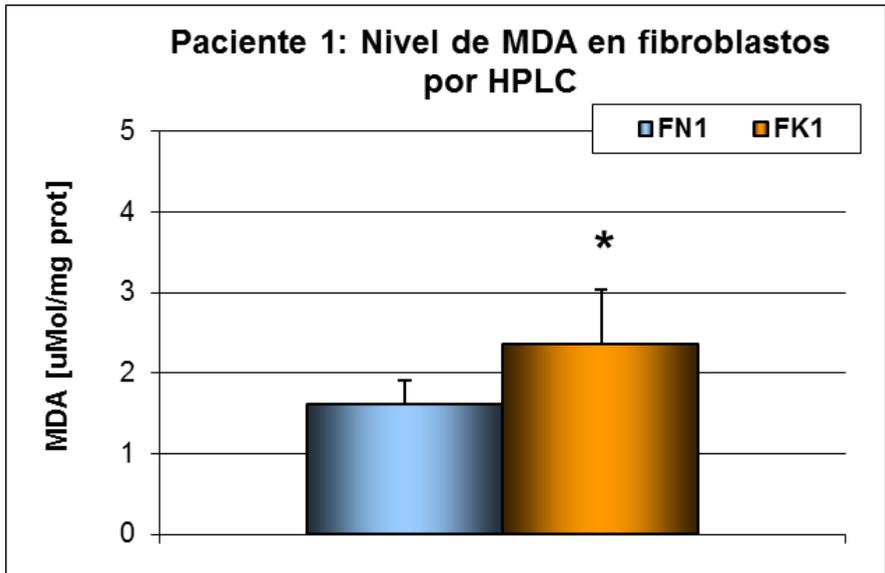


**Gráfico 10: Determinación espectrofotométrica de la concentración celular de GSH, mediante su reacción con la glutatión-s-transferasa.**

La gráfica representa la media, del resultado obtenido en 4 experimentos, de los niveles de GSH celular en [nmoles/mg proteína]. Se aprecian niveles reducidos, de alrededor del 30%, en las muestras FK en relación a los valores obtenidos para el control (FN), tanto en la paciente 1 como en la paciente 2.

### **5.8. Los niveles de Malondialdehído (MDA) determinados por HPLC están significativamente incrementados en FK.**

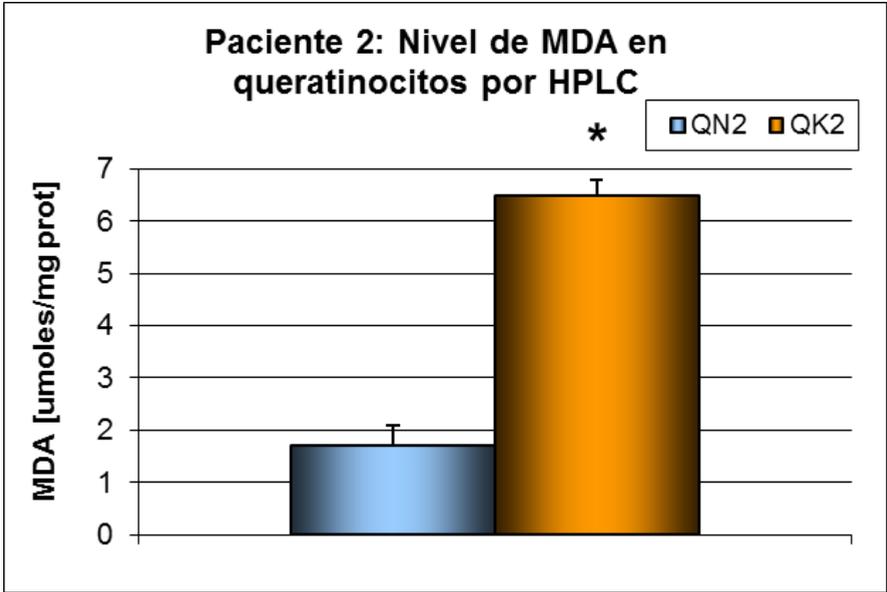
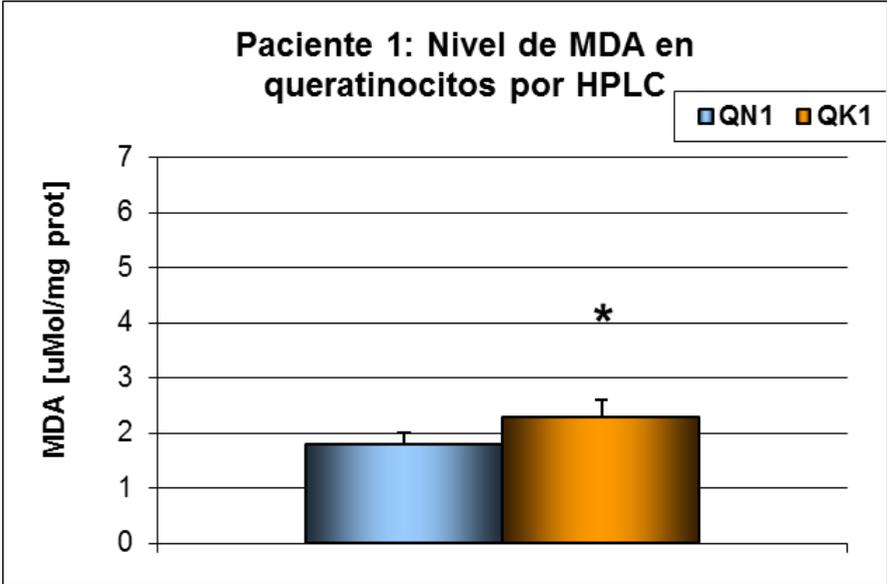
La determinación por HPLC de MDA en fibroblastos mostró un incremento estadísticamente significativo en las muestras FK con respecto al control. Este incremento ha sido del 33% en la paciente 1 y del 45% en la paciente 2. El Gráfico 11 muestra las concentraciones de MDA en [ $\mu$ M/mg] de proteína, en las que se aprecia el incremento mencionado, más pronunciado en la paciente 2.



**Gráfico 11: Determinación cromatográfica de MDA en fibroblastos.**

La gráfica representa la media, del resultado obtenido en 4 experimentos, de los niveles de MDA en [uMoles/mg proteína], en fibroblastos Kindler (FK) y control (FN). Se aprecia un incremento en las muestras FK con respecto al control, del 33% en la paciente 1 y del 45% en la paciente 2.

También se sometieron a esta determinación analítica las muestras de queratinocitos, cuyos resultados mostraron que, también en estas células, se evidenciaba un incremento estadísticamente significativo en las muestras QK con respecto al control (QN). El incremento ha sido del 21% en la paciente 1 y de más del 350 % en la paciente 2. El Gráfico 12 muestra las concentraciones de MDA en [uM/mg] de proteína, en las que se aprecia el incremento mencionado, más pronunciado en la paciente 2.

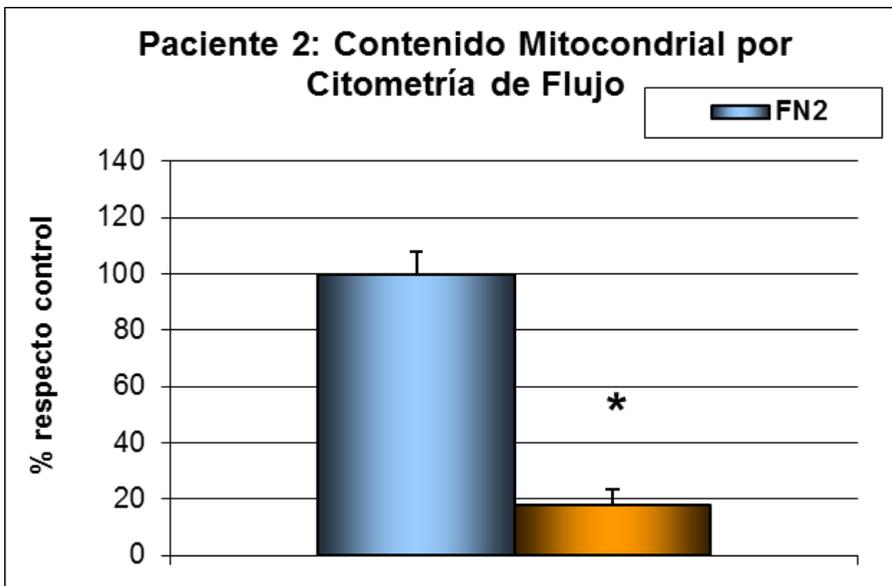
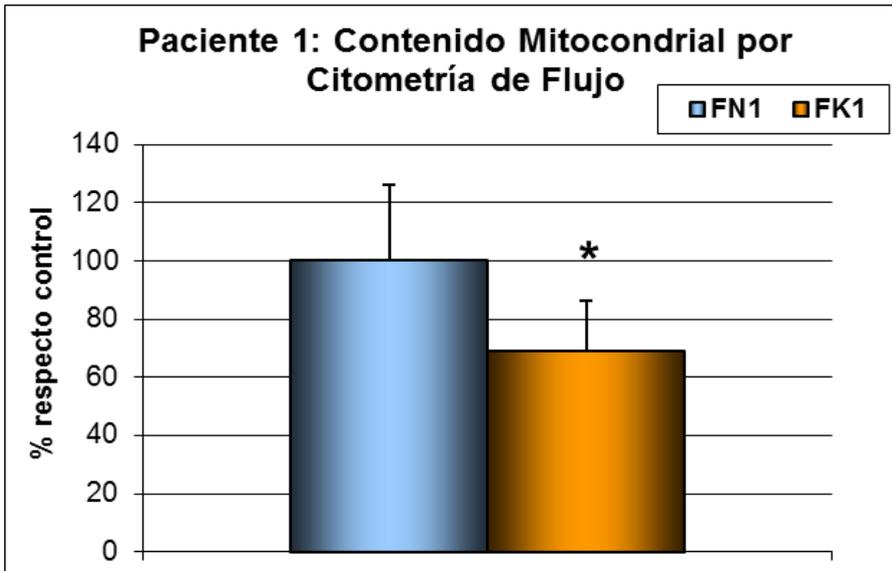


**Gráfico 12: Determinación cromatográfica de MDA en queratinocitos.**

La gráfica representa la media, del resultado obtenido en 3 experimentos, de los niveles de MDA en [uMoles/mg proteína], en queratinocitos Kindler (QK) y control (QN). Se aprecia un incremento en las muestras QK con respecto al control (QN). El incremento ha sido del 21% en la paciente 1 y de más del 350 % en la paciente 2.

**5.9. La masa mitocondrial analizada por citometría de flujo mediante marcaje con “*mitotracker green*” muestra una disminución estadísticamente significativa en los fibroblastos Kindler.**

Los resultados hallados en la determinación del contenido mitocondrial (masa mitocondrial) muestran una significativa disminución del nivel de fluorescencia del *Mitotracker green*, detectado mediante Citometría de flujo, en los fibroblastos FK, que representa una media de un 30% de reducción respecto a la masa mitocondrial obtenida para FN (considerada como el 100%) para la paciente 1, y de un 80% para la paciente 2. El Gráfico 13 muestra los datos obtenidos de masa mitocondrial para ambas cepas.



**Gráfico 13: Contenido mitocondrial por citometría de flujo mediante marcado con Mitotracker green.**

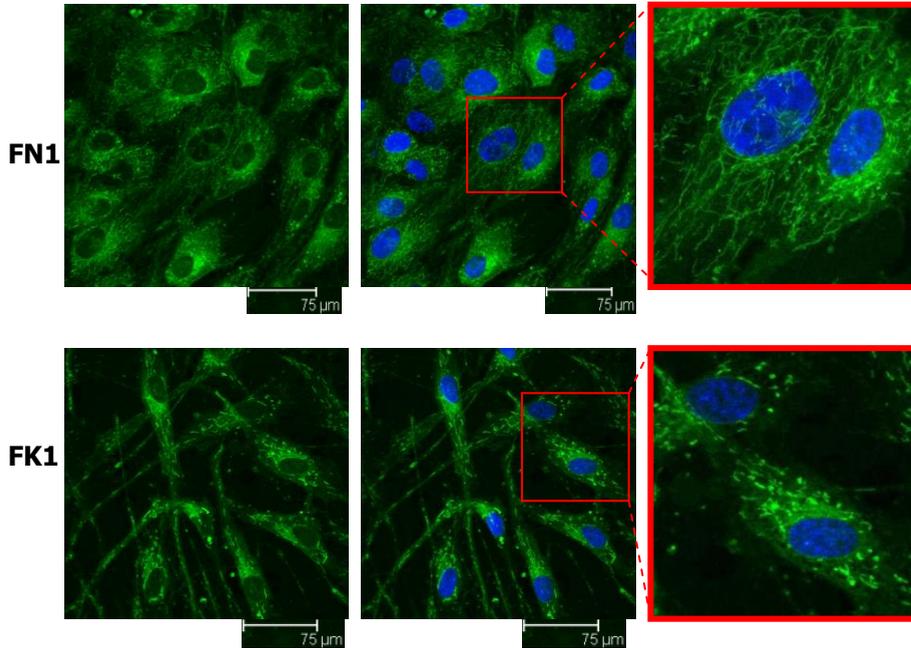
La gráfica representa la media, del resultado obtenido en 3 experimentos, del porcentaje de masa mitocondrial en los fibroblastos FK respecto de FN (control). Se aprecia una disminución del nivel de fluorescencia del *Mitotracker green*, en los fibroblastos FK, de un 30% para la paciente 1, y de un 80% para la paciente 2.

