FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

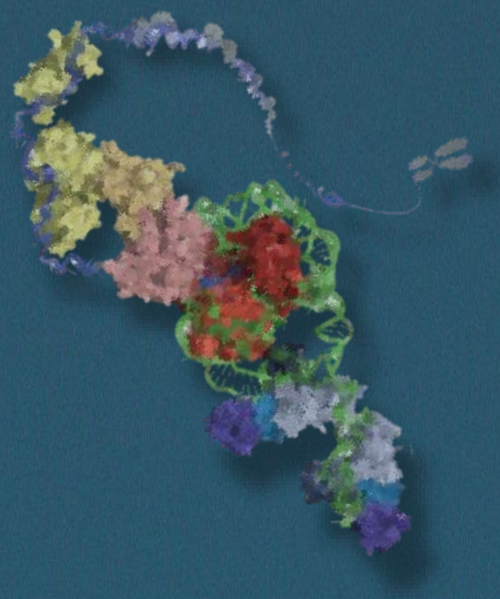
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN FISIOLOGÍA

DESREGULACIÓN DEL ESTADO REDOX EN MODELOS DE DEPLECIÓN AGUDA DE GENES IMPLICADOS EN LA DISQUERATOSIS CONGÉNITA

JOSÉ SANTIAGO IBÁÑEZ CABELLOS

MARZO 2018



Tutor: Dr. Federico V. Pallardó Calatayud

Directores: Dr. José Luis García Giménez

Dra. Gisselle Pérez Machado

Dr. Rafael Tabarés Seisdedos

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN FISIOLOGÍA

DESREGULACIÓN DEL ESTADO REDOX EN MODELOS DE DEPLECIÓN AGUDA DE GENES IMPLICADOS EN LA DISQUERATOSIS CONGÉNITA

JOSÉ SANTIAGO IBÁÑEZ CABELLOS

MARZO 2018

Tutor: **Dr. Federico V. Pallardó Calatayud**

Directores: **Dr. José Luis García Giménez**

Dra. Gisselle Pérez Machado

Dr. Rafael Tabarés Seisdedos

Dr. **José Luis García Giménez**, Investigador Post-doctoral CIBER consorciado al Dpt. Fisiología de la Facultat de Medicina de la Universitat de València.

Dra. **Gisselle Pérez Machado**, Investigador Post-Doctoral Torres Quevedo.

Dr. **Rafael Tabares Seisdedos**, Catedrático del Dpto. de Medicina de la Universitat de València.

CERTIFICA/N:

Que la presente memoria, titulada "**DESREGULACIÓN DEL ESTADO REDOX EN MODELOS DE DEPLECCIÓN AGUDA DE GENES IMPLICADOS EN LA DISQUERATOSIS CONGÉNITA**", corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por D. **José Santiago Ibáñez Cabellos**, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Fisiología de la Universitat de València.

Y para que conste firma/n el presente certificado en Valencia, a 19 de abril del 2018.

Fdo.: Rafael Tabares Seisdedos
Director/a

Fdo.: José Luis García Giménez
Director/a

Fdo.: Gisselle Pérez Machado
Director/a

Ratificación del tutor/a con su firma:

Fdo.: Federico V. Pallardó Calatayud
Tutor/a

Para la realización de esta tesis doctoral, José Santiago Ibáñez Cabellos ha disfrutado de una ayuda para la Formación de Personal Investigador de Carácter Predoctoral (PIF), dentro del marco del programa “Atracció de Talent”, del Vicerrectorado de Investigación y Política Científica de la Universitat de València.

El trabajo se ha llevado a cabo en el grupo U733 del CIBERER de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València.

Como resultado de la tesis realizada se publicó un artículo titulado “*Acute telomerase components depletion triggers oxidative stress as an early event previous to telomeric shortening*” J.S. Ibáñez-Cabellos, G. Pérez-Machado, M. Seco-Cervera, E. Berenguer-Pascual, J.L. García-Giménez, F.V.Pallardó. *Redox Biology*, 2017. Además, una segunda publicación está pendiente de ser enviada a una revista internacional.

AGRADECIMIENTOS

"Si se cree y se trabaja, se puede"

Recuerdo perfectamente el momento en el que entre en la facultad de Medicina, para encontrarme con el Profesor Federico V. Pallardó. Recuerdo observarlo en su escritorio del 0E, me indicó con la mano que pasará. Jamás había estado en un laboratorio que no fuese en prácticas, no conocía de nada mí, tampoco me pidió notas, ni referencias... Simplemente me dijo, muy amablemente, "si te gusta lo que hacemos, puedes quedarte sin problemas". La respuesta es obvia, ya llevo casi 7 años en el laboratorio. Gracias al Profesor Pallardó, por permitirme que hiciera mí trabajo de grado, de máster y la tesis. El profesor, siempre ha intentado ayudar y facilitar las cosas en todo lo posible. Además, de aportar su experiencia, que tan necesaria ha resultado ser muchas veces.

Una de las razones por la que estado tanto tiempo, y sin duda, el principal artífice de esta tesis, ha sido el Dr. José Luis García Giménez. Describir a esta bella persona se hace difícil, ya que es una de esas personas que todo el mundo quiere. Un hombre realmente trabajador, generoso y con mucho conocimiento. Gracias José Luis, por todo, porque no solo has demostrado ser un excelente líder, sino un gran amigo, preocupándote siempre por todos los problemas. También me gustaría dar las gracias también a Lorena, por ayudar en todo lo posible y ser muy generosa. Realmente, ambos sois excelentes personas. Tampoco me quiero olvidar de la pequeña Aitana, que con su sonrisa y sus bailes, contagia la alegría necesaria para seguir. Además de ayudarme, sin lugares a dudas, a aprenderme la canción de suéltalo. Por todo esto, los considero como parte de mi familia.

Sin duda, agradecer a la Dra. Giselle Pérez todo su conocimiento, metodología y ayuda prestada, porque fue clave, ya que sin ella no se hubiese podido realizar esta tesis. Recuerdo cada vez que volvía de Cuba, siempre lo agradecía porque sabía que cuando estaba se avanzaba. También, agradecer a Guillermin, por los momentos y las risas que nos hemos echado, sobretodo en la Fila. Gracias a ambos por los buenos consejos que me habéis intentado proporcionar.

Agradecer al Profesor Rafael Tabarés, su ayuda y generosidad conmigo. Gracias al profesor, he podido seguir más años en el grupo lo que me ha servido para ampliar y mejorar la tesis de forma sustancial.

Una tesis no se puede hacer sin un gran laboratorio, que mejor laboratorio que el de los raritos. La verdad es que el llevar tiempo aquí me ha dado la oportunidad de conocer a muchos compañeros. Empezando por Isa que estuvo muchos años, y con su gran

experiencia siempre ha querido ayudar a todos los compañeros a que las cosas nos fueran bien. A los diversos compañeros que he ido conociendo: Marta, Alba, Paula, Jenny, Aitor, Ester, Clara, Vanessa, Carmen, Aingeru, Bojana, Laura, Diana, Pablo, Martina, María, Rosa, Inma, Ángela, Cristina, Rebeca, a mi procrastinador favorito Dani o más conocido por el Gallu, a nuestro querido Francisco José o José Francisco y al nuevo Paul of London, Pablo, que pese a todo seguirá siendo Maluma. Gracias a todos ellos por los grandes momentos que compartimos, esenciales para una tesis y de una gran amistad. Agradecer a Daymé, no solo por los momentos vividos, sino también por su ayuda, ya que realmente es ella quien me enseño lo que puedo saber de bioinformática. Mención aparte el Dream Team de las tortugas ninjas, Guillermo, Alejandro, Jesús y un servidor. La verdad es que la pizza tiembla ante nuestra presencia. Son unos chavales increíbles, que te alegran cada día y con los que trabajar vale la pena. A todos ellos les deseo lo mejor, pues seguro que triunfarán. Gracias a Carlos Romá por los consejos, correcciones y los momentos compartidos, así como sus bromas que tanto repite en clase. A Eva por su gran conocimiento en la bioestadística que es de gran ayuda y liberarnos del papeleo de los pedidos. A Pili, por los consejos que nos da para mejorar. A Guadalupe, por toda la ayuda que me ha dado en esta tesis. Me gustaría destacar y agradecer a Sergio, la ayuda que siempre me ha ofrecido y del buen rollo que compartimos. Gracias a ti siempre disponía de campana y las células podían seguir viviendo. Espero que no cambies por el bien de Sergio Jr. y Isabela, un fenómeno. Agradecer a Carla, la amistad tan fuerte que hemos tenido durante todos estos años, y que tantas cosas hemos tenido que aguantar. Espero poder compartirla por mucho tiempo más.

A nuestros vecinos los LINCES, por los momentos compartidos y su generosidad con todo. En especial a Xavi, que es nuestro informático favorito. Espero algún día desarrollar una app con él. Gracias también a los compañeros del laboratorio de Viña, aunque muchos no estén, siempre ayudaron en lo posible.

Gracias también a los compañeros de los laboratorios de Oncología del 2E. Sobre todo aquellos buenos momentos compartidas en el pasado con nuestros partidos de fútbol, los siempre rivales INCLIVA-Fisiología.

Agradecer a Elena y Mari de la Secretaría de Fisiología, el bueno trato que siempre me han ofrecido. Siempre han tenido una eficiencia y un trato personal que raramente se encuentra. Gracias de nuevo a Mari, porque últimamente la tengo muy liada con poder llevar a buen puerto esta tesis.

Me gustaría destacar a mis amigos de Sagunto, porque vale la pena la calidad a la cantidad. Gracias a Virginia, porque más vale pedir perdón que pedir permiso. A Fernando, por entender que a veces hay que aguantar todo. A Kim, la última

incorporación y familia, que nos hace más ameno todo y nos alegra. Al Gallo Rafa, porque me contagiaste del espíritu de superación y a no rendirse jamás. A Ana Cristina, porque es una persona con un gran corazón y un reflejo de lo que supone la amistad. A todos vosotros en conjunto, gracias por ayudarme a caminar de nuevo. Somos Gallos.

Nota especial para el primo Javi, con el que compartí unos momentos inolvidables y con el que aprendí que es bueno tener ambición, pero sobretodo que hay que trabajarla.

Gracias a mis amigos del Camino, por regalarme unos momentos increíbles en los momentos más duros y la energía necesaria para seguir mí propio camino.

Gracias a mis amigos de Marruecos, por enseñarme que con nada uno puede ser feliz, y que la vida es una aventura y hay que vivirla.

A mis amigos de la universidad, en especial a Ray, Pablo, Juan y Toni, que siempre me ayudaron en todo y me hicieron las prácticas más amenas. Siempre nos quedaran esos grandes momentos y el “explícamelo”.

A la Peña la Botija, por la gran confianza y alta estima que me tienen. Además, con ellos es difícil no pasarlo bien.

Eternamente agradecido a la labor de Rosana, Alberto y Alexandra. Porque me ayudaron en mi momento más oscuro. Todos ellos con paciencia y entendimiento, me han hecho que siga con pie firme en el día a día y que en todos los ámbitos me vaya genial. No obstante, me gustaría destacar a Alberto y Alexandra, porque gran mérito de esta tesis la tienen ellos, desde las sombras me han estado animando a seguir realizándola y a creer en esto que llamamos ciencia.

Gracias a mi familia, porque son los mejores. Siempre han estado preocupándose y apoyando en todo cuanto fuese. Siempre me tienen un cariño especial, que no se puede pagar con nada. Así que cualquier calificativo que os pueda decir, se queda corto. Tiempos difíciles hemos pasado, pero hoy podemos ver recompensado un poco todo ello con esta tesis. A mis abuelos, Pepe y Santiago, aunque ya no están, los sigo teniendo presentes, esta tesis va por vosotros. Porque he aprendido en vosotros que la generosidad y el trabajo son necesarios. A mis padres, de los cuales estoy tremendamente orgulloso, porque siempre han intentado darme la mejor educación posible y que nunca me faltara de nada. Siempre han estado en las duras y en las maduras. Muchas gracias por invertir tantas horas y esfuerzos en mí, esta tesis es vuestra también.

Gracias a mi otra familia, Seco-Cervera, porque siempre me han aceptado como uno más. Por su generosidad y por los buenos momentos y los mejores que vendrán.

A mi familia perruna, que son Junior, Lula y Lluna. Siempre dándotelo todo sin pedir nada a cambio, bueno comida sí. Que buenos momentos y recuerdos me habéis dado.

Finalmente, quiero dar las gracias a la persona más importante que tengo. Esa persona que me inspira, que mejor me comprende y a la que más amo, Marta Seco Cervera. Tú, amor, eres una de las personas que más me ha tenido que aguantar y sabe por todo lo que he pasado. Gracias por tanto y perdón por tan poco. Sin duda, tenerte a mi lado me hace sentirme la persona más feliz del mundo. Eres una persona especial, un espejo en el que mirarse y seguir tu ejemplo. Nunca cambies. Por caminar siempre contigo al lado. Te quiero.

ABREVIATURAS

γ-H2A.X	Forma Fosforilada de la Variante H2A.X
ARNi	Pequeño ARN de interferencia
DC	Disqueratosis Congénita
DKC1	Pseudouridina Sintasa 1 Disquerina
DSB	Roturas de Doble Cadena
ERN	Especies Reactivas de Nitrógeno
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
GSH	Glutatión Reducido
GSSG	Glutatión Oxidado
HeLa	Células de cáncer cérvico-uterino
KEGG	Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto
NHEJ	Unión de Extremos No Homólogos
NOP10	Subunidad 3 del complejo de ribonucleoproteína H/ACA
oGG1	Enzima 8-Oxoguanina Glicosilasa
PARP1	Poli-(ADP-Ribosa) Polimerasa 1
RAD51	Recombinasa RAD51
RAD53	Serina/Treonina Proteína Quinasa
REB	Reparación por Escisión de Bases
REN	Reparación por Escisión de Nucleótidos
RH	Recombinación Homóloga
RNP	Ribonucleoproteína
RNPsn	Ribonucleoproteína Nucleolares
RT-qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa
SSB	Roturas de Simple Cadena
TIN2	Proteína codificada por el gen TINF2
TINF2	Factor nuclear 2 que interacciona con TERF1
WRN	Proteína Werner con actividad Helicasa
XPA	Enzima Xenoderma Pigmentosum grupo A

ÍNDICE

0. ABSTRACT ..... - 1 -

1. INTRODUCCIÓN ..... - 7 -

1.1. BIOLOGÍA DEL TELOMERO Y TELOMEROPATÍAS ..... - 9 -

1.2. DISQUERATOSIS CONGÉNITA ..... - 12 -

1.2.1. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS ..... - 13 -

1.2.2. BASES GENÉTICAS ..... - 14 -

1.3. ESTRÉS OXIDATIVO ..... - 19 -

1.4. SISTEMAS ANTIOXIDANTES CELULARES ..... - 21 -

1.5. DAÑO A BIOMOLÉCULAS ..... - 25 -

1.6. MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN ..... - 30 -

1.6.1. Reparación por escisión de bases (REB) ..... - 30 -

1.6.2. Reparación por escisión de nucleótidos (REN) ..... - 31 -

1.6.3. Recombinación homóloga (RH) ..... - 33 -

1.6.4. Unión de extremos no homólogos (NHEJ) ..... - 35 -

1.7. MODELO CELULAR DE SILENCIAMIENTO AGUDO DE GENES IMPLICADOS EN LA DC ..... - 37 -

2. HIPÓTESIS ..... - 39 -

3. OBJETIVOS ..... - 43 -

4. MATERIALES Y MÉTODOS ..... - 47 -

4.1. LINEAS CELULARES Y CULTIVOS ..... - 49 -

4.2. SILENCIAMIENTO GÉNICO ..... - 49 -

4.3. VIABILIDAD CELULAR ..... - 51 -

4.4. CICLO CELULAR ..... - 52 -

4.5. MEDIDA DE LA LONGITUD DE LOS TELÓMEROS ..... - 53 -
4.6. CUANTIFICACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS ..... - 55 -
4.7. ACTIVIDAD TELOMERASA ..... - 55 -
4.8. EXPRESIÓN GÉNICA GLOBAL MEDIANTE MATRICES DE EXPRESIÓN ..... - 58 -
4.9. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS MATRICES DE EXPRESIÓN ..... - 59 -
4.10. PSEUDOURIDILACIÓN ..... - 60 -
4.11. RATIO GSSG/GSH ..... - 63 -
4.12. DOT-BLOT ..... - 64 -
4.13. WESTERN-BLOT ..... - 66 -
4.14. DENSITOMETRÍA ..... - 67 -
4.15. EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE RT-qPCR ..... - 68 -
4.16. ANÁLISIS DE γ-H2A.X POR CITOMETRÍA ..... - 70 -
4.17. ANÁLISIS DE POLI-(ADP-RIBOSIL)ACIÓN (PAR) POR CITOMETRÍA ..... - 71 -
4.18. ANÁLISIS ESTADÍSTICO ..... - 73 -

5. RESULTADOS ..... - 75 -

5.1. GENERACIÓN SATISFACTORIA DE LOS MODELOS CELULARES DE siDKC1, siNOP10 y siTINF2 ..... - 77 -
5.2. LA EXPRESIÓN GÉNICA GLOBAL SE ENCUENTRA ALTERADA EN LOS MODELOS DE DC ..... - 80 -
5.3. LA GLICÓLISIS SE ENCUENTRA ALTERADA EN EL MODELO CELULAR DE TINF2 ..... - 87 -
5.4. LA PSEUDOURIDILACIÓN SE ENCUENTRA AFECTADA EN LOS MODELOS CELULARES DE DC ..... - 88 -
5.5. LA RUTA DE P53 SE ENCUENTRA ACTIVA EN LOS MODELOS CELULARES DE DC ..... - 89 -

5.6. EL ESTRÉS OXIDATIVO ES UN RASGO PRESENTE EN LOS MODELOS CELULARES DE DC ..... - 91 -

5.7. LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES SE ENCUENTRAN ALTERADAS EN LOS MODELOS CELULARES ..... - 93 -

5.8. LOS MODELOS CELULARES GENERADOS SUFREN UNA MAYOR PARSILACIÓN CUANDO SON SOMETIDOS A ESTRÉS ..... - 99 -

5.9. LA RESPUESTA AL DAÑO DEL ADN SE VE AFECTADA EN LOS MODELOS CELULARES ..... - 101 -

6. DISCUSIÓN ..... - 105 -

6.1. ANTECEDENTES EN LAS TELOMEROPATÍAS ..... - 107 -

6.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS MODELOS CELULARES DE DC ..... - 109 -

6.3. TRANSCRIPTÓMICA DE LOS MODELOS CELULARES ..... - 111 -

6.4. LA PSEUDOURIDILACIÓN SE ENCUENTRA AFECTADA ..... - 113 -

6.5. ESTRÉS OXIDATIVO ..... - 114 -

6.6. ESTUDIO DEL DAÑO AL ADN ..... - 121 -

6.7. RELEVANCIA DE LOS RESULTADOS DE LOS MODELOS CELULARES ..... - 123 -

7. CONCLUSIONS ..... - 127 -

8. LIMITACIONES ..... - 131 -

9. BIBLIOGRAFÍA ..... - 135 -

10. ANEXO ..... - 147 -

0. ABSTRACT

Telomeres are special structures located at the end of chromosomes in eukaryotic cells. The main function of telomeres involve regulation of the structure of chromosomes, control of cell division, and regulation of cellular life through cellular senescence. Length and structure of telomeres depend on action of multiprotein complexes that compose the telosome and telomerase complexes. Telosome is formed by telomere binding proteins, which bind to the terminal end of telomeric DNA. The structural unit consists of six protein subunit: POT1, TRF1, TRF2, TIN2, ACD, and RAP1, that provide structural support. The function of telosome is to protect and to maintain the structure of telomeres, in addition to regulating telomerase activity. Telomerase is an enzymatic complex formed by a set of ribonucleoproteins with polymerase activity. The proteins involved are TERT, with reverse transcriptase activity; TERC, ribonucleotide complex; Disquerin, NOP10, NHP2, GAR1, and TCAB1.

There are a group of genetic diseases caused by alterations in telomeric maintenance, known as telomeropathies, which share clinical manifestations and molecular mechanisms. The first described telomeropathy was Dyskeratosis Congenita (DC). It is a rare multisystemic disease that presents premature aging. DC is characterized by a triad of mucocutaneous signs, consisting of nail dystrophy, abnormal pigmentation and oral leukoplakia. DC shows three types of inheritance: X-linked DC, where the mutated gene is *DKC1*; Autosomal Dominant DC, where can be *TERC, TERT, TINF2*, and *ACD*; and Autosomal Recessive DC, can be *NOP10, NHP2, TCAB1, CTC1*, and *PARN*.

In addition, molecular events that alter telomere length, due to genes mutations in telomerase and telosome complex, may not be the only molecular mechanism responsible for the phenotype associated with DC. Currently, there is a debate about which is the primary cause of the physiopathology of the disease. Telomerase deficiency and alterations in ribosome biogenesis have been proposed as primary causes in the etiopathogenesis of DC; besides, oxidative stress and alterations in the antioxidant response have been considered a secondary event to telomere dysfunction. It has also been observed that extra-telomeric functions could contribute to the pathophysiology of DC. For example *DKC1, NOP10*, and *NHP2* are genes that code for small proteins present in the telomerase complex and H/ACA boxes. The H/ACA boxes are involved in the maturation of nucleolar, ribosomal and transfer RNA, by a pseudouridylation

process. Other, such as TIN2, can migrate from the nucleus to mitochondria and regulate mitochondrial oxidative phosphorylation. Also TERT can migrate from the nucleus to mitochondria in order to reduce oxidative stress.

On the other hand, it has been described that DNA damage is a common feature of telomeropathies. Cells derived from DC patients have shown an increase in chromosomal fragmentation, an alteration in their ability to repair DNA.

In this thesis, we have designed a cellular model of acute silencing of DKC1, NOP10 and TINF2 genes. This allows the identification of gene expression profiles and the mechanisms altered as a consequence of the affectation of these genes. Moreover, the characterization of these models will contribute to distinguish molecular events that are affected before the telomeric shortening takes place. Transcriptomic analysis constitutes a good tool to analyse these cellular models, in order to observe which genes and routes are affected in the different silenced cell models.

The silencing for each cell model was confirmed by mRNA and protein expression of DKC1, NOP10, and TINF2 genes using RT-qPCR and Western blot. A decrease of 90% in gene expression and a decrease of 40% in protein expression were observed in silenced cells respect to siCONTROL. Moreover, cell viability and cell cycle were not affected by this silencing. Gene expression of *TERC* decreased in the siDKC1 and siNOP10 models, although the telomeric length was not affected in the cellular models, but a significant decrease in telomerase activity was observed for both the siDKC1 and siNOP10 models. Furthermore, a decrease in pseudouridylation and in *18S* ribosomal subunit expression were observed by RT-qPCR when *DKC1* and *NOP10* were silenced. Consequently, the depletion of *DKC1* and *NOP10* caused a decrease in telomerase activity via TERC, in addition to altering pseudouridylation and ribosomal biogenesis.

Once characterized the models, we analysed their transcriptome by means of gene expression arrays. We observed a total of 1951 genes altered in siNOP10, a total of 217 genes altered in siDKC1, and a total 216 altered genes in siTINF2. Following identification of genes with differential expression, we proceeded to study the number of significant KEGG metabolic pathways for each model, obtaining 22 pathways for siNOP10, 9 pathways for siTINF2 and 6 pathways for siDKC1. The pathways obtained in each model were compared among them, to identify similar pathways. The results show that siDKC1

and siNOP10 models had in common the signalling pathway of p53, involving the common genes SESN3 and ZMAT3. On the other hand, siNOP10 and siTINF2 had in common the pathway of adherent junctions, with the genes *YES1* and *TGFBR1*.

The results obtained from the expression matrices were validated by RT-qPCR. Regarding *ZMAT3* gene expression, a decrease was observed for siDKC1 and an increase for siNOP10, while in *SESN3*, a decrease was observed in siDKC1 and siNOP10. The expression of *YES1* was increased in all the silenced models, while for *TGFBR1* an increase was observed in siNOP10 and siTINF2. The genes *YES1* and *TGFBR1* are involved in cell cycle and apoptosis; thus, it is possible that after longer silencing times the cell cycle will be affected and cells would enter apoptosis. Next, we proceeded to observe if p53 was activated. Our results showed an increased gene expression of *p53* and higher phosphorylation levels in siDKC1 and siNOP10 models.

For characterization of oxidative stress, different parameters were evaluated, such as the levels of carbonylated proteins, the GSSG/GSH ratio and the oxidation of Peroxiredoxin 6 (PRDX6-SO_3H). An increase of all these parameters was observed in siDKC1 and siNOP10 models. In addition, these results are in agreement with SESN3 gene expression, where a decrease in *SESN3* was observed for siDKC1 and siNOP10. Sestrins are necessary to reduce oxidized peroxiredoxins. In siTINF2, no changes were observed, although these results are in agreement with other studies of acute silencing. Next, we studied the main antioxidant enzymes. The ones responsible for detoxifying cellular superoxide showed a decrease in *SOD1* gene expression for siNOP10, and an increase in *SOD2* gene expression for siDKC1 and siNOP10. The results in protein expression of these genes, CuZnSOD and MnSOD proteins respectively, showed a significant increase in MnSOD when NOP10 was silenced. The enzymes responsible for detoxifying hydrogen peroxide were also studied, finding an increase in *CAT* expression in siNOP10, and an increase in *GPX1* expression in siDKC1. The results obtained for Catalase and Glutathione peroxidase protein levels did not show significant differences in any of the cellular models. Also the enzymes responsible for reduction of disulphide bridges, thioredoxins, were studied. The results showed an increase in *TRX1* gene expression in siDKC1 and siNOP10 models, whereas a decrease in *TRX2* gene expression was observed in siTINF2, and an increase in siNOP10. The results for protein levels

showed an increase in TRX1 when NOP10 was silenced, and a decrease in TRX2 when TINF2 was silenced. These results suggest the generation of a response in order to attenuate oxidative stress.

After confirming the presence of oxidative stress, we studied DNA damage. The levels of γ-H2A.X were analyzed in all cellular models, under basal conditions and after stimulation with H_2O_2. The results did not show significant differences for any models, in any conditions. Probably, because the number of double-strand breaks in DNA can be still very low after 48h of silencing. On the other hand, the levels of PARsylation were evaluated, in basal conditions and after stimulation with etoposide. The results did not show differences in basal levels, but showed an increase with etoposide in siDKC1 and siNOP10. These findings indicate that cells were more susceptible to single chain damage in DNA, results that agree with other studies of DC patient cells, were more susceptibility to damage with etoposide was found.

Finally, the profile of the main enzymes repairing DNA damage was studied. We focused in the enzyme oGG1, responsible for the repair of bases; the enzyme XPA, responsible for repair through the nucleotide excision repair mechanism; the enzymes RAD53 and RAD51, involved in the homologous recombination; and the enzymes WRN and PARP1, involved in non-homologous end joining. The results obtained for gene expression analysis of each of these enzymes, in basal conditions or after stimulation with etoposide, showed an increase in *RAD53* gene expression under basal conditions and after stimulus in siNOP10, and an increase in *PARP1* gene expression after stimulus in siDKC1 and siNOP10. These results correlate with those obtained in PARsylation levels after stimulation with etoposide.

In conclusion, the silencing of *DKC1* and *NOP10*, but not of *TINF2*, affects the H/ACA boxes. This impairment affects the pseudouridylation processes, necessary for the maturation of ribosomal, nuclear and transfer RNA. In addition, oxidative stress is an early event for DKC1 and NOP10 depletion, but might be a secondary consequence of telomere shortening, for *TINF2*. The susceptibility to DNA damage is increased after *DKC1* and *NOP10* silencing, mainly through PARP1-related molecular pathways. Finally, the onset of oxidative stress and the increased susceptibility to DNA damage observed after *DKC1* and *NOP10* silencing is promoted by p53 activation.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. BIOLOGÍA DEL TELOMERO Y TELOMEROPATÍAS

Los telómeros son estructuras especiales, que se encuentran en los extremos de los cromosomas de las células eucariotas. Se trata de regiones de ADN no codificante con una secuencia de nucleótidos altamente repetitiva, TTAGGG (Figura 1). La función principal de los telómeros, es la estabilidad estructural de los cromosomas, el control de la división celular y la regulación del tiempo de vida celular a través de la senescencia celular [1].

La longitud y la estructura de los telómeros dependen principalmente de la actuación conjunta de los complejos multiproteicos: telosoma y telomerasa (Figura 2) [2]. El telosoma, también llamado complejo protector o shelterina, está formado por proteínas de unión a telómeros (TBPs), que se unen al extremo final del ADN telomérico (Figura 2). Su núcleo está formado por seis subunidades proteicas: POT1, TRF1, TRF2, TIN2, ACD (conocido previamente como *TPP1*) y RAP1 [2]; que interactúan entre si y a su vez con otras proteínas no específicas de los telómeros, proteínas asociadas o accesorias al telosoma, como PINX1 o Apollo, conformando el punto central en una auténtica red de regulación a la que denominan "interactoma" de los telómeros.

La función principal del telosoma es proteger y mantener la estructura de los telómeros, además de regular la actividad telomerasa. Para ello, el telosoma reconoce las secuencias teloméricas y se une a ellas obligando al ADN a formar una estructura en forma de lazo-T. Este lazo se forma para evitar que la maquinaria de reparación pueda reconocer el telómero como rupturas intracatenarias, que desencadenaría una respuesta de reparación, como la unión de extremos no homólogos (o en inglés *non-homologous end joining*, NHEJ) [3]. Además de proteger y estabilizar los telómeros también regulan su longitud, ya que cuando el telosoma se une y forma el lazo-T evita que la telomerasa pueda incorporarse y elongar el telómero, funcionando como un complejo regulador de la actividad telomerasa [4].

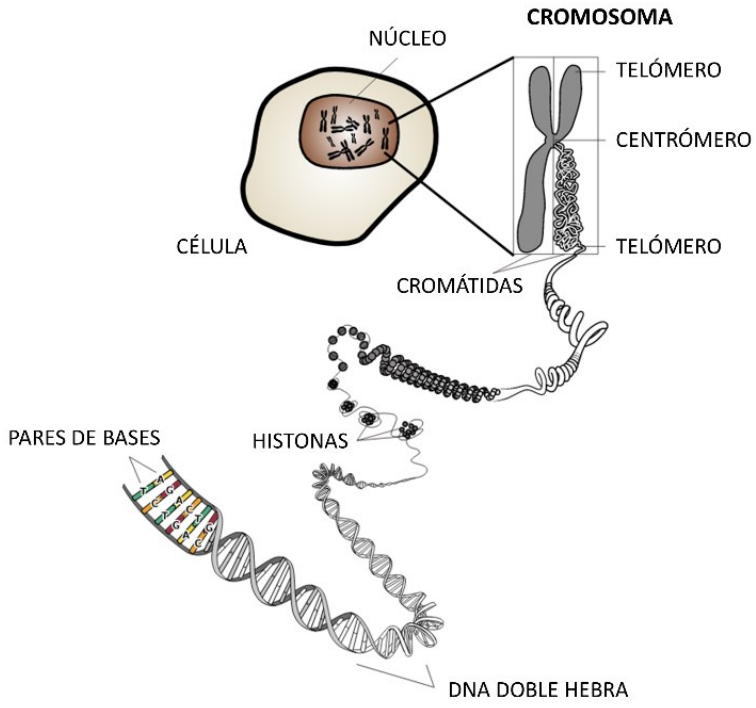


Figura 1. *Estructura del cromosoma y del telómero. El ADN se compacta a diferentes niveles, el primer nivel donde el ADN se une a las histonas formando los nucleosomas, luego los nucleosomas se unen formando la fibra de 30nm, esta fibra se compacta más aun formando la de 300nm, la compactación del ADN sigue con la fibra de 700nm para conformar finalmente el cromosoma. En los extremos de los cromosomas es donde se localizan los telómeros. Se trata de regiones de ADN no codificante con una secuencia de nucleótidos altamente repetitiva, TTAGGG (fuente: http://www.genome.gov/Pages/Hyperion//DIR/VIP/Glossary/Illustration/chromosome.shtml).*

Las proteínas que conforman el telosoma son TRF1, que se une a la doble cadena TTAGGG del telómero además de ser inhibidor de la telomerasa; TRF2, que se une a la doble cadena TTAGGG del telómero y previene que sea reconocido como daño; RAP1, que es una proteína estabilizadora del complejo que se asocia con TRF2; POT1, que se une a las regiones de cadena simple del ADN telomérico previniendo la degradación de este; ACD, que actúa como estabilizador del complejo y media en el acceso de la telomerasa al telómero; TIN2, que estabiliza a las proteínas TRF1 y TRF2, además de inhibir la parsilación de TRF1 y regenerar el ADN telómerico *de novo* [1, 2] (Figura 2). Además, en los últimos años se le han atribuido nuevas funciones a la proteína TIN2, cómo la de asociarse con la matriz nuclear [5] para posicionar correctamente los telómeros durante la meiosis o durante procesos de daño al ADN [6], por lo que la perdida de la proteína TIN2 podría producir grabes problemas a nivel celular.

La telomerasa es un complejo enzimático formado por un conjunto de ribonucleoproteínas (RNP) con actividad polimerasa (Figura 2), que está presente en células germinales, tejidos fetales y en ciertas células madre. Presenta actividad retrotranscriptasa para compensar el acortamiento de aproximadamente 50 nucleótidos que sufren los telómeros en cada ciclo de replicación, conocido como problema de la "replicación terminal". Este acortamiento resulta de la imposibilidad de la ADN polimerasa para rellenar el hueco que se produce cuando se elimina el cebador de los fragmentos de Okazaki del extremo 5' de la cadena retardada. Para rellenar el hueco que es rico en guaninas, TTAGGG, la telomerasa reconoce las secuencias en tándem y realiza una extensión del telómero en dirección 5'→3', utilizando como molde su propia molécula de ARN sin necesidad de cebador. Las proteínas que conforman el complejo proteico de la telomerasa son: TERT, que es la subunidad con actividad transcriptasa reversa; la Disquerina, NOP10, NHP2 y GAR1 que son RNPs nucleolares cuyas funciones son ayudar en la formación de la estructura de la telomerasa y también forman parte de la cajas H/ACA que intervienen en la maduración los ARN mediante la pseudouridilación; TCAB1, es una proteína que recluta al resto de proteínas para forma el complejo telomerasa y conducirlo hasta los cuerpos de Cajal donde elongará los telómeros. El complejo ribonucleotídico de la telomerasa está formado por TERC, cuya secuencia de ARN es AAUCCC (Figura 2) [1, 7].

Existe un conjunto de enfermedades que comparten mutaciones en genes involucrados en el mantenimiento del telómero, por lo que han recibido la denominación de telomeropatías. Se incluye en este grupo tanto enfermedades prevalentes como la fibrosis idiopática pulmonar (IPF), cirrosis hepática, y la anemia anaplásica, como también síndromes raros de temprano y severo debut como la Disqueratosis congénita (DC), el síndrome Hoyeraal-Hreidarsson (HHS), el síndrome Revesz (RS) la ataxia telangiectasia (AT), el síndrome de Werner (WS) y la progeria de Hutchinson Gilford (HGPS) [8-11]. Teniendo como epicentro la homeostasia del telómero estas patologías comparten síntomas y mecanismos moleculares, pero la considerable complejidad génica subyacente en su etiopatogenia contribuye al amplio espectro fenotípico que exhiben.