### **5.10. El análisis de las mitocondrias por microscopia confocal muestra diferencias en morfología y distribución entre los fibroblastos SK y los fibroblastos control, así como entre los queratinocitos QK y los queratinocitos control**

El análisis de la distribución y morfología mitocondrial de los fibroblastos y queratinocitos se realizó, mediante microscopía confocal, utilizando los fluorocromos *Mitotracker green* y *Hoechst 33342*. En las Figuras 13 y 14, se muestran imágenes representativas de fibroblastos de la paciente 1 y de la paciente 2, respectivamente, obtenidas a partir de tres experimentos independientes donde, en la primera columna se pueden ver las mitocondrias teñidas de verde mediante *Mitotracker green*, y en la segunda columna se muestra una imagen donde se superpone la tinción de las mitocondrias (verde) y los núcleos, teñidos de azul mediante el *Hoechst 33342*. La última columna corresponde al detalle de la zona marcado en rojo en la imagen superpuesta (zoom).

En los fibroblastos control, las mitocondrias muestran una distribución en filamentos formando una red distribuida por todo el citoplasma celular de una manera homogénea (fila superior de imágenes Figuras 13 y 14). Por su parte, los fibroblastos Kindler muestran una distribución mitocondrial más compacta, en la que se aprecia una morfología mitocondrial más densa; las mitocondrias parecen estar agregadas y más compactas, con una aparente merma de la homogeneidad de la red mitocondrial (fila inferior en las Figuras 13 y 14).

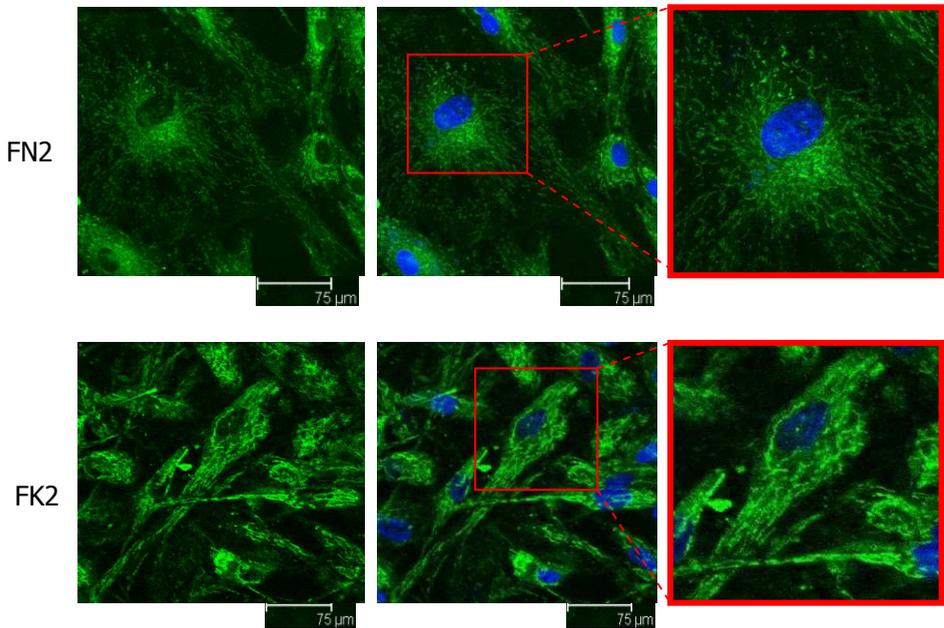
## PACIENTE 1



**Figura 13: Análisis por microscopía confocal de mitocondrias en fibroblastos control y Kindler de la Paciente 1, marcados con *Mitotracker green* y *Hoechst 33342***

Se muestran imágenes representativas de 3 experimentos. La primera fila corresponde a los fibroblastos control y la segunda a los fibroblastos Kindler. Se puede ver en la primera columna las mitocondrias marcadas en verde con *Mitotracker green*, en la segunda columna una imagen superpuesta de las mitocondrias y los núcleos marcados en azul con *Hoechst 33342*, y en la última columna se muestra un detalle de la imagen superpuesta (zoom).

## PACIENTE 2



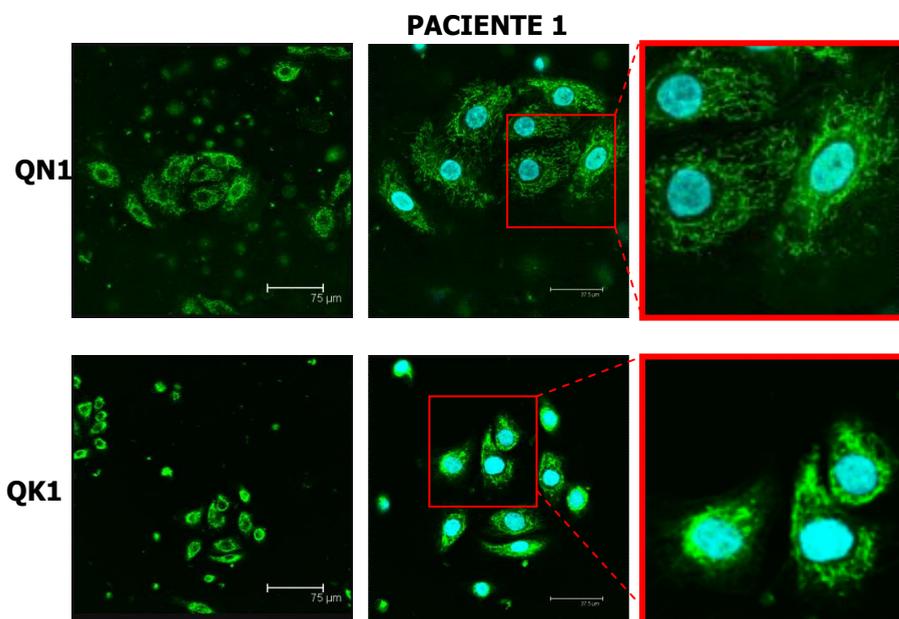
**Figura 14: Análisis por microscopía confocal de mitocondrias en fibroblastos control y Kindler de la Paciente 2, marcados con *Mitotracker green* y *Hoechst 33342***

Se muestran imágenes representativas de 3 experimentos. La primera fila corresponde a los fibroblastos control y la segunda a los fibroblastos Kindler. Se puede ver en la primera columna las mitocondrias marcadas en verde con *Mitotracker green*, en la segunda columna una imagen superpuesta de las mitocondrias y los núcleos marcados en azul con *Hoechst 33342*, y en la última columna se muestra un detalle de la imagen superpuesta (zoom).

En las Figura 15 y 16 se muestran imágenes representativas de queratinocitos de la paciente 1 y de la paciente 2, respectivamente, obtenidas a partir de tres experimentos independientes donde, en la primera columna se pueden ver las mitocondrias teñidas de verde mediante *Mitotracker green*, en la

segunda columna se muestra una imagen donde se superpone la tinción de las mitocondrias (verde) y los núcleos, teñidos de azul mediante el *Hoechst 33342*. La última columna corresponde al detalle de la zona marcado en rojo en la imagen superpuesta (zoom).

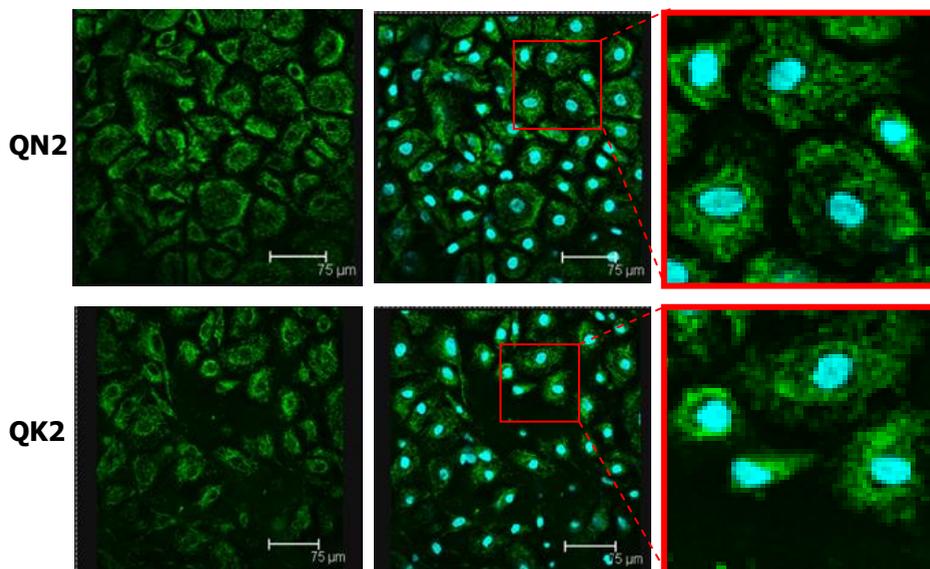
Con los queratinocitos QK se repite el mismo patrón que con los fibroblastos FK. En los queratinocitos control las mitocondrias muestran una distribución en filamentos formando una red distribuida por todo el citoplasma celular de una manera homogénea (fila superior de imagen Figuras 15 y 16). Por su parte, los queratinocitos Kindler muestran una distribución mitocondrial más compacta, en la que se aprecia una morfología mitocondrial más densa; las mitocondrias parecen estar agregadas y más compactas, con una aparente merma de la homogeneidad de la red mitocondrial (fila inferior en las Figuras 15 y 16).



**Figura 15: Análisis por microscopía confocal de mitocondrias en queratinocitos control y Kindler de la Paciente 1, marcados con *Mitotracker green* y *Hoechst 33342*.**

Se muestran imágenes representativas de 3 experimentos. La primera fila corresponde a los queratinocitos control y la segunda a los queratinocitos Kindler. Se puede ver en la primera columna las mitocondrias marcadas en verde con *Mitotracker green*, en la segunda columna una imagen superpuesta de las mitocondrias y los núcleos en azul marcados con *Hoechst 33342*, y en la última columna se muestra un detalle de la imagen superpuesta (zoom).

## PACIENTE 2



**Figura 16: Análisis por microscopía confocal de mitocondrias en queratinocitos control y Kindler de la Paciente 2.**

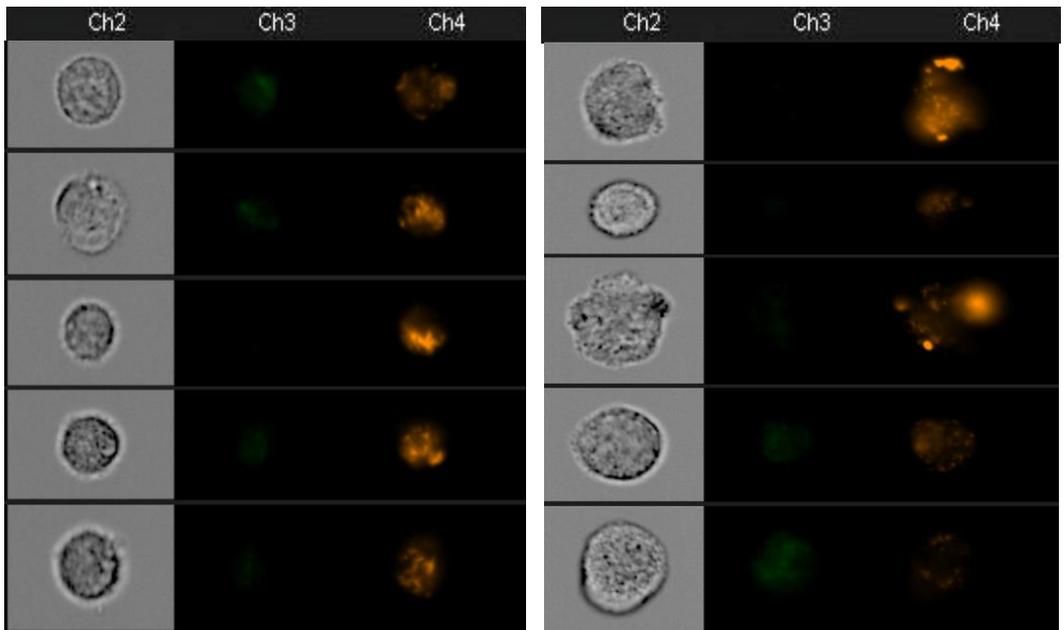
Se muestran imágenes representativas de 3 experimentos. Se puede ver en la primera columna las mitocondrias marcadas en verde con *Mitotracker green*, en la segunda columna una imagen superpuesta de las mitocondrias y los núcleos en azul marcados con *Hoechst 33342*, y en la última columna se muestra un detalle de la imagen superpuesta (zoom).

### **5.11. El análisis de las mitocondrias, mediante citometría de imagen, muestra una significativa disminución del potencial de membrana mitocondrial en los fibroblastos Kindler.**

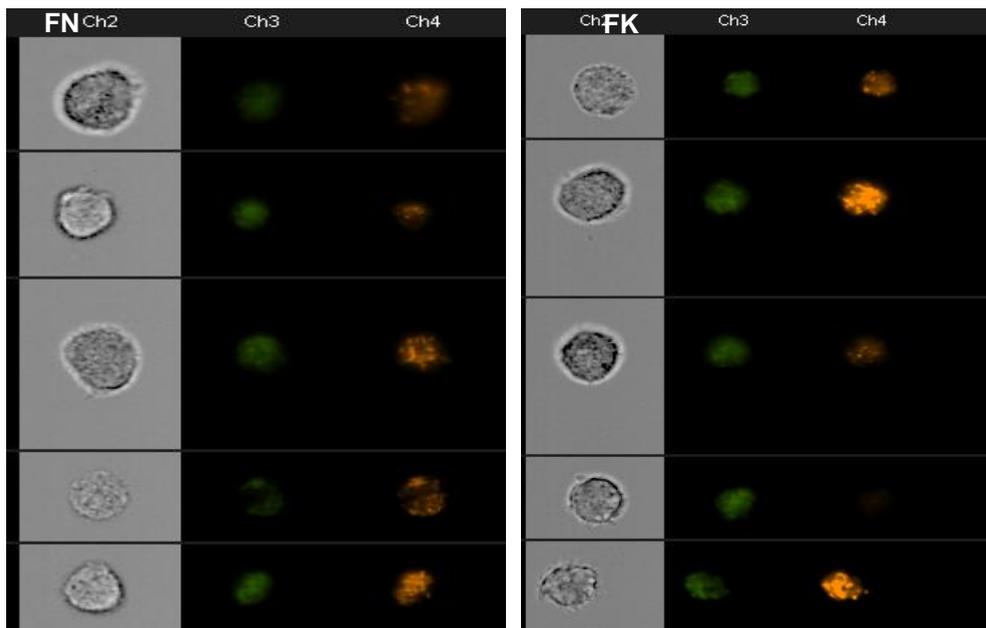
Para estudiar el potencial de membrana mitocondrial, las muestras de fibroblastos control (FN) y fibroblastos Kindler (FK) se tiñeron con el fluorocromo *JC1* y se analizaron mediante citometría de imagen. Como parte de los resultados, se obtuvieron imágenes de las células analizadas así como valores medios de intensidad de fluorescencia de dichas muestras.

En la Figura 17 se muestran las imágenes, correspondientes a ambas pacientes, de experimentos representativos elegidos a partir de 4 experimentos independientes; en la imagen de la izquierda, se muestran los fibroblastos control (FN) y en la derecha, los fibroblastos de Kindler. La primer columna (Ch2) muestra las imágenes de transmisión, la segunda la fluorescencia verde (Ch 3) y la última (Ch 4) corresponde a la fluorescencia naranja. Estos resultados muestran una mayor presencia de agregados de JC1, es decir, fluorescencia naranja, en los fibroblastos de Kindler (FK) comparado con los resultados obtenidos en los fibroblastos control (FN). Se han analizado entre 1000 y 3.000 eventos para cada experimento.

### PACIENTE 1



## PACIENTE 2



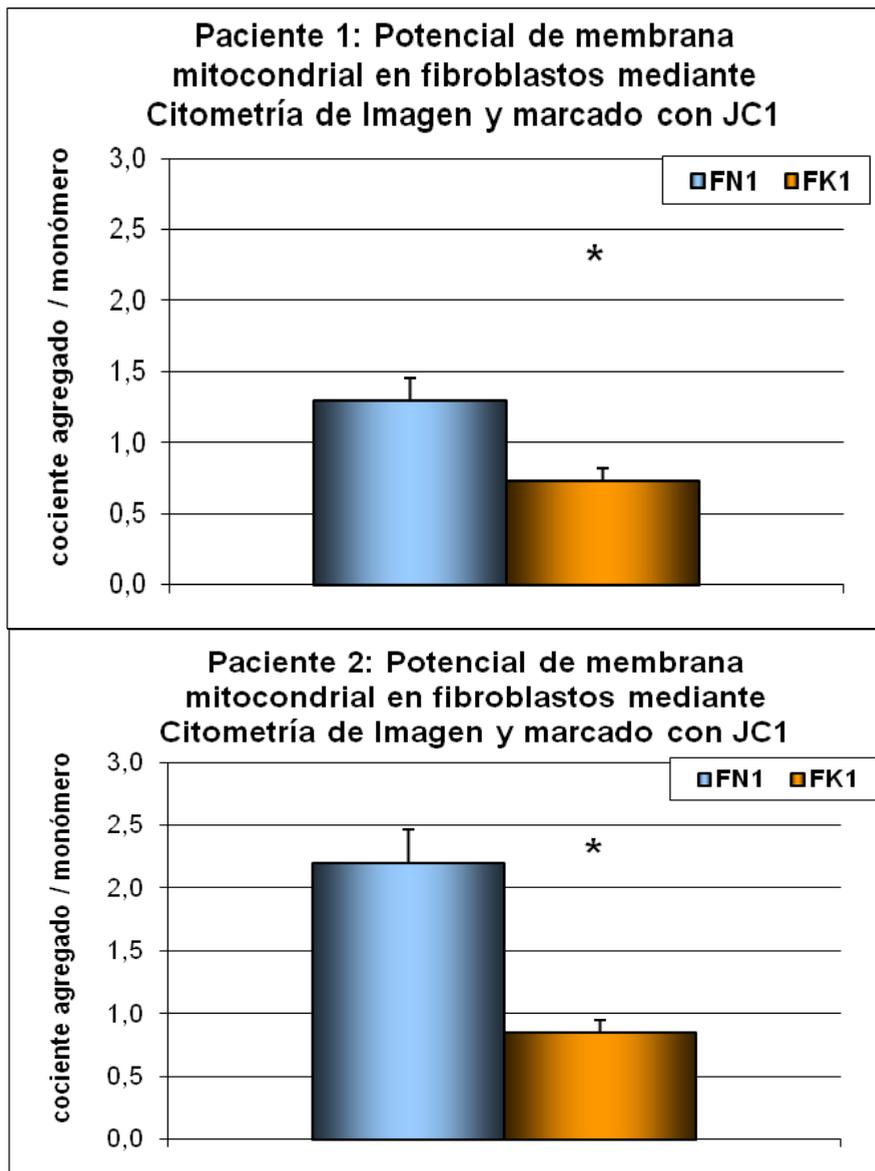
**Figura 17: Imágenes de fibroblastos teñidos con JC1 obtenidas por Citometría de Imagen.**

Resultados obtenidos del análisis mitocondrial mediante Citometría de Imagen. las imágenes corresponden a un experimento representativo de un cuadruplicado. A la izquierda se muestran los fibroblastos control (FN) y a la derecha los de Kindler (FK).

La primera columna corresponde a la imagen de transmisión, la segunda a los monómeros (fluorescencia verde) y la tercera a los agregados (fluorescencia naranja)

En el Gráfico 14 se muestran los resultados de potencial de membrana mitocondrial obtenidos, para los fibroblastos control (FN) y Kindler (FK), de las pacientes 1 y 2. Como medida del nivel de potencial de membrana mitocondrial, se ha usado un ratio entre la intensidad media de la fluorescencia naranja, que representa la cantidad de agregados formados dentro de mitocondria como consecuencia directa de su potencial de membrana, y la intensidad media de la fluorescencia verde proveniente de los monómeros del fluorocromo remanentes en el citosol. Estos datos se han

expresado como la media del ratio obtenido de cuatro experimentos independientes, con su correspondiente desvío estándar. En estos resultados se puede observar que los fibroblastos de Kindler presentan un potencial de membrana mitocondrial significativamente menor al obtenido en los fibroblastos control (FN). Concretamente, en la paciente 1 se ha evidenciado una disminución aproximada del 50%, mientras que en la paciente 2 esta disminución alcanza el 70%.



**Gráfico 14: Potencial de membrana mitocondrial de fibroblastos por citometría de imagen (AMNIS) y marcado mediante JC1.**

La gráfica representa la media, del resultado obtenido en 4 experimentos, del nivel de potencial de membrana mitocondrial en los fibroblastos FK respecto de FN (control). los fibroblastos de Kindler presentan una disminución del potencial de membrana mitocondrial en ambas pacientes.

### **5.12. Determinación de la expresión de enzimas por RT-PCR .**

En el estudio de la determinación de la expresión de enzimas por RT-PCR se analizaron algunas de las enzimas involucradas con los mecanismos que intervienen en la defensa antioxidante y en la reparación del ADN.

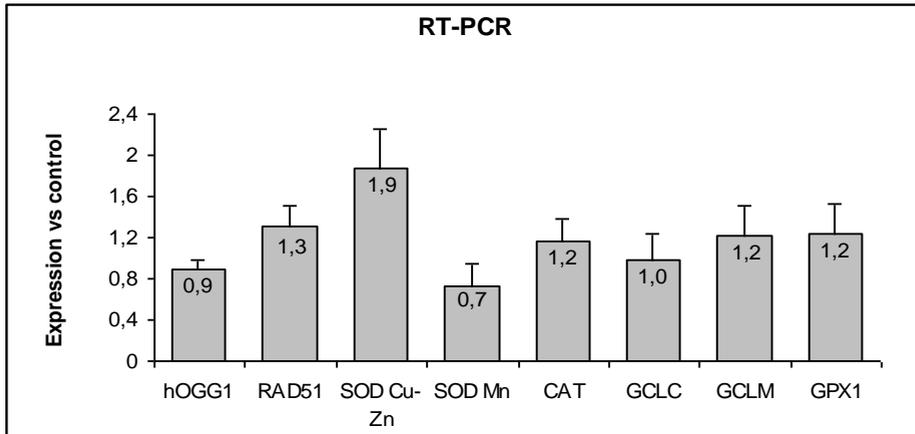
Las enzimas que intervienen en los mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo estudiadas son: MnSOD, Cu/ZnSOD, GPx1, Catalasa y GCL (subunidades GCLC, GCLM).

Las enzimas que intervienen en los procesos de reparación del ADN estudiadas son: hOGG1 y RAD51.

En el Grafico 15 se puede ver la expresión relativa de cada una de las proteínas estudiadas en las muestras Kindler (FK) respecto del control (FN), de la paciente 1. Los resultados obtenidos han sido los siguientes:

- hOGG1: no se aprecian diferencias en la expresión en Kindler respecto del control.
- RAD51: se observó un incremento del 30% en las muestras FK respecto de FN.
- Cu/ZnSOD: presenta un incremento del 90% en las muestras FK respecto del control.
- MnSOD: muestra una disminución del 30% en Kindler respecto del control.
- Catalasa (CAT): se obtuvo un incremento del 20% en las muestras FK respecto de FN.
- GCLC: prácticamente no varían su expresión.
- GCLM: la muestra de Kindler tiene un incremento del 20% comparado con el control.
- GPx1: la muestra de Kindler tiene un incremento del 20% comparado con el control.