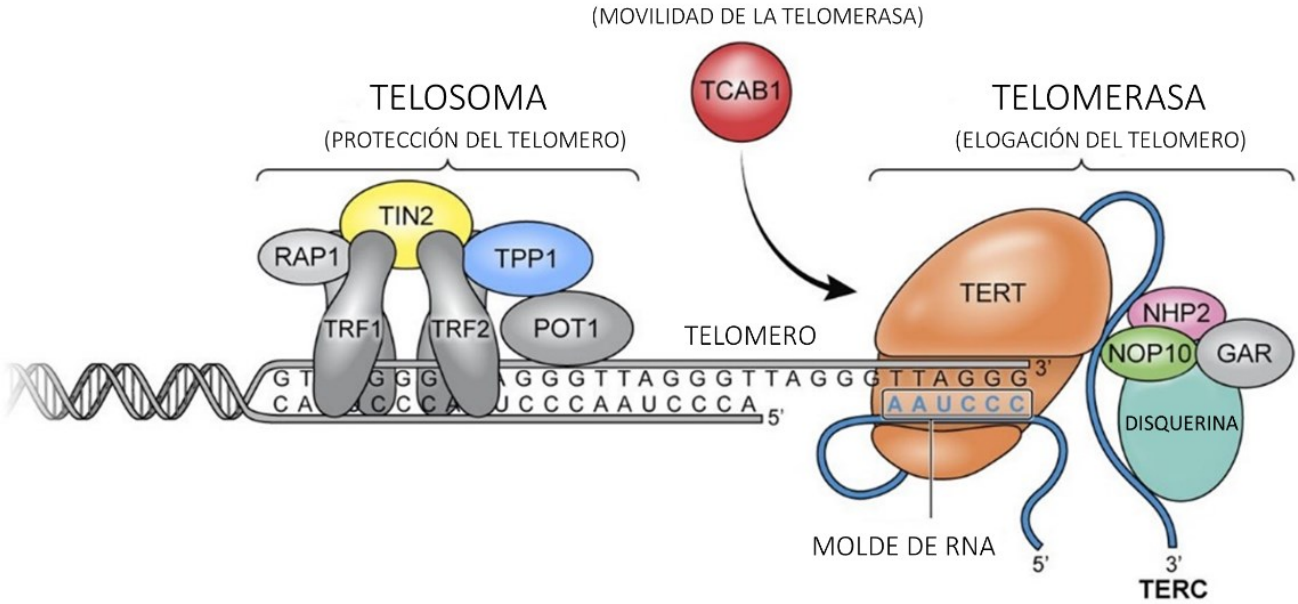


Figura 2. Estructura de los diferentes complejos para el mantenimiento telomérico. Los telómeros están compuestos por miles de repeticiones TTAGGG localizadas en los extremos de los cromosomas lineales. Los telómeros están protegidos por el telosoma, un complejo de 6 proteínas (TRF1, TRF2, TIN2, POT1, TPP1 y RAP1), cuya principal función es el mantenimiento de la longitud del telómero formando los bucles T, evitando la activación de la respuesta al daño del ADN y modulando la actividad de la telomerasa. La telomerasa, es la enzima responsable de la elongación de los telómeros, tiene un componente estructural de 4 proteínas (disquerina, NOP10, NHP2 y GAR1), una plantilla de ARN (TERC) y la transcriptasa inversa (TERT). La proteína TCAB1 asegura el tráfico del complejo telomerasa a los extremos teloméricos (Fuente: Danielle M. Townsley et al. Bone marrow failure and the telomeropathies. Blood 2014).

1.2. DISQUERATOSIS CONGÉNITA

La primera telomeropatía descrita fue la DC. Se trata de una enfermedad rara multisistémica (ORPHA 1775), que presenta envejecimiento prematuro y tiene una prevalencia estimada de 1/1.000.000 de habitantes [12]. La esperanza de vida de los pacientes se encuentra alrededor de los 50 años, y las principales causas de muerte son fallos en la medula ósea que conllevan finalmente a la aparición de cáncer.

Una característica única e intrigante de DC es la alta y estrecha relación entre la heterogeneidad genética, y la heterogeneidad clínica, en términos de anomalías fenotípicas, edad de inicio y gravedad.

1.2.1. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS

La DC se caracteriza por anormalidades mucocutáneas, encanecimiento, alopecia, fibrosis pulmonar, fallos de la médula ósea y alta predisposición al desarrollo de tumores [13]. Dentro de las anormalidades mucocutáneas, las más comunes son: distrofia ungueal, pigmentación anormal (especialmente cuello y tórax) y leucoplasia oral, que conforman la clásica tríada fenotípica patognomónica en estos pacientes (Figura 3).

Figura 3. *Características clínicas de la Disqueratosis congénita. Se observan las tres características mucocutáneas que caracterizan clásicamente la Disqueratosis congénita: (A) pigmentación anormal de la piel; (B) distrofia ungueal; (C) leucoplasia oral (Kirwan, M.; Dokal, I. Dyskeratosis congenita, stem cells and telomeres. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2009).*

Las manifestaciones clínicas de la DC, frecuentemente aparecen en la niñez. La pigmentación anormal de la piel y los cambios en las uñas, suelen ser los primeros signos en aparecer, lo hacen alrededor de los 10 años. Los fallos de médula ósea se desarrollan sobre los 20 años. Alrededor de un 80% de pacientes con una edad de 30 años ya han manifestado estos fallos. Sin embargo, existe una variabilidad considerable entre los pacientes, con respecto a la edad en que manifiestan la enfermedad y la severidad de la misma, incluso en miembros de la misma familia [14].

1.2.2. BASES GENÉTICAS

El origen génico de la DC es muy heterogéneo, pero sobresalen las mutaciones en al menos once genes que forman parte del complejo telomerasa: *TERC, TERT, DKC1, NHP2, NOP10* y *TCAB1*; del complejo telosoma: *TINF2* y *ACD*; y también en genes que intervienen en la replicación del telómero, *CTC1*; en la formación del lazo-T telomérico, *RTEL1*; y en la maduración del extremo 3 terminal de TERC, degradando la cola poli-A, *PARN* [14-17].

El gen *DKC1* codifica para la proteína Disquerina [14], que se une a la subunidad TERT de la telomerasa, ayudando a la estabilización del complejo telomérico. Más de 50 mutaciones en DKC1 se han asociado con el modo más prevalente (48%) de herencia de DC, la herencia recesiva ligada al cromosoma X (DC-X). Las mutaciones identificadas son de diferente naturaleza: sustituciones de aminoácidos, deleciones e incluso la pérdida de todo el exón 15 dentro de la disquerina, aunque predominan las mutaciones *de novo* que producen un solo cambio de aminoácido. Las mutaciones suelen agruparse en 2 regiones del gen: I) la región que codifica el dominio de unión al ARN del dominio PseudoUridina sintasa y Archaeosina transglicosilasa (PUA) y II) la región del extremo N-terminal, ambas regiones están muy juntas, lo que sugiere que todas las mutaciones afectan la función de la disquerina de unión de ARN [18].

Otro tipo de herencia de DC es la autosómica dominante (DC-D) con una prevalencia de un 34%. Este tipo de herencia se asocia con mutaciones hasta en cinco genes. Las primeras mutaciones, se identificaron en *TERC*, que codifica el componente de ARN de la telomerasa, específicamente en el dominio pseudoknot (plantilla), y el dominio ScaRNA para el reclutamiento nuclear [18]. El segundo gen mutado que se identificó en este tipo de herencia fue *TERT*, que codifica para el componente enzimático de la telomerasa. El componente TERT se compone de tres dominios, la extensión N-terminal (NTE) que contiene dominios de interacción de ARN 1 y 2 (RID1 y RID2), el dominio de transcripción inversa (RT) donde se produce la transferencia de nucleótidos y la extensión C-terminal (CET) para procesividad y localización. Las mutaciones se distribuyen a lo largo de la longitud de la región de codificación con un ligero

agrupamiento en el dominio RT. También, se identificaron mutaciones en *RTEL1,* que regula la actividad telomerasa a través de la formación del lazo-T telomérico y en el gen ACD, que codifica para una proteína que forma parte del complejo telosoma dando soporte estructural y regulando a la telomerasa. Finalmente, el gen *TINF2*, también exhibe mutaciones que se asocian con este modo de herencia de DC. *TINF2*, codifica la proteína TIN2 del componente del complejo telosoma. Los pacientes con mutaciones en *TINF2*, tienen tendencia a presentar un fenotipo severo y con una aparición de la enfermedad a edades muy tempranas, además presentan telómeros excesivamente cortos [14]. TIN2 participa en el reclutamiento dependiente de ACD de la actividad de la telomerasa, las proteínas mutantes disminuyen su capacidad para asociarse con TERC. Recientemente se descubrió que TIN2 se une a la proteína llamada HP1g, que se une a los telómeros en la fase S y participa en la cohesión, por lo que las mutaciones en este sitio de unión interfieren con el mantenimiento de la longitud de los telómeros y ocasiona la aparición de DC.

La tercera forma de herencia es la autosómica recesiva (DC-R), con una prevalencia del 18%, y que se correlaciona con mutaciones en cinco genes. El primer gen identificado fue *NOP10*, componente estructural de la telomerasa, en el cual las mutaciones homocigotas afectan un residuo altamente conservado. El segundo que se descubrió fue el gen *NHP2*, forma parte del complejo telomerasa, en el que se encontraron mutaciones bialélicas. En pacientes con este tipo de DC, también se han apreciado mutaciones en *TCAB1,* cuya función es reclutar las diversas proteínas para formar la telomerasa. Finalmente, los últimos dos genes mutados que se han descrito para este tipo de herencia fueron *CTC1*, interviene en la replicación del telómero, y *PARN*, que degrada las colas poli A de TERC [19].

Los eventos moleculares que alteran la longitud del teloméro a causa de mutaciones en los genes del complejo telomerasa y telosoma pueden no ser el único mecanismo molecular responsable del fenotipo asociado a DC. Por ejemplo, *DKC1, NOP10 y NHP2* son genes que codifican para proteínas pequeñas, que están presentes tanto en el complejo de telomerasa como en los RNPsn de H/ACA (Figura 4), que son complejos

donde se produce la maduración de los ARN nucleolares (ARNsn), ARN ribosómicos (ARNr) y ARN de transferencia (ARNt) [20], mediante un proceso de pseudouridilación [21, 22]. Además, y en particular para la disquerina, su función en el complejo telomerasa no está del todo dilucidada, como lo es el efecto de las mutaciones en la pseudouridilación y, a su vez, el efecto de una disminución en la eficacia de la pseudouridilación en la biogénesis de los ribosomas. En este sentido y debido a la doble función de la disquerina, las contribuciones relativas de los defectos del ARNr y los defectos de la telomerasa a la patología de DC son difíciles de determinar [12, 23].

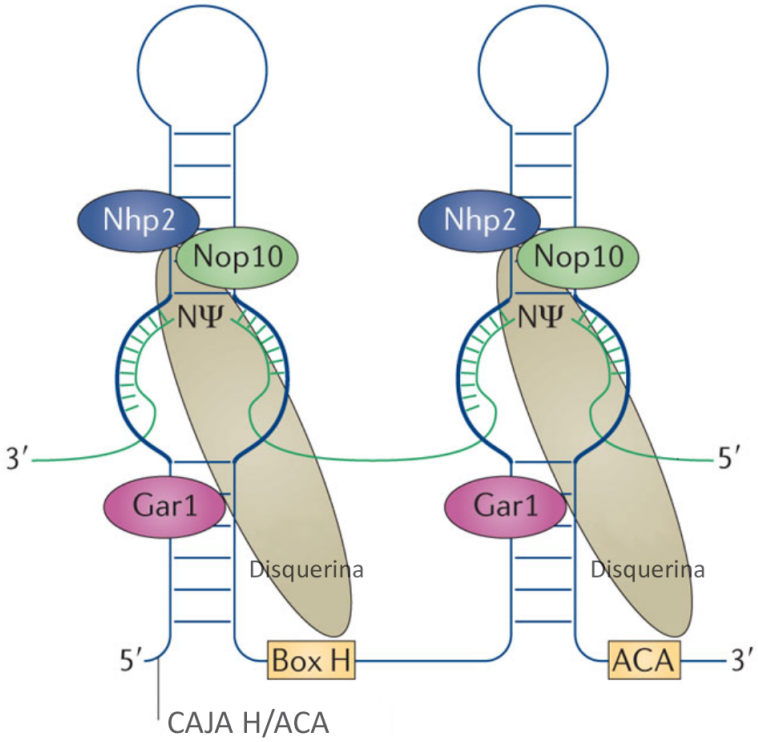


Figura 4. *Esquema de la caja H/ACA compuesta por ribonucleoproteínas. Las cajas H/ACA están formadas por cuatro proteínas principales DKC1, GAR1, NHP2 y NOP10. El ARN sustrato se une a la caja H/ACA por complementación de bases y de esta forma se puede pseudouridilar (Modificado de Karijolich, J.; Yi C.; Yu, T. Transcriptome-wide dynamics of RNA pseudouridylation. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2015).*

La pseudouridilación es la conversión del nucleótido uridina en una forma isomérica diferente, la pseudouridina (Ψ); y constituye la modificación postranscripcional más abundante en los ARN no codificantes (Figura 5). Los ARNr humanos maduros contienen aproximadamente 95 modificaciones [24]. La pseudouridilación se rige por dos mecanismos independientes. El primer mecanismo está mediado por la sola familia de

proteínas llamadas pseudouridina sintasas (PUSs), que reconocen el sustrato y catalizan la isomerización independiente de ARN. La segunda es la pseudouridilación guiada por ARN por medio de las RNP que forman las cajas H/ACA (Figura 4) [25].

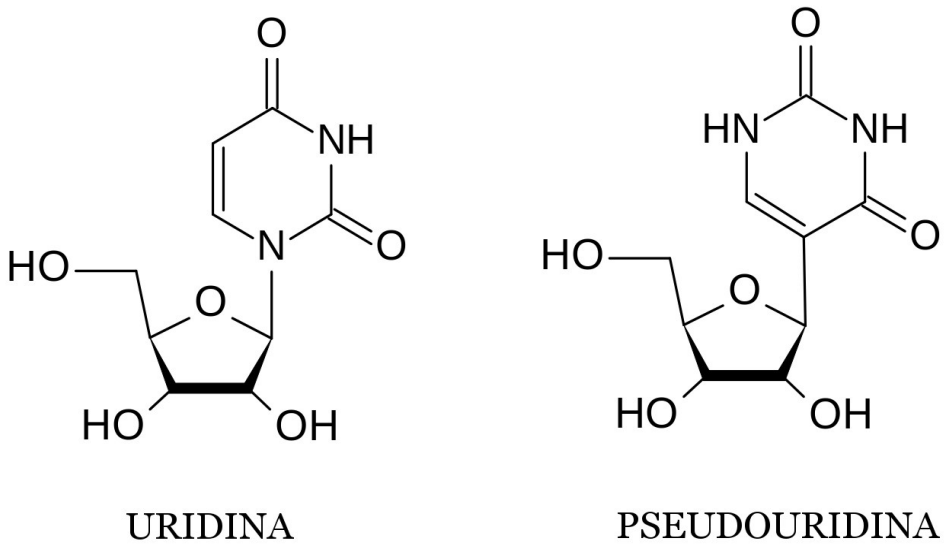


Figura 5. *Representación de las estructuras químicas de la uridina y de la pseudouridina. La pseudouridilación es una modificación postranscripcional del ARN nucleolares, ARN ribosómicos y ARN de transferencia, donde se produce una isomerización del nucleótido de uridina en pseudouridina (Fuente: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:DiferenceBetweenUridine-PseudouridineENG.svg).*

El papel de los residuos modificados en esos ARN no se comprende completamente. Sin embargo, las pseudouridinas parecen ser importantes para la estabilidad y la función del ARNr y para el ensamblaje y la función del RNPsn de U2. Por lo tanto, las mutaciones causantes de DC en las proteínas H/ACA podrían alterar la función ribosómica y espliceosoma, además del mantenimiento de los telómeros [20]. Por ejemplo, se ha visto que el ortólogo del gen DKC1 en levaduras, el gen Cbf5p, es esencial para el procesamiento previo al ARNr y está relacionado con la participación en la pseudouridilación del ARNr, lo que sugiere que la Disqueratosis sería como una enfermedad ribosomal en los primeros estadios. Mutaciones en el gen DKC1 podrían convertirse en un limitante de la velocidad para el procesamiento previo al ARNr, por lo tanto, para la biosíntesis de ribosomas, o podría ser que el ARNr procesado inadecuadamente provocaría que los ribosomas no funcionaran correctamente [26].

Además de estos genes, existen otros genes con funciones extra-teloméricas como TINF2, que también puede contribuir al fenotipo asociado a DC. Se ha observado que TIN2 es un regulador del metabolismo. Se descubrió que TIN2 se procesa postraduccionalmente en las mitocondrias y regula la fosforilación oxidativa mitocondrial. La reducción de la expresión de TINF2 por silenciamiento de ARNi, inhibió el metabolismo de la glicólisis y redujo la producción de especies de reactivas de oxígeno (ERO). Estos resultados sugieren un vínculo entre las proteínas teloméricas y el control metabólico, proporcionando un mecanismo adicional por el cual las proteínas teloméricas regulan el cáncer y el envejecimiento [27]. También se ha observado como el gen TERT del complejo telomerasa, también tienen funciones más allá del telómero que podrían afectar al fenotipo de la DC. Recientemente se demostró, que TERT puede migrar del núcleo a la mitocondria en condiciones de estrés oxidativo, cuya función es proteger la función mitocondrial y disminuir el estrés oxidativo intracelular [28, 29]. En conjunto, estos hallazgos fundamentan un vínculo entre las proteínas teloméricas y el control metabólico, presentando el estrés oxidativo como un mecanismo adicional que contribuye al fenotipo de DC, el cáncer o el envejecimiento [14].

En la actualidad persiste el debate sobre cuál es la causa primaria en la DC, debate que deviene de la variedad de procesos que pueden verse alterados por el número y la versatilidad funcional de los genes mutados relacionados con la patología. Tanto la deficiencia en la telomerasa como las alteraciones en la biogénesis de los ribosomas ha sido propuesta indistintamente como causas primarias en la etiopatogenia de la DC. A día de hoy son sólidos y razonables los argumentos para aceptar que ambas, sin exclusión de ninguna de ellas, contribuyen a la fisiopatología de esta enfermedad [30, 31].

A pesar de lo mucho que se ha avanzado en el conocimiento acerca de las telomeropatías, todavía existen importantes preguntas quedan por contestar, siendo un reto actual, el estudio molecular de la etiopatogenia de estos desórdenes.

1.3. ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo puede definirse como la desregulación entre la producción celular de especies reactivas de oxigeno (ERO) o especies reactivas de nitrógeno (ERN) y la capacidad antioxidante [32]. Las ERO y las ERN se producen continuamente en las células a través del metabolismo basal por medio de reacciones químicas de óxido-reducción. Las principales fuentes de producción son la cadena respiratoria, el sistema citocromo P-450 y la síntesis de prostaglandinas [33]. Las ERO y ERN son moléculas implicadas en distintos procesos de señalización celular, sin embargo, si se produce un aumento de estas puede ocurrir un daño oxidativo a macromoléculas como los ácidos nucleicos, los carbohidratos, los lípidos y las proteínas, y es por ello que aparecen implicadas en la fisiopatología de muchas enfermedades, como las telomeropatías [34].

Una de las ERO más comunes es el anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$), que se encuentra en un estado de oxidación de -1/2 debido a la ganancia de un electrón en la molécula de oxígeno formado en muchas reacciones de oxidación. El $O_2^{\cdot -}$ es poco reactivo pero muy tóxico, ya que puede reaccionar y dar lugar a otros intermediarios más reactivos [35].

$$O_2 + e^- + H^+ \rightarrow O_2^{\cdot -} + H^+$$

Otra ERO es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que presenta un estado de reducción de dos electrones en el oxígeno. El H_2O_2 se puede formar a partir del radical $O_2^{\cdot -}$ por dismutación, o directamente de la reducción del O_2 en medio ácido. Se trata de una molécula de alta reactividad, ya que atraviesa las membranas celulares [36].

$$2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 \rightarrow O_2$$

$$O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$$

El radical hidroxilo ($OH^{\cdot}$) es la especie de oxigeno más reactiva. Se puede generar a consecuencia de las radiaciones de alta energía (rayos X y rayos γ). Otro proceso más importante para generar el hidroxilo es la reacción de Fenton [37]:

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\cdot}$$

También se puede formar a partir de agua oxigenada y del radical superóxido, en una reacción catalizada por metales como el hierro o el cobre conocida como reacción de Haber-Weiss [38]:

$$H_2O_2 + O_2^{\cdot-} \rightarrow O_2 + OH^- + OH^{\cdot}$$

Las ERN más comunes son el óxido nítrico (NO), la principal fuente de producción del NO es el catabolismo del aminoácido L-arginina cuando es convertido a L-citrulina por la óxido nítrico sintasa (NOS) (Figura 6) [39].

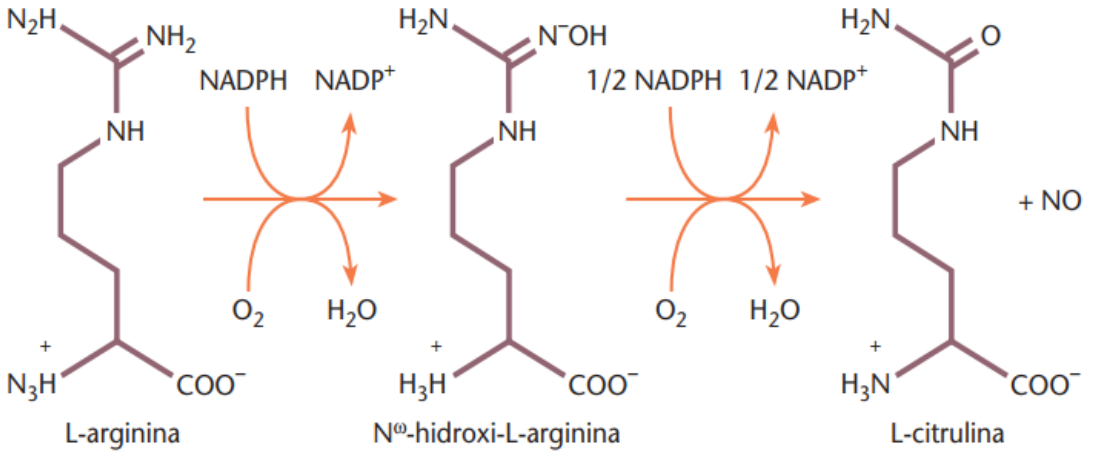


Figura 6. *Reacción de la NO-Sintasa, que produce óxido nítrico y citrulina a partir de arginina (Fuente: Josep J Centelles, Cristina Esteban, Santiago Imperial. Óxido nítrico. Offarm, 2004).*

Se trata de una molécula altamente inestable que se oxida rápidamente en presencia de O_2 [40]. Cuando el NO reacciona con $O_2^{\cdot-}$ se genera el peroxinitrito ($ONOO^-$), que reacciona con tirosina y triptófano para dar lugar a nitrotirosina y nitrotriptofano,

respectivamente, o a lípidos para producir lípidos nitrados. Todos estos subproductos son usados como marcadores biológicos en el estrés oxidativo [40].

$$O_2^{\cdot-} + NO^{\cdot} \rightarrow ONOO^{-}$$

Se ha descrito que la sensibilidad especial al estrés oxidativo erosiona los telómeros y que por el contrario las sustancias antioxidantes desaceleran el acortamiento [41]. El estrés oxidativo muchas veces se ha considerado como secundario a las disfunciones teloméricas, y las respuestas de reparación del daño al ADN. No obstante, también se ha barajado que el estrés oxidativo pudiera ser un mecanismo que se desarrolla como consecuencia de mutaciones en genes implicados en DC con independencia del acortamiento telomérico.

Al respecto sobresalen los que evalúan genes mutados que actúan sobre dianas celulares directamente implicadas en el equilibrio redox. En este sentido, la proteína telomérica TERT fue la primera que se identificó localizada en los compartimentos subcelulares mitocondria y núcleo, y en correspondencia se le han reconocido funciones, además de la del mantenimiento de la integridad telomérica, asociadas con la protección frente al estrés oxidativo [30, 42]. TIN2 es una proteína telosómica a la que también se le ha atribuído la capacidad de regular el metabolismo mitocondrial, la producción de especies reactivas de oxigeno (ERO) y la producción de especies reactivas de nitrógeno (ERN) [27]. Queda en evidencia que las proteínas implicadas en la homeostasia telomérica, pueden desencadenar tanto fenotipos tumorales como ligados al envejecimiento prematuro a través del estrés oxidativo.

1.4. SISTEMAS ANTIOXIDANTES CELULARES

El organismo ha desarrollado una serie de mecanismos de defensa antioxidante para evitar el daño a moléculas biológicas o de orgánulos celulares. Halliwell en 1995 definió antioxidante como “cualquier sustancia que, en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato”

[43, 44]. Los mecanismos antioxidantes pueden actuar de la siguiente forma: previniendo la formación de especies EROs y ERNs, interceptando el ataque de las EROs y ERNs, secuestrando metabolitos reactivos y convirtiéndolos en moléculas menos reactivas, amplificando la resistencia de las dianas biológicas sensibles al ataque de las EROs y ERNs, facilitando la reparación del daño causado por las EROs y ERNs, manteniendo un ambiente favorable para la actuación de otros antioxidantes entre otras funciones. Los sistemas antioxidantes se clasifican en antioxidantes enzimáticos y antioxidantes no enzimáticos [45].

El glutatión (GSH) es el antioxidante no enzimático más importante en las células eucariotas y se encuentra en todos los orgánulos celulares. Se trata del tripéptido (gamma-glutamilcisteinil-glicina) que actúa como donante de electrones, y reduce los enlaces disulfuro, actuando como cofactor en algunas enzimas antioxidantes como las glutatión peroxidasas [46]. Cuando se oxida, se convierte en disulfuro de glutatión (GSSG), sin embargo, en condiciones basales, el GSH se encuentra mayoritariamente en estado reducido (Figura 7) [47].

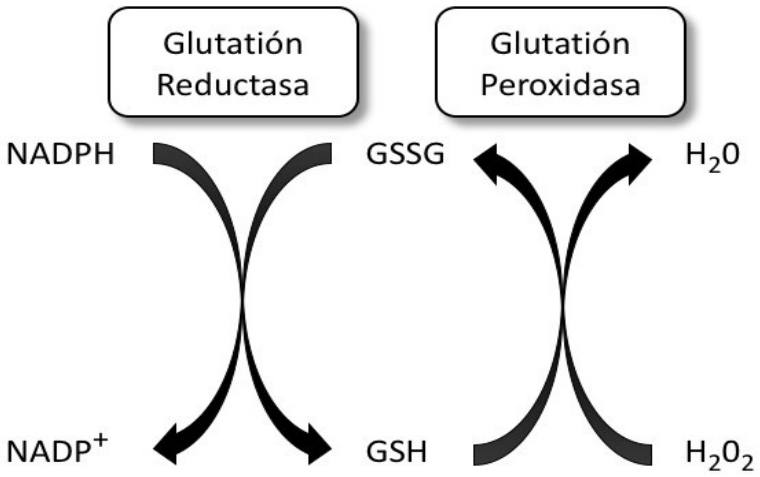


Figura 7. *Ciclo redox del glutatión: cuando aparece una agresión oxidativa, el GSH se oxida a GSSG mediante una reacción catalizada por la enzima glutatión peroxidasa. A continuación, la glutatión reductasa, reduce el GSSG formado a GSH. La glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, se encarga de ceder el NADPH que la glutatión reductasa necesita como cofactor (Adaptada de Weydert, C.; Cullen, J. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. Nature protocols 2009).*

Entre los principales sistemas antioxidantes enzimáticos encontramos a la superóxido dismutasa (SOD). Esta enzima cataliza la dismutación del radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Existen diferentes isoformas de la SOD, como la CuZnSOD, codificada por el gen *SOD1*, que utiliza como cofactores el cobre y el zinc y se encuentra en el citosol; y la MnSOD, codificada por el gen *SOD2*, que emplea el manganeso como cofactor y se encuentra en la mitocondria (Figura 8) [48].

Otro antioxidante enzimático es la catalasa, codificada por el gen *CAT*. Se trata de una enzima oxidorreductasa que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno molecular y agua. Se localiza principalmente en los peroxisomas, aunque también se encuentra en las mitocondrias y el citosol (Figura 8) [49].

La glutatión peroxidasa 1, codificada por el gen *GPX1*, cataliza la reacción de reducción de peróxidos generados en las células, utilizando el GSH como donador de electrones, y con GSSG y un grupo alcohol (ROH) como productos de reacción (Figura 8) [50].

Las tiorredoxinas (TRX), son proteínas oxidorreductasas que actúan facilitando la reducción de los puentes disulfuros de otras proteínas [51], . La función principal de las TRX es la reducción de los residuos de cisteínas oxidados y los enlaces disulfuro. Durante este mecanismo algunos de los residuos de las tiorredoxinas se oxidan, por lo que para reestablecer la función de las tiorredoxinas existe otra enzima que es la TRX reductasa que utiliza NADPH como fuente de electrones para volver a reducir a las tiorredoxinas. Existen diferentes tiorredoxinas, las más importantes son la *TRX1* que se encuentra en el citosol, y la *TRX2* que se encuentra en la mitocondria (Figura 8) [52].

La desregulación de los sistemas antioxidantes celulares es una característica presente en el fenotipo de las telomeropatías. Estudios como el de Manguan-Garcia et. al. [53] observaron que se producía una desregulación de las enzimas antioxidantes como la CuZnSOD, MnSOD y GPX1 en células de pacientes de DC, así como un aumento del glutatión oxidado. Otros estudios han establecido una correlación entre la actividad telomerasa y la actividad de la enzima antioxidante catalasa en fibroblastos procedentes

de embriones de ratón MEF ("mouse embryonic fibroblasts") Terc -/- [54]. Estos estudios mostraban como estos fibroblastos MEF presentaban estrés oxidativo y bajos niveles de enzima catalasa. Sin embargo, la sobreexpresión de Terc en MEF daba lugar a la recuperación de la actividad telomerasa disminuyendo el estrés oxidativo. Aunque estos autores no establecen ningún tipo de explicación molecular, ponían en evidencia una relación entre la actividad telomerasa y la respuesta antioxidante.

Se desconoce si esta desregulación se produce por la mutación de los genes descritos o por la presencia de estrés oxidativo. Por ello sería interesante confirmar si existe alguna relación o conexión molecular entre la actividad telomerasa y la expresión de enzimas antioxidantes.

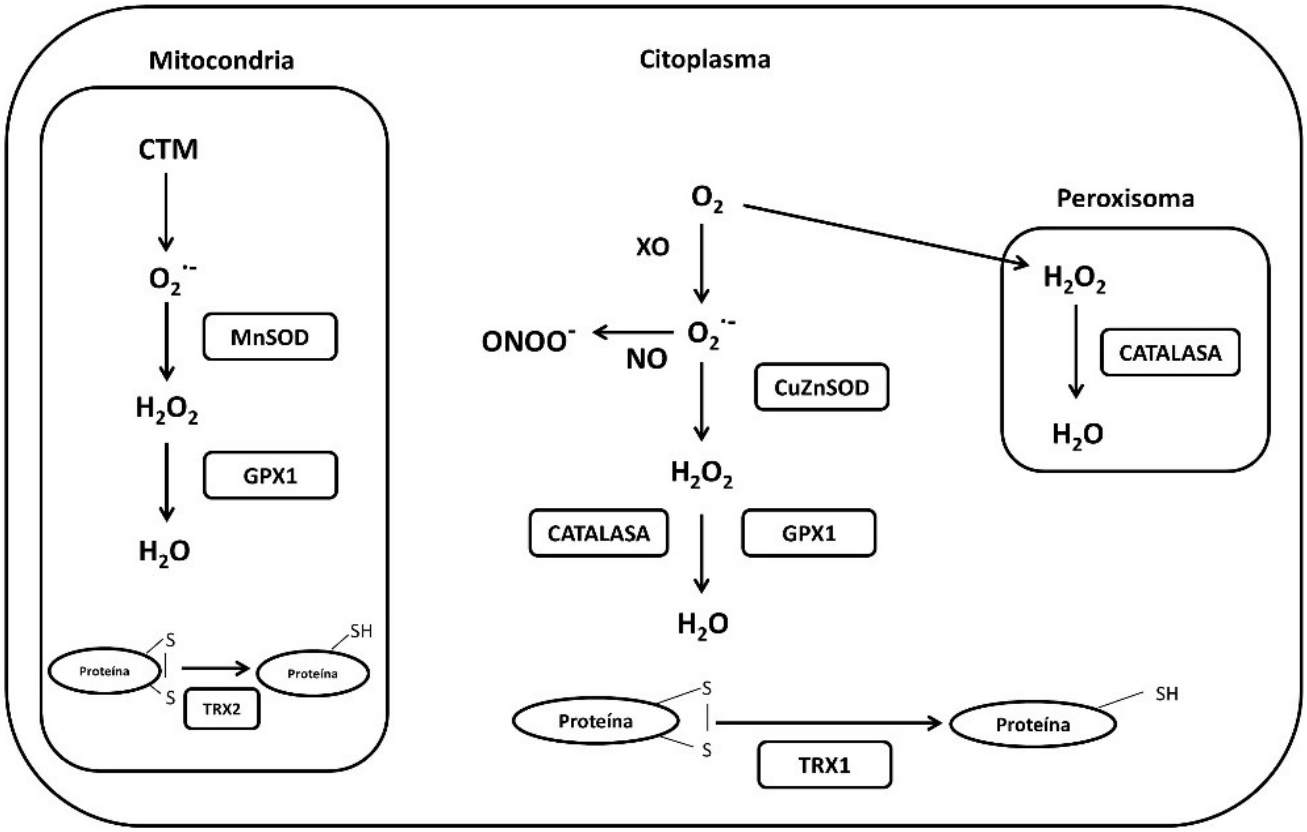


Figura 8. *Esquemas de las principales enzimas antioxidantes. Se puede observar la primera línea de antioxidantes celulares compuesta por la MnSOD en la mitocondria y CuZnSOD en el citoplasma, ambas enzimas son las encargadas de detoxificar el superóxido (O2·-) en peróxido de hidrogeno (H2O2). Como segunda línea antioxidante tenemos la GPX1 tanto en mitocondria como en citoplasma y la Catalasa en los peroxisomas y citoplasma, ambas enzimas son encargadas de detoxificar el peróxido de hidrogeno (H2O2) en agua. Por otro lado, tenemos la Tiorredoxina 1 en el citoplasma y la Tiorredoxina 2 en la mitocondria, que se encargan de reducir los puentes disulfuro (S-S).*

1.5. DAÑO A BIOMOLÉCULAS

Es conocido que el estrés oxidativo puede producir daño oxidativo en biomoléculas constituyentes de los componentes celulares como son las proteínas, el ADN y los lípidos [55].