## PACIENTE 1



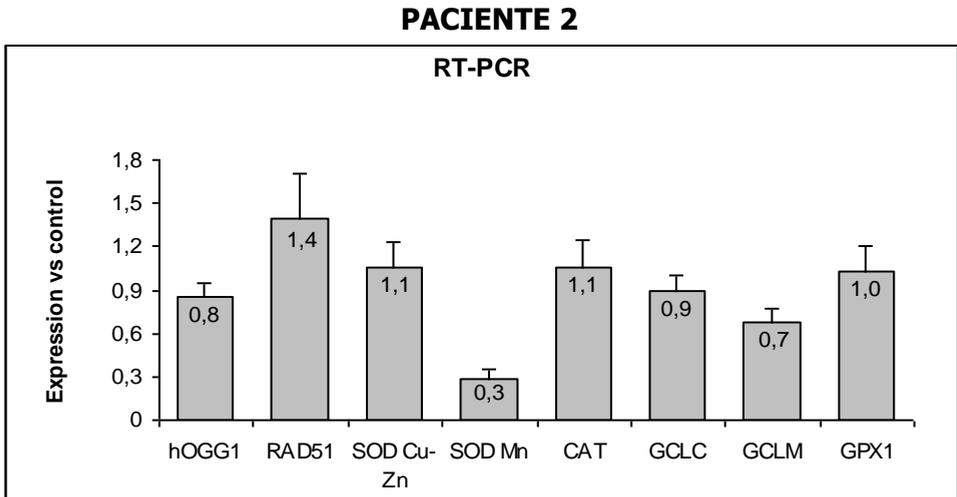
**Gráfico 15: Expresión de proteínas por RT-PCR en fibroblastos del paciente 1.**

La gráfica representa la media del resultado obtenido en 4 experimentos. Los resultados corresponden a la expresión génica relativa de Kindler respecto del control. Cada columna corresponde a la proporción de la expresión de cada proteína respecto del control, que se considera el 100%. La barra sobre cada columna representa la desviación estándar.

En el Gráfico 16 se puede ver la expresión relativa de cada una de las proteínas estudiadas en las muestras Kindler (FK) respecto del control (FN), de la paciente 2. Los resultados obtenidos han sido los siguientes:

- hOGG1: muestra una disminución del 20% en Kindler respecto del control.
- RAD51: se observó un incremento del 40% en las muestras FK respecto de FN.
- Cu/ZnSOD: presenta un incremento del 10% en las muestras FK respecto del control.
- MnSOD: muestra una disminución del 70% en Kindler respecto del control.
- Catalasa (CAT): se obtuvo un incremento del 10% en las muestras FK respecto de FN.

- GCLC: prácticamente no varían su expresión.
- GCLM: la muestra de Kindler tiene una disminución del 30% comparado con el control.
- GPx1: prácticamente no varían su expresión.



**Gráfico 16: Expresión de proteínas por RT-PCR en fibroblastos de la paciente 2.**

La gráfica representa la media, del resultado obtenido en 4 experimentos, Los resultados corresponden a la expresión génica relativa de Kindler respecto del control. Cada columna corresponde a la proporción de la expresión de cada proteína respecto del control, que se considera el 100%. La barra sobre cada columna representa la desviación estándar.

### **5.13. Las enzimas relacionadas con los mecanismos de estrés oxidativo están disminuidas en Kindler.**

En el estudio de la determinación de la expresión de proteínas por Western Blotting, se analizaron algunas de las proteínas relacionadas con los mecanismos que intervienen en el estrés oxidativo. Las proteínas que intervienen en mecanismos de protección frente a la oxidación estudiadas son: MnSOD, Cu/ZnSOD, GPx1, tiorredoxina y catalasa. La proteína HSP70

tiene una acción genérica ante el estrés celular, interviniendo en los mecanismos de degradación de las proteínas desnaturalizadas.

También se ha estudiado la expresión de la actina, que forma parte del citoesqueleto e interviene en los mecanismos de anclaje con la membrana plasmática, mecanismos que están alterados en el Síndrome de Kindler.

Los resultados más representativos obtenidos en las pacientes 1 y 2 se han resumido en la Figura 21 y corresponden a 3 experimentos para cada paciente obtenidos a partir de un triplicado. Las proteínas estudiadas han sido:

-Tubulina: elegido como control de carga.

-HSP70: Se observa un ligero incremento en los FK respecto del control.

-Catalasa: Se observa una ligera disminución en Kindler con respecto al control.

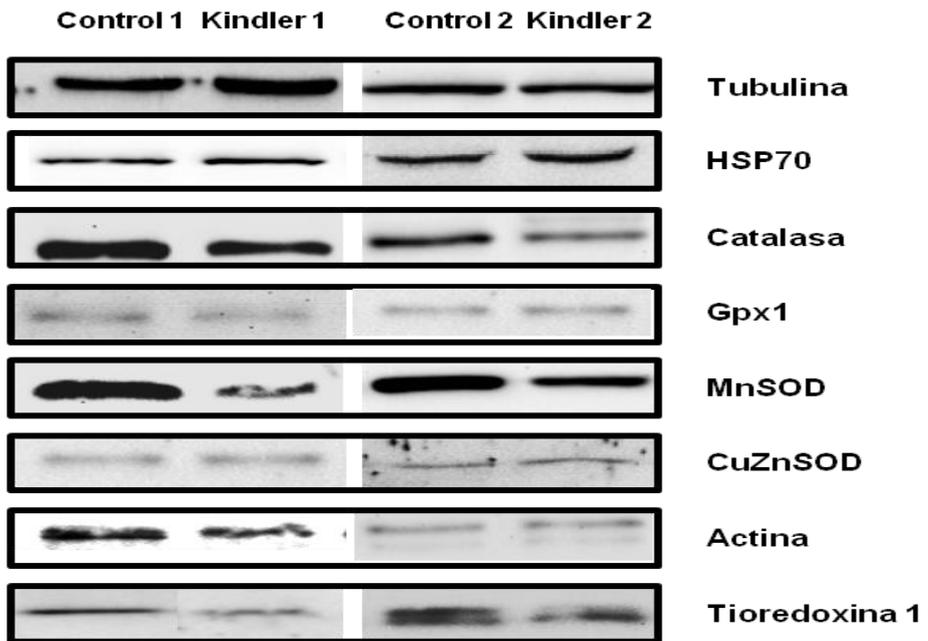
-GPx1: También se observa una disminución de la expresión de GPx1 en Kindler respecto del control.

-MnSOD: Se aprecia una significativa disminución de la expresión de MnSOD en Kindler comparado con el control.

-Cu/ZnSOD: No se aprecian diferencias entre las muestras.

-Actina: se aprecia una ligera disminución en la expresión en la muestra de Kindler al compararlo con el control.

-Tiorredoxina: se aprecia una disminución de la expresión en la muestra de Kindler.



**Figura 21: Expresión de proteínas por Western Blotting en fibroblastos de los pacientes 1 y 2.**

La figura es un resumen de los resultados más representativos obtenidos con un mínimo de tres experimentos para cada paciente, obtenidos a partir de un triplicado. La primera columna corresponde al control (FN) y la segunda al paciente 1 con Síndrome de Kindler; la tercera columna corresponde al control (FN) y la cuarta al paciente 2 con Síndrome de Kindler; a la derecha se indican las proteínas analizadas. Se aprecia una disminución en Catalasa, GPx1, MnSOD y Actina en los FK respecto de los FN.



## **6.- DISCUSIÓN**



## 6. DISCUSIÓN

El Síndrome de Kindler (SK) es una rara enfermedad autosómica recesiva que se caracteriza por la presencia de ampollas en zonas acras, fotosensibilidad, poiquilodermia y, ocasionalmente, carcinogénesis. Esta sintomatología también aparece en el Síndrome de Werner, en el que se ha descrito de manera evidente la implicación de estrés oxidativo (Pagano *et al.*, 2005; Pallardó *et al.*, 2010). Sin embargo, no se ha encontrado en la bibliografía científica ningún estudio sobre el estrés oxidativo asociado al SK.

En el presente trabajo se plantea la hipótesis de que el SK está asociado a una alteración del equilibrio oxidación-reducción, con una alta tendencia al estrés oxidativo.

A efectos de poner a prueba esta hipótesis, se analizaron una serie de parámetros de estrés oxidativo (MDA, niveles celulares de ROS, nivel de GSH, etc.) y de metabolismo y morfología mitocondrial en fibroblastos y queratinocitos de piel provenientes de dos pacientes con Síndrome de Kindler y de dos donantes sanos de similar edad y sexo, como control.

### **Análisis de los modelos celulares elegidos**

Actualmente, la bibliografía existente en relación con la bioquímica y la biología celular del SK, circunscribe su objeto al estudio de las alteraciones bioquímicas, estructurales y genéticas. La mayor parte de los estudios revisados utilizan, como modelo celular, los queratinocitos de piel, debido a que el SK es una enfermedad preferentemente dermatológica. Sin embargo, las alteraciones observadas en los queratinocitos podría explicar solo la parte de la sintomatología epidérmica de esta enfermedad, pero en modo alguno puede explicar la sintomatología extra-epidérmica, como son las lesiones en mucosas oral, esofágica, intestinal y vaginal o su asociación con carcinomas.

Puesto que los fibroblastos están presentes en el tejido conectivo de piel y mucosas, y son responsables de la síntesis y mantenimiento de la matriz extracelular y su alteración, este modelo celular podría explicar la sintomatología tanto epidérmica como extra-epidérmica. Por ello, en el presente trabajo se decidió utilizar fibroblastos y queratinocitos de la piel de pacientes con SK como modelos celulares.

Por tanto, en base a la hipótesis planteada en este trabajo, se pretende determinar la existencia de estrés oxidativo en los fibroblastos y queratinocitos de pacientes con SK, para lo que hemos diseñado un conjunto de pruebas analíticas, cuyos resultados se analizan a continuación, agrupadas de acuerdo con los objetivos planteados en el presente trabajo de investigación.

### **6.1. Análisis de los niveles celulares de ROS y el posible daño celular producido por el estrés oxidativo.**

Los niveles celulares de anión superóxido y de peróxido de hidrógeno mostraron incrementos estadísticamente significativos en los fibroblastos de pacientes con SK respecto de los fibroblastos control. Este incremento resultó especialmente evidente en el estudio de los niveles de ROS de la paciente 2, de mayor edad. (Gráficos 8 y 9)

Los niveles celulares de MDA también mostraron incrementos estadísticamente significativos en los fibroblastos de pacientes con SK respecto de los fibroblastos control y, también con mucha mayor intensidad, en la paciente 2, de mayor edad. (Gráfico 11)

El estudio de los niveles de MDA en queratinocitos mostró también un importante incremento en las muestras procedentes de pacientes con SK y, de nuevo, los valores de la paciente 2, de mayor edad, resultaron especialmente elevados. (Gráfico 12).

Estos datos son claramente indicativos de la existencia de un estrés oxidativo tanto en los fibroblastos como en los queratinocitos de pacientes con SK, con evidencia de daño celular (peroxidación lipídica) que parece aumentar su intensidad con la edad. El origen de este estrés oxidativo es, por el momento, desconocido aunque, como veremos seguidamente, podría ser debido, al menos en parte, a la disminución de la expresión de algunas enzimas antioxidantes y a la alteración mitocondrial. Es evidente que será necesario realizar nuevos estudios que permitan averiguar la causa del estrés oxidativo observado.

El recuento de fibroblastos mostró una disminución del nº de células en las muestras SK respecto de las muestras control (Gráfico 1), aunque las diferencias no son estadísticamente significativas. El estudio por citometría de flujo del porcentaje de muerte celular sí ha mostrado un incremento estadísticamente significativo en la paciente de mayor edad. Aún cuando este dato sería compatible con la presencia de una tendencia a la apoptosis detectada en los queratinocitos de pacientes con SK (Hertz, 2006), el hecho de que los análisis se hayan realizado una vez los fibroblastos habían crecido a confluencia, resta relevancia a las diferencias observadas. Tampoco se sometió a los fibroblastos estudiados a ninguna condición de estrés ni a privación de factor de crecimiento. Tal vez por ello, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en el análisis del ciclo celular entre los fibroblastos SK y los fibroblastos control (Gráficos 4 y 5).

Se ha descrito que la función de la kindlina-1 está directamente relacionada con el anclaje de la actina del citoesqueleto a la membrana plasmática celular (Has *et al*, 2006) y con el anclaje de las células epiteliales basales con la membrana basal. Para comprobar esta correlación en el SK, se sometió a estudio la expresión de la actina por Western Blot y los resultados mostraron una disminución en los fibroblastos SK respecto de los fibroblastos control en ambas pacientes (Figura 21). Queda por saber, sin embargo, cuál es el

mecanismo por el que se produce una disminución en la síntesis o en la función de la actina.

El estudio de las muestras por citometría de flujo no mostró diferencias significativas en el tamaño celular pero sí las mostró en la complejidad celular. Los fibroblastos de la paciente de mayor edad mostraron un aumento de la complejidad celular que está relacionada con los cambios morfológicos que se producen en las células por la rotura de la membrana plasmática, condensación de cromatina, fragmentación nuclear y derramamiento de cuerpos apoptóticos, previos a la muerte celular por necrosis y/o apoptosis. La aparente disminución de los niveles actina, debida a una pérdida de la función de la kindlina-1, parece generar, en los fibroblastos afectados, las alteraciones morfológicas previas a la muerte celular en los fibroblastos afectados.

## **6.2. Análisis de los sistemas de defensa antioxidante.**

En términos generales, el análisis de las defensas antioxidantes parece indicar que estas se encontrarían comprometidas en los fibroblastos SK. Los niveles de GSH así como la expresión de las proteínas antioxidantes están disminuidos en las muestras de SK respecto del control.

### **6.2.1. Existe una disminución de los niveles de GSH celular en las muestras SK.**

El estudio de los niveles de GSH en los fibroblastos SK reveló una disminución estadísticamente significativa respecto de los fibroblastos control (Gráfico 10). Como ya se ha dicho, el GSH es el tiol más abundante en las células de mamíferos y tiene una clara función antioxidante (Viña, 1990). Esta disminución puede deberse a dos causas. Por un lado, puede deberse a un aumento del consumo de GSH por su función detoxificadora debida a un exceso en la producción de ROS, explicación que sería coherente con los

datos obtenidos en el presente trabajo. La otra causa podría ser una disminución en la síntesis de GSH (Halliwell, 1996).

Dado que el estudio de la expresión de glutamato-cisteín-ligasa (enzima que participa en la biosíntesis del GSH) mediante RT-PCR no ha mostrado diferencias significativas entre los fibroblastos SK y los fibroblastos control en ninguna de las dos pacientes (Figuras 15 y 16), no parece que esta disminución del nivel de GSH se deba a una disminución en la síntesis del tripéptido. Teniendo en cuenta que en el presente trabajo se han registrado aumentos de ROS en las muestras SK, estos resultados podrían indicar que la disminución de GSH observada en los fibroblastos SK se debe a un aumento de su reducción a GSSG para intentar neutralizar el estatus oxidativo. En este sentido, sería informativo analizar las actividades de estas enzimas a fin de esclarecer estos resultados. Estos estudios no se han podido realizar por la dificultad en la obtención de muestras, ya comentada anteriormente.

### **6.2.2. Las enzimas relacionadas con los mecanismos de estrés oxidativo están disminuidas en el SK.**

El análisis de expresión de las proteínas antioxidantes en fibroblastos ha determinado que existen diferencias entre los fibroblastos de SK y el control (Gráficos 15 y 16 y Figura 21). En términos generales se observa una disminución de la expresión de las proteínas antioxidantes, lo que podría indicar que se encontrarían comprometidas las defensas antioxidantes en los fibroblastos de SK.

El estudio de la expresión de proteínas relacionadas con el estrés oxidativo mostró una importante disminución de MnSOD en los fibroblastos SK, respecto de los fibroblastos control, tanto mediante la técnica *Western Blot*, como mediante RT-PCR. Esta enzima es un importante antioxidante que cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrogeno y que se encuentra, de manera preferente, en la matriz mitocondrial (Fridovich,

1974; Chance *et al.*, 1979) . Teniendo en cuenta que se ha registrado un incremento en los niveles celulares de peróxido de hidrógeno (Gráfico 8,) es factible suponer que existe un fallo en la defensa antioxidante en los fibroblastos SK. Hay que destacar que, de nuevo, los resultados obtenidos en la paciente de mayor edad muestran unas diferencias mucho más evidentes, en especial los referidos a la expresión de MnSOD mediante RT-PCR.

Esta disminución de MnSOD, observada mediante RT-PCR, parece indicar que la alteración se debe a algún problema en la síntesis de la enzima. Recientes estudios han relacionado la actividad de la *MnSOD* con la protección contra el daño foto-oxidativo (Meewes *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2008). Por tanto, la disminución observada podría estar directamente relacionada con la fotosensibilidad descrita en los pacientes con Síndrome de Kindler.

El estudio de la expresión de Cu/ZnSOD mediante *Western Blot*, enzima con la misma función que la MnSOD pero que se encuentra preferentemente en el citosol y en la intermembrana mitocondrial, no mostró diferencias entre los dos tipos de celulares. Sin embargo, los resultados mediante RT-PCR sí que mostraron un aumento de un 70% en los fibroblastos SK respecto de los fibroblastos control en la paciente 1. Los resultados obtenidos para la paciente 2 resultaron anodinos. Estos datos podrían ser indicativos de que, en los fibroblastos SK, se produce un aumento de la síntesis de Cu/ZnSOD para compensar el aumento de su consumo necesario para la dismutación del *superóxido*.

El estudio de la expresión de las enzimas catalasa y GPx1, que también participan en los mecanismos de defensa antioxidante, mostró resultados algo diferentes a los observados con la Cu/ZnSOD. En cuanto a la expresión de catalasa por *Western-blot*, se observa una disminución en Kindler con respecto al control en ambas pacientes. Sin embargo, el análisis por RT-PCR mostró un ligero incremento. La misma tendencia se observa en la expresión de la Glutación peroxidasa. Se observa una disminución de expresión de la

proteína por *Western-blot*, mientras que el análisis mediante RT-PCR mostró un ligero incremento, pero tan solo en la paciente 1.

Ambas enzimas cumplen una importante función de eliminación de peróxido y, por tanto, con la defensa antioxidante. Como se ha comentado anteriormente, los niveles de ROS celular están incrementados en la muestra de SK. En ambos casos, el análisis de la actividad enzimática podría ser informativo a efectos de determinar qué mecanismos prevalecen. Los resultados de cantidad de proteína y mRNA parecen indicar que en el Síndrome de Kindler existe una menor cantidad de las dos enzimas antioxidantes (catalasa y Gpx) que intenta compensar la célula con un aumento de la cantidad de mensajero.

También el estudio de la expresión de tiorredoxina, mediante *Western Blot*, mostró una disminución en los fibroblastos SK respecto del control en ambas pacientes. Tal vez esta disminución sea consecuencia, también, de su participación en la reducción de los puentes disulfuro creados por la oxidación de proteínas. Un estudio de fibroblastos de piel humana demostró que la tiorredoxina está implicada en la protección del DNA frente a las radiaciones UVA (Didier *et al*, 2001). Por tanto, la reducción de los niveles de tiorredoxina observada en los fibroblastos SK podría tener alguna relación con la fotosensibilidad que afecta a los pacientes con Síndrome de Kindler.

El estudio mediante *Western Blot* de la expresión de HSP70, enzima cuya expresión aumenta en las células sometidas a estrés y que participa en la degradación de las proteínas desnaturalizadas, mostró un ligero incremento en los fibroblastos SK respecto de los fibroblastos control. También el estudio por RT-PCR de la expresión de RAD51, enzima que participa en la reparación de la ruptura de la doble cadena de ADN, mosttó un incremento significativo en los fibroblastos SK respecto de los fibroblastos control, en ambas pacientes. Estos resultados permiten constatar que se han activado los mecanismos de reparación alterados por el estatus oxidativo creado en los

fibroblastos SK. En otros síndromes con implicación de estrés oxidativo también se han encontrado niveles elevados de RAD51, como en el Síndrome de Werner (Otterlei *et al*, 2006) y de HSP70, como en el Síndrome de Down (Yoo *et al*, 1999).

### **6.3. Análisis de la morfología y el metabolismo de las mitocondrias.**

Las mitocondrias constituyen el origen de ROS más importante del organismo (Rickwood *et al.*, 1987; Orrenius *et al.*, 2007; Kakkar and Singh, 2007; Navarro and Boveris, 2007). Como se ha comentado anteriormente, en el presente trabajo se ha detectado un incremento en los niveles de ROS en los fibroblastos SK; así mismo se han detectado niveles reducidos de la enzima *MnSOD*, catalasa y Gpx. La disminución de *MnSOD* podría ser consecuencia de su localización en la matriz mitocondrial (Fridovich, 1974; Chance *et al.*, 1979). Teniendo en cuenta estos resultados y dada la importancia de las mitocondrias en la producción de ROS, se planteó la necesidad de realizar un estudio más detallado de estos orgánulos en las muestras SK y en el contexto del estrés oxidativo detectado.

#### **6.3.1. Existe una disminución del potencial de membrana mitocondrial, posiblemente debido al incremento de ROS.**

El análisis del potencial de membrana mitocondrial, realizado mediante Citometría de Imagen, mostró una reducción significativa en los fibroblastos SK respecto de los fibroblastos control (Gráfico 14), que otra vez resultó especialmente intensa en las muestras correspondientes a la paciente de mayor edad. La reducción del potencial de membrana mitocondrial se relaciona con una disminución de la función mitocondrial normal y con un mayor estado de oxidación mitocondrial (Kroemer, 2003).

Como principal fuente de producción de ROS, la mitocondria parece ser más propensa a sufrir daño por parte de estas especies reactivas. Una respuesta

común al daño causado por ROS es la permeabilización de la membrana mitocondrial interna. Los niveles incrementados de ROS pueden inducir la apertura de los poros de permeabilidad transitoria en la membrana interna mitocondrial. De esta forma se produciría el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y, eventualmente, esto conduciría la muerte celular (Lemasters et al., 1998; Kim et al., 2003). Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación indican que existe un incremento en los niveles de ROS, lo que podría relacionarse con la disminución del potencial de membrana mitocondrial observada. La alteración de la estructura mitocondrial podría dar lugar a un aumento en la producción de ROS; de la misma forma, un aumento en la producción de ROS podría generar un daño en la estructura mitocondrial. En consecuencia, tanto por un origen como por el otro, se puede generar un proceso de retroalimentación positiva que generaría un estrés oxidativo crónico y un continuo proceso de daño mitocondrial.

### **6.3.2. La morfología mitocondrial de los fibroblastos de SK difiere de la obtenida en las muestras control.**

Las mitocondrias se disponen en la célula formando un entramado reticular, remodelando constantemente su distribución a través de los procesos de fusión y fisión y del movimiento mitocondrial (Griffin et al., 2006, Westermann, 2008). Numerosos estudios demuestran que el ciclo de vida mitocondrial consiste en frecuentes eventos de fisión y fusión y estos procesos se suceden a través de ciclos continuos (Karbowski et al., 2004, Chen and Chan, 2005, Bereiter-Hahn et al 2008).

En el presente trabajo, el estudio de morfología y distribución de las mitocondrias mediante microscopía confocal mostró diferencias en los fibroblastos SK respecto a los fibroblastos control (Figuras 13 y14). Mientras que las mitocondrias de los fibroblastos control muestran la habitual distribución en filamentos, formando una red homogénea por todo el citoplasma de la célula, las mitocondrias de los fibroblastos SK muestran una

morfología más compacta y una distribución de las mitocondrias menos homogénea. El estudio de la morfología y distribución de las mitocondrias mediante microscopía confocal mostró las mismas diferencias en los queratinocitos SK respecto a los queratinocitos control (Figuras 15 y 16).

Por su parte, el análisis de la masa mitocondrial, realizado mediante citometría de flujo, mostró una reducción estadísticamente significativa en los fibroblastos SK respecto de los fibroblastos control (Gráfico 13). Esta reducción alcanza valores cercanos al 80% en los fibroblastos de la paciente de mayor edad.

Se ha demostrado que el estrés oxidativo produce alteraciones en la estructura mitocondrial; por ejemplo, se ha descrito una disminución del número de crestas mitocondriales, dilatación de los espacios intracrestales, agregación de crestas y densificación de la matriz mitocondrial (Jendrach *et al*, 2008).