Las proteínas sufren varios tipos de oxidación; una de ellas, la formación de grupos carbonilo, que ha sido utilizada metodológicamente para evaluar el grado de daño oxidativo en diferentes sistemas biológicos. La carbonilación de proteínas es un daño oxidativo irreversible que se produce en las proteínas, que a menudo conduce a una pérdida de la función de la proteína. La carbonilación consiste en la oxidación de las cadenas laterales de aminoácidos proteicos, se produce en aminoácidos como la lisina, arginina, prolina y treonina, entre otros aminoácidos, catalizada por medio de metales que forman grupos carbonilos en las cadenas laterales de las proteínas [56]. Los productos de la carbonilación de estos residuos son el semialdehído glutámico (producto de la oxidación de arginina y prolina) y semialdehído aminoadípico (producto de la oxidación de lisina) (Figura 9) [57]. La carbonilación se considera como un indicador generalizado de daño oxidativo severo.

El ADN telomérico es especialmente susceptible al estrés oxidativo, debido a que es monocatenario y además la secuencia telomérica tiene un alto contenido en guaninas [58, 59]. Los radicales libres derivados del oxígeno (EROs), especialmente de los radicales hidroxilo ($OH^{\cdot}$), reaccionan con los residuos de guanina de la cadena de ADN telomérico, a través de la reacción de Fenton [60], dando como producto moléculas de 8-oxodG [61, 62]. Existen alrededor de 20 tipos de daño oxidativo al ADN [63], siendo el más común la 8-oxoguanosina (8-oxoG) (Figura 10). Las modificaciones oxidativas que se producen en las bases nitrogenadas, provocan mutaciones por sustituciones de bases como G → T y A → C [64].

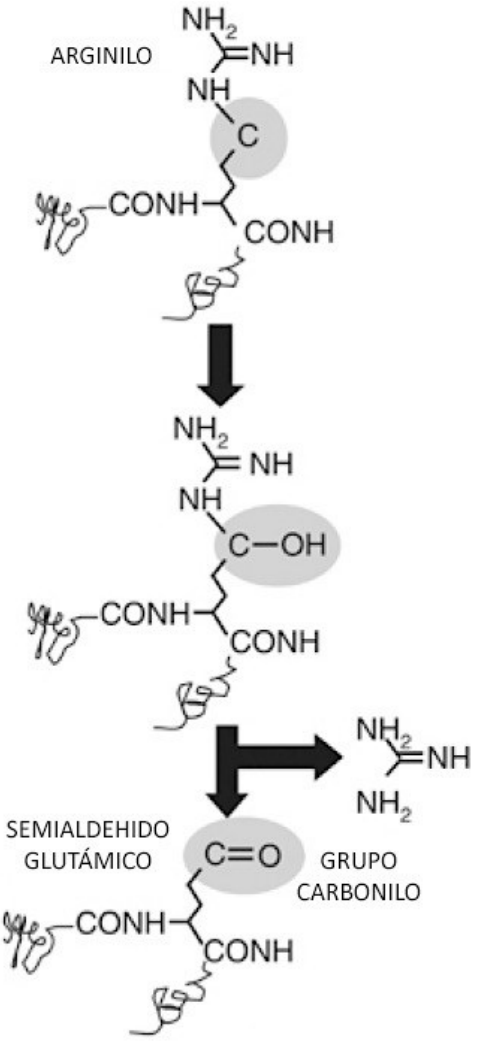


Figura 9. *Carbonilación de una cadena lateral de aminoácidos proteicos. Se describe un esquema para la formación de semialdehído glutámico a partir de un residuo de arginilo (Modificada de Nyström, T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. EMBO, 2005).*

Estudios con linfocitos de pacientes de DC han demostrado que diferentes mutaciones en genes *TERT, TINF2 y TERC* producen un fenotipo asociado al estrés oxidativo, en el que se observan altos niveles de ERO, daño en el ADN, senescencia celular e incremento en la apoptosis [65, 66]. Otros estudios también confirman la presencia de daño en el ADN cuando algunos de los genes que causan telomeropatías están mutados, como por ejemplo *NHP2, NOP10, GAR1 y DKC1* [31, 67].

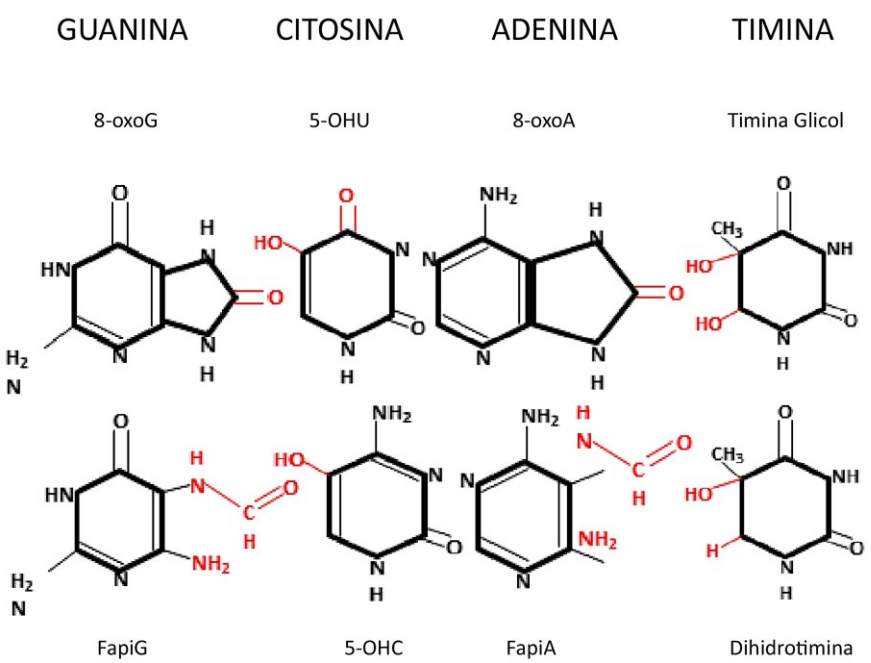


Figura 10. *Las ERO y ERN se producen constantemente durante el metabolismo aeróbico. Estas especies reactivas generan varios tipos de lesiones oxidativas en las bases nitrogenadas y roturas de simple cadena (SSB) en el genoma. Las SSBs también se generan como intermediarios durante el procesamiento de bases oxidadas a través de reparación de escisión base (BER). Las SSBs inducidas por ROS contienen terminales diversos, como 3'- fosfoglicolato, 3'-fosfato, 5'-OH y 5'-desoxirribosa fosfato (Modificado de Mitra, J., et al., New perspectives on oxidized genome damage and repair inhibition by pro-oxidant metals in neurological diseases. Biomolecules, 2014).*

Dentro de los biomarcadores de daño al ADN encontramos los polímeros de poli(ADP-ribosas) en las colas de algunas proteínas, conocido como parsilación. La parsilación es una modificación postraduccional, que sirve como sensor de daño [68]. Esta modificación regula una serie de procesos biológicos, incluyendo la reorganización de la cromatina, la respuesta de daño del ADN (simple o doble cadena), regulación transcripcional, apoptosis y mitosis. Se realiza por medio de la poli-(ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP1), esta enzima utiliza el dinucleótido de adenina nicotinamida (NAD^+) como sustrato, y así une múltiples unidades de ADP-ribosa (PAR) a sí misma y a otras proteínas aceptoras para señalizar el daño y de esta forma marcar el ADN para que se pueda reparar el ADN dañado (Figura 11) [69, 70].

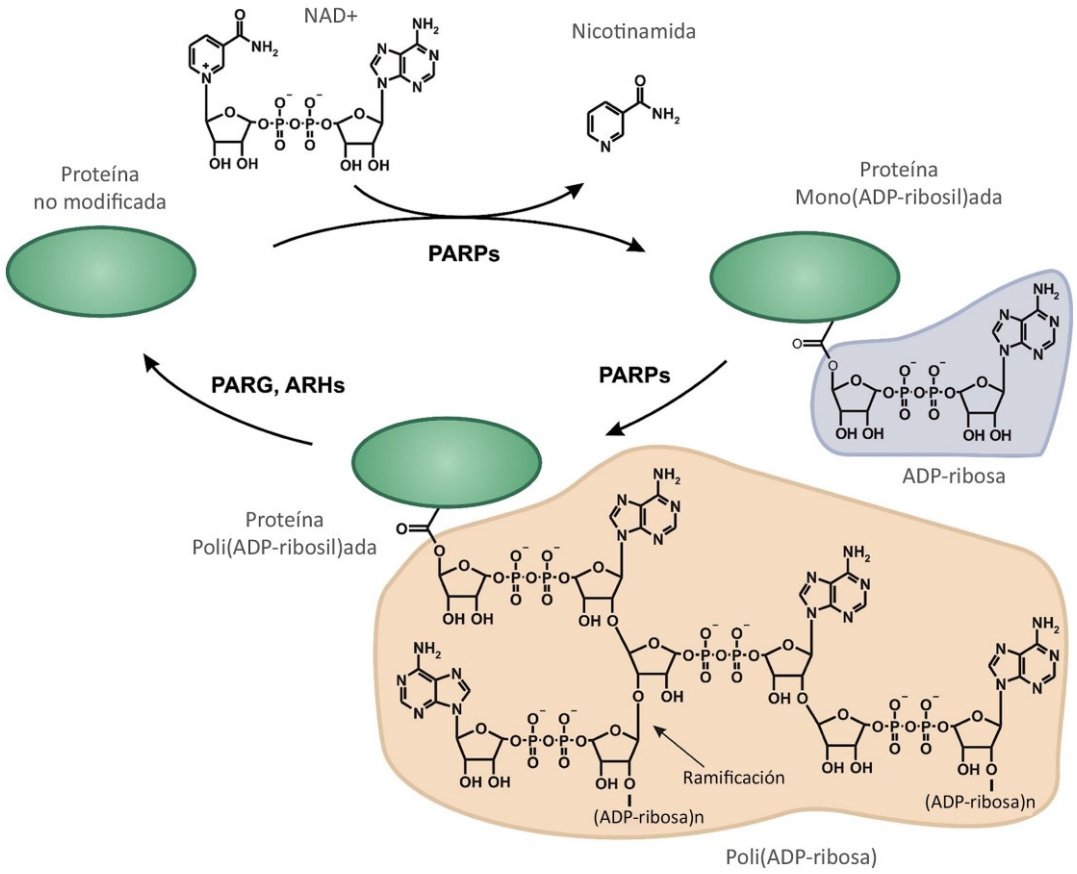


Figura 11. *Mecanismo de la PARsilación. Las enzimas PARP escinden NAD en nicotinamida y ADP-ribosa, este último se une covalentemente con las proteínas aceptoras para marcar daño. Mediante la escisión de moléculas de NAD adicionales, las enzimas PARP1 unen más unidades de ADP-ribosa al primer residuo proximal de ADP-ribosa, y construyen un polímero de PAR ramificado, que se descompone principalmente en poli (ADP-ribosa) glicohidrolasa (PARG) y ADP-ribosil hidrolasa (ARH) (Modificado de Hegedűs C, et al., Poly(ADP-ribose) in the bone: from oxidative stress signal to structural element. Free Radic Biol Med 2015).*

La forma fosforilada de la variante H2A.X (γ-H2A.X), una histona de la familia H2A ,es otro biomarcador que permite detectar roturas en el ADN [71]. Las roturas de simple y doble cadena, son señalizadas por unos complejos proteicos que reclutan y activan dos proteínas quinasas (ATM serina/treonina quinasa y ATR serina/treonina quinasa) en el sitio de la rotura [72, 73]. Estas quinasas fosforilan el residuo de Ser139 produciendo la γ-H2A.X, que señaliza una serie de eventos nucleares entre los que están la activación de otras quinasas (CHECK2 o su ortólogo en *S. cerevisiae* RAD53) que paran el ciclo celular para facilitar la reparación del ADN (Figura 12).

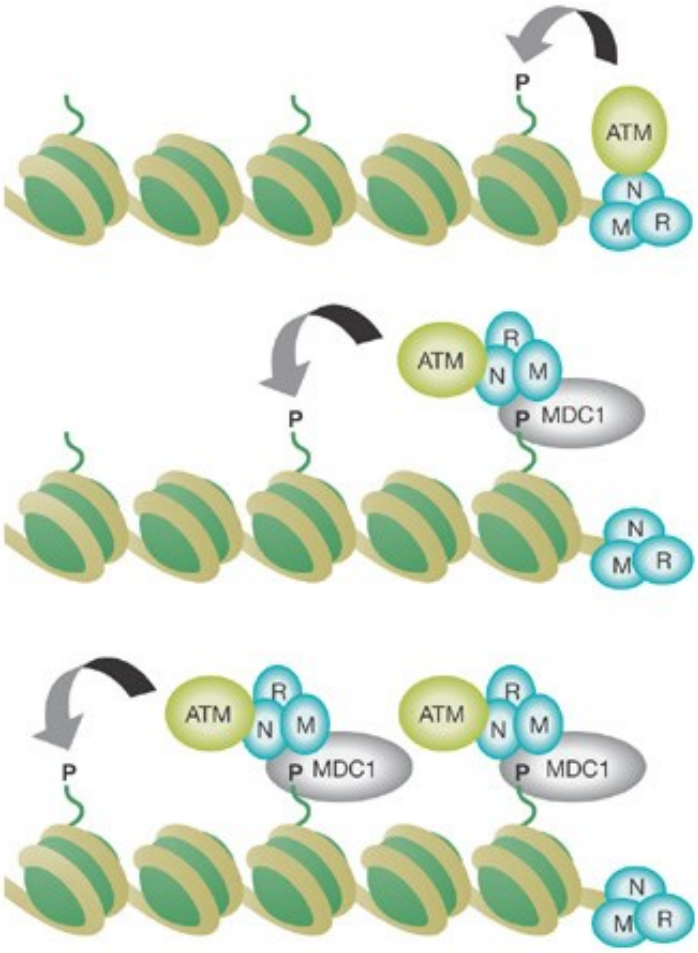


Figura 12. *Mecanismo de la fosforilación de HA2.X. El complejo formado por MRE11, RAD50 y NBS1 (MRN) se une a los extremos del ADN, en los sitios de daño del ADN y recluta ataxia telangiectasia mutada (ATM), que fosforila H2A.X. El mediador del punto de control 1 del daño al ADN (MDC1) se une a la H2A.X próxima que esta fosforilada y recluta más MRN-ATM (Fuente: Adam G West, and Haico van Attikum. Chromatin at the crossroads. Meeting on Signalling to Chromatin Epigenetics. EMBO Rep 2006).*

Está descrito que el daño al ADN es una característica de estas enfermedades, pero no se conoce bien el origen de este daño. Se ha planteado si proviene del acortamiento del telómero, de la disfunción en los procesos de maduración del ARN, del estrés oxidativo o de todos en conjunto. Estudios como el Gu *et. al.* han mostrado que las mutaciones patogénicas en ratón Dkc1 causan un crecimiento menor y un mayor daño al ADN en los telómeros con una longitud normal. Proponen que el crecimiento lento que tienen las células es independientemente del acortamiento de los telómeros y que es debido a la inducción de daño en el ADN. Por lo tanto, que la disquerina interactúa con la telomerasa y afecta el mantenimiento de los telómeros independientemente de la longitud de los telómeros [74]. Otros estudios como el de Pereboeva *et. al.* observaron en linfocitos de sujetos con mutaciones en TERC, que los linfocitos de DC mostraron un

fenotipo estresado, caracterizado por niveles elevados de ROS, DDR y marcadores apoptóticos [31]. Además, en estudios previos realizados en nuestro laboratorio también se observó que se producía un mayor daño al ADN en fibroblastos de pacientes que tenían mutado el gen de *DKC1* [53].

1.6. MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN

El daño al ADN puede alterar la integridad del genoma y comprometer la viabilidad celular, una de las formas de producir daño al ADN es por medio del estrés oxidativo. Debido a la gran importancia de preservar integro el ADN, las células poseen diversos mecanismos de reparación del ADN, siendo los más importantes la reparación por escisión de bases, la reparación por escisión de nucleótidos, la recombinación homóloga y la unión de extremos no homólogos [75].

1.6.1. Reparación por escisión de bases (REB)

Una de las rutas responsables de la reparación de daño al ADN, es la reparación por escisión de bases (REB). Este mecanismo se inicia por glicosilasas específicas que reconocen el daño y eliminan la base dañada del esqueleto de azúcar-fosfato, de modo que aparece un sitio apurínico/apirimidínico (sitio AP). A continuación, la endonucleasa AP hidroliza inmediatamente el enlace fosfodiester 5’ o 3’ en el sitio AP y la cadena de fosfato es eliminada del ADN por medio de la dRpasa. El hueco que se produce tras la escisión es rellenado por una polimerasa específica (ADN pol β) y finalmente se liga con una ADN ligasa (Figura 13). La 8-oxoguanina glicosilasa (oGG1), es la principal glicosilasa de entre las enzimas de esta naturaleza que inician la ruta, [76], que como indica su nombre indica escinde la base mutada 8-oxoguanina (8-oxoG). Además, la oGG1 exhibe actividad liasa para unir los extremos generados tras la escisión de la cadena [77].

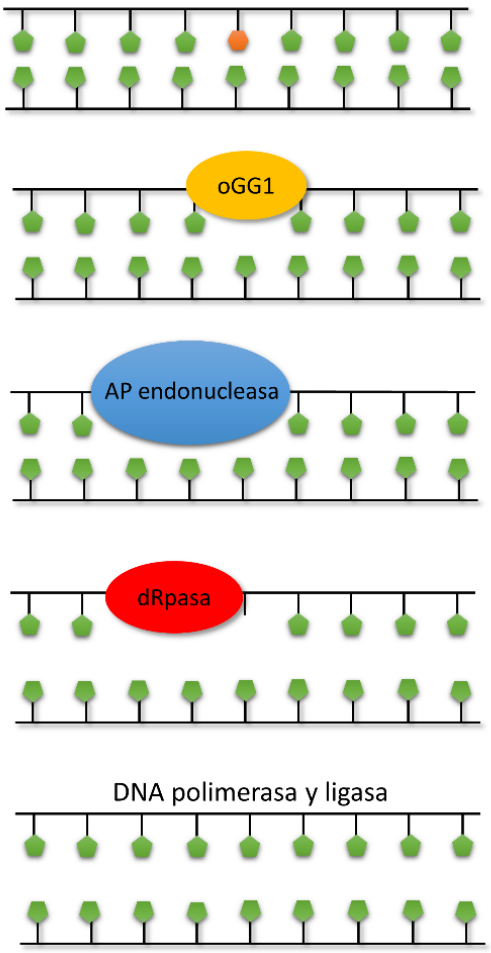


Figura 13. *Representación esquemática de la ruta por escisión de bases. En primer lugar, se detecta el daño al ADN, una base dañada (color naranja), la cual es reconocida y eliminada por la DNA glicosilasa oGG1 (amarillo), generando un sitio AP. La endonucleasa AP (azul) hidroliza inmediatamente el enlace fosfodiester 5' o 3' en el sitio AP y la cadena de fosfato es eliminada del ADN por medio de la dRpasa (rojo). Finalmente, la DNA polimerasa sintetiza los nuevos nucleótidos en el hueco producido y se unen mediante la ligasa al resto del ADN (Fuente: Luiz Augusto-Pinto, et. al. Escherichia coli as a model system to study DNA repair genes of eukaryotic organisms. Genet. Mol. Res. 2003).*

1.6.2. Reparación por escisión de nucleótidos (REN)

Entre las otras rutas de reparación que encontramos está la reparación por escisión de nucleótido (REN). Se trata de una ruta que, durante el proceso de reparación, interviene sobre cadenas más largas que el mecanismo REB, entre 2 y 30 bases, y en la que intervienen unas 18 proteínas. En una primera etapa, el sistema reconoce el lugar de la lesión. Seguidamente actúa una endonucleasa que corta un pequeño fragmento de la hebra que presenta la lesión y en ambos lados de la misma. Luego la polimerasa de ADN comienza la síntesis del fragmento que sustituirá al eliminado, tomando como molde la

hebra complementaria (Figura 14). Una de las principales enzimas de la reparación por escisión de nucleótidos es la enzima *Xeroderma pigmentosum* grupo A (XPA). Se trata de una proteína en forma de dedos de zinc, que actúa en conjunto con otras proteínas del complejo *Xeroderma pigmentosum* que reconoce el daño y promueve la eliminación de este [78].

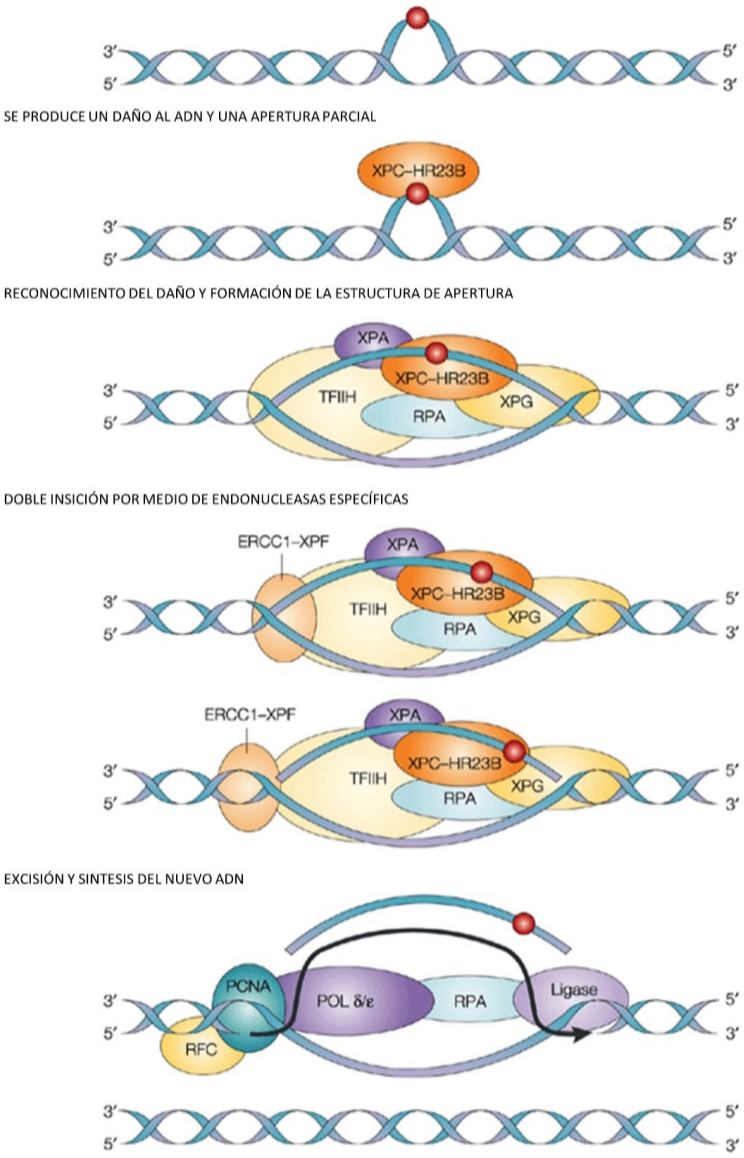


Figura 14. *Esquema de reparación por escisión de nucleótidos (NER). El paso de reconocimiento e incisión de la reacción NER requiere el complejo XPC, XPA, RPA, TFIIH, XPG y el complejo ERCC1-XPF. La proteína XPC se une al ADN, alterando su estructura y permitiendo el acceso a otros factores de reparación. Las proteínas XPA, RPA y TFIIH se unen a continuación al ADN distorsionado. El ADN es desenrollado por la helicasa de TFIIH. Se corta la cadena dañada mediante las nucleasas XPG, que corta 3' al daño y el complejo ERCC1-XPF, que corta 5' de la lesión. Se produce la liberación de la lesión dentro de un oligonucleótido de 24 a 32 bases de longitud. El ADN eliminado se reemplaza por uno nuevo que sintetiza la polimerasa de ADN (POL) delta o la holoenzima epsilon con RFC y PCNA. La reacción de reparación se completa con una ligasa de ADN, que vuelve a conectar el nuevo ADN con el resto (Fuente: John R.W. Masters & Beate Köberle. Curing metastatic cancer: lessons from testicular germ-cell tumours. Nature Reviews Cancer 2013).*

1.6.3. Recombinación homóloga (RH)

Uno de los mecanismos que utiliza la célula para la reparación de las roturas de doble cadena, es la recombinación homóloga (RH) [79]. Este mecanismo es complejo y utiliza una estrategia de recombinación similar a la que se produce en el intercambio de las cromátidas que ocurre durante el proceso de meiosis, donde las secuencias de nucleótidos se intercambian entre dos moléculas similares de ADN. Cuando se produce una rotura de doble cadena, inmediatamente se reconoce el daño por las proteínas RAD53 y por el complejo MRN, formado por MRE11, RAD50, NBS1, que detienen el ciclo celular. A continuación, se escinde el ADN de los extremos 5' de la rotura, creando extremos cortos con el extremo 3' de ADN de una sola hebra, para permitir la unión de RPA, RAD51 y RAD52 a las cadenas de ADN simple. El complejo formado por las proteínas junto con el ADN, busca una región homologa en el dúplex de ADN intacto e inicia el emparejamiento facilitado por RAD54. La síntesis de ADN se produce desde el extremo del ADN dañado, extendiendo la región de reparación y formando una unión de Holliday (una estructura de cadena cruzada, se forma un lazo en forma de D, que se produce entre cuatro cadenas de ADN durante la recombinación). Esta estructura en forma de lazo-D permite que se sinteticen las cadenas eliminadas mediante la DNA polimerasa y usando como molde el otro cromosoma. Finalmente, una ligasa unirá las nuevas cadenas sintetizadas con el resto (Figura 15). Entre las proteínas más importantes que intervienen en la recombinación homóloga encontramos la serina/treonina proteína quinasa (RAD53), que reconoce las zonas donde se produce el daño al ADN fosforilando las serinas, treoninas y tirosina, y de esta forma detiene el ciclo celular para evitar que se propague el daño. Otra proteína muy importante es la recombinasa RAD51 (RAD51), se trata de una proteína que interviene en la búsqueda de homologías y ayudando en el intercambio de las hebras de ADN [80].

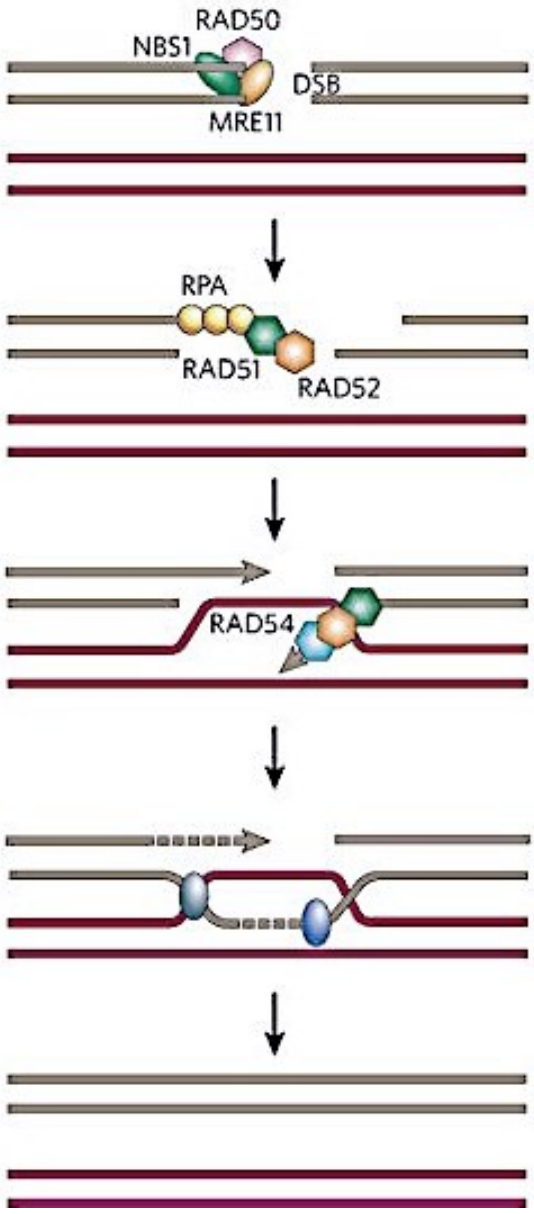


Figura 15. *Esquema de la recombinación homóloga. Cuando sucede un daño de doble cadena al ADN, se reconoce por las proteínas RAD53 y por el complejo MRN, formado por MRE11, RAD50, NBS1, que detienen el ciclo celular. Los extremos del ADN son eliminados para permitir la unión de RPA, RAD51 y RAD52 a las cadenas de ADN simple. El complejo formado por las proteínas junto con el ADN, busca una región homologa en el dúplex de ADN intacto (rosa) e inicia el emparejamiento facilitado por RAD54. La síntesis de ADN se produce desde el extremo del ADN dañado, extendiendo la región de reparación y formando una unión de Holliday (una estructura de cadena cruzada, que se produce entre cuatro cadenas de ADN durante la recombinación). Esta unión se transloca a lo largo del ADN para generar la cadena de ADN complementaria y se escinde por una resolvasa (gris). Una vez sintetizado el nuevo ADN se junta con el resto (Fuente: Jessica A. Downs, Michel C. Nussenzweig & André Nussenzweig. Chromatin dynamics and the preservation of genetic information. Nature 2007).*

1.6.4. Unión de extremos no homólogos (NHEJ)

La unión de extremos no homólogos (en inglés non-homologous end joining, NHEJ), es otra ruta que repara roturas de doble cadena de ADN [81]. Este sistema de reparación consiste en la unión de los extremos generados tras la rotura sin la ayuda de moléculas accesorias de ADN que funcionen como molde [82]. El primer paso consiste en el reconocimiento de los extremos generados, donde se encontrarán las bases y los esqueletos azúcar-fosfato alterados. El siguiente paso, es un procesamiento que permite recuperar la configuración de los extremos 3'-OH y 5'-PO_4^- necesarios para la ligación. Las uniones que se producen más frecuentemente son las que generan algún tipo de complementariedad entre las bases de ambos extremos. Pero para que se produzcan estas uniones, los extremos han de estar cercanos espacialmente y accesibles a las enzimas de reparación. En este caso pueden producirse microhomologías donde se aparean entre 1 y 4 nucleótidos que no tienen por qué coincidir con la secuencia original. Además, en el proceso de reparación puede producirse la extensión de los extremos por adición de nucleótidos sin necesidad de molde. Una vez están alineados y con la configuración definitiva se produce la ligación para recuperar la continuidad del ADN. Finalmente, en este mecanismo de reparación participan polimerasas y nucleasas que rellenan los huecos y eliminan los nucleótidos sobrantes (Figura 16). Entre las proteínas más destacadas que podemos encontrar en esta ruta de reparación, están la proteína Werner y la proteína Poli-(ADP-Ribosa) polimerasa 1 (PARP1) [83]. La proteína Werner (WRN) es una helicasa con actividad 3'→ 5' exonucleasa. Cuya función es separar la doble hebra de ADN y eliminar los nucleotidos dañados para que se pueda mantener el ADN [84]. La proteína PARP1 es la proteína más importante en la ruta alternativa de NHEJ (Figura 16). Cuando la vía convencional no funciona, se recurre a la vía de unión de extremos no homólogos alternativa mediante la participación de la enzima PARP1 [85]. La parsilación inducida por el daño del ADN cambia perceptiblemente la estructura local de la cromatina y provoca la acumulación de varias proteínas de la respuesta del daño del ADN en las lesiones del ADN [86].

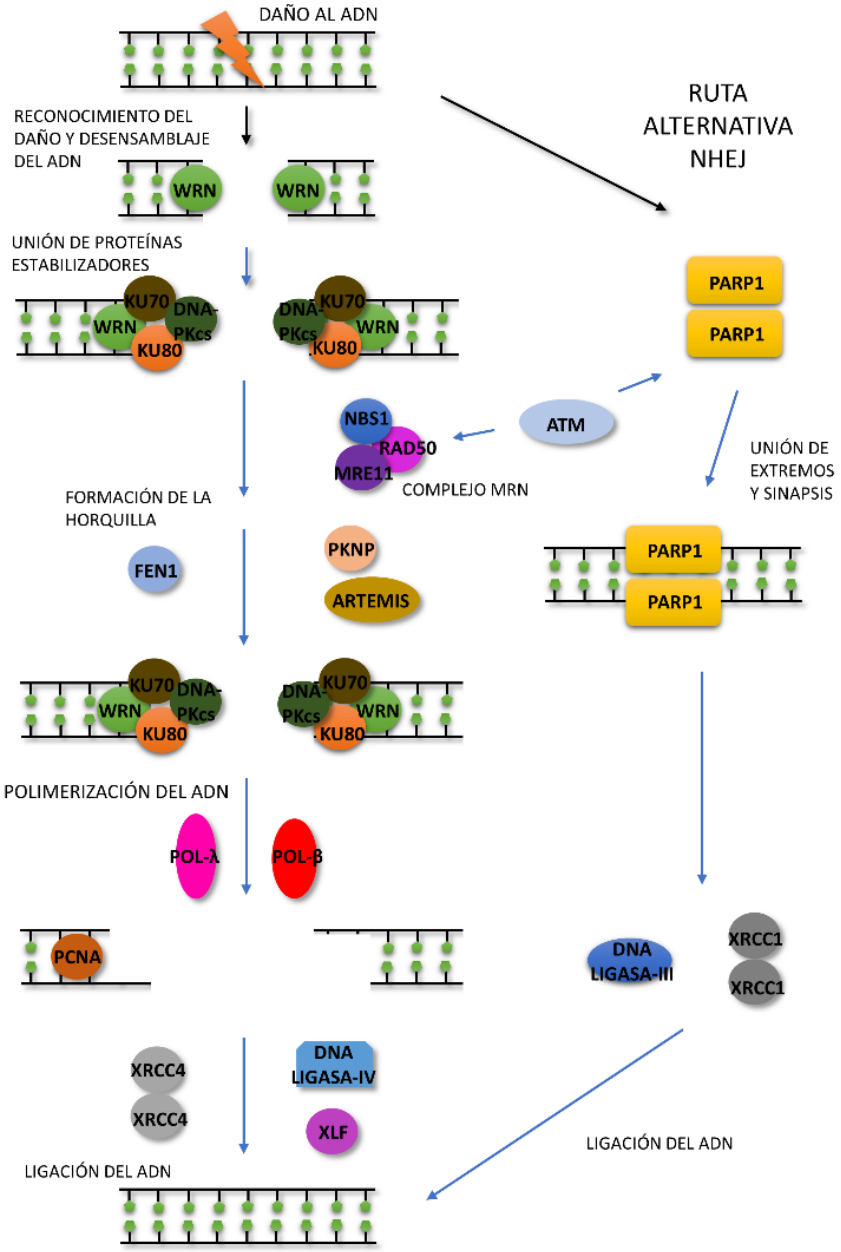


Figura 16. *Representación esquemática de la ruta de reparación por unión de extremos no homólogos y de la ruta alternativa de reparación por unión de extremos no homólogos. En la ruta de reparación de extremos no homólogos (parte izquierda), cuando existe un daño de doble cadena, el proceso de reparación se inicia por la unión del heterodímero de KU (KU70/KU80) junto con otras proteínas como WRN y la proteína PK-ADN que empiezan el proceso de reparación. La activación de PK-ADN ayuda al reclutamiento de múltiples proteínas implicadas en el procesamiento final del ADN (NBS1, RAD50, MRE11, FEN1, PNKP, Artemis, POL β y POL λ) requerido para generar extremos de ADN que se ligaran. La unión de los extremos está mediada exclusivamente por el complejo DNA Ligasa 4/ XRCC4 y está asistida por el mediador de ligación XLF. Al final de este proceso se restaura la integridad del ADN en la ruptura, pero la secuencia de ADN en la unión puede que se encuentre alterada. Cuando se produce un daño y no se puede reparar con la ruta convencional PARP1 inhibe el hetorodímero KU70/KU80 y se realiza mediante la ruta alternativa (parte derecha del esquema). PARP1 se une a las cadenas doble de ADN para estabilizar y permitir que se produzca la unión de los extremos por medio de la ADN Ligasa III y XRCC1, para devolver la integridad al ADN aun con errores (Fuente: https://www.qiagen.com/lt/shop/genes-and-pathways/pathway-details/?pwid=144).*

El daño al ADN es una característica presente en el fenotipo de las telomeropatías, pero no se conoce muy bien que ocurre con la respuesta celular a este daño. Estudios como el Latre *et. al.* que han utilizado un modelo de ratón silenciado para Terc al cual le indujeron daño con radiación, observaron que los procesos de reparación de las roturas de doble cadena se ven afectados en estos ratones silenciados [87]. Otros estudios, como el de Masutomi *et. al.*, mostraron que la supresión de la subunidad catalítica de la telomerasa (TERT) anula la respuesta celular a las roturas de doble cadena del ADN. Se observó, que la pérdida de TERT no altera la integridad de los telómeros a corto plazo, sino que afecta la configuración general de la cromatina. Además, las células que carecen de TERT exhiben una radiosensibilidad aumentada, una capacidad disminuida para la reparación del ADN y cromosomas fragmentados, lo que demuestra que la pérdida de TERT afecta la respuesta al daño del ADN [88]. En general, el estudio de Kirwan *et al.*, apunta a que son los telómeros cortos o disfuncionales la principal causa de la patología en humanos de DC, que presentan mutaciones en DKC1, TERC y TERT. Si bien la acumulación de daño en el ADN puede contribuir a la patología en algunos tejidos, es poco probable que una respuesta disfuncional al daño del ADN desempeñe un papel principal en el fenotipo clínico general en estos individuos [89].

1.7. MODELO CELULAR DE SILENCIAMIENTO AGUDO DE GENES IMPLICADOS EN LA DC

Es reconocido que los genes DKC1, NOP10 y TINF2 son claves en la integridad del telómero, sea como parte del complejo telomerasa o del complejo telosoma, y sus mutaciones contribuyen en los mecanismos moleculares de diferentes síndromes, como la DC. También se ha observado que estos genes pueden realizar más de una función celular fundamental. En el caso de la Disquerina y NOP10 además de formar parte de la telomerasa son H/ACA snoRNPs, cuya función es crucial en la biogénesis ribosomal eucariota y la función del espliceosoma [21]. En el caso de TIN2, además de formar parte del telosoma, también es procesado postraduccionalmente en las mitocondrias de manera que regula la fosforilación oxidativa mitocondrial [27]. Aunque el estudio de

estos genes se ha extendido a fin de revelar su implicación funcional en eventos extratelomericos, la contribución a la respuesta al daño al ADN, al estrés oxidativo y la regulación de todavía se desconoce.

Establecer un modelo celular de silenciamiento agudo de los genes DKC1, NOP10 y TINF2, permitiría identificar funciones, mecanismos o perfiles de expresión génica que se asocian con la mutación de estos genes. Así mismo, permitiría contribuir a distinguir eventos moleculares que se alteran antes que el acortamiento telomérico tenga lugar. Una buena herramienta para analizar estos modelos celulares sería por medio del transcriptoma. Se podría definir al transcriptoma como al conjunto completo de transcritos de ARNm y moléculas de ARN no codificante, presentes en una célula o tejido en un momento concreto. Así como el genoma es la información genética común a todas las células de un organismo, el transcriptoma es la parte de ese genoma que se expresa en una célula en una etapa específica de su desarrollo. El poder estudiar perfiles de transcriptoma tiene un potencial muy en cuanto a las aplicaciones en la medicina actual. En nuestro caso estudiar el transcriptoma es muy interesante porque nos puede mostrar que genes y rutas se encuentran afectadas en los diferentes modelos celulares silenciados.

2. HIPÓTESIS

Mutaciones en los genes *DKC1, NOP10 y TINF2,* identificadas en algunas telomeropatías, se asocian con la disminución de la actividad telomerasa, el acortamiento telomérico y los fallos en la biogénesis ribosomal. Sin embargo, el papel de la respuesta al daño al ADN, el estrés oxidativo y el perfil transcriptómico son eventos menos caracterizados en estas patologías.

En la presente Tesis Doctoral se plantea la siguiente hipótesis trabajo:

La disfunción de los genes *DKC1, NOP10 y TINF2* produce alteraciones a nivel de estrés oxidativo, respuesta antioxidante y en mecanismo de respuesta del daño al ADN. Estas alteraciones son previas e independientes al acortamiento telomérico y producen una alteración en el perfil transcriptómico.

3. OBJETIVOS

El objetivo principal del trabajo es, determinar si la disminución en la expresión génica de *DKC1 NOP10 y TINF2* produce estrés oxidativo, como un evento no directamente asociado a la disminución de la actividad telomerasa y el acortamiento telomérico. Para ello, se establecen los siguientes objetivos específicos:

- Generar por tecnología de ARN de interferencia diferentes modelos celulares silenciados para los genes *DKC1, NOP10 y TINF2* (siDKC1, siNOP10 y siTIN2) implicados en distintos tipos de herencia de DC.
- Caracterizar y validar los diferentes modelos celulares del estudio como modelos de depleción aguda de DKC1, NOP10 y TINF2.
- Analizar la expresión génica global de los modelos celulares generados mediante matrices de expresión génica.
- Estudiar el perfil de estrés oxidativo y defensas antioxidantes en los modelos celulares generados.
- Estudiar las principales marcas de daño al ADN y los mecanismos de reparación de daño al ADN en los modelos celulares generados.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. LINEAS CELULARES Y CULTIVOS

Se utilizó como línea celular para el estudio las células de cáncer cérvico-uterino humano (HeLa). La selección de células HeLa para desarrollar el modelo celular para este estudio, se basa en dos razones: estas células tienen actividad telomerasa y existen antecedentes de su uso en telomeropatías, como la DC [13, 90-92].

En el cultivo de las células HeLa, se utilizó el medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; L0103-500, Biowest, Nuaillé, Francia) suplementado con 10% suero bovino fetal inactivado (SBF; S1810-500, Biowest, Nuaillé, Francia) y 1% de antibióticos penicilina/estreptomicina (p/s; L0018-100, Biowest, Nuaillé, Francia). Las células se cultivaron a una temperatura controlada de 37ºC y en una atmósfera del 5% CO_2.

Para disponer de células para cada uno de los experimentos, a lo largo de todo el trabajo se realizaron subcultivos celulares, evitando llegar a confluencia durante su amplificación. Todos los procedimientos se hicieron según pautas ATCC (American Tissue Cell Culture). Se comprobó periódicamente, como control de calidad del cultivo, que no hubiese contaminación por micoplasma, usando la técnica de PCR y el kit Mycoplasma Plus™ PCR Primer Set (Agilent Technologies, Santa Clara, EE.UU.).

4.2. SILENCIAMIENTO GÉNICO

El silenciamiento génico se realizó mediante tecnología del ARN de interferencia (ARNi), específicamente se realizó una transfección directa usando como agente transfectante la lipofectamina RNAiMAX (Invitrogen, Nueva York, EE.UU.). El ARNi es un ARN, de una longitud de 20-25 nucleótidos, específico para la secuencia de nucleótidos de su ARNm diana, y que al interaccionar con este interfiere con la expresión del gen respectivo. Las proteínas Argonautas del complejo RISC (siglas en inglés *RNA-induced silencing complex*) se ensamblan con el ARNi para identificar el ARNm complementario y catalizar el corte del mensajero en dos mitades ocasionando la degradación nucleolítica, y bloqueando la expresión génica. La lipofectamina es un reactivo que permite la formación de liposomas

gracias a los lípidos catiónicos que se unen con el ARNi con cargas aniónicas. Los liposomas se fusionan con la membrana plasmática de la célula, permitiendo así la entrada del ARNi al interior celular. Esta tecnología se ha aplicado en varios estudios [93], por la facilidad y rapidez para generar una depleción génica temporal. Además, en nuestro laboratorio se realizaron estudios previos con ARNi para comprobar su eficiencia, concentración y tiempos necesarios. También, se puso apunto el tipo de lipofectamina necesaria y la concentración óptima, además se observó cómo afectaba ésta a la viabilidad celular [94].

Los experimentos se diseñaron con 5 grupos, 3 réplicas por grupo, tres de los grupos se corresponden con los genes en estudio, uno con el control negativo (iguales condiciones de transfección y ARNi inespecífico) y uno con células HeLa sin ningún tratamiento. Para ello se compraron ARNi validados (siTARGET) para los genes *DKC1* (siDKC1), *NOP10* (siNOP10) y *TINF2* (siTINF2) (ID: s4111, ID: 215701 e ID: s25355, respectivamente) (Ambion, Waltham, EE.UU.) y un siCONTROL, (Silencer Negative Control siRNA #1; Ambion, Waltham, EE.UU.). Se siguió el protocolo de transfección secuencial en placas de 6 pocillos elaborado previamente en nuestro laboratorio [94], por su mayor eficiencia de silenciamiento (Figura 17).

Se cultivaron $2 \cdot 10^5$ células/pocillo en 2mL de DMEM suplementado (10% SBF). A las 24h de cultivo (40% de confluencia) las células fueron transfectadas con 100nM de ARNi específico para cada gen diana en 4µL de lipofectamina, 24h horas después se repitió el proceso de transfección y transcurridas otras 24h (48 horas después de la primera transfección) las células fueron recolectadas. Brevemente se procedió de la siguiente forma: en un vial se añadieron 4µL de lipofectamina y 146µL de DMEM sin suplementar, en otro se añadieron 12µL de siTARGET (genes de interés y control) y 138µL de DMEM sin suplementar. Se dejaron durante 5 minutos a temperatura ambiente, tras estos minutos se procedió a la adición del contenido del vial de lipofectamina sobre el vial del siTARGET. Se mezclaron suavemente y se dejaron durante 30 minutos a temperatura ambiente, para que se formaran los liposomas con el siTARGET en su interior. Tras ello se procedió a la adición gota a gota del contenido de cada vial sobre su correspondiente

pocillo. El tratamiento duró 5 horas a una temperatura de 37ºC y en una atmosfera del 5% de CO_2. Pasado el tiempo se retiró el medio con la mezcla de transfección, y se añadieron 2mL de DMEM suplementado con 10% SBF sin antibiótico. Este procedimiento se realizó dos veces consecutivas. Las células se recogieron 48h después de la transfección inicial para los experimentos siguientes (Figura 17). Este protocolo se repitió para cada uno de los siguientes experimentos, con el fin de obtener el numero muestras suficientes para cada caso. Además, la eficiencia del silenciamiento se evaluó por reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (RT-qPCR) y Western blot (WB), posteriormente descrita, de forma previa a cada experimento.

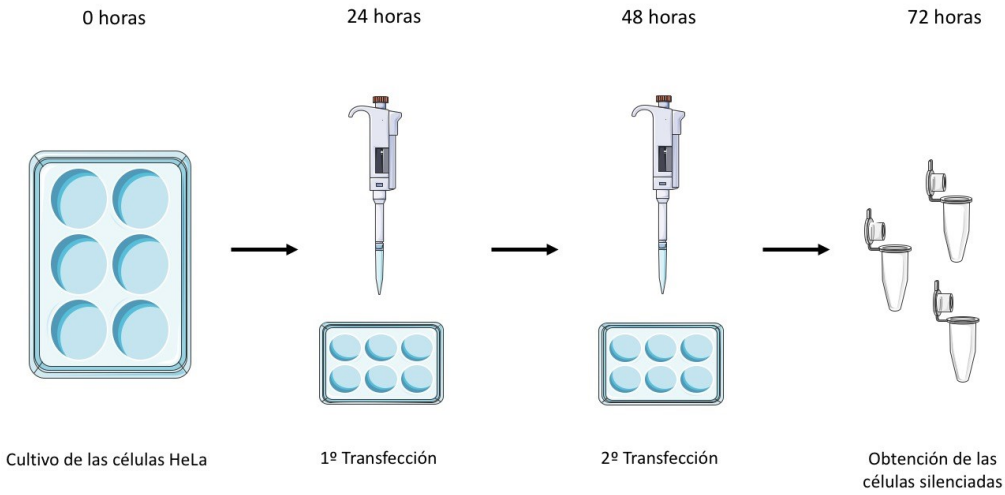


Figura 17. *Esquema metodológico del proceso de transfección secuencial por medio de ARNi en células HeLa cultivadas en placas de 6 pocillos.*

4.3. VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad celular se evaluó a través de apoptosis usando la técnica de citometría de flujo con el kit Annexin-V FITC (ANXVKF-100T, Immunostep, Salamanca, España) y siguiendo las especificaciones del fabricante. Cuando la localización de la fosfatidilserina cambia y se encuentra en la cara externa de la membrana plasmática, la anexina V se une específicamente a ella mediante una reacción dependiente de calcio, permitiéndonos detectar la apoptosis temprana. En estadios tardíos de apoptosis y/o necrosis, cuando la membrana plasmática ha perdido su integridad y el DNA se hace

accesible, se une el yoduro de propidio al ADN, pudiendo detectar la apoptosis tardía y la necrosis.

Antes de extraer las células de las placas, se recuperaron los medios de cultivo de cada uno de los pocillos en distintos viales etiquetados adecuadamente. Se extrajeron las células y se juntaron con el medio de cultivo que previamente había sido retirado para cada una de los pocillos. Se juntaron las células con el medio para evitar perder células necróticas que estuviesen flotando en el medio. Una vez juntadas las distintas fracciones recuperadas de cada pocillo, se centrifugaron y se resuspendieron con 100µL de tampón 1X Annexin-V, se tiñeron con 5µL de Anexina-V-FITC y 5µL de yoduro de propidio por muestra, durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Pasado este tiempo, se añadieron 500µL de tampón 1X Annexin-V. A continuación, se analizaron las células teñidas mediante citometría de flujo utilizando el citómetro FACS-Verse (Beckton Dickinson, East Rutherford, EE.UU.) y el software Infinicyt (Cytognos, Salamanca, España) en el servicio de Citometría (Unidad Central de Investigación, Facultad de Medicina y Odontología, Universitat de València).

4.4. CICLO CELULAR

El ciclo celular se estudió mediante la técnica de citometría de flujo y con ayuda del kit PI/RNASE Solution (PI/RNASE, Immunostep, Salamanca, España), acorde con las instrucciones del fabricante. El yoduro de propidio se intercala en la doble hebra de ADN, pero también se une al ARN, por ello se elimina este yoduro de propidio del ARN mediante nucleasas (ARNasa) detectando únicamente el ADN. La cuantificación del contenido de ADN, nos permite conocer las fases del ciclo celular. Las células en fase G2 y M del ciclo celular tienen el doble contenido de ADN que en fase G0 y G1, y otra fase más correspondiente a las células en fase S.

Se extrajeron las células de las placas de cultivo y se resuspendieron con 200µL etanol frio al 70% a cada muestra. Se dejaron una hora a 4ºC, pasado el tiempo se realizó un lavado con 500µL de PBS a cada muestra. Se añadieron 500µL de PI/RNASA por muestra

y se dejó incubar durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. A continuación, se analizaron las células teñidas mediante citometría de flujo utilizando el citómetro FACS-Verse (Beckton Dickinson, East Rutherford, EE.UU.) y el software Infinicyt (Cytognos, Salamanca, España) en el servicio de Citometría (Unidad Central de Investigación, Facultad de Medicina y Odontología, Universitat de València).

4.5. MEDIDA DE LA LONGITUD DE LOS TELÓMEROS

La longitud de los telómeros, en las líneas silenciadas y en los controles, se determinó mediante el kit de Qiagen DNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania). El ADN extraído de las muestras celulares, se le evaluó la calidad y concentración en NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Nueva York, EE.UU.). Las muestras cumplían las exigencias de calidad y rendimiento de ADN, y se ajustaron a una concentración conocida de 100ng/µL.

La medición se basó en una PCR cuantitativa referida a una curva patrón construida a partir de ADN genómico conocido (1691112, Roche, Basilea, Suiza) a una concentración inicial de 200ng/µL. Con este ADN se generó una serie de diluciones seriadas (1:10) para incluir como puntos en la curva, y de esta forma obtener la eficiencia de la PCR. Las diluciones, se obtuvieron por adición de H_2O libre de ARNasas, entre cada punto de dilución se agitó suavemente y se dejó 15 min para permitir la total disolución del ADN. Se prepararon al menos 6 concentraciones.

Con el ADN ajustado, se realizó la medición de los telómeros por PCR en tiempo real, utilizando los cebadores descritos en la Tabla 1. La longitud relativa de los telómeros se determinó en base a la diferencia entre el número de ciclos en que se adelanta la amplificación de las secuencias teloméricas con respecto al gen de referencia para cada muestra de ADN. Se calculó por la fórmula que considera la cantidad relativa de Telómero, respecto a la cantidad relativa del gen de referencia (Ratio T/S) [95]. El gen de referencia utilizado fue el gene 36B4, este gen codifica para una fosfoproteína ribosomal acídica P0 (RPLP0), que se asocia con la proteína 40s del ribosoma.

Se utilizó la plataforma de PCR de Roche *LightCycler* 480(Roche, Basilea, Suiza). El máster mix utilizado fue LightCycler 480 SYBR Green I Master (04707516001, Roche, Basilea, Suiza). Los componentes utilizados y las cantidades utilizadas se muestran en la Tabla 2.

Tabla 1. *Secuencias de los cebadores para la medición de la longitud telomérica (Sigma-Aldrich, San Luis, EE.UU.).*

NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA CEBADOR
Telómero directo	5'-CGGTTTGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT-3'
Telómero inverso	5'-GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT-3'
36B4 directo	5'-CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC-3'
36B4 inverso	5'-CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA-3'

Tabla 2. *Componentes y cantidades utilizadas para la medición de la longitud del telómero por PCR en tiempo real.*

TELOMERO	1x	36B4	1x
H_20 libre de ARNasas	7µL	H_20 libre de ARNasas	7µL
Telómero directo	1µL	36B4 directo	1µL
Telómero inverso	1µL	36B4 inverso	1µL
Master-mix	10µL	Master-mix	10µL
DNA muestras o dilución serial de la curva	1µL	DNA muestra o dilución serial de la curva	1µL

El perfil de ciclos térmicos utilizados fue: un primer ciclo de 15 min a 95ºC, un segundo ciclo de 45 ciclos de 10s a 95ºC, 5s a 55ºC y 11s a 72ºC.

Cada muestra se analizó por triplicado, y la cuantificación se calculó por Cawthon *et al.* [95].

$$\textit{Cantidad Relativa T/S-Ratio} = \frac{ef(muestra\ telómero)^{Ct(muestra\ telómero)}}{ef(muestra\ referencia)^{Ct(muestra\ referencia)}} \div \frac{ef(estandar\ telómero)^{Ct(telómero\ estandar)}}{ef(estandar\ referencia)^{Ct(muestra\ estandar)}}$$

4.6. CUANTIFICACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de proteína de las muestras se midieron usando el método de Bradford [96]. Se trata de un método colorimétrico que emplea un colorante hidrofóbico *Bradford Protein Assay (*Bio-rad, Hercules, EE.UU.), cuyas disoluciones acuosas en presencia de ácido fosfórico tienen un color pardo y que, al encontrarse en el entorno hidrofóbico del interior de una proteína, origina un color azul intenso que se puede medir fácilmente. Este complejo coloreado generado se mide a 595nm de absorbancia.

Se usaron diluciones estándar de albúmina de suero bovino (ASB) para generar una curva estándar (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4µg/µL) con la que obtener la concentración de proteína de las muestras. Se determinó usando la siguiente fórmula:

$$Concentración\ Proteína\ (mg/ml) = \frac{Absorbancia\ media\ muestra - (ordenada\ en\ el\ origen)}{Pendiente} X\ Dilución$$

4.7. ACTIVIDAD TELOMERASA

La actividad de la telomerasa se midió usando el protocolo de amplificación de repetición telomérica cuantitativa en tiempo real (ensayo RTq-TRAP) [97].

Para obtener los extractos proteicos, las células fueron resuspendidas en 200µL del tampón 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS; Sigma-Aldrich, San Luis, EE.UU.), se agitaron y se dejaron en hielo durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se centrifugaron a 12.000*xg* durante 20 minutos a 40ºC. Una vez centrifugado, se recogió el sobrenadante y se cuantificó mediante el método de Bradford. Las muestras se ajustaron a una concentración de 500ng/µL conocida para que lo resultados fueran comparables.

Para realizar una cuantificación relativa, se preparó una curva patrón. Se hicieron diluciones seriadas a partir de un extracto de células con actividad telomerasa ($1 \cdot 10^6$ células HeLa), los puntos de la curva fueron los siguientes: 10000, 1000, 100, 10, 1, y 0.1 células HeLa. Además, se utilizaron controles de telomerasa positivo, control del tampón CHAPS y control con agua libre de ARNasas para asegurar que la PCR fuera correcta y evitar falsos positivos y falsos negativos.

En el ensayo de RTq-TRAP, aparte de poner diferentes controles para la contaminación, también se realizó un control por amplificación de la polimerasa (ITAS). De esta forma se puede saber si los resultados eran producidos por una deficiencia en la actividad telomerasa y no por culpa de una inhibición de la polimerasa en la PCR. Así pues, para analizar la actividad telomerasa se utilizó el cebador TS, se trata de un cebador directo de la secuencia del telómero y el cebador ACX, que corresponde al inverso de la secuencia del telómero. En el análisis de actividad polimerasa, se utilizó una secuencia de ADN exógena, en vez de la del telómero. La utilizada fue la del TSNT, que es la suma de las secuencias del TS y NT, y los cebadores utilizados fueron TS como cebador directo de la secuencia y NT como cebador indirecto. De forma que si no se amplificaba el TSNT era debido a inhibición de la polimerasa por lo que resultados obtenidos no se deberían a una inhibición de la telomerasa. Los cebadores, utilizados en la PCR se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. *Se muestran los diferentes cebadores utilizados y su secuencia para la medición de la actividad telomerasa (Sigma-Aldrich, San Luis, EE.UU.).*

NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA CEBADOR
TS	5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'
ACX	5'-GCGCGGCTTACCCTTACCCTTACCCTAACC-3'
NT	5'-ATCGCTTCTCGGCCTTTT-3'
TSNT	5'-AATCCGTCGAGCAGAGTTAAAAGGCCGAGAAGCGAT-3'

Los componentes utilizados y las cantidades utilizadas se muestran en la Tabla 4. La PCR utilizada es la *Roche480 Light Cycler* (Roche, Basilea, Suiza). El máster mix utilizado es LightCycler 480 SYBR Green I Master (04707516001, Roche, Basilea, Suiza). Los cebadores utilizados en ambos casos son los previamente descritos (Sigma-Aldrich, San Luis, EE.UU.).

Tabla 4. *Componentes y cantidades utilizadas para la medición de la actividad telomerasa mediante PCR en tiempo real.*

Componentes TELOMERASA	1x	ITAS	1x
H_20 libre de ARNasas	7µL	H_20 libre de ARNasas	5µL
TS	0.8µL	TS	0.8µL
ACX	0.2µL	NT	0.2µL
Master-mix	10µL	TSNT	2µL
DNA muestras o dilución seriada de la curva	2µL	Master-mix	10µL
		DNA muestra o dilución seriada de la curva	2µL

El ensayo RTq-TRAP se realizó en dos etapas:

La primera consistió en una extensión del cebador TS 5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3' mediada por telomerasa, se realizó en el termociclador *Verit Thermal Cycler* (ThermoFisher Scientific, Nueva York, EE.UU.) durante 20 min a 25ºC.

La segunda etapa, consistió en una amplificación por PCR, se realizó con el LightCycler 480 (Roche, Basilea, Suiza) utilizando las siguientes condiciones de ciclo: una preincubación de 95ºC durante 5 min, seguido de la amplificación con 40 ciclos (95ºC durante 30s, 55ºC durante 30s, y 72ºC durante 30s), y un ciclo final correspondiente a la curva de fusión (95ºC durante 30s, 65ºC durante 30s y 97ºC durante 30s).
Todas las muestras se analizaron por triplicado en tres experimentos independientes. La actividad de la telomerasa se evaluó comparativamente en base al Ct, y se determinó con la siguiente fórmula:

$$\Delta Ct = Ct\ tratamiento - \ Ct\ Control$$
$$Actividad\ Telomerasa\ \% = \ 1/1.8^{\Delta Ct} \cdot 100$$

4.8. EXPRESIÓN GÉNICA GLOBAL MEDIANTE MATRICES DE EXPRESIÓN

Para este estudio se procedió a la extracción de ARN, los sedimentos celulares se resuspendieron con 1mL de Trizol (15596-026, Thermo Fisher Scientific, Nueva York, EE.UU.) y se dejaron 5 minutos en a 4ºC. Se añadieron 200µL de cloroformo (372978, Thermo Fisher Scientific, Nueva York, EE.UU.) por cada mL de Trizol, se agitaron y se dejaron 5 minutos en a 4ºC. Tras este tiempo se centrifugaron las muestras a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4ºC. Se cogieron las fases acuosas que se formaron en cada vial y se pusieron en nuevos viales. Se añadieron 500µL de isopropanol (I9516, Sigma-Aldrich, San Luis, EE.UU.) a cada muestra, se agitaron y se dejaron toda la noche a -20ºC. Pasados el tiempo se centrifugaron de nuevo a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4ºC.

Se quitaron los sobrenadantes de cada muestra y se dejaron las muestras al aire libre para que se secaran mejor. Finalmente, se resuspendieron los precipitados con 25µL de H_2O libre de RNasas.

En el servicio de análisis multigénico de Affymetrix (Unidad Central de Investigación, Facultad de Medicina y Odontología, Universitat de València) se determinó la concentración y calidad de los extractos de ARN por medio de la plataforma (basada en la microfluídica capilar) *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies, Santa Clara, EE.UU.), haciendo uso de una matriz *RNA Nano Chip* (On-Chip-Electrophoresis, Agilent Technologies, Santa Clara, EE.UU.) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras cuantificadas y con valores de integridad del ARN de 9-10 sobre 10, pasaron al análisis de matrices de expresión.

En el análisis de expresión se utilizaron matrices de expresión *GeneChip™ Human Gene 2.0 ST Array* (ThermoFisher Scientific, Nueva York, EE.UU.). Se escogieron estas matrices porque proporcionan una medida más exacta, sensible y completa de los transcritos de ARN y ARN no codificantes intergénicos largos, además de ser matrices que se han utilizado en otros estudios similares [98]. Se realizaron las hibridaciones de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Finalmente se obtuvieron los archivos informáticos generados por la hibridación y se analizaron por bioinformática.

4.9. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS MATRICES DE EXPRESIÓN

Esta parte del trabajo se realizó en los laboratorios del Profesor Magnus Rattray (Facultad de Ciencias de la Vida, Universidad de Manchester, Reino Unido) y de la Dra. Fátima Al-Shahrour (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid, España).
En el análisis bioinformático se utilizaron los archivos CEL, que son los datos crudos de las matrices de expresión. Para cargar y analizar estos archivos CEL, se utilizó el paquete Oligo del software R, específico para el tipo de matrices utilizadas en el análisis [99]. Una vez cargados los archivos y analizados los niveles de las sondas, se procedió a la normalización de los datos mediante el método multianálisis robusto de matrices (RMA)

con el paquete Affy de R [100]. Esta normalización consistió en la eliminación del ruido de fondo, normalización por cuartiles y la suma de las medianas pulidas.

Una vez normalizada la matriz, se procedió al análisis diferencial de los genes según los diferentes modelos de silenciamiento. Se compararon los grupos de la siguiente forma: siDKC1 vs siCONTROL, siNOP10 vs siCONTROL y siTINF2 vs siCONTROL. Para obtener los genes más diferencialmente expresados, se utilizó el paquete Limma de R [101], es un paquete muy utilizado para modelos lineales donde se evalúa la expresión diferencial, junto con Limma se utilizó el método de Benjamini y Hochberg (BH) para la corrección de pruebas múltiples. Se consideraron genes significativos aquellos que tenían una tasa de descubrimiento falso (FDR) menor a 0.05 (FDR < 0.05).

Para el análisis de las rutas metabólicas que tenían una expresión diferencial entre los modelos estudiados se utilizó la base de datos Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG) que registra las redes de interacciones moleculares dentro de las células, y variantes de ellas específicas a organismos particulares [102]. Los genes que se expresaron más diferencialmente entre las diferentes comparaciones (siDKC1 vs siCONTROL, siNOP10 vs siCONTROL y siTINF2 vs siCONTROL) fueron sometidos a pruebas hipergeométricas, mediante la función hyperGTest del paquete Category de R, descubriendo las rutas metabólicas más sobre-representadas en KEGG. Este procedimiento utilizó el test exacto de Fisher para encontrar asociación entre los genes significativos y la pertenencia a una vía KEGG.

4.10. PSEUDOURIDILACIÓN

La pseudouridilación se analizó mediante una metodología indirecta, que cuantifica los niveles de pseudouridina del ARN de la subunidad 28S del ribosoma. Se trata de una técnica establecida por Rochi *et. al.* [103]. Una vez silenciadas las células se extrajo el ARN mediante el kit de extracción NucleoSpin RNA/Protein (Macherey-Nagel, Düren, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se lisan por incubación en una solución que contiene grandes cantidades de iones caotrópicos. Este tampón de

lisis inactiva casi todas las enzimas (ARNasas y proteasas) y crea condiciones de unión apropiadas para la adsorción del ARN a la membrana de sílice. El ADN, unido a la membrana de sílice, se elimina mediante una solución de rDNasa que se aplica directamente sobre la membrana de sílice. Finalmente se realizan unas etapas de lavado con dos tampones para eliminar sales, metabolitos y componentes celulares macromoleculares. El ARN puro se eluye por fuerza iónica baja con agua libre de ARNasa. El ARN total, de células silenciadas, se modificó con el N-Ciclohexil-N'-(2-morfolinoetil)carbodiimida p-toluenosulfonato (CMCT; Sigma-Aldrich, San Luis, EE.UU.). Este compuesto modifica todas las pseudouridinas, tiouridinas y 2-metiltio-6-isopenteniladenosida y produce aductos de N3-CMC-pseudo. Se añadieron 80µL de tampón BEU (urea 7 M, EDTA 4 mM, Bicina 50 mM, pH 8.5, tampón final pH = 9.0) y 20µL de CMCT 1M, preparado con tampón BEU. Las muestras se incubaron durante 20 minutos a 37ºC y se precipitaron añadiendo 2µL de *Pellet Paint Co-Precipitante* (Merck Millipore, Kenilworth, EE.UU.), 50µL de acetato de sodio 3M (pH 5.5) y 600µL de etanol 100% para concentrar el ARN. Los sedimentos se lavaron dos veces con 200µL de etanol al 70%, y se resuspendieron con 50µL de tampón de carbonato de sodio con pH 10,4 (carbonato de sodio 50 mM y EDTA 2 mM) y se incubaron a 37ºC durante 4h. Se añadió este tampón básico para eliminar los aductos producidos en las uridinas, el aducto en pseudouridinas exige condiciones alcalinas más fuertes. Tras la incubación, se precipitó el ARN añadiendo 2µL de *Pellet Paint Co-Precipitante* (Merck Millipore, Kenilworth, EE.UU.), 6µL de acetato de sodio 3M (pH 5.5) y 110µL de etanol 100% para concentrar el ARN. Los precipitados se lavaron con 200µL etanol al 70%, y se resuspendieron 20µL de agua libre de ARNasas. Se cuantificó la concentración de ARN mediante el *Nanodrop 2000* (ThermoFisher Scientific, Nueva York, EE.UU.), y todas las muestras se ajustaron con agua libre de ARNasas a una concentración de 6ng/µL.

Una vez ajustadas las muestras, se realizó la transcripción inversa de las muestras. Se utilizaron 100ng de cada muestra junto con el kit síntesis de ADNc de Maxima First Strand (Thermo Fisher, Nueva York, EE.UU.) y el cebador específico del 28S (Sigma-Aldrich, San Luis, EE.UU.), con la siguiente secuencia 5'-

ATTATGCTGAGTGATATCCCATCGAAGGATCAAAAGAG-3'. En la Tabla 5, se muestra las cantidades que se utilizaron de cada producto.

Tabla 5. Componentes y cantidades utilizados en la retrotranscripción del ARN para la medición de pseudouridilación.

COMPONENTES RT-PCR	CANTIDAD (µL)
Mix de reacción 5x	2
Transcriptasa Reversa	1
Cebador	0.4
Muestra ajustada	16.6
Volumen Final	20

Una vez preparada la placa con las cantidades anteriores para cada pocillo, se pusieron en el termociclador 2720 (ThermoFisher Scientific, Nueva York, EE.UU.) con el siguiente programa: Un primero paso a 25ºC durante 10 minutos, un segundo paso para la transcripción a 50ºC durante 15 minutos, y un paso final a 85ºC durante 5 minutos.

Finalizada la RT-PCR se realizó la PCR en tiempo real. Se utilizó el kit *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)* (ThermoFisher Scientific, Nueva York, EE.UU.) y la máquina de PCR 7900HT (ThermoFisher Scientific, Nueva York, EE.UU.). Los cebadores utilizados fueron el 28S y TERT (Sigma-Aldrich, San Luis, EE.UU.) como control endógeno. Las secuencias de cada gen se pueden observar en la Tabla 6.

Tabla 6. *Cebadores utilizados en la medición de la pseudouridilación con las secuencias utilizadas.*

NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA CEBADOR
28S directo	5'-GTGTCAGAAAAGTTACCACA-3'
28S inverso	5'-ATTATGCTGAGTGATATCCC-3'
TERT directo	5'-GCTGGCTTCGGCAGCACATATAC-3'
TERT inverso	5'-TATCGAACGCTTCACGAATTTGC-3'

Los compuestos y las cantidades utilizados en la RTq-PCR, se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. *Compuestos y cantidades utilizadas en la PCR en tiempo real para la medición de los niveles de pseudouridilación.*

COMPUESTOS RTq-PCR	CANTIDAD (µL)
Máster Mix	5
Cebador directo específico	0.5
Cebador inverso específico	0.5
H_2O libre ARNasas	3
Muestra RT-PCR	1
Volumen Final	10

Preparados los compuestos para cada pocillo, se procedió a la RTq-PCR con el siguiente programa: Un primer paso de activación a 95ºC durante 10 minutos, un segundo paso de 40 ciclos donde cada ciclo se componía de 95ºC durante 15 segundos seguido de 60ºC durante 60 segundos.