La correcta interacción entre la actina del citoesqueleto y las mitocondrias es esencial para la garantizar la normalidad en su morfología, movilidad y distribución. Por tanto, la consecuencia lógica de la disminución de la actividad de la actina, debida a una pérdida de función de la kindlina-1, es una alteración en la morfología, movilidad y distribución de las mitocondrias. Estudios relativamente recientes con *Aspergillus* y germen de levadura han demostrado la existencia de una conexión funcional entre la alteración de la actividad de la actina del citoesqueleto y la muerte celular por aumento de la producción de ROS mitocondrial, demostrando el papel de la actina en la regulación del estrés oxidativo (Boldogh *et al*, 2006).

La disminución de la expresión de la actina hallada mediante *Western-Blotting*, relacionada con la disminución de la función de la kindlina-1 demostrada en el Síndrome de Kindler, apuntan a la implicación de la

mitocondria, tanto en su alteración morfológica, y distribución, como en el incremento de la producción de ROS, con el resultado de muerte celular.

Diversos estudios recientes han asociado las alteraciones de la morfología de las mitocondrias con algunas proteínas relacionadas con los mecanismos de fusión y fisión mitocondrial.

Pellegrin y Scorrano han relacionado la proteína de fusión OPA1 con la morfología mitocondrial y con la remodelación de las crestas mitocondriales, independientemente de su acción en la fusión mitocondrial (Pellegrin *et al*, 2007). También se ha demostrado que la disminución de los niveles de OPA1 produce una alteración de la estructura de las crestas mitocondriales, disfunción y fragmentación mitocondrial y liberación de citocromo c que conducen a la muerte celular por apoptosis (Dimmer and Scorrano, 2006).

OPA 1 (optic atrophic 1) es una proteína anclada en la membrana interna mitocondrial que interviene en la fusión mitocondrial y regula la estructuración de las crestas mitocondriales (Pellegrin *et al*, 2007).

Por su parte, la mitofusina (mitofusin 2) es una proteína que se encuentra en la cresta mitocondrial y que cuya función está relacionada con el mantenimiento de la morfología y la función de las mitocondrias. Se trata de una proteína que media el proceso de fusión mitocondrial y que además se ha demostrado que está implicada en el control de la capacidad oxidativa mitocondrial en distintos tipos celulares, como fibroblastos embrionarios y células musculares (Santel *et al*, 2001, Pich, *et al*, 2005).

El estrés oxidativo produce, por su parte, una disminución importante de la dinámica de fusión/fisión mitocondrial (Jendrach *et al*, 2008). Por otra parte, otros autores han sugerido que estas alteraciones de la dinámica mitocondrial producidas por el estrés oxidativo podrían ser una de las causas de la aparición de cáncer, por la acumulación de mitocondrias dañadas en la célula. Por una parte, la fusión mitocondrial sería necesaria para el mantenimiento

del DNA mitocondrial y una disminución de esta dinámica podría contribuir a la pérdida de DNA mitocondrial observada en muchos cánceres. Por otra, la fisión mitocondrial sería importante para la eliminación de las mitocondrias dañadas; una disminución de la fisión podría contribuir a una acumulación en la célula de estas mitocondrias dañadas, que también se ha observado en muchos cánceres (Grandemange et al, 2009).

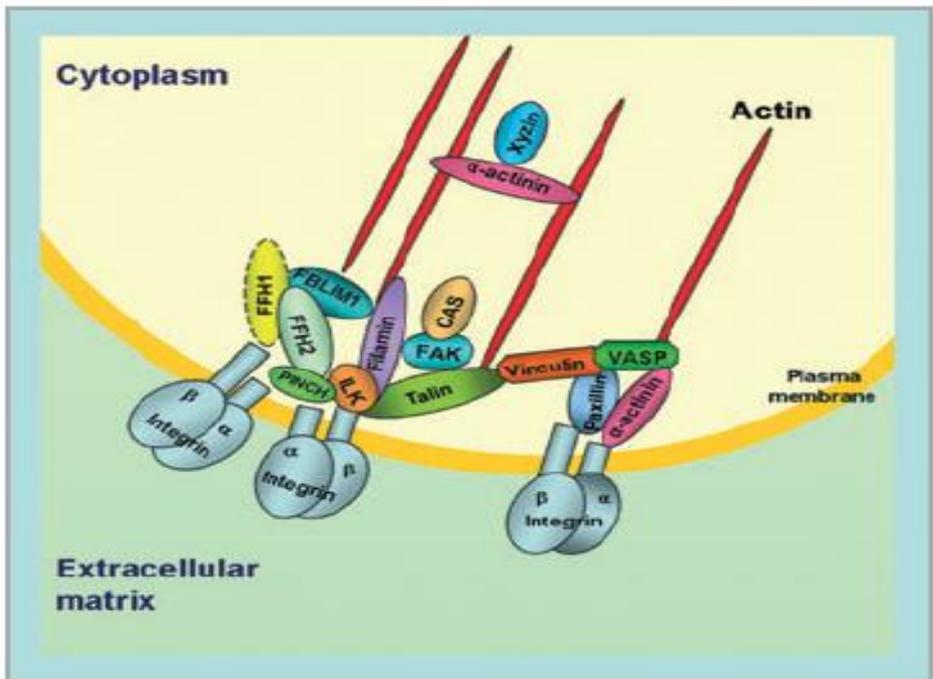
Una línea de investigación que quedaría pendiente sería, en consecuencia, el estudio de la relación entre el estrés oxidativo y los niveles de las proteínas de fusión y fisión así como posible su implicación con la carcinogénesis observada en pacientes con Síndrome de Kindler.

#### **6.4. Kindlinas y Síndrome de Kindler.**

Como ya se comentó en la introducción, las kindlinas parecen ser necesarias para el mantenimiento de la estabilidad de la unión dermo-epidérmica y para el anclaje de las células epiteliales basales con la membrana basal. La kindlina-1, además, está implicada en los mecanismos de anclaje de la actina del citoesqueleto a la membrana plasmática celular (Has *et al.*, 2006; Smith, 2008; Harburger, 2009; Meves, 2009).

Además, como ya se ha indicado en el presente trabajo, algunos autores han demostrado la existencia de una conexión funcional entre la alteración de la actividad de la actina del citoesqueleto y la muerte celular por aumento de la producción de ROS mitocondrial, demostrando el papel de la actina en la regulación del estrés oxidativo (Boldogh *et al.*, 2006). Por tanto, la disminución de la función de la kindlina-1, demostrada en el Síndrome de Kindler, sería determinante en el incremento de la producción de ROS mitocondrial, con el resultado de muerte celular.

Recientes estudios han mostrado, también, que las kindlinas 1 y 2 se acoplan directamente con el extremo de la región c-terminal de la integrina- $\beta$  citoplasmática, ejerciendo un efecto activador de las funciones de la integrina (Harburger *et al*, 2009; Lai-Cheong *et al*, 2009; Figura 19). Las ROS tienen un papel "clave" en la señalización de los receptores de las integrinas y, además, parecen tener una función sinérgica con otros transductores para el anclaje y crecimiento celular (Chiarugi, 2008).



**Figura23.** Esquema de la ubicación putativa de las kindlinas dentro de la zona de adhesión, donde FFH1: kindlina-1 y FFH2: kindlina-2. También se muestran otras proteínas de adhesión focal y sus interacciones con otras proteínas como heterodímeros de integrinas (Lai-Cheong *et al.*, 2009).

Las integrinas también se han asociado a los mecanismos de proliferación celular en el crecimiento de los tumores cancerígenos y en las metástasis (Mizejewski, 1999; Lu *et al*, 2008) y a mecanismos de activación inmunitaria (Evans *et al*, 2009).

Todos estos estudios parecen relacionar directamente la pérdida de función de la kindlinas con el estrés oxidativo desencadenante de algunas de las manifestaciones bioquímicas y clínicas características del Síndrome de Kindler. La confirmación de esta hipótesis podría abrir nuevas posibilidades terapéuticas en el tratamiento sintomático del Síndrome de Kindler; tal vez la utilización tópica de cremas y lociones con alto factor de protección solar y agentes antioxidantes podría ayudar a paliar los síntomas dermatológicos.

## **7.- CONCLUSIONES**



## **7. CONCLUSIONES**

1-Los fibroblastos procedentes de pacientes con Síndrome de Kindler poseen niveles superiores de especies reactivas del oxígeno.

2-Los niveles de lipoperóxidos (MDA) son superiores en las células procedentes de pacientes afectados de Síndrome de Kindler, tanto en fibroblastos como en queratinocitos.

3-Existe un mayor estrés oxidativo en fibroblastos y queratinocitos procedentes de pacientes con Síndrome de Kindler.

4-La protección antioxidante de las células procedentes de pacientes con Síndrome de Kindler es inferior a la de las células procedentes de controles sanos.

5-El contenido mitocondrial es inferior en las células procedentes de pacientes con Síndrome de Kindler y su patrón de distribución y morfología está alterado.

6-El potencial de membrana mitocondrial de los fibroblastos procedentes de pacientes con Síndrome de Kindler es inferior al de fibroblastos procedentes de sujetos control sanos.



## **8.- BIBLIOGRAFÍA**



## 8. BIBLIOGRAFÍA

Aebi H (1984) "Catalase *in vitro*". *Methods Enzymol.*; 105, 121-6.

Akerboom TP, Bilzer M Sies H (1982) "The relationship of biliary glutathione disulfide efflux and intracellular glutathione disulfide content in perfused rat liver". *J. Biol. Chem.*, 257(8), 4248-4252.

Arnoult D (2007) "Mitochondrial fragmentation in apoptosis" *Trends. Cell Biol.*, 17(1).

Ashton GH (2004) "Kindler syndrome". *Clin. Exp. Dermatol.*, 29(2): 116-21. Review.

Ashton GH, McLean WH, South AP, Oyama N, Smith FJ, Al-Suwaid R, Al-Ismaily A, Atherton DJ, Harwood CA, Leigh IM, Moss C, Didona B, Zambruno G, Patrizi A, Eady RA, McGrath JA. (2004) "Recurrent mutations in kindlin-1, a novel keratinocyte focal contact protein, in the autosomal recessive skin fragility and photosensitivity disorder, Kindler syndrome". *J. Invest. Dermatol.*, 122(1): 78-83.

Aumailley M, Has C, Tunggal L, Bruckner-Tuderman L. (2006) "Molecular basis of inherited skin-blistering disorders, and therapeutic implications". *Expert. Rev. Mol. Med.*; 8(24): 1-21. Review.

Babior BM (1978) "Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes". *N. Engl. J. Med.*; 298, 659-668.

Belloch F, Dumain P, Boisseau MR, Jallouestre C, Reiffers J, Bernard P, Lacombe F (1994) "A flow cytometric method using Hoechst 33342 and Propidium Iodide for simultaneous cell cycle analysis and apoptosis determination in unfixed cells" *Cytometry*, 17, 59-65.

- Bellomo C, Jewel SA, Thor H, Orrenius S (1982) "Regulation of intracellular calcium compartmentation: Studies with isolated hepatocytes and t-butylhydroperoxide". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; 79(22), 6842-6846.
- Benzi G, Moretti A (1995) "Age and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system". *Free. Rad. Biol. Med.*; 19(1), 77-101.
- Bereiter-Hahn J, Vöth M, Mai S, Jendrach M (2008) "Structural implications of mitochondrial dynamics" *Biotechnol. J.*, 3, 765-780.
- Boldogh IR, Pon LA (2006) "Interaction of mitochondria with the actin cytoskeleton" *Biochim. Biophys.*, 1763, 450-462.
- Boveris A, Chance BC (1973) "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen". *Biochem. J.*; 143, 707-716
- Brand MD, Murphy MP (1987) "Control of electron flux through the respiratory chain in mitochondria and cells". *Biol. Rev.*; 62, 141-193.
- Breen AP, Murphy JA (1995) "Reactions of oxyl radicals with DNA" *Free Radic. Biol. Med.*, 18(6), 1033-1077.
- Brigelius R, Muckel C, Akerboom TP, Sies H (1983) "Identification and quantification of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide" *Biochem. Pharmacol.*, 32 (17), 2529-2534.
- Burchill BR, Oliver M, Pearson CB, Leinbach ED, Berlin RD (1978) "Microtubule dynamics and glutathione metabolism in phagocytizing human polymorphonuclear leukocytes" *J. Cell. Biol.*, 76(2), 439-47.
- Cadenas E, Boveris A, Ragan CI, Stoppani AO (1977) "Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADPH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria" *Arch. Biochem. Biophys.*, 180(2), 248-257.
- Cadenas E, Davies KJA (2000) "Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging". *Free Radic. Biol. Med.*, 29(3/4), 222-230.