Cada muestra se analizó por triplicado, y la expresión génica relativa se calculó de acuerdo con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [104].

4.11. RATIO GSSG/GSH

Se evaluaron los niveles totales de GSH y GSSG, así como el ratio GSSG/GSH mediante el kit de detección fluorescente de glutatión (Arbor Assays, Ann Arbor, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez silenciadas las células, se añadió 200µL de ácido sulfosalicílico (SSA) frío al 5% a cada pocillo y se dejaron 10 minutos a 4ºC. Una vez pasado el tiempo, se rascaron las células de las placas y se vertieron en tubos, se centrifugaron a 14.000*xg* durante 15 minutos a 4ºC. El sobrenadante, que contenía el GSH y el GSSG, se trasvasó a otros

tubos, y los sedimentos que contenían las proteínas se guardaron para cuantificar posteriormente. El sobrenadante se diluyó 1:10 con *Assay Buffer*, preparamos 11µL muestra + 99µL *Assay Buffer* (se pusieron 50µL por pocillo, y se realizarán duplicados). Añadimos 50µL de las muestras diluidas, estándares y controles (C+: 5µL de *Oxidized Glutathione Control* + 245µL *Sample Diluent*) en los pocillos de la placa. Añadimos 25µL de *ThioStar Reagent* a cada pocillo y agitamos un poco la placa para mezclar los compuestos, dejamos incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Pasado el tiempo se procedió a la lectura en el espectrofluorímetro *Spectra Max GEMINI XPS* (Molecular Devices, San Jose, EE.UU.), con una emisión de 510nm, y una excitación de 370-491nm, para determinar el nivel de GSH libre.

Una vez leído el GSH libre, se añadieron 25µL del *Reaction Mixture* a cada uno de los pocillos (*Reaction Mixture*: *NADPH Concentrate* 150µL + *Glut Red Conc* 150µL + *Assay Buffer* 1200µL). Agitamos un poco la placa para mezclar los compuestos y dejamos incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Pasado el tiempo se leyó en el espectrofluorímetro *Spectra Max GEMINI XPS* (Molecular Devices, San Jose, EE.UU.) con una excitación de 370-491nm y una emisión de 510nm, para determinar el nivel de GSH total. Se utilizaron tres replicados para cada condición del experimento. Una vez obtenido los dos resultados, se procedió al cálculo del GSSG:

$$GSSG = \frac{(GSH\ Total - GSH\ Libre)}{2}$$

4.12. DOT-BLOT

La técnica *Dot-blot* se utilizó para medir los niveles de proteínas carboniladas [105]. Todas las muestras se ajustaron a una concentración de 10ng en un volumen de 10µL con H_2O bidestilada. Se derivatizaron a 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNP-hidrazona) por su reacción con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH)[106], utilizando el kit de detección de oxidación de proteínas Kit Oxi-Blot™ (Merck Millipore, Kenilworth, EE.UU.). Se

desnaturalizaron los 10ng de proteínas con 1.65µL SDS al 36%. La solución de proteína se trató con 10µL de DNPH 1X, para el alícuota control se le añade la solución de derivatización control, se incubaron durante 15 minutos. Pasado este tiempo se añadió 7.5µL de la solución neutralizadora y 1.43µL β-mercaptoetanol.

Se hidrató la membrana de transferencia de nitrocelulosa (GE Healthcare, Chicago, EE.UU.) y un papel de Whatman 3MM (GE Healthcare, Chicago, EE.UU.) con 5mL de ASB 0.01g/mL en solución PBS-Tween 4mM y Tween 0.1%. Luego, se pusieron encima de un papel de filtro seco y debajo de estos tres papeles de secar. Se vertió 1µL de cada muestra preparada anteriormente sobre la membrana, incluyendo los controles positivos y negativos de proteínas carboniladas. Se dejó secar durante unos minutos. Una vez que se secó, se realizó el bloqueo usando 5mL de 0.01g/mL de ASB en solución de PBS-Tween durante 1 h.

Después del bloqueo, se realizó la incubación con el anticuerpo primario usando el anticuerpo de conejo anti-proteínas carboniladas (1: 1000; Merck Millipore, Kenilworth, EE.UU.) en 5mL de 0.01g/mL de ASB en solución de PBS-Tween. La membrana se incubó durante la noche a 4ºC y con agitación suave.

Al día siguiente, se lavó la membrana tres veces con 0.01g/mL de ASB en solución de PBS-Tween, con el fin de eliminar el anticuerpo que no se unía. Después, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo (1:2500; Cell Signalling, Danvers, EE.UU.) con peroxidasa de rábano conjugada.

Se realizaron tres lavados con 0.01g/mL de ASB en solución de PBS-Tween con el fin de eliminar el anticuerpo no unido. Después, la membrana se incubó con el reactivo de *ECL Plus Western Blotting Detection System* (GE Healthcare, Chicago, EE.UU.). Las imágenes de quimioluminiscencia se obtuvieron con *LAS-4000* (GE Healthcare, Chicago, EE.UU.). Las muestras se analizaron por triplicado para cada línea celular.

4.13. WESTERN-BLOT

Se extrajeron las proteínas de las células HeLa de los grupos de experimentos para medir la expresión proteica mediante la técnica de Western-Blot [107]. Para ello, se lisaron las células en hielo usando 200µL por muestra de tampón de lisis (Hepes 20 mM, pH 7.4, Triton X-100 al 1%, NaCl 100 mM, NaF 50 mM, β-glicerofosfato 10 mM, ortovanadato sódico 1 mM, fenilmetanosulfonilo 1 mM Fluoruro (PMSF) y coctel inhibidor de la proteasa proteasa (Roche, Basilea, Suiza)). La suspensión resultante se centrifugó a 13.000*xg* durante 10 minutos a 4ºC. Los sobrenadantes, que contenían las proteínas, se recuperaron en otro tubo y se determinó la concentración de las proteínas por el método de Bradford, previamente descrito.

Se ajustaron las proteínas a una concentración conocida de 15µg en un volumen de 20µL con H_2O bidestilada. Una vez ajustadas las proteínas, se añadieron 5µL por muestra de tampón *Sample Buffer+* (Tris 40 mM, EDTA 4mM, azul de bromofenol 0.01%, sacarosa 40%, SDS 4%, β-mercaptoetanol 10%). Se calentaron a 95ºC durante 5 minutos, para que se desnaturalizaran y adquieran las cargas negativas para avanzar en la electroforesis.
Las proteínas se resolvieron mediante electroforesis en gel del 12% dodecilsulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE), a 100V durante dos horas. Posteriormente, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare, Chicago, EE.UU.) con una carga de 120V durante una hora. Después de la transferencia, la membrana se bloqueó en 5% de leche desnatada o 5% de ASB en Tween-20 al 0.1% (Sigma-Aldrich, San Luis, EE.UU.) y solución salina tamponada con fosfato (PBS), esto varió según el anticuerpo utilizado.

La membrana se incubó con anticuerpos monoclonales específicos para cada caso y se dejó toda la noche a 4ºC en agitación. Los anticuerpos utilizados específicos son los siguientes: DKC1 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EE.UU.), NOP10 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EE.UU.), TIN2 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EE.UU.), FOSFO-P53 (1:1000; Cell Signaling, Danvers, EE.UU.), PRDX6-SO3H (1:1000; Abcam, Cambridge, Reino Unido), PRDX6 (1:1000; Abcam,

Cambridge, Reino Unido), CuZnSOD (1:1000; Assay Design, Ann Arbor, EE.UU.), MnSOD (1: 1000; Assay Design, Ann Arbor, EE.UU.), CAT (1:1000; Sigma, Sant Luis, EE.UU.), GPX1 (1:1000; Abcam, Cambridge, Reino Unido), TRX1 (1:1000; Abcam, Cambridge, Reino Unido), TRX2 (1:1000; Abcam, Cambridge, Reino Unido) y β-actina (1:1000; Cell Signaling, Danvers, EE.UU.) y la histona H3 (1: 5000; Abcam, Cambridge, Reino Unido) como controles de carga.

Pasado el tiempo, se realizaron tres lavados a la membrana con TBS-Tween, y se incubaron con un anticuerpo secundario de ratón, conejo o cabra conjugado con peroxidasa de rábano, según el anticuerpo primario. La membrana se incubó durante 50 minutos, a temperatura ambiente y en agitación. Finalmente, la membrana se lavó tres veces con TBS-Tween. La visualización de las bandas de proteínas se realizó con reactivos de detección Western Blot de ECL (GE Healthcare, Chicago, EE.UU.) y las membranas se revelaron mediante el lector de imágenes LAS-4000 (GE Healthcare, Chicago, EE.UU.). Las muestras se analizaron por triplicado para cada línea celular.

4.14. DENSITOMETRÍA

Las imágenes obtenidas por quimioluminiscencia, Dot blot y Western blot, fueron analizadas utilizando el software de análisis de imágenes Image J (National Institutes of Health, Rockville Pike, EE.UU.) [105]. La intensidad relativa de los puntos o bandas se obtuvieron utilizando la herramienta del rectángulo para definir el área del punto o banda. La sección rectangular que incluye la región de interés, se definió como la mínima área que incluye los puntos o bandas en un rectángulo. Las regiones de interés fueron analizas con la opción “Gels” en el menú “Analyzed” del software, obteniéndose un histograma para cada rectángulo. Los picos observados en el histograma, para cada rectángulo, corresponden con cada banda o punto que encierra el rectángulo. El pico nos dio un valor de área que corresponde con el número de pixeles o intensidad, éste se midió con la herramienta del software llamada “Wand”. Los datos sobre estas áreas

fueron utilizados para detectar diferencias entre intensidades y consecuentemente en cantidad de proteína.

4.15. EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE RT-qPCR

Se analizó la expresión génica de las células silenciadas mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) [107], y de esta forma validar los resultados obtenidos mediantes matrices de expresión. Se procedió a la extracción del ARNm mediante el kit de extracción *NucleoSpin RNA/Protein* (Macherey-Nagel, Düren, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez obtenido el ARN, se cuantifico con el Nanodrop 2000. Todas las muestras se llevaron a una concentración conocida de 200ng en un volumen de 10µL para comparar la expresión en las mejores condiciones. Las diluciones se realizaron con H_2O libre de RNasas.

Una vez obtenido y ajustado el ARNm, se procedió a realizar la transcripción reversa. El ARNm se sometió a transcripción inversa usando hexámeros aleatorios que hibriden con todo el ARNm para obtener ADNc. Se utilizó el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (ThermoFisher Scientific, Nueva York, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. El kit contaba con la transcriptasa, los cebadores aleatorios, los nucleótidos necesarios, el tampón para la reacción y se utilizó agua libre de ARNasas. Los compuestos que se utilizaron para cada muestra se muestran en la Tabla 8.

Las condiciones de la retrotranscripción comprendían una etapa de incubación inicial a 25ºC durante 10 minutos, para permitir el anillamiento de los hexámeros aleatorios; seguido por una etapa a 37ºC durante 120 minutos, para producir la síntesis de ADNc; y una etapa final de 95ºC durante 5 minutos para una inactivación final.

Tabla 8. *Diferentes componentes utilizados y sus cantidades en la retrotranscripción del ARN a ADNc.*

COMPONENTES RT-PCR	CANTIDAD (µL)
Tampón de RT	2
Mix de NTP	0.8
Cebadores	2
Transcriptasa Reversa	1
H_2O	4.2
Muestra ajustada	10
Volumen Final	20

Una vez obtenido el ADNc, se procedió a observar la expresión génica por medio de la RTq-PCR utilizando un *ABI Prism 7900HT Fast Real-Time PCR* (ThermoFisher Scientific, Nueva York, EE.UU.). Para el análisis de expresión génica se utilizaron cebadores específicos para humano de cada gen de interés, los genes analizados fueron los siguientes: *DKC1* (Hs00154737_m1), *NOP10* (Hs00430282_m1), *TINF2* (Hs01554309_g1), *TERC* (Hs03454202_s1), *TERT* (Hs00972650_m1), SESN3 (Hs00914870_m1), ZMAT3 (Hs00536976_m1), YES1 (Hs00736972_m1), TGFBR1 (Hs00610320_m1), p53 (Hs01034249_m1), *SOD1* (Hs00533490_m1), *SOD2* (Hs00167309_m1), *CAT* (Hs00156308_m1), *GPX1* (Hs00829989_gH), *TRX1* (Hs00917067_m1), *TRX2* (Hs00912509_g1), *PARP1* (Hs00242302_m1), *oGG1* (Hs00213454_m1), *XPA* (Hs00166045_m1), *WRN* (Hs01087915_m1), *RAD51* (Hs00947967_m1), *RAD53* (Hs00200485_m1), *18S* (Hs03003631_g1), y *GAPDH* (Hs02758991_g1, todos de ThermoFisher Scientific, Nueva York, EE.UU.) elegido como gen de referencia endógena. Además de los cebadores, se utilizó también *1x TaqMan® PCR universal Master Mix* (ThermoFisher Scientific, Nueva York, EE.UU.), se trata del mix donde estaba el tampón de reacción y los nucleótidos, también se utilizó el ADNc obtenido en la retrotranscripción y agua libre de ARNasas. Los compuestos se utilizaron con los siguientes volúmenes, para cada muestra individual en la Tabla 9.

Tabla 9. *Compuestos y cantidades utilizadas en la medición de la expresión génica por PCR en tiempo real.*

COMPUESTOS RTq-PCR	CANTIDAD (µL)
Universal Master Mix	3.5
Cebador específico	0.5
H_2O	5
Muestra de la RT-PCR	1
Volumen Final	10

Las condiciones de la RTq-PCR fueron: Un primer paso de 95ºC durante 10 minutos, este paso era de activación de la Taq-Polimerasa; seguido por 40 ciclos a 95ºC durante 15 segundos y 60ºC durante 1 minuto. Cada muestra se analizó por triplicado, y la cuantificación relativa de los genes se calculó por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

4.16. ANÁLISIS DE γ-H2A.X POR CITOMETRÍA

El estudio de las marcas de daño al ADN, en concreto de γ-H2A.X como marcador de rotura de doble cadena se realizó por citometría de flujo [108]. Para ello se procedió al silenciamiento por duplicado de cada gen, uno para el estudio en condiciones basales y otra para la condición de daño al ADN inducido por H_2O_2. Se extrajeron todas las células de la placa, las células que fueron inducidas se resuspendieron con 100µL de H_2O_2 5mM y 900µL de medio completo (volumen total 1000µL) para tener una concentración final de H_2O_2 0.5mM. Las células basales se resuspendieron con 1000µL de medio completo. Todas las muestras se dejaron incubar a 37ºC durante 1 hora.

Una vez pasado el tiempo, se centrifugaron a 1500rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendieron las células con 100µL de PBS y 100µL de formaldehido al 8% (volumen total 200µL), para fijar las células y tener una concentración final del 4% de formaldehido, se dejaron incubar durante 15 minutos a

temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se centrifugaron a 1500rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante. Las muestras se resuspendieron con 200µL Triton X-100 al 0.5% para permeabilizar y se dejaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugaron a 1500rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió y se realizó un lavado con 500µL de PBS para eliminar los restos de Triton que pudiesen quedar, se centrifugó a 1500rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante.

Las células se resuspendieron en 50µL de PBS y 2.5µL de Alexa Fluor 488 Mouse anti-H2A.X (dilución 1:20 en PBS; pS139, BD Biosciences, San Jose, EE.UU.) y se incubaron durante 1h a 37ºC. Se realizó un lavado con 500µL de PBS para eliminar los restos de anticuerpo no unido para evitar inespecificidades, a 1500rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante. Finalmente, se resuspendieron en 500µL de PBS y se analizaron mediante citometría de flujo utilizando el citómetro FACS-Verse (Beckton Dickinson, East Rutherford, EE.UU.) y el software Infinicyt (Cytognos, Salamanca, España) en el servicio de Citometría (Unidad Central de Investigación, Facultad de Medicina y Odontología, Universitat de València). Los resultados se expresaron como porcentaje de roturas de doble hebra (DSB) en las células HeLa totales analizadas.

4.17. ANÁLISIS DE POLI-(ADP-RIBOSIL)ACIÓN (PAR) POR CITOMETRÍA

La PARsilación como marca de daño de simple como doble cadena se estudió por citometría [109]. Como en el estudio antes descrito, se silenció el doble de muestra, una para condiciones basales y otra para inducción de daño al ADN con etopósido. Se extrajeron todas las muestras de las placas, según la muestra se procedió de diferente forma. Las células que fueron inducidas se resuspendieron con 100µL de etopósido 20µM y 900µL de medio completo (volumen total 1000µL) para tener una concentración final de etopósido 200µM. Las células sin inducir se resuspendieron con 1000µL de medio completo. Todas las muestras se dejaron incubar a 37ºC durante 1 hora.

Pasado el tiempo, se centrifugaron a 1500rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendieron las células con 100µL de PBS y 100µL de formaldehido al 8% (volumen total 200µL), de esta manera se fijaron las células y se obtuvo una concentración final del 4% de formaldehido. Se dejaron incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente, se centrifugaron a 1500rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante. Las muestras se resuspendieron con 200µL Triton X-100 al 0.5% para permeabilizar la membrana y se dejaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron a 1500rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante. Se realizó un lavado con 500µL de PBS para eliminar los restos de Triton, se centrifugó a 1500rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante.

Las células se resuspendieron con 149µL de PBS y 1µL de Anti-PAR Rabbit (dilución 1:150 en PBS; Merck Millipore, Kenilworth, EE.UU.) y se dejaron incubar durante toda la noche a 4ºC. Al día siguiente, se realizó un lavado con 500µL de PBS, para eliminar los restos de anticuerpo no unido y evitar inespecificidades, a 1500rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendieron con el anticuerpo secundario, 249µL de PBS y 1µL de Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit (dilución 1:250, Invitrogen, Nueva York, EE.UU.), y se dejaron incubar durante 1h a 37ºC. Se realizó un lavado con 500µL de PBS para eliminar los restos de anticuerpo secundario, se centrifugó a 1500rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante. Finalmente, se resuspendieron en 500µL de PBS y se analizaron mediante citometría de flujo utilizando el citómetro FACS-Verse (Beckton Dickinson, East Rutherford, EE.UU.) y el software Infinicyt (Cytognos, Salamanca, España) en el servicio de Citometría (Unidad Central de Investigación, Facultad de Medicina y Odontología, Universitat de València). Los resultados se expresaron como porcentaje de roturas tanto de simple (SSB) como de doble hebra (DSB) en las células HeLa totales analizadas.

4.18. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los ensayos se realizaron por triplicado (réplicas biológicas) y con triplicados técnicos de cada uno de ellos. Los resultados, representan la media ± desviación estándar (DS) de todas las réplicas. La prueba U de Mann-Whitney [110] se aplicó para evaluar la significación estadística al comparar los resultados obtenidos para las líneas celulares siDKC1, siNOP10, siTINF2 y CONTROL frente al siCONTROL. Los valores de p inferiores a 0.05 se consideraron significativos. Las barras de error dentro de los gráficos son representativas de la desviación estándar de las muestras replicadas. El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando GraphPad Software v6.0 (GraphPad Software, La Jolla, EE.UU.).

5. RESULTADOS

5.1. GENERACIÓN SATISFACTORIA DE LOS MODELOS CELULARES DE siDKC1, siNOP10 y siTINF2

El primer objetivo del trabajo consistió en generar el modelo celular silenciado para los genes *DKC1, NOP10 y TINF2*; por medio de la tecnología del ARNi en células HeLa. Para comprobar que se generó satisfactoriamente cada uno de los modelos celulares a las 48h de la primera transfección, las células fueron recogidas para el estudio de expresión génica, mediante RT-qPCR, y el estudio de la expresión proteica, mediante Western Blot.

Los resultados mostraron que los niveles de expresión de ARNm de DKC1, NOP10 y TINF2 han disminuido alrededor de un 90% comparado con el grupo siCONTROL (Figura 18.A-C). En conformidad con los resultados de expresión génica, se observó una reducción de los niveles proteicos de alrededor del 40% de Disquerina, NOP10 y TIN2 comparados con el grupo siCONTROL (Figura 18.D-G).

Una vez comprobado el silenciamiento, se estudió la viabilidad y el ciclo celular de estos modelos. Los resultados obtenidos para el ciclo celular (Figura 19.A) y la viabilidad celular (Figura 19.B) no mostraron diferencias significativas entre los distintos modelos celulares ni con las líneas siCONTROL.

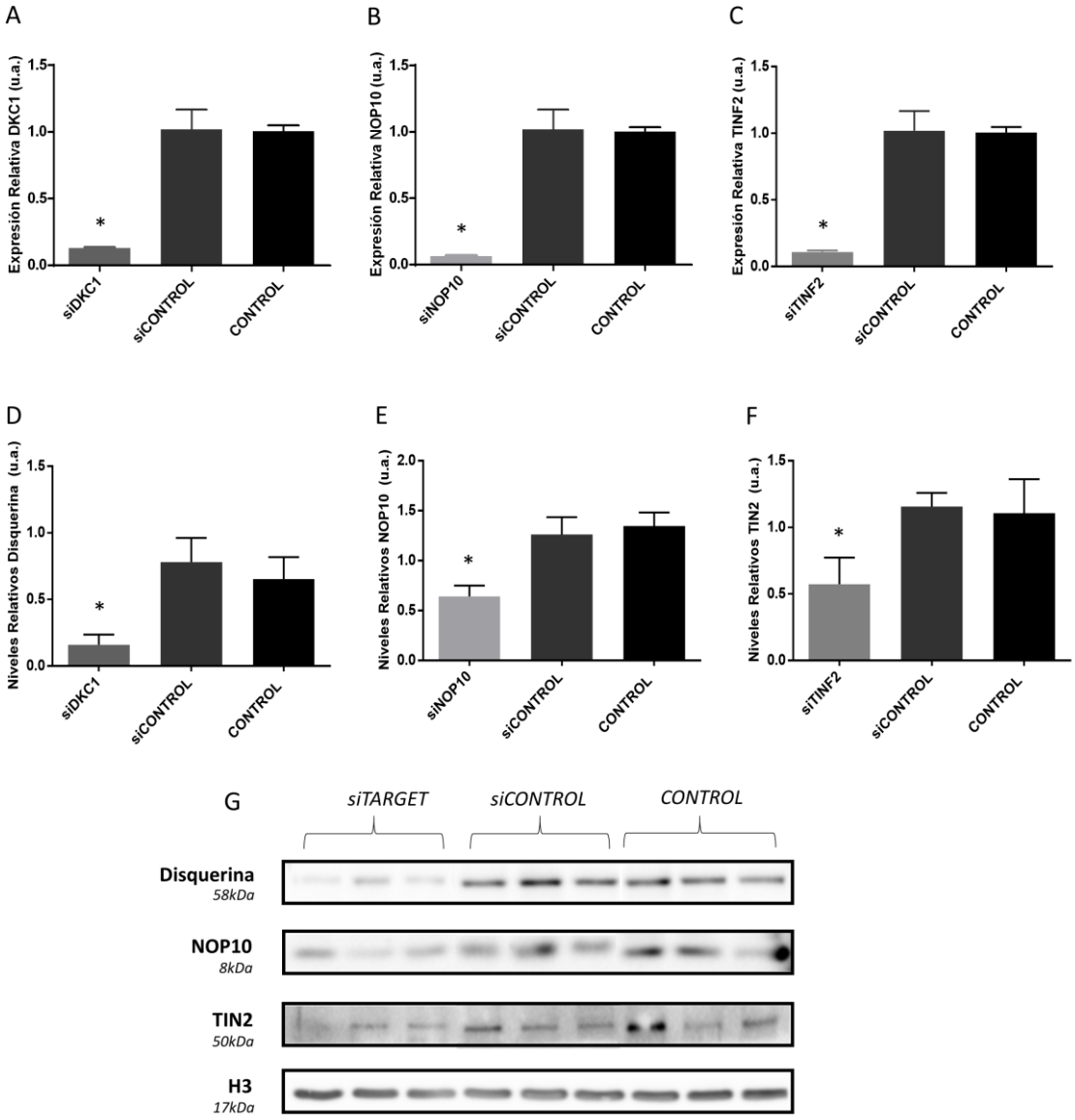


Figura 18. *Análisis de los modelos celulares de DC (siDKC1, siNOP10, siTINF2) generados por tecnología ARNi, después de las 48h de la primera transfección. A) Niveles de ARNm de DKC1 evaluados por RT-qPCR. B) Niveles de ARNm de NOP10 evaluados por RT-qPCR. C) Niveles de ARNm de TINF2 evaluados por RT-qPCR. La expresión génica se comparó con la del gen de referencia GAPDH. D) Niveles relativos de la densitométria del Western blot de la proteína Disquerina. E) Niveles relativos de la densitométria del Western blot de la proteína NOP10. F) Niveles relativos de la densitometría del Western blot de la proteína TIN2. Todas las bandas específicas de las proteínas fueron densitometradas con ImageJ, los valores fueron normalizados con el valor de la proteína de referencia H3 y comparados con los valores siCONTROL. Los resultados se muestran en unidades arbitrarias (u.a.). Las barras representan la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes. El asterisco representa la diferencia con significación estadística al comparar los grupos respeto al siCONTROL, para un nivel de confianza de un 95% (*$p<0.05$). G) Western blot de las proteínas Disquerina, NOP10 y TIN2. La expresión se comparó con la de la proteína referencia H3.*

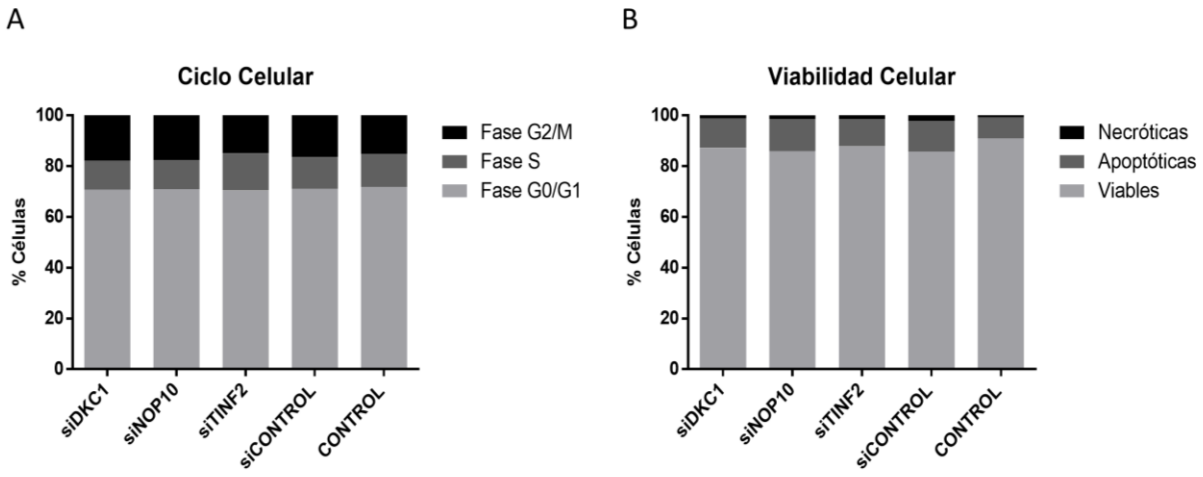


Figura 19. *Análisis por citometría de flujo del ciclo celular y la viabilidad celular de los diferentes modelos generados. A) Porcentaje de células que se encuentran en cada una de las diferentes etapas del ciclo celular. B) Porcentaje de células viables, necróticas y apoptóticas de cada uno de los modelos. Todos los datos representan el porcentaje de tres experimentos independientes. Las diferencias de los grupos respeto al siCONTROL, se evaluó con test estadístico con un nivel de confianza de un 95% (*p<0.05).*

A continuación, se midió la longitud de los telómeros para identificar si durante el periodo de silenciamiento génico y de replicación celular se producía un acortamiento telomérico. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas en la longitud telomérica en los distintos modelos estudiados (Figura 20.A). Así mismo, se midió la expresión génica de los genes TERC y TERT, que codifican para el componente de ARN y el componente catalítico de la telomerasa. No se observaron diferencias significativas en los niveles de TERT en ninguna de las tres líneas silenciadas (Figura 20.D), pero se observó una disminución de los niveles de TERC en los modelos celulares cuando se silenció DKC1 y NOP10 (Figura 20.C). Estos resultados correlacionaron muy bien con los resultados obtenidos para la actividad telomerasa, donde se observó una disminución de la actividad telomerasa en las líneas celulares siDKC1 y siNOP10 (Figura 20.B). Sin embargo, no se observaron diferencias en la actividad telomerasa (Figura 20.B) ni en los niveles de expresión de los genes TERC y TERT (Figura 20.C-D), cuando TINF2 estaba silenciado.

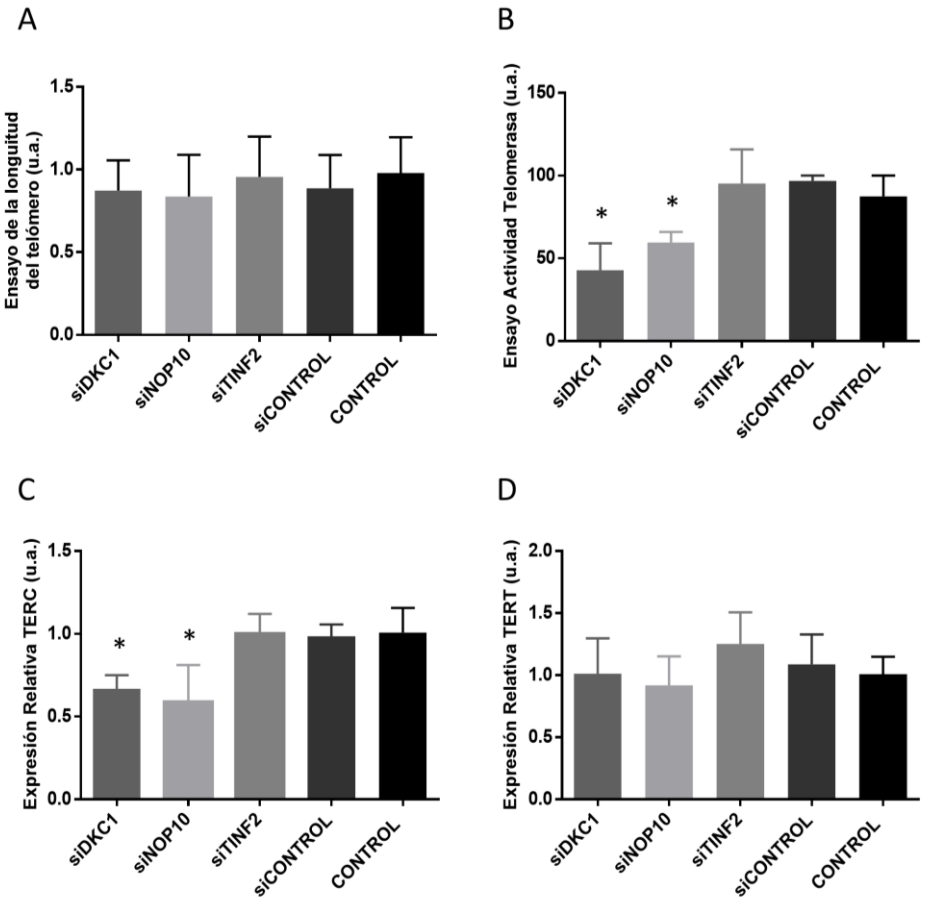


Figura 20. *Caracterización de los modelos celulares de DC (siDKC1, siNOP10 y siTINF2). A) Niveles de ARNm de TERC en los diferentes modelos celulares. B) Niveles de ARNm de TERT en los diferentes modelos celular. La expresión de ambos se comparó con la del gen de referencia GAPDH. C) Longitud telomérica medida como el ratio de número de copias de la secuencia telomérica (T/S). D) Ensayo de la actividad telomerasa en los diferentes modelos. Todos los resultados se obtuvieron por RT-qPCR. Todas las barras representan la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes. Las diferencias de los grupos respeto al siCONTROL, se evaluó con test estadístico con un nivel de confianza de un 95% (*$p<0.05$).*

5.2. LA EXPRESIÓN GÉNICA GLOBAL SE ENCUENTRA ALTERADA EN LOS MODELOS DE DC

El estudio génico global mediante matrices de expresión se realizó, con el interés de identificar que genes y vías se encontraban alteradas tras el silenciamiento de los genes DKC1, NOP10 y TINF2. En primer lugar, analizamos simultáneamente todas las líneas celulares para identificar perfiles transcripcionales que permitieran distinguir los diferentes grupos silenciados específicamente del control con ARN inespecífico. Realizamos un análisis de componentes principales bidimensional no supervisado (PCA:

Principal Component Analysis) basado en el análisis de todos los genes de las 9 muestras silenciadas específicamente y los 3 del siCONTROL (Figura 21). El PCA identificó cada grupo silenciado de acuerdo a la expresión génica global, observamos que tanto el grupo siDKC1, siNOP10 y siCONTROL agrupan bien. Sin embargo, en el grupo siTINF2 se localizó a una de las muestras más aisladas del resto, no obstante, es una muestra estadísticamente válida para el análisis.

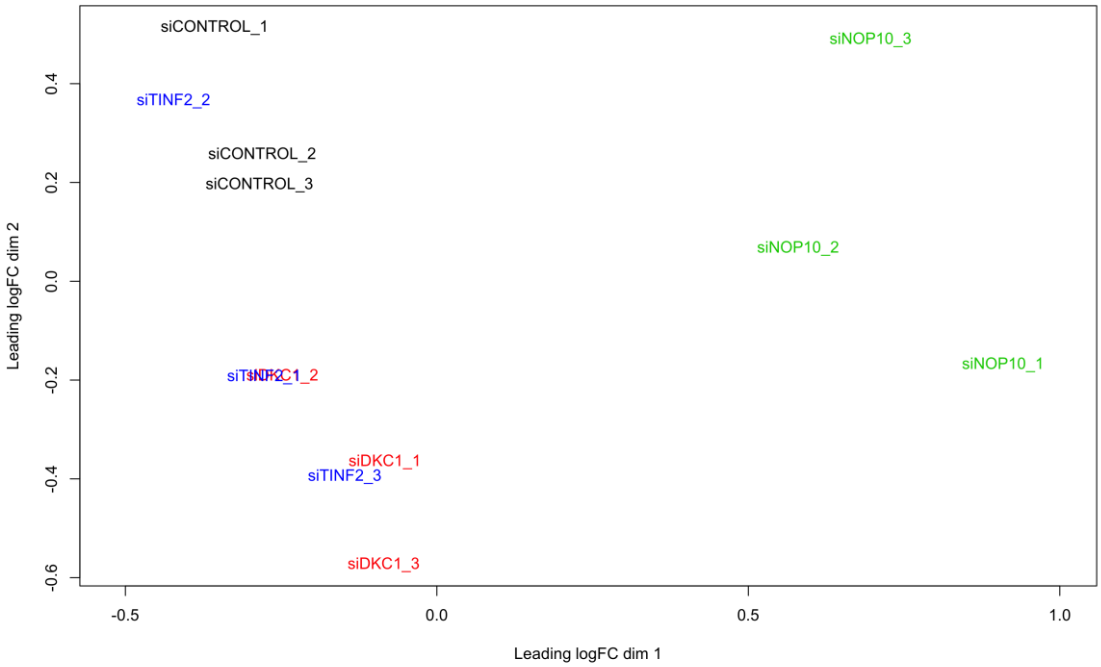


Figura 21. *Análisis de Componentes Principales bidimensional basado en la expresión génica de todos los modelos celulares. Cada muestra independiente, representada por su nombre, queda posicionada en función de su expresión global a lo largo de los dos componentes. El PCA se realizó con el software R estudio.*

Los resultados indicaron que los diferentes grupos celulares se agrupaban bien, así que se procedió al análisis de los genes significativos para cada línea celular. Los resultados mostraron que la línea celular que presentaba más genes significativamente alterados fue siNOP10. Para esta línea celular se obtuvieron un total de 1951 genes alterados en siNOP10, de los cuales 872 genes se encontraban sobreexpresados y 1079 estaban infraexpresados en siNOP10 respecto a la línea celular de referencia siCONTROL (Tabla 10). La línea celular de siDKC1 mostró un total de 217 genes diferencialmente expresados, de los cuales 104 estaban más expresados y 113 infraexpresados en siDKC1 respecto al grupo de referencia siCONTROL (Tabla 10). Finalmente, en la línea celular de

siTINF2 se encontraron un total de 216 genes significativos de los cuales 112 estaban sobreexpresados y 104 infraexpresados en siTINF2 respecto a la línea siCONTROL (Tabla 10).

Tabla 10. *Genes con expresión diferencial estadísticamente significativa para cada uno de los modelos celulares respecto a siCONTROL.*

LÍNEA CELULAR	GENES TOTALES	GENES MÁS EXPRESADOS	GENES MENOS EXPRESADOS
siDKC1	217	104	113
siNOP10	1951	872	1079
siTINF2	216	112	104

Una vez se obtuvieron los genes más significativos, se realizó el análisis de las rutas más significativas a través de la agrupación de los genes diferencialmente expresados en cada línea celular. Para la obtención de las rutas se utilizó la base de datos de la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG), se trata una colección de bases de datos en línea de genomas, rutas enzimáticas, y químicos biológicos. Los resultados mostraron que para la línea de siDKC1 se obtenían un total de 6 rutas KEGG, para siNOP10 se obtuvieron un total de 22 rutas KEGG y para siTINF2 un total de 9 rutas KEGG (Tabla 11). Para ver en más detalle todas las rutas obtenidas se puede consultar el Anexo (Tabla Anexo 1, Tabla Anexo 2 y Tabla Anexo 3).

Una vez obtenidos los genes significativos y las rutas significativas, se decidió entrecruzarlos para ver que rutas en común existían entre los diferentes modelos celulares dentro del contexto de la fisiopatología de DC de modo que pudieran explicar los rasgos fenotípicos comunes que existen en los distintos tipos de herencia estudiados con los modelos generados.

Tabla 11. *Análisis bioinformático de las rutas y los genes con expresión diferencial significativa en los modelos celulares silenciados respecto a siCONTROL.*

LÍNEA CELULAR	RUTAS SIGNIFICATIVAS	Nº GENES
siDKC1	Procesamiento de proteínas en el retículo endoplásmico	5
	Toxoplasmosis	4
	Ruta de señalización de p53	4
	Secreción del ácido gástrico	3
	Metabolismo de la cisteína y metionina	2
	Exportación de proteínas	2
siNOP10	Rutas en Cáncer	37
	Ruta de señalización MAPK	30
	Adhesiones focales	27
	Cáncer de pulmón de células pequeñas	21
	Metabolismo de las purinas	20
	Ruta de señalización p53	18
	Apoptosis	14
	Uniones Adherentes	14
	Ciclo Celular	13
	Leucemia mieloide crónica	13
	Interacciones del receptor ECM	12
	Miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho	12
	Cáncer de páncreas	11
	Invasión bacteriana de células epiteliales	11
	Glioma	10
	Cáncer de pulmón de células no pequeñas	9
	Metabolismo de la alanina, aspartato y glutamato	8
	Biosíntesis del aminoacil-ARNt	8
	Cáncer de vejiga	7
	Factores de transcripción basales	6
	Un grupo de carbono por folato	4
	Biosíntesis de la lisina	2

siTINF2	Interacción citoquina-receptor de citosinas	6
	Uniones estrechas	5
	Artritis Reumatoide	4
	la enfermedad de Chagas	4
	Leishmaniasis	3
	Vía de señalización del receptor tipo NOD	3
	Uniones adherentes	3
	Biosíntesis de pantotenato y CoA	2
	Ritmo Cardiaco	2

Los resultados obtenidos, mostraron que para siDKC1 y siNOP10 la ruta en común era la vía de señalización de p53 (Tabla 12), con un total de dos genes en común; sestrina 3 (*SESN3*), codifica para una proteína que se encarga de reducir las peroxirredoxinas oxidadas y matrina tipo 3 proteína de la familia dedos de Zn (*ZMAT3*, también conocido como *WIG-1*), se trata de un regulador positivo de p53. Los resultados obtenidos cuando se compararon siNOP10 y siTINF2 mostraron que la ruta en común era la vía de uniones adherentes celulares (Tabla 13), con dos genes en común: el proto-oncogen YES1 (*YES1*), codifica para una proteína que regula la apoptosis y el receptor del factor de crecimiento transformante beta 1 (*TGFBR1*), codifica para una proteína transmembrana que regula el ciclo celular. No se observaron rutas en común al comparar los modelos celulares siDKC1 con siTINF2. Se procedió a realizar la validación de estos genes mediante la técnica de RT-qPCR.

Tabla 12. *Resultados obtenidos de comparar las rutas y genes en común entre siDKC1 y siNOP10.*

RUTAS COMÚN DKC1 y NOP10	LOG2FC (DKC1/NOP10)	SÍMBOLO	NOMBRE
Ruta de señalización de p53	-0.934/-0.976 -0.838/0.765	SESN3 ZMAT3	Sestrina 3 Matrina tipo 3 proteína de la familia dedos de Zn

Tabla 13. *Resultados obtenidos de comparar las rutas y genes en común entre siNOP10 y siTINF2.*

RUTAS COMÚN NOP10 y TINF2	LOG2FC (NOP10/TINF2)	SÍMBOLO	NOMBRE
Uniones adherentes	0.956/0.766 0.681/0.978	YES1 TGFBR1	YES proto-oncogen Receptor del factor de crecimiento transformante beta 1

Los resultados obtenidos para el gen ZMAT3 mostraron un descenso en la expresión para el modelo siDKC1 y un aumento en la expresión para el modelo de siNOP10, no observándose diferencias en el modelo de siTINF2 respecto al siCONTROL (Figura 22.A). Los resultados para el gen SESN3 mostraron un descenso de la expresión cuando DKC1 y NOP10 estaban silenciados, no observándose diferencias cuando TINF2 estaba silenciado (Figura 22.B). Los resultados de expresión génica de ZMAT3 y SESN3 correlacionan con los obtenidos en el estudio bioinformático (Tabla 12). Los resultados obtenidos para el gen YES1 mostraron un aumento de la expresión en las tres líneas silenciadas respecto al siCONTROL (Figura 22.C), mientras que para el gen TGFBR1 se observó un aumento en la expresión en los modelos de siNOP10 y siTINF2 (Figura 22.D). Los resultados de expresión génica de YES1 y TGFBR1 correlacionan con los obtenidos en el estudio bioinformático (Tabla 12).

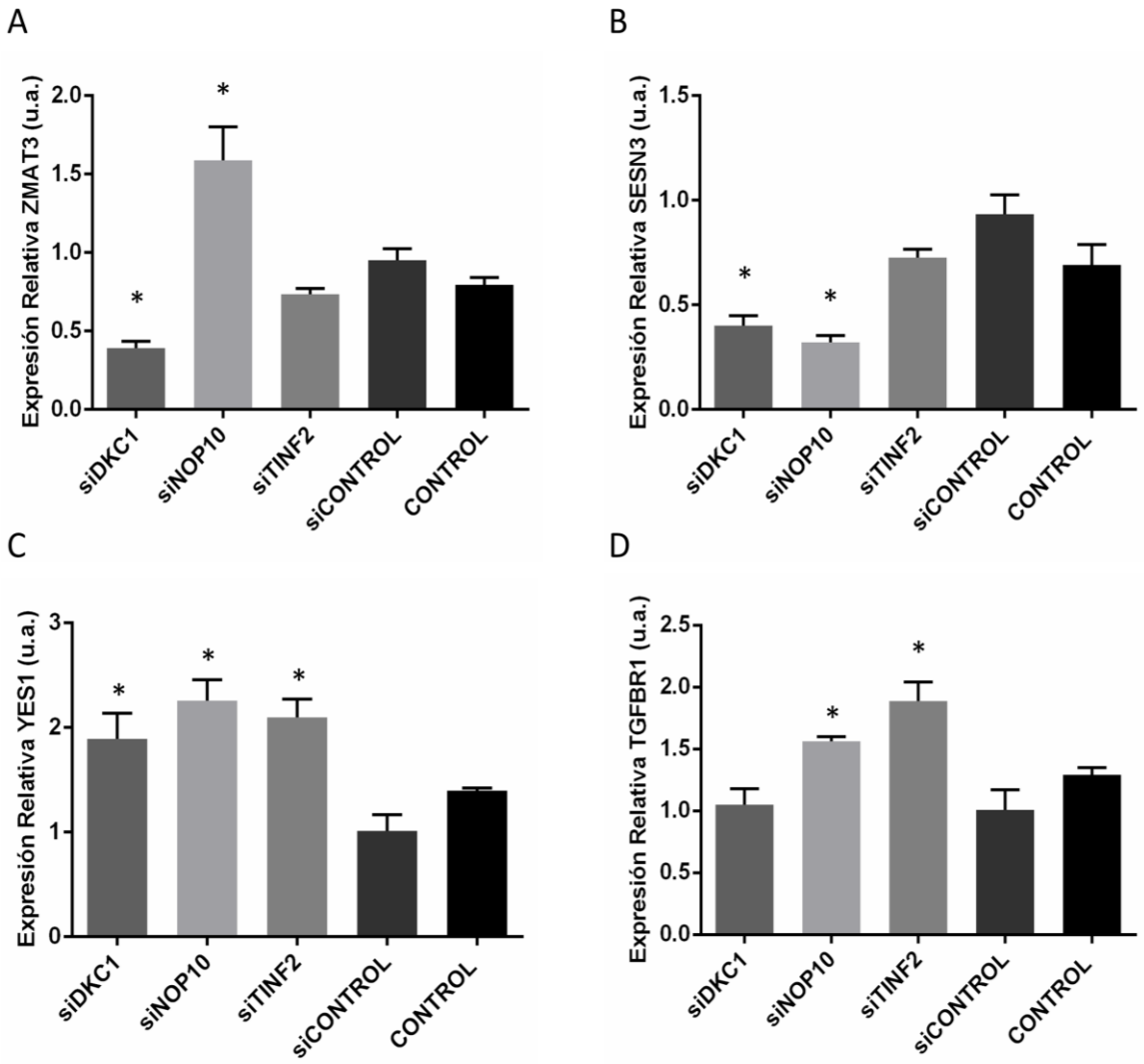


Figura 22. *Validación de los genes obtenidos en el análisis bioinformático tras la comparación entre diferentes líneas celulares silenciadas. A) Niveles de expresión relativa del gen ZMAT3 en los diferentes modelos celulares. B) Niveles de expresión relativa del gen SESN3 en los diferentes modelos celulares. C) Niveles de expresión relativa del gen YES1 en los diferentes modelos celulares. D) Niveles de expresión relativa del gen TGFBR1 en los diferentes modelos celulares. Todos los resultados se obtuvieron por RT-qPCR y la expresión de todos se comparó con la del gen de referencia GAPDH. Todas las barras representan la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes. Las diferencias de los grupos respeto al siCONTROL, se evaluó con test estadístico con un nivel de confianza de un 95% (*p<0.05).*

5.3. LA GLICÓLISIS SE ENCUENTRA ALTERADA EN EL MODELO CELULAR DE TINF2

En los resultados obtenidos en las matrices de expresión para siTINF2, se obtuvo que había rutas con diversos genes alterados que tenían relación con la glicólisis (Tabla 14).

Tabla 14. *Genes con expresión diferencial estadísticamente significativa relacionados con la Glicólisis para el modelo celular de siTINF2 respecto a siCONTROL.*

GENES TINF2	LOG2FC	SÍMBOLO	NOMBRE
Biosíntesis de pantotenato y coenzima A	0.620 -0.582	PANK3 PPCS	Pantotenato quinasa 3 Fosfopantotenoilcisteína sintetasa
Metabolismo de amino azúcares	-0.734 -0.805	GNPDA1 GFPT1	Glucosamino-6-Fosfato Desaminasa 1 Glutamina-Fructosa-6-Fosfato Transaminasa 1

Se observó que la ruta de la biosíntesis de pantotenato y coenzima A (CoA) se encontraba alterada. Se observó un aumento de la expresión de la PANK3 (Tabla14), cuya función es controlar los niveles de CoA. También, se observó una disminución de la PPCS (Tabla 14) respecto a siCONTROL, que es una enzima clave en la biosíntesis del CoA que utiliza ATP y cisteína para convertir fosfopantotenato a fosfopantotenoilcisteina. Además, se encontraron alterados otros genes que pertenecen a la ruta del metabolismo de amino azúcares. Se observó una disminución de GNPDA1 (Tabla 14), la función de este gen es catalizar la conversión de la glucosamina-6-fosfato a fructosa-6-fosfato, y una disminución en el gen GFPT1 (Tabla 14) comparado al grupo siCONTROL, la función de esta enzima es controlar el flujo de glucosa en la ruta de la hexosamina. Estos resultados parecen mostrar que la glicolisis está alterada cuando TINF2 esta silenciada.

5.4. LA PSEUDOURIDILACIÓN SE ENCUENTRA AFECTADA EN LOS MODELOS CELULARES DE DC

Con los resultados obtenidos del análisis de la expresión global, se observó que había muchos ARN nucleolares que pertenecen a las cajas H/ACA con una expresión génica muy baja para los modelos silenciados de DKC1 y NOP10 (Tabla 15). Recordemos que las cajas H/ACA son muy importantes porque intervienen en procesos de maduración del ARN, pseudouridilación, sobre todo en ARN ribosomales. Además, de DKC1 y NOP10 forman del núcleo principal de las cajas H/ACA. Observando estos resultados obtenidos en las matrices de expresión, se decidió estudiar cómo se encontraban los niveles de pseudouridilación, mediante la técnica de RT-qPCR.

Tabla 15. *ARN nucleolares pequeños con expresión diferencial estadísticamente significativa involucrados en la formación de las cajas H/ACA para los modelos de siDKC1 y siNOP10 respecto a siCONTROL.*

	LOG2FC (DKC1/NOP10)	SÍMBOLO	NOMBRE
RNAsn COMUNES PARA DKC1 y NOP10	-1.174/-1.248	SNORA14A	Pequeño ARN nucleolar 14A de la Caja H/ACA
	-1.339/-0.716	SNORA21	Pequeño ARN nucleolar 21 de la Caja H/ACA
	-1.015/-0.998	SNORA22	Pequeño ARN nucleolar 22 de la Caja H/ACA
	-1.052/-1.216	SNORA23	Pequeño ARN nucleolar 23 de la Caja H/ACA
	-1.065/-0.922	SNORA24	Pequeño ARN nucleolar 24 de la Caja H/ACA
	-1.120/-0.873	SNORA38B	Pequeño ARN nucleolar 38B de la Caja H/ACA
	-1.130/-0.728	SNORA47	Pequeño ARN nucleolar 47 de la Caja H/ACA
	-1.222/-0.953	SNORA49	Pequeño ARN nucleolar 49 de la Caja H/ACA
	-0.585/-0.441	SNORA65	Pequeño ARN nucleolar 65 de la Caja H/ACA
	-1.056/-0.821	SNORA68	Pequeño ARN nucleolar 68 de la Caja H/ACA
	-1.132/-1.090	SNORA71A	Pequeño ARN nucleolar 71A de la Caja H/ACA
	-0.835/-0.783	SNORA71C	Pequeño ARN nucleolar 71C de la Caja H/ACA
	-0.989/-0.914	SNORA71D	Pequeño ARN nucleolar 71D de la Caja H/ACA

Los resultados obtenidos por RT-qPCR mostraron que los niveles de expresión génica de la subunidad ribosomal 28S se encontraba reducida cuando *DKC1 y NOP10* estaban silenciados (Figura 23.B). Probablemente como resultado directo de esto, los niveles de ARNr maduro de la subunidad ribosomal 18S también fueron menores en los modelos celulares de siDKC1 y siNOP10 (Figura 23.A) respecto a siCONTROL. Sin embargo, ni la pseudouridilación ni la síntesis de ARNr 18S se vieron afectadas después del silenciamiento de *TINF2* (Figura 23.A-B).

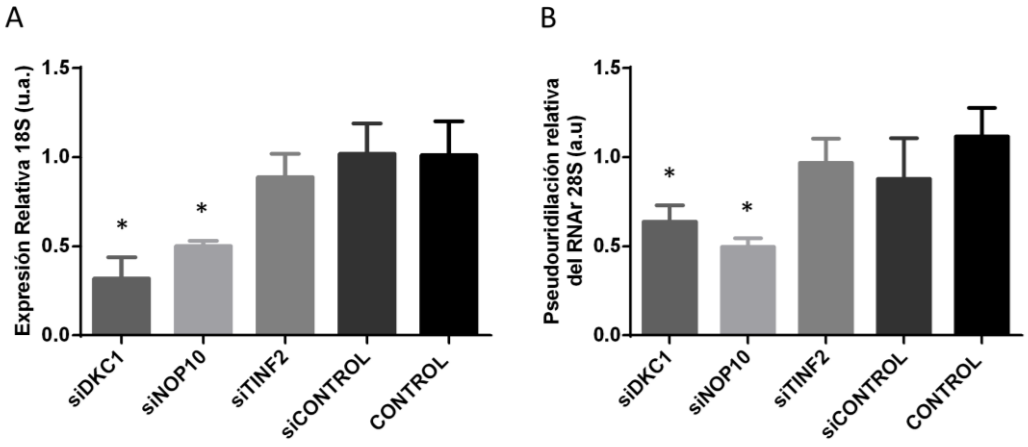


Figura 23. *Caracterización del proceso de pseudoridilación en los modelos celulares. A) Niveles de expresión relativa del ARN ribosomal 18S en los diferentes modelos celulares. La expresión se comparó con la del gen de referencia GAPDH. B) Niveles de pseudouridilación del ARN ribosomal 28S en los diferentes modelos celulares. Todos los resultados se obtuvieron por RT-qPCR. Las barras representan la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes El asterisco representa la diferencia con significación estadística al comparar los grupos respeto a siCONTROL para un nivel de confianza de un 95% (*p<0.05).*

5.5. LA RUTA DE P53 SE ENCUENTRA ACTIVA EN LOS MODELOS CELULARES DE DC

Los resultados obtenidos del análisis de la expresión global mostraron que la ruta en común que existía entre el modelo siDKC1 y siNOP10 era la vía de p53. Además, en la validación de los genes en común de esa vía, *ZMAT3 y SESN3*, se observaron diferencias significativas. Esos genes en común tienen interacción con p53. Se realizó el estudio del

estado de la vía de p53 a través de la expresión génica y proteica de p53. Los resultados obtenidos para la expresión génica de p53 mediante RT-qPCR, mostraron un aumento significativo de la expresión en los modelos de siDKC1 y siNOP10, no observándose diferencias significativas para siTINF2 respecto al siCONTROL (Figura 24.A). Los resultados obtenidos mediante la técnica de Western Blot para la fosforilación de p53, mostraron un aumento de los niveles proteicos fosforilados de p53 para siDKC1 y siNOP10 respecto al grupo siCONTROL, no observándose diferencias significativas para siTINF2 (Figura 24.B-C). Estos resultados correlacionan con los obtenidos en la expresión génica donde se observó un aumento de la expresión de p53.

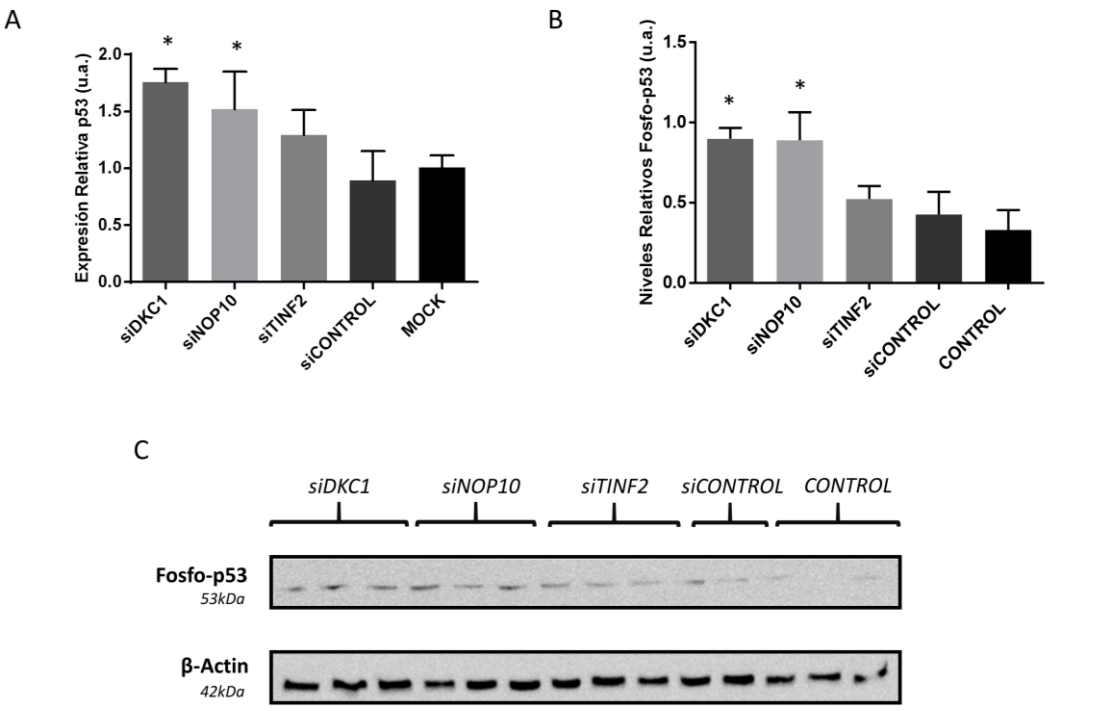


Figura 24. *Expresión génica y proteica de p53 en los diferentes grupos de estudio. A) Niveles de expresión génica relativa del gen p53. B) Niveles proteicos de p53 fosforilado resultantes de la densitometría del Western blot. La densitometría se realizó con ImageJ, los valores fueron normalizados con la proteína de referencia β-Actina y, comparados con los valores SICONTROL. Los resultados se muestran en unidades arbitrarias (u.a.). Las barras representan la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes. El asterisco representa la diferencia con significación estadística al comparar los grupos respeto al siCONTROL para un nivel de confianza de un 95% (*p<0.05). C) Western blot de la fosforilación de p53. La expresión se comparó con la proteína de referencia β-Actina.*

5.6. EL ESTRÉS OXIDATIVO ES UN RASGO PRESENTE EN LOS MODELOS CELULARES DE DC

En la caracterización del perfil del estrés oxidativo se evaluaron diferentes parámetros como las marcas de daño oxidativo y la respuesta antioxidante en los diferentes modelos celulares.

Los resultados obtenidos para los niveles de proteínas carboniladas mediante la técnica de Dot-blot, mostró un incremento de las proteínas carboniladas en los modelos celulares de siDKC1 y siNOP10 respecto al grupo siCONTROL, no siendo así para siTINF2 (Figura 25.A).

Otro parámetro medido para evaluar el perfil de estrés oxidativo celular fue el análisis de los niveles de la forma oxidada de la peroxiredoxina-6 (PRDX6-SO_3H). Los resultados mostraron que los niveles de PRDX6-SO_3H fueron mayores en las líneas silenciadas de *DKC1 y NOP10* comparados frente a la línea siCONTROL. Sin embargo, la línea silenciada de *TINF2* no mostró mayores niveles de PRDX6-SO_3H respecto a la línea siCONTROL (Figura 25.B).

Finalmente, evaluamos el estado redox celular mediante el análisis del cociente de GSSG/GSH. Los resultados mostraron un incremento de la proporción GSSG/GSH en las líneas celulares de siDKC1 y siNOP10, mientras que en siTINF2 no se observaron diferencias respecto al grupo siCONTROL (Figura 25.C). Estos parámetros nos indican que las líneas silenciadas de DKC1 y NOP10 presentan un estado redox más oxidado que la línea celular siTINF2 y las líneas siCONTROL.

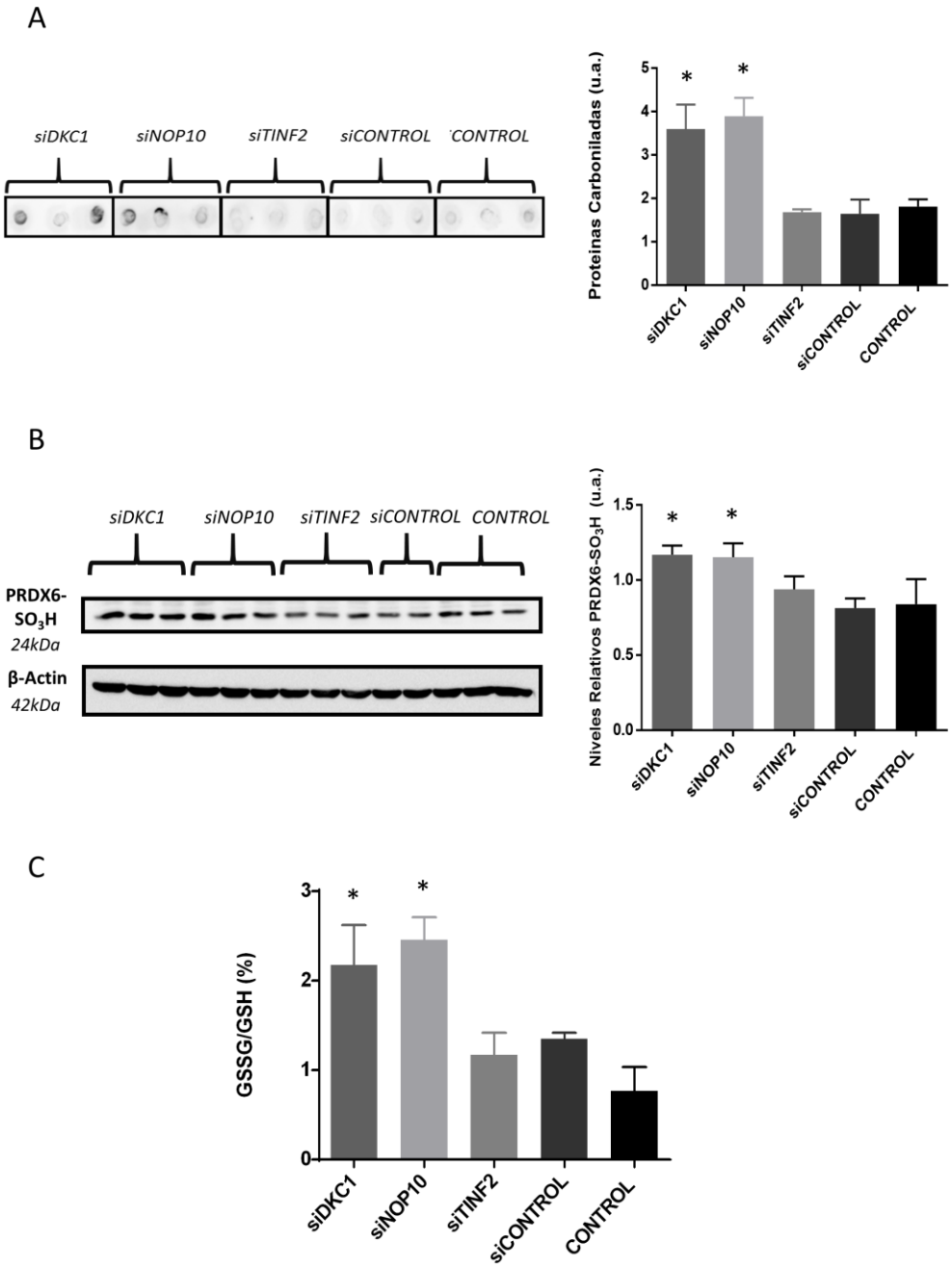


Figura 25. *Análisis de marcas oxidativas en las células HeLa silenciadas. A) Dot Blot de proteínas derivatizadas con DNPH para detectar proteínas carboniladas. Las marcas de carbonilación fueron densitometradas (derecha) con ImageJ, los valores fueron normalizados con el contenido total de proteínas y comparados con los valores del SICONTROL. Los resultados se muestran en unidades arbitrarias (u.a.), normalizadas con las muestras siCONTROL. B) Análisis Western blot analysis de PRDX-SO3H. Los niveles proteicos relativos se compararon con los de la proteína de referencia β-Actina. Las bandas específicas de Prdx6-SO3H fueron densitometradas (derecha) con ImageJ, los valores fueron normalizados con el valor de la proteína de referencia β-Actina y comparados con los valores siCONTROL. Los resultados se muestran en unidades arbitrarias (u.a). C) El cociente GSSG/GSH fue cuantificado con el kit de GSH. Todas las barras de todos los experimentos representan la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes. El asterisco representa la diferencia con significación estadística al comparar los grupos respeto al siCONTROL para un nivel de confianza de un 95% (*p*<0.05).

5.7. LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES SE ENCUENTRAN ALTERADAS EN LOS MODELOS CELULARES

Caracterizado el estado oxidativo de las líneas celulares silenciadas, se decidió estudiar la expresión de las principales enzimas antioxidantes celulares, a través de la expresión génica por RT-qPCR y proteica por Western blot.

En el estudio de la primera línea de defensa antioxidante se evaluaron la expresión de los genes SOD1 y SOD2. Se observó un descenso de los niveles de ARNm de *SOD1* cuando NOP10 estaba silenciado. No se observaron diferencias en el resto de los modelos celulares respecto al siCONTROL (Figura 26.A). Por el contrario, se apreció un incremento en los niveles de ARNm de *SOD2* en los modelos celulares de siDKC1 y siNOP10, pero no se encontraron diferencias significativas en el modelo de siTINF2 (Figura 26.B). Los resultados de la expresión proteica no mostraron cambios en los niveles de CuZnSOD para ninguno de los modelos celulares silenciados (Figura 26.C y Figura 26.E). Sin embargo, se observó un incremento en la expresión de MnSOD para el modelo siNOP10, no siendo así para el resto de modelos (Figura 26.D y Figura 26.E). Los resultados obtenidos a nivel proteico para NOP10 correlacionan con los obtenidos a nivel génico (Figura 26.D-E y Figura 26.B).

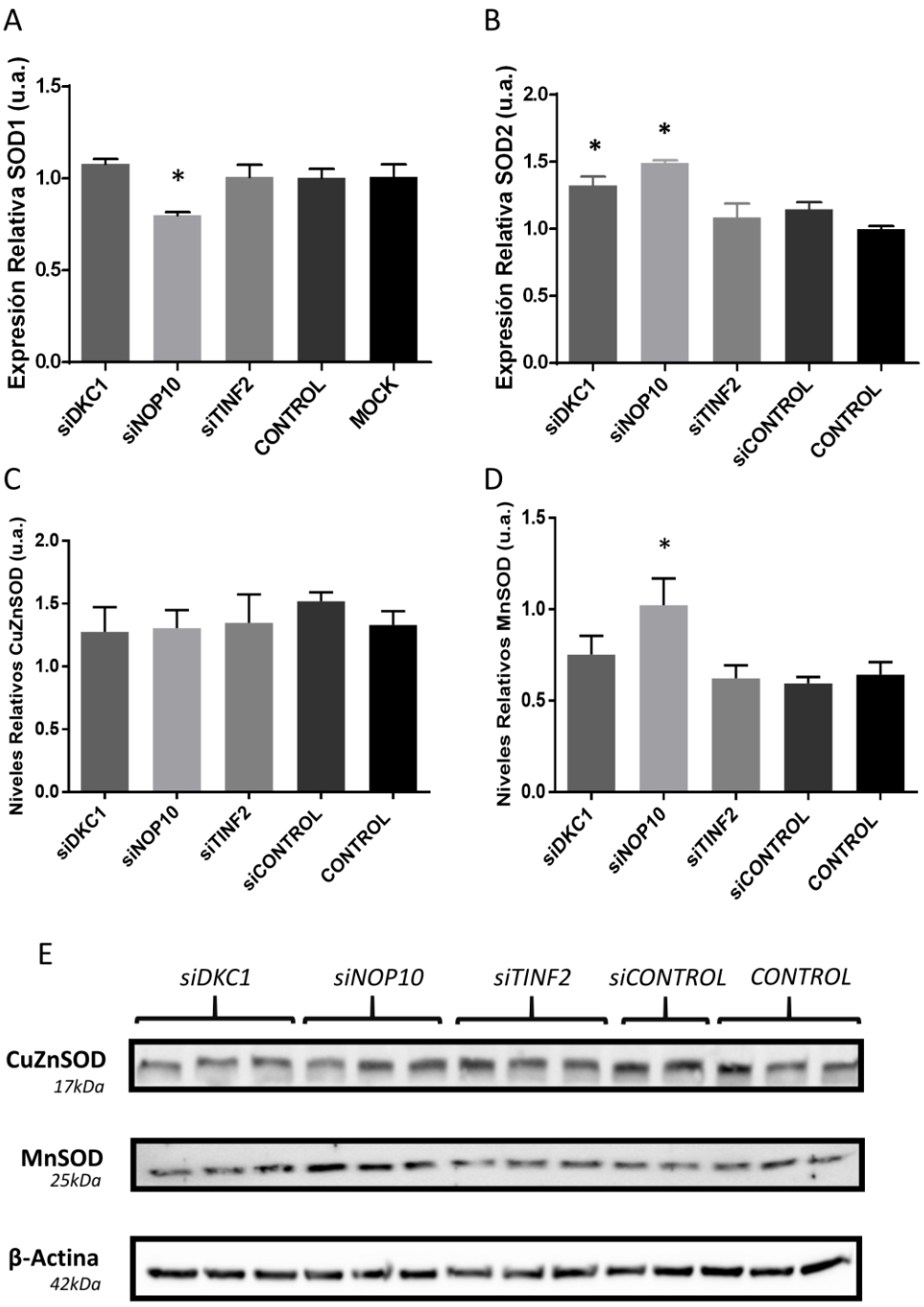


Figura 26. *Análisis de las principales enzimas detoxificadoras de O2·- en los modelos celulares. A) Niveles de ARNm de SOD1 evaluados por RT-qPCR. B) Niveles de ARNm de SOD2 evaluados por RT-qPCR. La expresión se comparó con la del gen normalizador GAPDH. C) Densitometría de la banda de proteína de CuZnSOD. D) Densitometría de la banda de proteína de MnSOD. En todos los casos las bandas específicas de las proteínas fueron densitometradas con ImageJ, los valores fueron normalizados con el valor de la proteína de referencia β-Actina y comparados con los valores siCONTROL. Los resultados se muestran en unidades arbitrarias (u.a.). E) Western blot de las proteínas CuZnSOD y MnSOD. La expresión se comparó con la proteína de referencia β-Actina. En todos los casos se realizaron tres experimentos independientes por grupo. Todas las barras de todos los experimentos representan la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes. El asterisco representa la diferencia con significación estadística al comparar los grupos respeto al siCONTROL para un nivel de confianza de un 95% (*p<0.05).*

El segundo mecanismo de defensa antioxidante frente a las EROs corresponde a las enzimas Catalasa y GPX1, encargadas de detoxificar el H_2O_2. Los resultados obtenidos en la expresión génica de la CAT mostraron un aumento de la expresión cuando NOP10 está silenciado comparado frente al resto de líneas celulares, pero no se observaron cambios en la expresión de la CAT en los otros modelos celulares (Figura 27.A). Los resultados de la expresión génica del gen que codifica para la GPX1 mostraron un aumento de la expresión en siDKC1, no observándose cambios en la expresión génica de GPX1 en el resto de modelos celulares cuando se compararon frente a la condición siCONTROL (Figura 27). A continuación, se analizaron los niveles de las proteínas codificadas por estos genes mediante la técnica de Western blot. En este caso no se observaron cambios en los niveles de proteína para la catalasa (Figura 27.C y Figura 27.E), ni tampoco en los niveles de proteína de la glutatión peroxidasa (Figura 27.D-E) para ninguno de los modelos celulares.