- Chance B, Sies H, Boveris A (1979) "Hydroxiperoxide metabolism in mammalian organs". *Physiol. Rev.*, 59(3), 527-605.
- Cheeseman KH, Slater TF (1993) "An introduction to free radical biochemistry" *Br. Med. Bull.* 49(3), 481-93.
- Chen H, Chan DC (2005) "Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission". *Hum. Mol. Genet.*, 14 (2): R283-9.
- Chiarugi P (2008) "From Anchorage Dependent Proliferation to Survival: Lessons from Redox Signalling" *IUBMB Life*, 60(5), 301–307.
- Cossarizza A (2006) "Measure of mitochondrial membrane potential with the fluorescent probe JC1" *Purdue Cytometry*, Volume 3.
- Cossarizza A, Salvioli, S. (2001) "Flow cytometric analysis of mitochondrial membrane potential using JC-1", *Curr. Protoc. Cytom.*, May, Chapter 9, Unit 9.14
- Dailey M, Marrs G, Statz J, Waite M (1999) "Exploring biological structure and function with Confocal Microscopy" *Biol. Bull.*, 197, 115-122.
- Darzynkiewicz Z, Bedner E, Li X, Gorczyca W, Melamed MR (1999) "Laser-scanning cytometry: a new instrumentation with many applications" *Exp. Cell. Res.*, 249, 1-12.
- Davies, FJA (1987) "Protein Damage and Degradation by Oxygen Radicals" *J. Biol. Chem.*, 262(20), 9895-9901.
- Debatin KM (2004) "Apoptosis pathway in cancer and cancer therapy" *Cancer. Immunol. Immunother.*, 53, 153-159.
- Didier C, Pouget J-P, Cadet J, Favier A, B'Eani J-C, Richard M-J (2001) "Modulation of exogenous and endogenous levels of thioredoxin in human skin fibroblasts prevents DNA damaging effect of ultraviolet A radiation" *Free Radic. Biol. Med. USA.*, 30(5), 537–546.
- Dimmer K, Scorrano L (2006) "(De)constructing Mitochondria: What For?" *Physiology*, 21, 233-241.

- Evans R, Patzak I, Svensson L, De Filippo K, Jones C, McDowall A, Hogg N (2009) "Integrins in immunity" *J. Cell. Sci.*, 122, 215-225.
- Földes-Papp Z, Demel U, Tilz G (2003) "Laser scanning confocal fluorescence microscopy: an overview" *Int. Immunopharmacol.*, 3, 1715-1729.
- Forster RE, Eastbrook RW (1993) "Is oxygen an essential nutrient?". *Annu. Rev. Nutr.*, 13, 383-403.
- Forstrom JW, Zakowski JJ, Tappel AL (1978) "Identification of the catalytic site of the rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine". *Biochemistry*, 17(13), 2639-2644
- Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN (1990) "Oxidative damage to DNA during aging: 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87, 4533-4577.
- Freeman BA, Crapo J (1982) "Biology of disease: Free radicals and tissue injury". *Lab. Invest.*, 47(5), 412-426.
- Frei B (1994) "Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of action". *Am. J. Med.*, 97(3A), 5S-13S.
- Fridovich I (1974) "Superoxide Dismutases". *Adv. Enzimol.*, 41, 35-97.
- Fridovich I (1986) "Superoxide dismutases". *Methods. Enzymol.*, 58: 61-97.
- Fridovich I (1989) "Superoxide dismutases: an adaptation to a paramagnetic gas". *J. Biol. Chem.*, 264, 7761-7764.
- Garesse R, Vallejo CG (2001) "Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes". *Review. Gene.*, 263: 1-16.
- Ghafourifar P, Richter C (1997) "Nitric oxide synthase activity in mitochondria". *FEBS Lett.*, 418(3), 291-296.
- Go YM, Jones DP (2008) "Redox compartmentalization in eukaryotic cells. Review". *Biochim. Biophys.*, 1780, 1273-1290.
- Gomes A, Fernandes E, Lima J (2005) "Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species" *J. Biochem. Biophys. Methods*, 65, 45-80.

- Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z (1994) "A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry" *Anal. Biochem.*, 218, 314-319.
- Grandemange S, Herzig S, Martinou JC (2009) "Mitochondrial dynamics and cancer" *Semin. Cancer. Biol.*, 19, 50-56.
- Granger DN, Rutili G, McCord JM (1981) "Superoxide radicals in feline intestinal ischemia". *Gastroenterology*; 81(1), 22-29.
- Griffin EE, Chan DC (2006) "Domain interactions within Fzo1 oligomers are essential for mitochondrial fusion". *J. Biol. Chem.*, 281: 16599–16606.
- Griffith OW, Meister A (1985) "Origin and turnover of mitochondrial glutathione". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82 (14), 4668-4672
- Halliwell B (1991) "Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease". *Am. J. Med.*; 91(3C): 14S-22S.
- Halliwell B (1994) "Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence?". *Lancet*, 344 (8924): 721-724.
- Halliwell B (1996) "Antioxidants in human health and disease". *Annu. Rev. Nutr.*, 16: 33-50.
- Halliwell B, Gutteridge JMG (1989) "Free radicals in biology and medicine". Oxford, Clarendon Press, Reino Unido.
- Halliwell (2007) "Oxidative stress and cancer: have we moved forward?". *Biochem. J.*, 401(1): 1-11.
- Harburger DS, Bouaouina M, Calderwood DA (2009) "Kindlin-1 and -2 directly bind the C-terminal region of beta integrin cytoplasmic tails and exert integrin-specific activation effects". *J. Biol. Chem.*, 284(17):11485-97.
- Has C, Wessagowit V, Pascucci M, Baer C, Didona B, Wilhelm C, Pedicelli C, Locatelli A, Kohlhase J, Ashton GH, Tadini G, Zambruno G, Bruckner-Tuderman L, McGrath JA, Castiglia D (2006) "Molecular basis of Kindler syndrome in Italy: novel and recurrent Alu/Alu recombination, splice site,

nonsense, and frameshift mutations in the KIND1 gene" *J. Invest. Dermatol.*; 126(8): 1776-83.

Hertz C, Aumailley M, Schulte C, Scholtzer-Schrehardt U, Bruckner-Tuderman L, Has C (2006) "Kindlin-1 Is a Phosphoprotein Involved in Regulation of Polarity, Proliferation, and Motility of Epidermal Keratinocytes" *J. Biol. Chem.*, 281(47), 36082-36090.

Holmgren A (1979) "Glutathione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides. Purification and characterization of glutaredoxin from *Escherichia coli*". *J. Biol. Chem.*, 254(9), 3664-71.

Hopkins F (1929) "On glutathione: a reinvestigation". *J. Biol. Chem.*, 84, 269-320

Jendrach M, Mai S, Pohl S, Vöth M, Bereiter-Hahn J (2008) "Short- and long-term alterations of mitochondrial morphology, dynamics and mtDNA after transient oxidative stress" *Mitochondrion*, 8, 293-304.

Jobard F, Bouadjar B, Caux F, Hadj-Rabia S, Has C, Matsuda F, Weissenbach J, Lathrop M, Prud'homme JF and Fischer J (2003) "Identification of mutations in a new gene encoding a FERM family protein with a pleckstrin homology domain in Kindler syndrome". *Hum. Mol. Genet.*, 12(8): 925-35.

Jonte, F., Hospital Universitario Central de Asturias.  
<http://es.scribd.com/doc/187631119/Ciclo-Celular-dr-Jonte>

Kaim G, Dimroth P (1999) "ATP synthesis by F-type ATP synthase is obligatorily dependent on the transmembrane voltage". *EMBO J.*, 18: 4118-4127

Kakkar P, Singh BK (2007) "Mitochondria: a hub of redox activities and cellular distress control". *Mol. Cell. Biochem.*, 305, 235-253.

Karbowski M, Arnoult D, Chen H, Chan D, Smith CL, Youle RJ (2004) "Quantitation of mitochondrial dynamics by photolabeling of individual organelles shows that mitochondrial fusion is blocked during the Bax activation phase of apoptosis" *J. Cell. Biol.*, 164(4), 493-499.

Kaviarasan PK, Prasad PV, Shradda and Viswanathan P (2005) "Kindler syndrome". *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.*, 71(5): 348-50.

- Ketterer B (1986) "Detoxication reactions of glutathione and glutathione transferases". *Xenobiotica*, 16, 957-973
- Kim JS, Qian T, Lemasters JJ (2003) "Mitochondrial permeability transition in the switch from necrotic to apoptotic cell death in ischemic rat hepatocytes" *Gastroenterology*. 124(2), 494-503
- Kindler T (1954) "Congenital poikiloderma with traumatic bulla formation and progressive cutaneous atrophy" *Br. J. Dermatol.* 66(3), 104-111.
- Korshunov SS, Skulachev VP, and Starkov (1997) "High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria". *FEBS Lett.*, 416: 15-18
- Kosower NS, Kosower EM (1978) "The glutathione status of the cells". *Int. Rev. Cytol.*, 54, 109-160
- Krendel M, Sgourdas G, Bonder EM (1998) "Disassembly of Actin filaments leads to increased rate and frequency of mitochondrial movement along microtubules" *Cell. Motil. Cytoskel.*, 40, 368-378.
- Kroemer G (2003) "Mitochondrial control of apoptosis: an introduction". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 304(3), 433-5
- Lai-Cheong JE, Parsons M, Tanaka A, Ussar S, South AP, Gomathy S, Mee JB, Barbaroux JB, Techanukul T, Almaani N, Clements SE, Hart IR, McGrath JA (2009) "Loss-of-function FERMT1 mutations in kindler syndrome implicate a role for fermitin family homolog-1 in integrin activation". *Am. J. Pathol.*, 175(4): 1431-41.
- Lai-Cheong JE, Tanaka A, Hawche G, Emanuel P, Maari C, Taskesen M, Akdeniz S, Liu L, McGrath JA (2009) "Kindler syndrome: a focal adhesion genodermatosis". *Br. J. Dermatol.*, 160(2): 233-42.
- Lanschuetzer CM, Muss W, Emberger M, Pohla-Gubo G, Klausegger A, Bauer JW, Hintner H (2003) "Characteristic immunohistochemical and ultrastructural findings indicate that Kindler's syndrome is an apoptotic skin disorder". *J. Cutan. Pathol.*, 30: 553-560.

- Larjava H, Plow EF and Wu C (2008) "Kindlins: essential regulators of integrin signalling and cell-matrix adhesion". *EMBO Rep.*, 9(12): 1203-8. Review.
- Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA, Herman B (1998) "The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy" *Biochim. Biophys. Acta.*, 1366(1-2),177-96.
- Lenaz G (2001) "The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology". *Life.*, 52: 159-164.
- Lowry O, Rosebrough N, Farr AL, Randall R (1951) "Protein measurement with the folin phenol reagent" *J. Biol. Chem.*, 265-275.
- Lu X, Lu D, Scully M, Kakkar V (2008) "The Role of Integrins in Cancer and the Development of Anti-Integrin Therapeutic Agents for Cancer Therapy", *Perspectives in Medicinal Chemistry*, 2 57-73
- Markossian KA, Poghossian AA, Paitian NA, Nalbandyan RM (1978) "Superoxide dismutase activity of cytochrome oxidase". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 81(4), 1336-1343.
- McCord JM, Fridovich I (1969) "Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte hemoglobin". *J. Biol. Chem.*, 244, 6049-6055.
- McCord JM, Keele BB Jr., Fridovich I (1971) "An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 68, 1024-1027.
- Meewes C, Brenneisen P, Wenk J, Kuhr L, Ma W, Alikoski J, Poswig A, Krieg T, Scharffetter-Kochanek F (2001) "Adaptative antioxidant response protects dermal fibroblasts from UVA-induced phototoxicity". *Free Radic. Biol. Med.*, 20, 238-247
- Meves A, Stremmel C, Gottschalk K, Fässler R (2009) "The Kindlin protein family: new members to the club of focal adhesion proteins". *Trends Cell. Biol.*, 19(10): 504-13. Review.
- Mizejewski GJ (1999) "Role of integrins in cancer: survey of expression patterns" *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 222(2), 124-38.