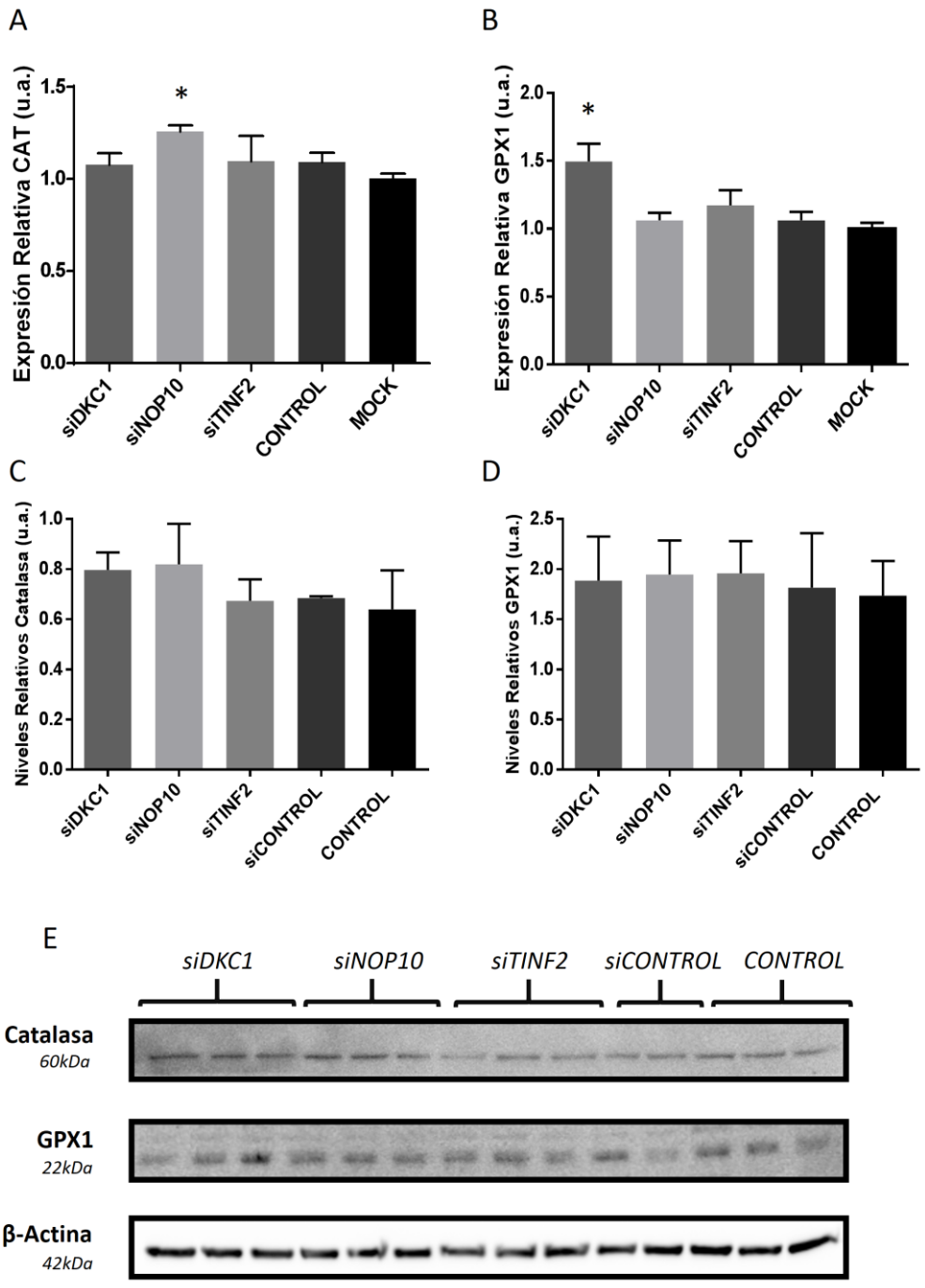


Figura 27. *Análisis de las principales enzimas detoxificadoras de peróxido en los modelos celulares. A) Niveles de ARNm de CAT evaluados por RT-qPCR. B) Niveles de ARNm de GPX1 evaluados por RT-qPCR. La expresión se comparó con la del gen normalizador GAPDH. C) Densitometría de la banda de proteína de Catalasa. D) Densitometría de la banda de proteina de GPX1. En todos los casos las bandas específicas de las proteínas fueron densitometradas con ImageJ, los valores fueron normalizados con el valor de la proteína de referencia β-Actina y comparados con los valores siCONTROL. Los resultados se muestran en unidades arbitrarias (u.a). E) Análisis mediante Western blot de las proteínas Catalasa y GPX1. La expresión se comparó con la proteína de referencia β-Actina. En todos los casos se realizaron tres experimentos independientes por grupo. Todas las barras de todos los experimentos representan la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes. El asterisco representa la diferencia con significación estadística al comparar los grupos respeto al siCONTROL para un nivel de confianza de un 95% (*p<0.05).*

Además de las enzimas antioxidantes evaluadas en el apartado anterior, también se estudiaron los niveles de expresión génica y proteica de la TRX1 y la TRX2. Estas enzimas se encargan de la reducción de los puentes disulfuro resultantes de la oxidación de los grupos –SH de los residuos de cisteína. Cuando se estudió la expresión génica de estos genes se observó un aumento en la expresión génica de la TRX1 en siDKC1 y siNOP10, pero no se observaron cambios en el modelo celular de siTINF2 (Figura 28.A) comparando frente a las condiciones siCONTROL. A continuación, se estudiaron los niveles proteicos mediante la técnica de Western blot. Los resultados de la expresión génica de los genes TRX1 se correlacionaron muy bien con los obtenidos a nivel proteico donde se observó un aumento de la TRX1 cuando NOP10 estaba silenciada, no observándose cambios en DKC1 y TINF2 respecto a la línea celular siCONTROL (Figura 28.C y Figura 28.E). Cuando se estudió la expresión génica de la TRX2, se observó un aumento en la expresión para siNOP10 y se observó un descenso en la expresión de TRX2 para siTINF2. Para el modelo celular siDKC1 (Figura 28.B) no se observaron cambios en la expresión cuando se comparó frente a las líneas siCONTROL. Los resultados de expresión proteica mostraron un descenso de los niveles de tioredoxina-2 para la línea siTINF2, mientras que en siDKC1 y siNOP10 no se observaron cambios, resultados que están de acuerdo con los obtenidos para la expresión génica de TRX2 en la línea celular siTINF2 (Figura 28.D-E).

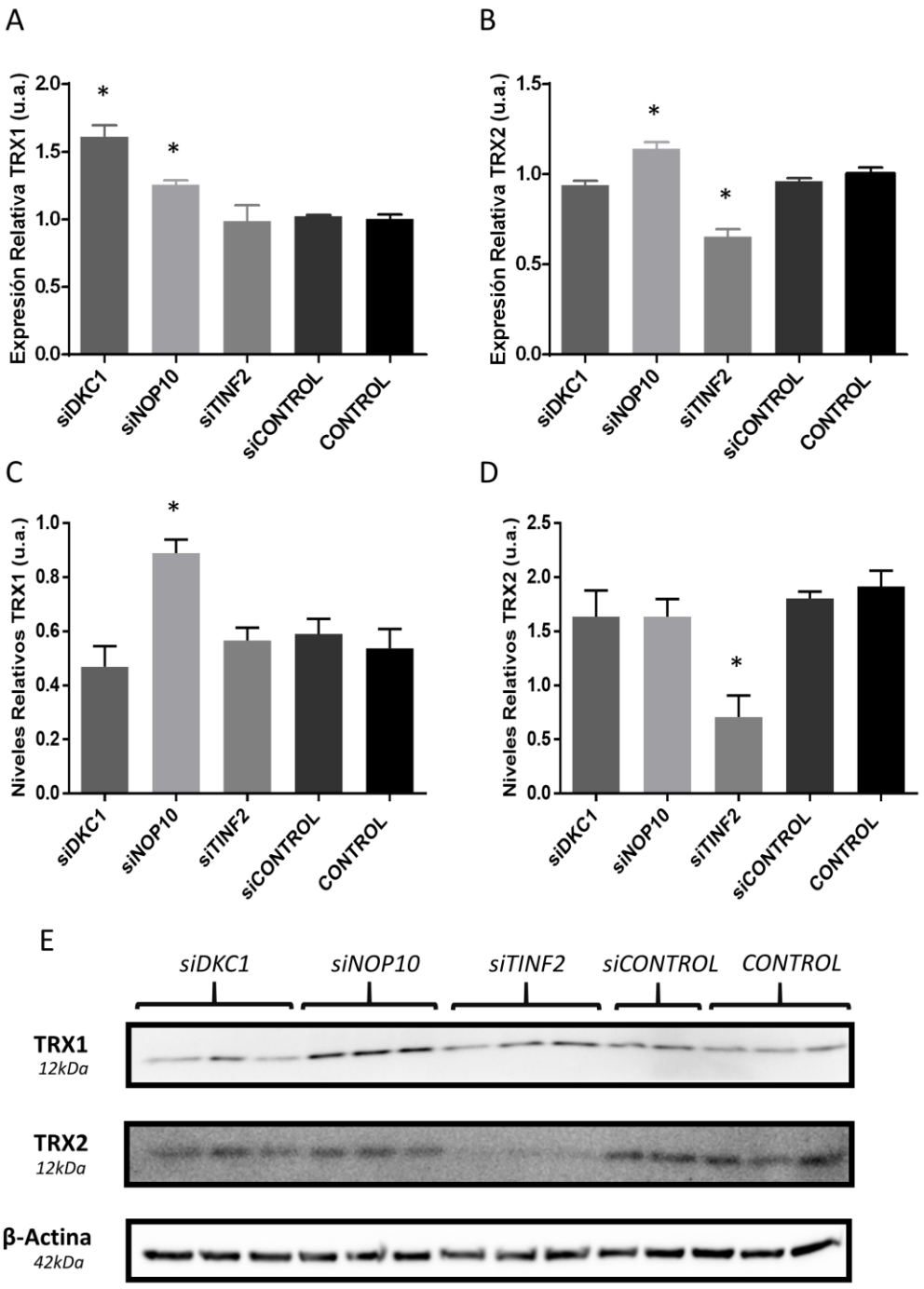


Figura 28. *Análisis de las principales enzimas encargadas de reducir los puentes disulfuro en los diferentes modelos celulares. A) Niveles de ARNm de TRX1 evaluados por RT-qPCR. B) Niveles de ARNm de TRX2 evaluados por RT-qPCR. La expresión se comparó con la del gen normalizador GAPDH. C) Densitometría de la banda de proteína de TRX1. D) Densitometría de la banda de proteína de TRX2. En todos los casos las bandas específicas de las proteínas fueron densitometradas con ImageJ, los valores fueron normalizados con valor de la proteína de referencia β-Actina y comparados con los valores siCONTROL. Los resultados se muestran en unidades arbitrarias (u.a.). E) Análisis mediante Western blot de las proteínas TRX1 y TRX2. La expresión se comparó con la proteína de referencia β-Actina. En todos los casos se realizaron tres experimentos independientes por grupo. Todas las barras de todos los experimentos representan la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes. El asterisco representa la diferencia con significación estadística al comparar los grupos respeto al siCONTROL para un nivel de confianza de un 95% (*p<0.05).*

5.8. LOS MODELOS CELULARES GENERADOS SUFREN UNA MAYOR PARSILACIÓN CUANDO SON SOMETIDOS A ESTRÉS

Para evaluar si el silenciamiento de los genes *DKC1, NOP10 y TINF2* podría influir en el daño al ADN se examinaron las marcas postraduccionales en histonas, como es la fosforilación en la Ser139 de histona H2A.X (γ-H2A.X) y la parsilación de las histonas.

El estudio de los niveles de γ-H2A.X se realizó en dos condiciones distintas, en estado basal y en condiciones de inducción de daño al ADN con 0.5mM H_2O_2 durante 1 hora. Los niveles de γ-H2A.X medidos en condiciones basales y con inducción de daño no mostraron diferencias significativas para ningún modelo celular de silenciamiento de los genes *DKC1, NOP10* y *TINF2* respecto a las líneas celulares siCONTROL (Figura 29.A y 30.B).

El estudio de la PARsilación de las proteínas se realizó también en dos condiciones distintas, en estado basal y en condiciones con inducción de daño al ADN por tratamiento con 200 μM de etopósido durante 1 hora. Los resultados obtenidos para las condiciones basales indicaron que no hubo cambio en los niveles de PARsilación para ninguno de los tres modelos celulares silenciados respecto al siCONTROL (Figura 29.C). Sin embargo, cuando se analizaron los niveles de PARsilación de proteínas en condiciones de inducción de daño al ADN sí se observó un incremento de los niveles de PARsilación en las líneas celulares siDKC1 y siNOP10 respecto a las líneas siCONTROL. Sin embargo, no se observaron cambios en la línea celular siTINF2 respecto a las líneas siCONTROL después del tratamiento con etopósido (Figura 29.D).

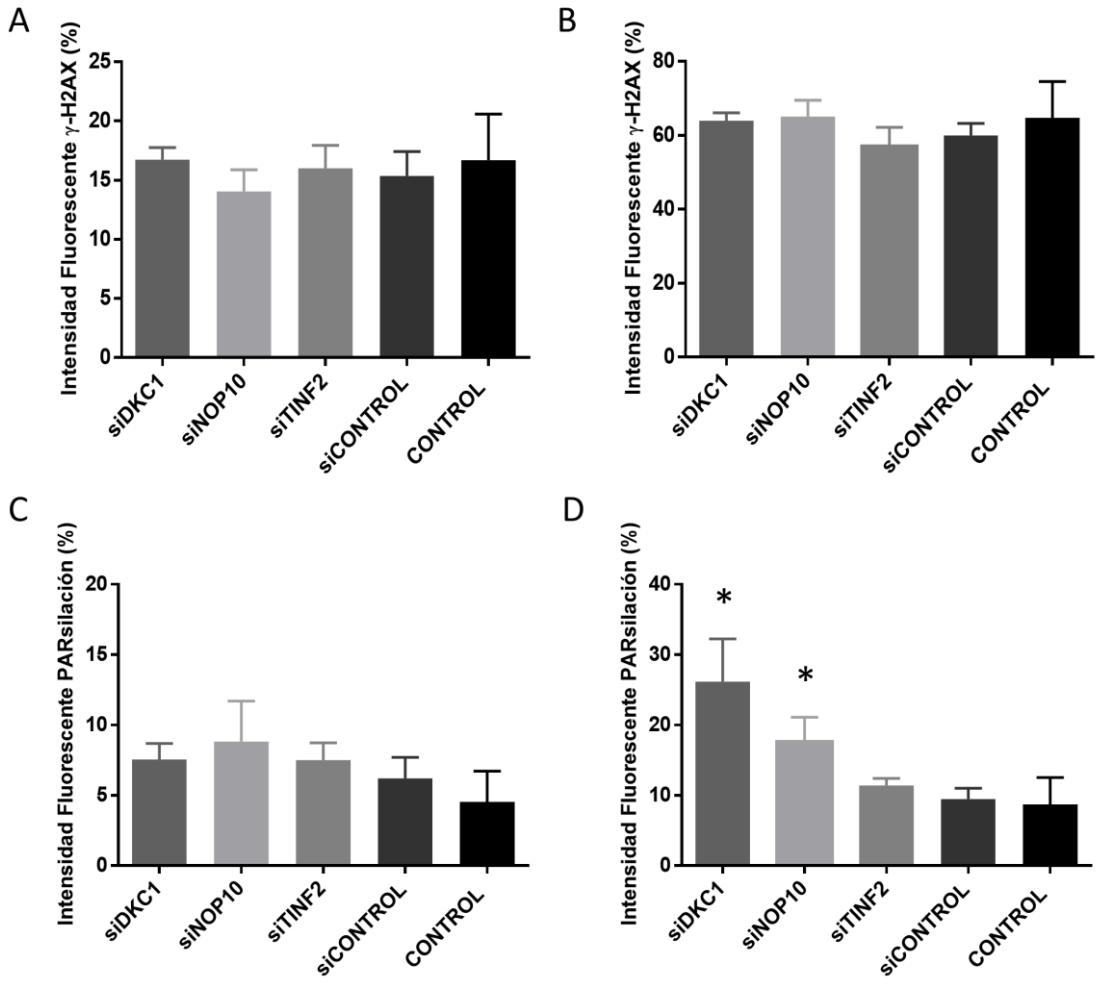


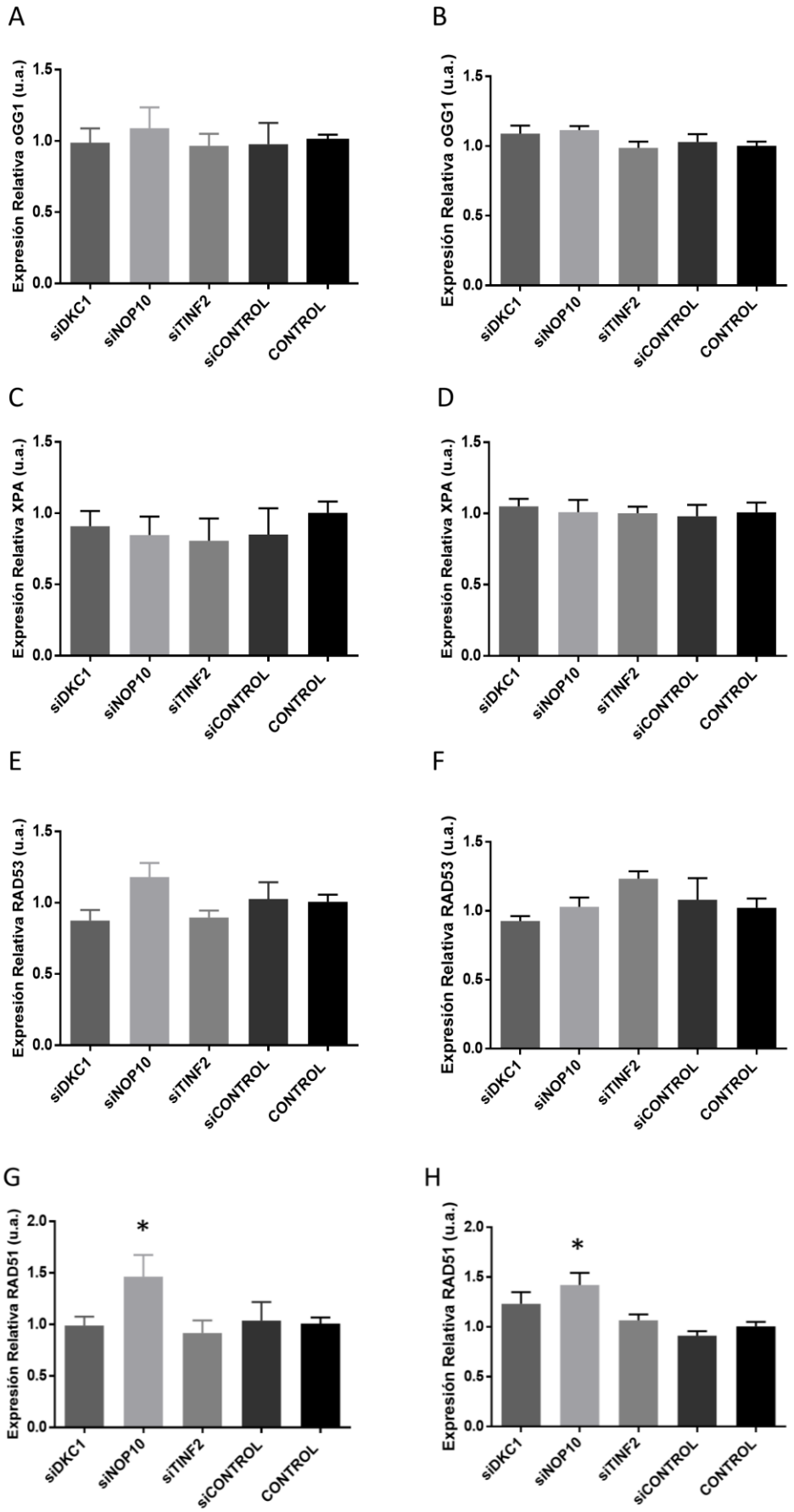
Figura 29. *Análisis de los principales parámetros de daño al ADN en células HeLa silenciadas. A) Niveles basales de γ-H2A.X medidos por citometría de flujo. B) Niveles de γ-H2A.X en los diferentes modelos tras la inducción de daño al ADN con H2O2 por citometría de flujo. C) Niveles basales de PARsilación medidos por citometría de flujo. D) Niveles de PARsilación en los diferentes modelos tras la inducción de daño al ADN con etopósido por citometría de flujo. En todos los casos se realizaron tres experimentos independientes por grupo. Todos los resultados se muestran como intensidad de fluorescencia. Todas las barras de todos los experimentos representan la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes. El asterisco representa la diferencia con significación estadística al comparar los grupos respeto al siCONTROL para un nivel de confianza de un 95% (*p*<0.05*).*

5.9. LA RESPUESTA AL DAÑO DEL ADN SE VE AFECTADA EN LOS MODELOS CELULARES

Dado el aumento en los niveles de PARsilación en los modelos celulares siDKC1 y siNOP10, se decidió analizar la expresión génica las principales enzimas de reparación al ADN en condiciones basales y tras un estímulo con 200 μM de etopósido. Se escogió al menos un gen que representará a cada una de las principales vías de reparación del ADN: REB (*oGG1*), REN (*XPA*) RH (*RAD53*, *RAD51*) y NHEJ (*WRN y PARP1)*.

No se observaron cambios en la expresión de los genes *oGG1* (Figura 30.A-B), *XPA* (Figura 30.C-D), RAD53 (Figura 30.E-F) y *WRN* (Figura 30.I-J), en los niveles basales ni en condiciones con estimulo con etopósido.

La expresión de RAD51, mostró un aumento en condiciones basales al silenciar NOP10, pero no fue así en las demás líneas silenciadas siDKC1 y siTINF2 respecto al grupo siCONTROL (Figura 30.G). En condiciones de estímulo también se observó un aumento de la expresión de RAD51 para el grupo siNOP10 (Figura 30.H), resultados que correlación con los obtenidos en las condiciones basales. Estos resultados pueden sugerir que la recombinación homóloga estaría afectada. Los resultados de la expresión génica de *PARP1* en condiciones basales no mostraron diferencias (Figura 30.K). Por el contrario, los resultados obtenidos aplicando un tratamiento con etopósido, sí demostró un aumento en la expresión génica en las líneas celulares siDKC1 y siNOP10, no observando diferencias significativas en siTINF2 cuando se comparó la expresión frente a las líneas siCONTROL (Figura 30.J). Estos resultados correlacionan muy bien con los obtenidos para la PARsilación donde también se observó un aumento en condiciones de estímulo para los mismos modelos celulares (Figura 29.D).


A
Expresión Relativa oGG1 (u.a.)
1.5
1.0
0.5
0.0
siDKC1
siNOP10
siTINF2
siCONTROL
CONTROL
B
Expresión Relativa oGG1 (u.a.)
1.5
1.0
0.5
0.0
siDKC1
siNOP10
siTINF2
siCONTROL
CONTROL
C
Expresión Relativa XPA (u.a.)
1.5
1.0
0.5
0.0
siDKC1
siNOP10
siTINF2
siCONTROL
CONTROL
D
Expresión Relativa XPA (u.a.)
1.5
1.0
0.5
0.0
siDKC1
siNOP10
siTINF2
siCONTROL
CONTROL
E
Expresión Relativa RAD53 (u.a.)
1.5
1.0
0.5
0.0
siDKC1
siNOP10
siTINF2
siCONTROL
CONTROL
F
Expresión Relativa RAD53 (u.a.)
1.5
1.0
0.5
0.0
siDKC1
siNOP10
siTINF2
siCONTROL
CONTROL
G
Expresión Relativa RAD51 (u.a.)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
siDKC1
siNOP10
siTINF2
siCONTROL
CONTROL
H
Expresión Relativa RAD51 (u.a.)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
siDKC1
siNOP10
siTINF2
siCONTROL
CONTROL

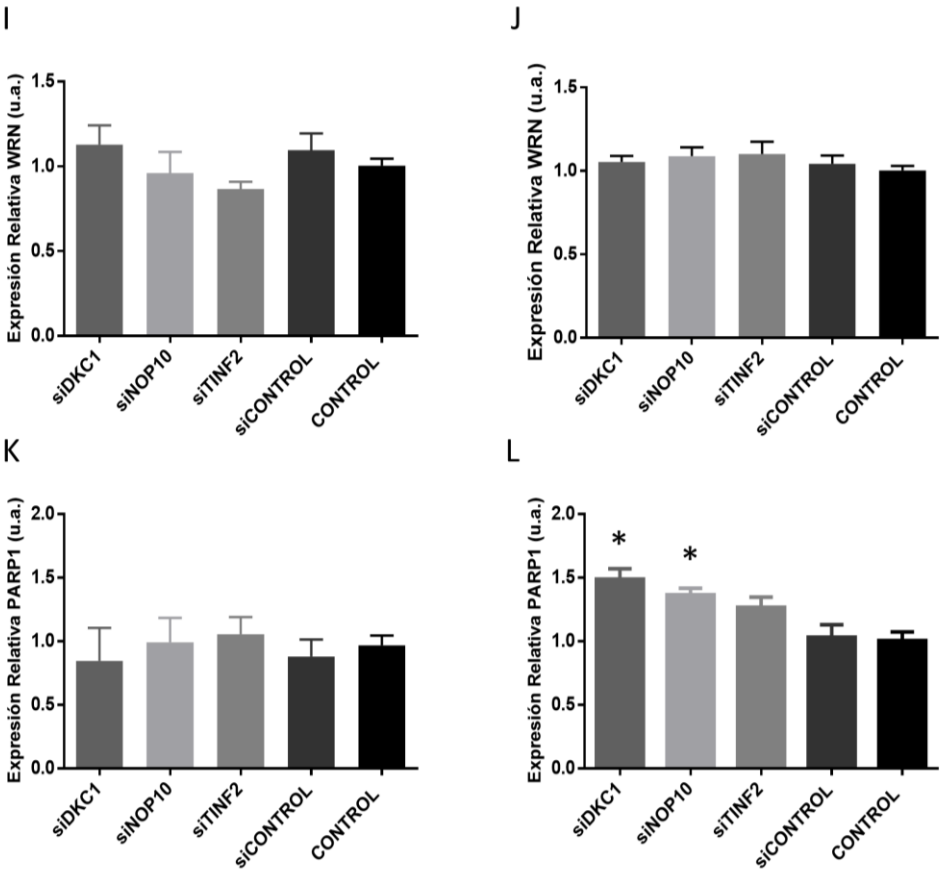


Figura 30. *Análisis de las principales enzimas de reparación de daño al AND en células HeLa silenciadas. A) Niveles basales de ARNm de oGG1 evaluados por RT-qPCR. B) Niveles de ARNm de oGG1 tras inducción de daño con etopósido evaluados por RT-qPCR. C) Niveles basales de ARNm de XPA evaluados por RT-qPCR. D) Niveles de ARNm de XPA tras inducción de daño con etopósido evaluados por RT-qPCR. E) Niveles basales de ARNm de RAD53 evaluados por RT-qPCR. F) Niveles de ARNm de RAD53 tras inducción de daño con etopósido evaluados por RT-qPCR. G) Niveles basales de ARNm de RAD51 evaluados por RT-qPCR. H) Niveles de ARNm de RAD51 tras inducción de daño con etopósido evaluados por RT-qPCR. I) Niveles basales de ARNm de WRN evaluados por RT-qPCR. J) Niveles de ARNm de WRN tras inducción de daño con etopósido evaluados por RT-qPCR. K) Niveles basales de ARNm de PARP1 evaluados por RT-qPCR. L) Niveles de ARNm de PARP1 tras inducción de daño con etopósido evaluados por RT-qPCR.La expresión de todos se comparó con la del gen normalizador GAPDH. Los resultados se muestran en unidades arbitrarias (u.a.). Todas las barras de todos los experimentos representan la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes. El asterisco representa la diferencia con significación estadística al comparar los grupos respeto al siCONTROL para un nivel de confianza de un 95% (*$p<0.05$).*

6. DISCUSIÓN

6.1. ANTECEDENTES EN LAS TELOMEROPATÍAS

Hoy en día es indudable que las mutaciones en varios genes implicados en la biología del telómero o en el procesamiento ribosómico subyacen en el genotipo de muchas telomeropatías, incluida la DC, determinando sus características clínicas [16, 111]. Sin embargo, también se ha considerado que la implicación de estos genes en otros procesos celulares pudiera contribuir a la etiopatogenia de patologías; incluidas las telomeropatías, a través de mecanismos no del todo comprendidos hasta hoy [11, 112]. Así, por ejemplo, se suman estudios que consideran el daño al ADN y el estrés oxidativo mecanismos estrechamente relacionados con la pérdida de homeostasis de los telómeros, y que la sensibilidad telomérica al estrés oxidativo [113] se correlaciona con las manifestaciones patológicas de muchos de estos síndromes [114, 115].

El papel del estrés oxidativo en DC, ha sido motivo de particular atención por parte de varios autores, que refieren una asociación entre las mutaciones génicas, el aumento en los niveles de EROs y la disminución de la expresión de las enzimas antioxidantes en las células de pacientes con la enfermedad [31, 53, 116]. Los resultados obtenidos por Pereboeva *et. al.* permitieron proponer un modelo en que el acortamiento de los telómeros incrementa la susceptibilidad al daño en el ADN, y la consecuente aparición del estrés oxidativo; lo que a su vez produce mayor daño al ADN, y repercute en un ambiente celular más oxidado [31, 66] al generar un círculo vicioso. Otros estudios apoyan que las alteraciones en las vías oxidativas afectan a la biología telomérica generando, al igual que en el caso anterior, un ciclo de retroalimentación positiva que mantiene elevados los niveles EROs y favorece la entrada en senescencia [66]. En concordancia con estos hallazgos, nuestro grupo demostró previamente que el entorno redox, en concreto los niveles de GSH celular, modulan la actividad telomerasa *in vitro* [117].

No obstante, se ha asumido generalmente que el desequilibrio redox, detectado en pacientes con DC, es una consecuencia del acortamiento telomérico y la disminución de

la actividad telomerasa [41, 54, 118]. Aunque debemos tener en cuenta que cuando la expresión de los genes de DC se interrumpe de forma aguda también se pueden afectar otros procesos [116, 119, 120], no fácilmente detectables en estudios con células de pacientes, como la síntesis y correcto funcionamiento de las ribonucleoproteínas nucleolares [121, 122]. Los fibroblastos de pacientes con DC pueden desarrollar mecanismos compensatorios a estos eventos tempranos y más dinámicos, lo cual no sucede una vez que los telómeros se acortan después de un número definido de duplicaciones celulares. Carrillo *et al.* demostraron que en modelos de silenciamiento agudo de DKC1 o NOP10 se afecta la biogénesis ribosomal, y este deterioro en la síntesis de proteínas es la que induce la activación de la vía de señalización de p53, mientras que en los fibroblastos de pacientes la síntesis de proteínas se mantiene a niveles compatibles con el crecimiento celular, y es la inhibición de la telomerasa, el acortamiento telomérico y el daño al ADN, los que activan p53 y la senescencia celular [114, 116]. El fallo en la biogénesis de los ribosomas y la desregulación de p53 observado en el modelo de pez cebra, con mutaciones en NOP10, confirman la versatilidad funcional de este gen y que otros mecanismos pueden contribuir al fenotipo de DC antes de que se produzcan cambios en la actividad telomerasa y acortamiento de los telómeros [123]. A favor de esta hipótesis, se ha observado que la Drosophila careciendo de la telomerasa canónica, necesita de la disquerina para su viabilidad, y desarrollo [124-127]. Así mismo, se ha publicado el papel de la disquerina en la remodelación del citoesqueleto y la desregulación del tráfico vesicular Rab5-Rab11, lo que revela mecanismos adicionales e inesperados por los cuales esta proteína puede afectar la homeostasis celular [120].

Con estos precedentes cabe cuestionarse si la mutación en los genes identificados en DC, pudieran tener implicaciones funcionales a nivel de estrés oxidativo que no han sido detectadas en los estudios con fibroblastos de pacientes. Si sumamos que la tecnología del silenciamiento de genes por ARNi es una herramienta útil en la identificación de funciones génicas [128], estamos en el escenario que nos permitió plantearnos la hipótesis de que los genes *DKC1*, *NOP10* y *TINF2,* implicados en varios patrones de herencia de DC pueden producir una desregulación a nivel transcripcional y del equilibrio redox, independiente del acortamiento telomérico. La tecnología de ARNi es

un enfoque que nos permitiría analizar en detalle la cascada de eventos que ocurren dentro de un marco de tiempo corto (1-3 duplicaciones de células), inmediatamente después de la caída de las proteínas, y en gran medida previa al tiempo necesario para el acortamiento de los telómeros.

6.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS MODELOS CELULARES DE DC

Nuestros resultados corroboraron que 48 horas después de la transfección con ARNi, no hubo diferencias en la longitud de los telómeros en ninguno de los modelos celulares siDKC1, siNOP10 y siTINF2, a pesar de que la expresión génica se redujo en un 90% y la proteica en un 40% (Figura 18). Con estos resultados, se descartó que la posibilidad de que el acortamiento pueda ser el evento que subyace en los cambios detectados en nuestro trabajo. Ni la viabilidad celular ni el ciclo celular se vieron afectados por el silenciamiento, resultados que están de acuerdo con estudios previos de silenciamiento de DKC1, que tampoco detectaron cambios en la proliferación celular a las 48h después de la primera transfección [114].

Sin embargo y como era de esperar, los modelos celulares siDKC1 y siNOP10 mostraron bajos niveles génicos de *TERC* y disminución de la actividad telomerasa. El gen *TERC* tiene en su extremo 3’ un dominio H/ACA, secuencia similar al de los ARN nucleolares que se procesan en las cajas H/ACA (Figura 31), que le permite reclutar a las H/ACA ribonucleoproteínas, siendo un dominio esencial para la acumulación de TERC, el procesamiento de su extremo 3' y la actividad de la telomerasa. Tanto DKC1 como NOP10 son ribonucleoproteínas del complejo telomerasa con cajas H/ACA, de cuya interacción se deriva la mayor parte de su influencia sobre la célula [67, 119]. Cualquier disfunción en ellas, como la disminución de su expresión por silenciamiento, puede reducir la estabilidad de TERC afectando el tráfico, la biogénesis [14, 111, 129-131] y la actividad de la telomerasa [67, 131].

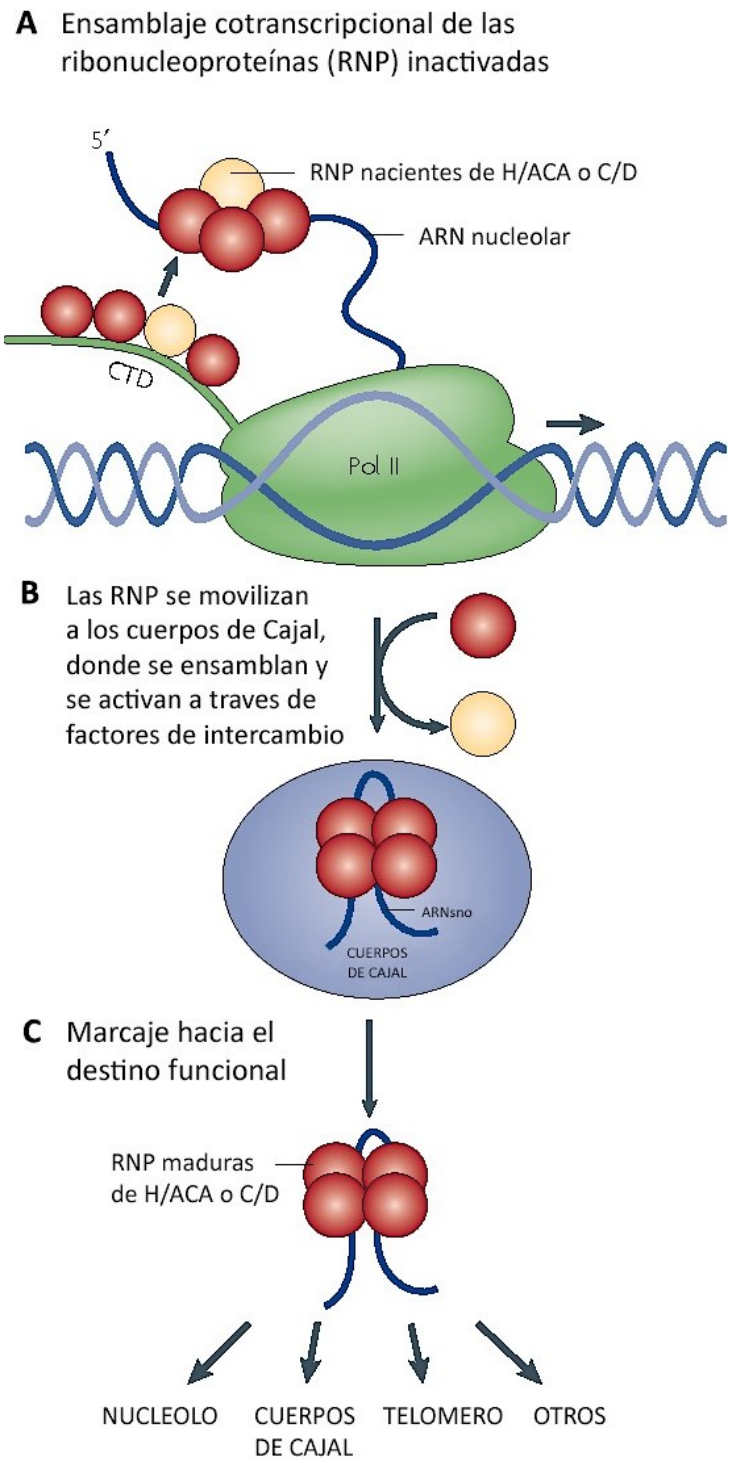


Figura 31. *Síntesis, ensamblaje y tráfico de los RNP H/ACA. A) Ensamblaje de los pre-RNP inactivos (biogénesis temprana). Un subconjunto de las proteínas RNP centrales (rojo) y un factor de intercambio (amarillo) se asocian con el dominio C-terminal (CTD) de la ARN polimerasa II (Pol II) en el sitio de transcripción del ARN guía y se ensamblan en el ARN naciente, formando un pre-RNP metabólicamente estable, pero inactivo. B) Maduración de los RNP para que sean funcionales (biogénesis tardía y activación funcional). El pre-RNP se traslada a los cuerpos de Cajal donde ocurren los pasos finales en la formación de complejos funcionales, incluidas las modificaciones de ARN y el reemplazo del factor de intercambio por la falta de una proteína central. C) Las RNP maduras se trasladan a los sitios donde funcionan (localización), por ejemplo: nucléolos, cuerpos de Cajal o telómeros (Modificado de A. Gregory Matera, Rebecca M. Terns, Michael P. Terns. Non-coding RNAs: Lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007).*

La no detección de cambios a nivel de expresión de *TERC* o actividad telomerasa observada en el modelo siTINF2 es concordante con trabajos previos que refieren que la pérdida de la proteína no tiene efecto sobre los niveles de expresión génica de *TERC* [9, 66, 132], sobre la actividad telomerasa*,* ni sobre la proliferación celular [133]. La proteína TIN2 ha sido reconocida como un componente central del complejo telosoma con acciones sobre el reclutamiento de la telomerasa más que sobre su actividad *per se* [92, 133]. También es un modulador de PARP en el complejo TRF1 que regula la longitud de los telómeros, pero no tiene efecto sobre TERC, un factor reconocido como limitante para la actividad telomerasa y el mantenimiento de los telómeros [134].

6.3. TRANSCRIPTÓMICA DE LOS MODELOS CELULARES

Para completar la caracterización de los modelos celulares de siDKC1, siNOP10 y siTINF2 se realizaron matrices de expresión. En los resultados obtenidos en las matrices de expresión génica observamos un aumento de la expresión del gen *YES1* para las tres líneas silenciadas, se trata de un gen que está involucrado en la regulación del ciclo celular y la apoptosis [135]. Además, también se observó un aumento de la expresión del gen *TGFBR1 en* siNOP10 y siTINF2, cuya función es regular la proliferación celular y la apoptosis [136]. En nuestro caso no se encontró una afectación del ciclo celular ni de la viabilidad celular en los resultados. Estudios como el de Lin *et. al.* observaron un efecto como el nuestro, donde se obtuvo un aumento en la expresión para los genes senescentes a las 72h de la transfección en células silenciadas para DKC1. Esto sugirió que la perdida de Disquerina desencadena una firma molecular pro-senescente [114, 137]. En nuestro caso, el aumento en la expresión de estos genes podría indicar que se produciría una detención del ciclo celular y un aumento en la apoptosis de las líneas celulares a tiempos mayores.

En el análisis de matrices de expresión para siTINF2 (Tabla 14), se observó que la ruta de la biosíntesis de pantotenato y coenzima A (CoA) se encuentra alterada. Con un aumento de la expresión de la pantotenato quinasa 3 (PANK3) y una disminución de la fosfopantotenoilcisteína sintetasa (PPCS) (Tabla Suplementaria 3). La función de la

enzima PANK3 es controlar los niveles de CoA [138], y PPCS también es una enzima clave en la biosíntesis del CoA que utiliza ATP y cisteína para convertir fosfopantotenato a fosfopantotenoilcisteina [139], por lo que el aumento de PANK3 y la disminución de PPCS se asocia con disminución de la síntesis de CoA. Se ha observado que la glicólisis regula la biosíntesis de CoA [140], así que estos resultados confirman que el silenciamiento de TINF2 podría disminuir la glicólisis y la biosíntesis de CoA. También se observó una reducción en la expresión del gen GNPDA1, cuyo producto es la única enzima que une los sistemas de hexosamina con las vías glicolíticas [141], siendo responsable de catalizar la conversión de la glucosamina-6-fosfato a fructosa-6-fosfato. El gen GFPT1 también tuvo una expresión reducida, la función de esta enzima es controlar el flujo de glucosa en la ruta de la hexosamina, lo que apoya la idea que la glicólisis está detenida cuando TINF2 esta silenciada. Se ha observado tanto en fibroblastos de ratón como en líneas celulares de carcinoma humano que la reducción de la glicólisis produce un descenso de la expresión de la GNPDA1 mediada por K-Ras [142]. Además, la Trx2 es una proteína que regula indirectamente la ATP sintasa de la cadena respiratoria mitocondrial, necesaria en los últimos pasos de la glicólisis [143, 144]. En nuestros resultados, se observó un descenso en la expresión de la Trx2 en el modelo de siTINF2. Esta descrito que TIN2 también tiene efectos a nivel metabólico en la glicólisis, por lo que su silenciamiento modula negativamente la vía glicolítica disminuyendo varios metabolitos de la vía (3-fosfoglicerato y fructosa-1,6-bifosfato) esenciales para la biosíntesis [30]. Nuestros resultados indican que la glicólisis podría encontrarse alterada cuando TINF2 está silenciado (Figura 32).

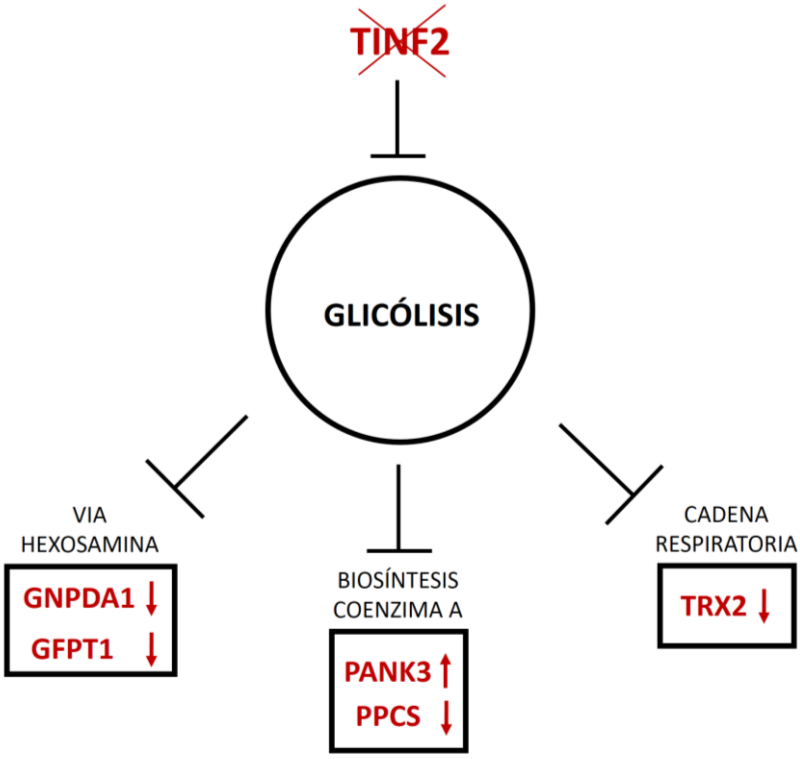


Figura 32. *La depleción de TIN2 produce una desregulación de la glicólisis provocando que diversas rutas como la vía de la hexosamina, biosíntesis de coenzima A y la cadena respiratoria se vean alteradas. Se puede observar como la expresión de los genes que participan en ellas se encuentran alterados.*

6.4. LA PSEUDOURIDILACIÓN SE ENCUENTRA AFECTADA

En el estudio de las matrices de expresión también se observó que en los modelos de siDKC1 y siNOP10 se encontraban alteradas las ribonucleoproteínas (RNPsn) que forman parte del proceso de pseudouridilación (Tabla 15). Las proteínas Disquerina y NOP10 son necesarias para la síntesis del ARNr, además de madurar los ARNt y ARNsn por medio de la pseudouridilación, que se considera la modificación más común y evolutivamente conservada de los nucleótidos de ARN en células eucariotas [67, 119]. Aunque la función de los residuos modificados en esos ARN no se comprende por completo, las pseudouridinas parecen ser importantes para la estabilidad y función del ARNr y para el ensamblaje y la función de las RNPsn [20]. Estudios previos con células transfectadas con ARNi específico de DKC1 demostraron disminución de la relación ARNr ψ/C (siendo ψ un isómero C-glucosídico de uridina y C-citosina) para el ARN 18S y, en menor medida

para el ARN 28S, y con ello que la reducción de la pseudouridilación del ARNr [145]. Así mismo, fue descrito que en el pez cebra mutante con disminución de la expresión de nop10 se producían defectos en el procesamiento del ARNr 18S y el colapso de la subunidad ribosómica pequeña. Sin embargo, su papel en el mantenimiento de los telómeros parece contribuir a la fisiopatología de la DC en estadios más tardíos de la vida del pez cebra [123]. Además, es de resaltar el efecto de las depleciones de DKC1 y NOP10 sobre los niveles de expresión de otros H/ACA RNPsn, y como afectan las funciones de otras proteínas [10, 20, 21, 114, 146], como hemos podido observar en los resultados de las matrices de expresión analizadas en esta tesis. Podría ser razonable, a la luz de nuestros resultados en relación a la disminución de la pseudouridilación, pensar que muchos de los efectos detectados en las modelos de siDKC1 y siNOP10, estuvieran mediados por la desregulación de los ARN H/ACA derivada de la pérdida de las funciones extra-teloméricas de DKC1 y NOP10.

6.5. ESTRÉS OXIDATIVO

Por otro lado, el estrés oxidativo debe ser unos de los efectos pleiotrópicos derivados del silenciamiento de los genes en estudio. Tal es el caso del aumento de la PRDX6-SO_3H, indicativo de un aumento del estrés oxidativo [147-149], observado en los modelos celulares de siDKC1 y siNOP10. Este aumento de la oxidación de la PRDX6 correlaciona con la disminución en la expresión génica del gen *SESN3*, que codifica para la Sestrina3, una enzima que cataliza la reducción de la PRDX6-SO_3H a PRDX6 para reestablecer su función catalítica [150]. También está implicada en la detoxificación de ROS a través del eje AKT/FOXO (FOXO1/FOXO3a) [151, 152], además de tener una contribución especial en el envejecimiento (Figura 33) [153]. Nuestros resultados están de acuerdo con el trabajo de Budanov *et. al.* que observaron que una baja expresión de las sestrinas, en nuestro caso la sestrina 3, produce un incremento del estrés oxidativo debido a que las peroxirredoxinas no se pueden reducir de nuevo y se quedan en su forma oxidada [152].

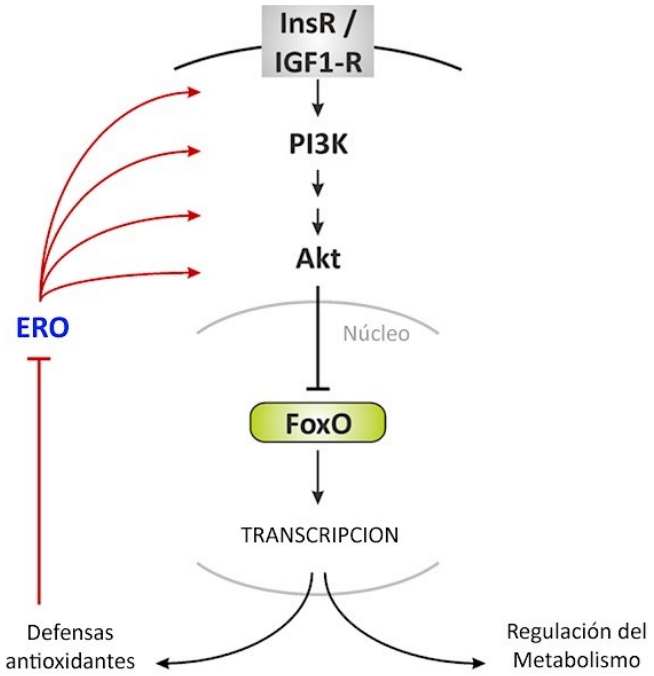


Figura 33. *Los FoxO estimulan la transcripción de genes que codifican proteínas antioxidantes ubicadas en diferentes compartimentos subcelulares, como las mitocondrias y peroxisomas, así como proteínas antioxidantes que se encuentran extracelularmente en el plasma. Por otro lado, las ROS, así como otros estímulos estresantes que provocan la formación de ROS, pueden modular la actividad de FoxO en múltiples niveles, incluyendo modificaciones postraduccionales de FoxO (como fosforilación y acetilación), interacción con correguladores, alteraciones en la localización subcelular de FoxO, síntesis y estabilidad de proteínas. Además, el control transcripcional y postranscripcional de la expresión de genes que codifican FoxOs es sensible a ROS (Modificado de Klotz, L.O. et. al. Redox regulation of FoxO transcription factors. Redox Biology, 2015).*

En los modelos silenciados siDKC1 y siNOP10 también observamos un aumento en los niveles de las proteínas carboniladas. Esta modificación post-traduccional oxidativa es un tipo de oxidación que tiene como resultado la formación de cetonas o aldehídos reactivos [56, 154] que alteran la actividad normal de las proteínas oxidadas como consecuencia de un cambio conformacional o funcional. Además, el incremento en el cociente GSSG/GSH como consecuencia de un aumento de los niveles de glutatión oxidado, también corroboró la presencia de estrés oxidativo en los modelos celulares de siDCK1 y siNOP10. Los resultados obtenidos para siDKC1, concuerdan con los obtenidos previamente por nuestro grupo en colaboración con el grupo de la Dra. Rosario Perona donde observamos un aumento del cociente GSSG/GSH en células de pacientes con DC ligada al cromosoma X [53]. Sin embargo, para siTINF2 no se observaron cambios en el estado redox celular, resultados que coinciden con la ausencia de estrés oxidativo referida en estudios previos de silenciamiento agudo de este gen (Figura 25) [27].

Para completar el análisis del estado redox celular evaluamos la expresión de las principales enzimas antioxidantes. El aumento de la expresión génica de SOD2 y TRX1 y de los niveles de las proteínas MnSOD y Trx1 tras el silenciamiento *NOP10*, nos indica un estrés oxidativo; estos genes son inducibles y se sobreexpresan en respuesta al estrés oxidativo. Interpretamos estos hallazgos como una respuesta antioxidante inmediata, porque en células de pacientes con DC ligada al cromosoma X, y en condiciones de estrés oxidativo crónico, las enzimas antioxidantes cambian y tienen niveles de expresión bajos [53, 54]. Esto apoyaría el enunciado de que la respuesta antioxidante depende de la cronicidad de la enfermedad y de los efectos pleiotrópicos producidos por el estrés oxidativo crónico [155]. En condiciones de estrés oxidativo leve o agudo, las células activan Nrf2 y genes antioxidantes aguas abajo (es decir, catalasa, MnSOD, etc.), sin embargo, el estrés oxidativo crónico que se produce en células de pacientes altera muchas señales y mecanismos celulares, como son la defensa antioxidante, la DDR, la senescencia y la apoptosis. Nuestros resultados son congruentes con lo anteriormente descrito, incluso para el modelo siTINF2, donde no observamos ningún cambio en marcas de estrés oxidativo ni en respuesta antioxidante: El estado pro-oxidante en células de pacientes con mutaciones en *TINF2* se ha asociado con la respuesta al daño al ADN resultante de la deficiencia de telomerasa y el acortamiento de los telómeros, lo que suele suceder a mayor número de duplicaciones celulares o en estadios más tardíos [66]. Otros estudios han observado nuevos papeles funcionales de TIN2 (funciones extrateloméricas), que abarca la modulación de la morfología y función mitocondrial. Sullivan *et al.*, describieron que TIN2 puede estar en la mitocondria, donde disminuye la producción de ATP y el consumo de O_2 mientras aumenta la producción de ROS para activar el factor de transcripción HIF-1 (Figura 34) [30]. Estos resultados apoyan el papel mitocondrial de TIN2 en la modulación de la fosforilación oxidativa mitocondrial. Con este principio, Chen *et. al.* transfectaron diferentes células con diferentes secuencias de ARNi, en las que se logró inhibición significativa de TIN2 (> 70%), observando un incremento del ATP total y mayor consumo basal de oxígeno, así como una inhibición de la glicólisis (como se ha observado previamente en los resultados y la discusión) y una menor cantidad de ROS [27].

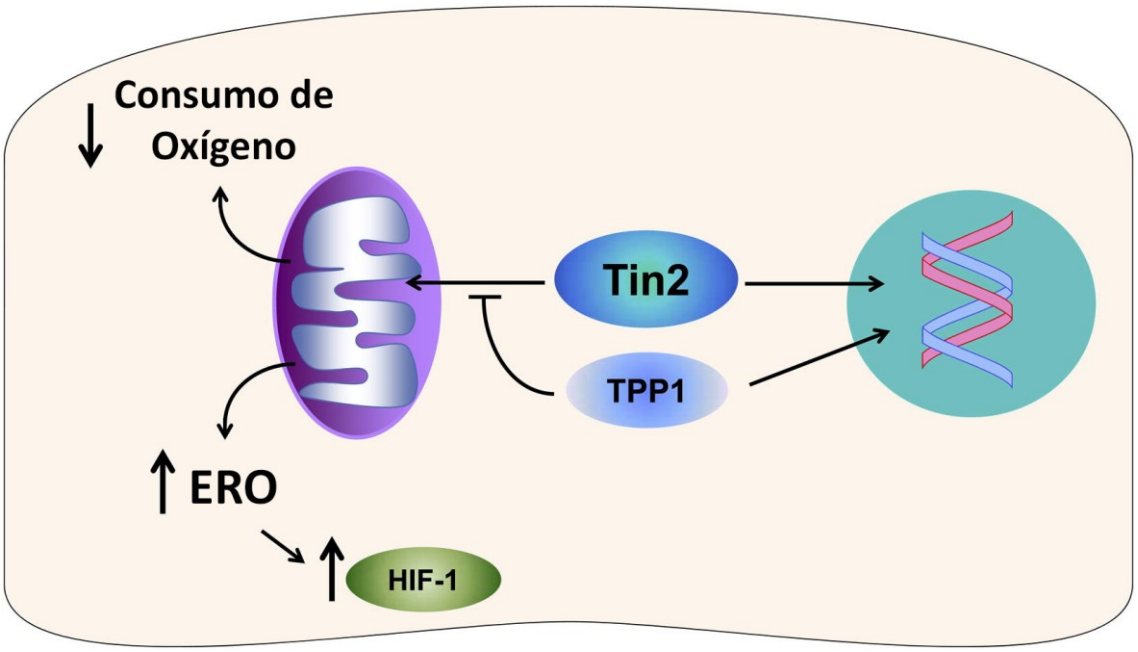


Figura 34. Funciones mitocondriales y nucleares de TIN2. La proteína Tin2 forma parte del complejo telosoma, que se une a los telómeros y contribuye a su mantenimiento. TIN2 también puede localizarse en las mitocondrias, donde disminuye la producción de ATP y el consumo de O2 al tiempo que aumenta la producción de ROS para activar el factor de transcripción HIF-1. La translocación de Tin2 a las mitocondrias se inhibe por la unión de otra proteína telosoma/shelterina, TPP1 (Modificado de Sullivan et. al. Mitochondria and Telomeres: The Promiscuous Roles of TIN2. Molecular Cell 2012).

Sabemos que el estrés oxidativo celular y la pérdida del homeostasis redox celular se produce por un desequilibrio entre las especies reactivas (tanto producidas por el propio metabolismo celular como por fuentes exógenas) y los sistemas de detoxificación de estas especies [156]. Si bien es cierto que el estrés oxidativo es un hecho en células de pacientes de DC y en modelos celulares [53, 66], no está completamente claro cuál es el origen de este estrés oxidativo. Por lo tanto, una explicación al aumento de los parámetros relacionados con el estrés oxidativo (aumento de PRDX6-SO_3H, proteínas carboniladas y ratio GSSG/GSH) en las primeras 48h tras el silenciamiento de siDKC1 y siNOP10 serían una consecuencia de la desregulación transcripcional de las enzimas antioxidantes, que solo parece ocurrir cuando se han silenciado los componentes proteicos del complejo telomerasa.

Una posible ruta con un papel clave en la alteración de la homeostasis redox celular en los modelos de DC sería la ruta de p53. De hecho, p53 también desempeña un papel en la respuesta antioxidante, que se descubrió a través de la identificación de una nueva

familia de genes Sestrin (SESN) [152], que participa en la regulación de los ERO a través de la regulación de la degradación de Keap1 y Nrf2, que a su vez son genes clave en la modulación de la respuesta antioxidante [157]. Por otro lado, los resultados obtenidos en la validación de la ruta de p53 muestran un aumento en la expresión génica de *ZMAT3* en el modelo de siNOP10 que correlacionan con un aumento en la expresión génica de p53, ya que ZMAT3 es un regulador positivo de p53 y lo hace a través de la unión directa de los elementos ricos en AU (ARE) en la región 3'-UTR del ARNm de p53 [158]. Además, del aumento en la expresión génica de p53, también se observó un aumento de la fosforilación del residuo Serina 15 en la proteína p53. Es conocido que p53 es la proteína clave a través de la cual se desarrollan una serie de desregulaciones que producen el incremento del estrés oxidativo [159]. Estudios como el de Carrillo *et. al.* en modelos de silenciamiento agudo de DKC1 o Nop10 observaron que se producía una activación de la vía de señalización de p53 a consecuencia de la afectación de la biogénesis ribosomal que producía un deterioro en la síntesis de proteínas [116]. Además, esta activación no solo se producía en modelos agudos, también se producían con células de pacientes; Westin et. al. señalaron que la activación de la respuesta al daño del ADN (DDR) como consecuencia de la detección de la estabilidad telomérica desencadenaría una respuesta a través de p53 y su mediador, p21 (WAF/CIP), que produciría un aumento del superóxido y del GSSG, ambos indicadores de estrés oxidativo [137].

De forma preliminar en el laboratorio se han iniciado experimentos para dar continuidad al trabajo de esta tesis en su objetivo de dilucidar los mecanismos que se alteran como consecuencia del silenciamiento de DKC1, NOP10 y TINf2. Entre estos mecanismos está la compresión de la función del nucléolo en los modelos celulares de telomeropatías y concretamente en aquellos modelos en que DKC1 y NOP10, a través de sus funciones extra-teloméricas podrían participar en la regulación de la función de la maquinaria nucleolar. Esta idea se deriva del hecho de que el nucléolo se ha descrito como un sensor de estrés de la célula [160].

Para ello, en nuestro grupo, fuera del ámbito de esta Tesis Doctoral, se ha estudio la nucleofosmina, NPM1, una fosfoproteína muy abundante dentro del nucléolo, que

presenta actividad ARNasa y que participa en diferentes pasos de la síntesis de las subunidades ribosomales como el factor de ensamblaje ribosomal, a la vez que es un regulador transcripcional y chaperona de las histonas que ayudan a mantener la estabilidad del genoma participando en la reparación de la rotura del ADN de doble cadena [161]. La proteína NPM1 destaca por su función como un regulador clave en el control nucleolar de la homeostasis celular y como sensor de estrés celular [161, 162].

En condiciones normales, la NPM1 se distribuye de forma homogénea por el nucléolo, donde interactúa con el extremo N-terminal de ARF lo que bloquea su paso al nucleoplasma y su asociación con MDM2; una E3 ubiquitin-ligasa que actúa como un regulador negativo de p53 por medio de su ubiquitinación y posterior degradación por el proteasoma [161]. Sin embargo, cuando se altera la función nucleolar se produce una acumulación de p53. El mecanismo que une la disrupción de la homeostasis nucleolar con la activación de p53 está regulado por el mecanismo de degradación de MDM2 descrito anteriormente [161]. Además, en estas condiciones de estrés, NPMI y varios factores de ensamblaje ribosomal y proteínas ribosomales que se encuentran en el núcleo (RpL5 y RpL1) se liberan al nucleoplasma y bloquean la acción de MDM2, y con ello evitan la degradación de p53. A esta regulación, se suma la proteína Arf (proteína de pauta de lectura alternativa) que en condiciones de estrés también bloquearía a MDM2 permitiendo que p53 aumentara su expresión [161, 163].

En los modelos siDKC1 y siNOP10 apreciamos descenso en la fluorescencia de NPM1 en el nucleolo, translocación de NPM1 al nucleoplasma y co-localización de la proteína con GSTP en el núcleo, lo que junto a los niveles bajos de expresión de las subunidades ribosomales 45s y 18s sustenta que el silenciamiento de los genes DKC1 y NOP10 producen un estrés nucleolar por estrés oxidativo además de por fallos en la biogénesis ribosomal, tanto a nivel de síntesis del pre-ARNr como al procesamiento de las subunidades ribosomales.

Por otro lado, el estudio de la co-localización de NPM1 y GSTP en las diferentes poblaciones silenciadas reveló que en siDKC1 y en siNOP10 ambas proteínas están

presentes en el nucleolo mientras que en siCONTROL y en siTINF2 co-localizaban perinucleolarmente. Este resultado concuerda con el trabajo de Yang et al., que propuso a la S-glutationilación de NPM1 como un mecanismo implicado en la translocación de NPM1 durante la oxidación nucleolar. Esta experiencia nos permite confirmar que el silenciamiento de DKC1 y NOP10 produce un estrés que favorece la interacción de NPM1 con GSTP, que conduce a la translocación de la proteína nucleolar y a la activación de p53 [160]. En contraste la disminución aguda de los niveles de TIN2 no produce un estrés oxidativo detectable por parámetros nucleolares.

Este conjunto de hallazgos sugiere que sería interesante estudiar la función MDM2 y Arf para corroborar el estrés a nivel de nucleolo y que el aumento de p53 observado en nuestro modelo, también podría ser debido al bloqueo de MDM2 [161, 164]. Además, se ha descrito que el estrés nucleolar puede afectar a la regulación de los ARN nucleolares [165] y nuestros resultados con matrices de expresión así lo demuestran (Tabla 15) en los modelos de siDKC1 y siNOP10. Esta desregulación viene dada por la depleción de los genes principales de las cajas H/ACA, pero también podría contribuir la desregulación de la homeostasis nucleolar.

Por otro lado, algunas proteínas estudiadas en esta tesis como son RAD51 (que participa en el proceso de recombinación homóloga) y PARP1 (implicada en el proceso de unión de extremos no homólogos) también se localizan en el nucléolo [166], lo que sugiere que el estrés en la célula, que perturban las funciones normales del nucléolo, tendría profundas consecuencias en el secuestro/liberación de las proteínas de reparación del ADN y en concreto en el ADN ribosómico [167]. Por todo ello, sería interesante profundizar en el estudio y caracterización del estado del nucléolo y su relación con la fisiopatología de la DC, concretamente en aquellas con mutaciones en DKC1 y NOP10, las cuáles han sido consideradas además de telomeropatías como ribosomopatías [167].

6.6. ESTUDIO DEL DAÑO AL ADN

Las mutaciones de los genes en estudio pueden influir en la respuesta al daño al ADN condicionando otro mecanismo subyacente en la fisiopatología de DC, sin embargo no hay un consenso sobre el papel de estas mutaciones en esta respuesta (Kirwan *et al.*, 2011). Gu et al. han informado que las mutaciones patogénicas de Dkc1 en ratones causan una respuesta al daño al ADN aumentada en telómeros de longitud normal y que esta respuesta es a través de la vía ATM/p53 (Gu, Bessler and Mason, 2008) [74, 89]. Por el contrario, los modelos de ratón con mutaciones Terc y Tert han mostrado una respuesta normal [74, 89]. La disminución transitoria de DKC1 mediada por ARNi en células de cáncer colorrectal [168]y en células de osteosarcoma U2OS humano produce una disminución de DDR [114, 169]. Así mismo, el silenciamiento de NOP10 en estas últimas células también limitó la acumulación de daños en el ADN [114]. En el estudio de Kirwan *et al.* con fibroblastos y linfocitos provenientes de pacientes de DC con mutaciones en DKC1, TERT y TERC, demostraron que un aumento en la respuesta al daño global del ADN no es una característica que se reproduzca en todos los tejidos de pacientes con DC, incluso después de la exposición a etopósido [89]; algunos autores han encontrado que la DDR no aumenta [74, 89], mientras que otros refieren niveles elevados de DDR [53], lo que pone de relieve la escasa comprensión de estos mecanismos en DC.

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Lin, et al [114], [31] porque no detectamos ningún cambio en DDR después de la depleción mediada por ARNi de DKC1, NOP10 o TINF2. Este hallazgo apunta a que la desregulación de DDR y el daño en el ADN se incrementan en el tiempo como causa de un aumento del estrés oxidativo generado por las mutaciones DKC1 y NOP10. Por tanto, sería un proceso crónico pero aguado o inicial. Sin embargo, a pesar de encontrar una desregulación de la homeostasis redox en las células de siDKC1 y siNOP10, no detectamos un incremento en la formación de los *focis* de γ-H2A.X, ni siquiera después del tratamiento *in vitro* con H_2O_2 (Figura 29), probablemente porque a las 48 h del cultivo celular es pequeño aún el número de roturas de doble cadena (DSB) en el ADN [53, 89], o porque las roturas monocatenarias

(SSB) se reparan oportunamente por las defensas antioxidantes (catalasa, glutatión peroxidasa, y peroxirredoxina-6) [170] impidiendo la posterior formación de DSB. De hecho, los altos niveles de γH2A.X en las células de pacientes con DC [53, 66] han sugerido que estas células acumulan marcas de daño en el ADN a lo largo del tiempo de forma crónica. La disfuncionalidad de los mecanismos de reparación del ADN y la acumulación del daño con el tiempo en algunos tejidos y tipos celulares serían los que contribuirían al fenotipo clínico de la DC [89] durante la historia natural de la enfermedad.

También evaluamos los efectos de la depleción de los genes DKC1, NOP10 y TINF2 en la activación de la DDR mediante la medición de los niveles de PARsilación. La PARsilación es una modificación post-traduccional proteica fundamental (PTM) que aparece rápidamente en los sitios de daño del ADN y que es catalizada por la poli-(ADP-ribosa) polimerasa (PARP). Esta modificación regula una serie de procesos biológicos que incluyen la reorganización de la cromatina, la respuesta al daño del ADN (DDR), la regulación transcripcional, la apoptosis y la mitosis. PARP1, que funciona como un sensor de daño en el ADN, puede