- Mullins JM (1994) "Overview of fluorophores". *Methods Mol. Biol.*, 34, 107:16.
- Mullins JM (1999) "Overview of fluorochromes". *Methods Mol. Biol.*, 115, 97-105.
- Navarro A, Boveris A (2007) "The mitochondrial energy transduction system and the aging process". *Am. J. Physiol-Cell. Ph.*, 292(2), C670–C686.
- Ochoa S (1983) "Regulation of protein synthesis initiation in eukaryotes". *Arch. Biochem. Biophys.*, 223, 325-349
- Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B (2007) "Mitochondrial Oxidative Stress: Implications for Cell Death". *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 47, 143–83.
- Orrenius S, Moldeus P (1984) "The multiple roles of glutathione in drug metabolism". *Trends. Pharmacol. Sci.*; 5, 432-435.
- Otterlei M, Bruhein P, Ahn B, Bussen W, Karmakar P, Baynton K, Bohr V (2006) "Werner syndrome protein participates in a complex with RAD51, RAD54, RAD54B and ATR in response to ICL-induced replication arrest" *J. Cell. Sci.*, 119, 5137-5146.
- Ow CK, Tay YK (2006) "What syndrome is this? Kindler syndrome. *Pediatr. Dermatol.*; 23(6): 586-8.
- Pagano G, Zatterale A, Degan P, d'Ischia M, Kelly FJ, Pallardó FV, Kodama S (2005) "Multiple involvement of oxidative stress in Werner syndrome phenotype" *Biogerontology*, 6(4), 233-243.
- Pajares MA, Durán C, Corrales F, Pliego MM, Mato JM (1992) "Modulation of rat liver S-adenosylmethionine synthetase activity by glutathione". *J. Biol. Chem.*; 267(25), 17598-17605
- Pallardó FV, Lloret A, Lebel M, d'Ischia M, Cogger VC, Le Couterur DG, Gadaleta MN, Castello G, Pagano G (2010) "Mitochondrial dysfunction in some oxidative stress-related genetic diseases: Ataxia-Telangiectasia, Down Syndrome, Fanconi Anaemia and Werner Syndrome" *Biogerontology*, (2010) 10.1007/s10522-010-9269-4.
- Pallardó FV, Markovic J, García JL, Viña J (2009) "Role of nuclear glutathione as a key regulator of cell proliferation". *Mol. Aspects. Med.*; 30(1-2), 77-85

- Papa S, Guerrieri F, Capitanio N (1997) "A possible role of slips in cytochrome c oxidase in the antioxygen defense system of the cell". *Bioscience Rep.*, 17(1), 23-31.
- Pellegrin L, Scorrano L (2007) "A cut short to death: Parl and Opa1 in the regulation of mitochondrial morphology and apoptosis" *Cell. Death. Differ.*, 14, 1275-1284.
- Philpot RM (1991) "Characterization of cytochrome P450 in extrahepatic tissues." *Methods. Enzymol.*; 206, 623-631.
- Pich, S.; Bach, D.; Briones, P.; Liesa, M.; Camps, M.; Testar, X.; Palacín, M. Y Zorzano, A. (2005) "The Charcot-Marie-Tooth 2A gene product, MFN2, upregulates fuel oxidation through expression of oxphos system", *Human. Mol. Genet.*, 14 (11): 1405-1415.
- Reed DJ (1990) "Glutathione: Toxicological implications". *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*; 30, 603-631
- Rickwood D, Wilson MT, Darley-Usmar VM (1987) "Isolation and characteristics of intact mitochondria. Mitochondria: a practical approach". V.M. Darley-Usmar, D. Rickwood and M.T. Wilson. Oxford, I.R.L. Press Limited: 1-16.
- Rieseberg M, Kasper C (2001) "Flow cytometry in biotechnology" *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56, 350-360.
- Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay FS, Fogarty KE, Lifshitz L, Tuft RA, Pozzan T (1998) "Close contacts with the Endoplasmic Reticulum as determinants of Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> responses" *Science*, 280, 1763-1766.
- Robinson K, Janes M, Pehar M, Monette J, Ross M, Hagen T, Murphy M, Beckman J (2006) "Selective fluorescent imaging of superoxide *in vivo* using ethidium-based probes" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 103, 15038-15043.
- Ronnenberg O, Baddeley D, Scheipl F, Verveer PJ, Burkhardt H, Cremer C, Farhmeir L, Cremer T, Joffe B (2008) "Spatial quantitative analysis of fluorescently labeled nuclear structures: problems, methods, pitfalls" *Chromosome res.*, 16, 523-562.

- Sadler E, Klausseger A, Muss W, Deinsberger U, Pohla-Gubo G, Laimer M, Lanschuetzer C, Bauer J W, Hintner H (2006) "Novel KIND1 mutation in Kindler Syndrome with severe gastrointestinal tract involvement" *Arch. Dermatol.*, 142, 1619-24.
- Santel, A. and Fuller, M.T. (2001) "Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin" *J. Cell Sci.*, 114, 867-874.
- Sastre J, Pallardó FV, Viña J (1996) "Glutathione, oxidative stress and aging". *Age*, 19. 129-139.
- Saugstad OD (1990) "Oxygen toxicity in the neonatal period". *Acta Paediatr. Scand.*, 79(10), 881-892.
- Sherindan JW, Bishop CJ, Simmons RJ (1981) "Biophysical and morphological correlates of kinetic change and death in a starved human melanoma cell line" *J. Cell. Sci.*, 49, 119-137.
- Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN (1999) "Oxidative damage and mitochondrial decay in aging" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91, 10771-10778.
- Siegel DH, Ashton GH, Penagos HG, Lee JV, Feiler HS, Wilhelmsen KC, South AP, Smith FJ, Prescott AR, Wessagowit V, Oyama N, Akiyama M, Al About D, Al About K, Al Githami A, Al Hawsawi K, Al Ismaily A, Al-Suwaid R, Atherton DJ, Caputo R, Fine JD, Frieden IJ, Fuchs E, Haber RM, Harada T, Kitajima Y, Mallory SB, Ogawa H, Sahin S, Shimizu H, Suga Y, Tadini G, Tsuchiya K, Wiebe CB, Wojnarowska F, Zaghloul AB, Hamada T, Mallipeddi R, Eady RA, McLean WH, McGrath JA, Epstein EH (2003) "Loss of kindlin-1, a human homolog of the *Caenorhabditis elegans* actin-extracellular-matrix linker protein UNC-112, causes Kindler syndrome". *Am. J. Hum. Genet.*, 73(1): 174-87.
- Sies H. (1999) "Glutathione and his role in cellular functions" *Free Radical Bio. Med.*, 27(9/10), 916-921.
- Skulachev VP, Bakeeva LE, Chernyak BV, Domnina LV, Minin AA, Pletjushkina OY, Saprunova VB, Skulachev IV, Tsyplenkova VG, Vasiliev JM, Yaguzhinsky LS,

- Zorov DB (2004) "Thread-grain transition of mitochondrial reticulum as a step of mitoptosis and apoptosis". *Mol. Cell. Biochem.*, 256-257, 341-358
- Smith, CV (2008) "Adhesion molecules and receptors" *J. Allergy Clin. Immunol.*, 121 (2 suppl), 375-379.
- Stadtman ER. (1992) "Protein Oxidation and Aging" *Science*, 257, 1220-1224.
- Szilagyi G, Simon L, Koska P, Telek G, Nagy Z (2006) "Visualization of mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species via double staining" *Neurosci. Lett.*, 399, 206-209.
- Taddei ML, Parri M, Mello, T, Catalano A, Levine AD, Raugei G, Ramponi G, Chiarugi P (2007) "Integrin-mediated cell adhesion and spreading engage different sources of reactive oxygen species" *Antioxid. Redox. Signal.* 9, 469-481.
- Tarpey M, Wink D, Grisham M (2004) "Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: *in vitro* and *in vivo* considerations" *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 286, 431-444.
- Tateishi N, Shiozaki H, Naruse A, Nakashima K, Shiozaki H (1977) "Rat liver glutathione: Possible role as reservoir of cysteine". *J. Nutr.*; 107(1): 51-58
- Viña J (ed). 1990. "Glutathione: Metabolism and Physiological Function". CRC Press, Boston.
- Viña J, Gascó E, et al. (1990) "Effect of physiological changes in cystathionase activity on amino acid and glutathione metabolism in rat fetus. Endocrine and biochemical development of the fetus and neonate". J. M. Cuezva and A. M. Pascual-Leone. Nueva York., Editorial Plenum Press: 283-286.
- Viña JR, Palacín M, Puertes IR, Hernandez R, Viña J (1989) "Role of the gamma-glutamyl cycle in the regulation of amino acid translocation". *Am. J. Physiol.*; 257 (6Pt1), E916-E922
- Viña J, Romero FJ, Saez GT, Pallardó FV (1983) "Effects of cysteine and N-acetyl cysteine on GSH content of brain of adult rats". *Experientia*, 39(2): 164-5.

- Wardma, P (2007) "Fluorescent and luminiscent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues". *Free Radic. Bio. Med.*, 43, 995-1022.
- Westerman B (2008) "Molecular Machinery of Mitochondrial Fusion and Fission" *J. Biol. Chem.*, 283(20), 13501-13505.
- White S, McLean I (2005) 'Kindler surprise: mutations in a novel actin-associated protein cause Kindler syndrome" *J. Dermatol. Sci.*, 38, 169-175.
- Wiebe CB, Petricca G, Häkkinen L, Jiang G, Wu C and Larjava HS (2008) "Kindler syndrome and periodontal disease: review of the literature and a 12-year follow-up case". *J Periodontol*; 79(5): 961-6. Review. Yan, S., Brown, S., Kolozsvary, A., Freytag, S., Lu, M., Kim, J., "Mitigation of radiation-induced skin injury by AAV2-mediated MnSOD gene therapy" *J. Gene Med.*, 10, 1012-1018
- Yoo BC, Seidl R, Cairns N, Lubec C (1999) "Heat-shock protein 70 levels in brain of patients with Down syndrome and Alzheimer's disease" *J. Neural Transm. Suppl.*, 57, 315-322.
- Young I S, Trimble E R (1991) "Measurement of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection". *Ann. Clin. Biochem.*, 28, 504-508.



## **ANEXO: ABREVIATURAS**

ADN: ácido desoxirribonucleico  
ADP: adenosina difosfato  
ARN: ácido ribonucleico  
ATP: adenosina trifosfato  
BSA: seroalbúmina bovina  
cDNA: ADN complementario  
CDNB: clorodinitrobenzeno  
Cu/Zn SOD: cobre/zinc superóxido dismutasa  
DMEM: medio basal de Eagle modificado  
DMSO: dimetil sulfóxido  
DNA: ácido desoxirribonucleico  
DRP 1: dynamin related protein 1  
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético  
FIS 1: proteína de fisión 1  
FK1: fibroblastos del paciente 1  
FK2: fibroblastos del paciente 2  
FN1: fibroblastos del sujeto control sano 1  
FN2: fibroblastos del sujeto control sano 2  
GCL: glutamato cisteín ligasa  
GPx1: glutatión peroxidasa  
GSH: glutatión  
GSSG: disulfuro de glutatión  
GST: glutatión-s-transferasa  
HBSS: Hank's balanced salt solution  
HEPES: ácido hidroxietil piperazinaetanosulfónico  
hOGG1: 8-oxoguanina glicosilasa humana  
HPLC: High Performance Liquid Chromatography  
HSP: heat shock protein  
IGEPAL: octilfenoxipolietoxietanol  
IP: yoduro de propidio

JC1: 5,5',6,6'tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazol-carbocianin ioduro

MDA: malondialdehído

MG: mitotracker green

Mn SOD: manganeso superóxido dismutasa

OMIM: On line database Mendelian Inheritance in Man

OPA 1: optic atrophy type 1

ORPHAN: portal de "rare diseases and orphan drugs"

PBS: "Phosphate Buffer Saline" tampón fosfato salino

PCA: "perchloric acid" ácido perclórico

QK1: queratinocitos del paciente 1

QK2: queratinocitos del paciente 2

QN1: queratinocitos del sujeto control sano 1

QN2: queratinocitos del sujeto control sano 2

RNA-asa: ribonucleasa

RNS: especies reactivas del nitrógeno (reactive nitrogen species)

ROS: especies reactivas del oxígeno (reactive oxygen species)

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

SBF: suero bovino fetal

SDS: dodecilsulfato sódico

SK: Síndrome de Kindler

TBA: ácido 2-tiobarbitúrico

TBST: tampón TRIS salino + Tween 20 (polisorbato)

TRIS: 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol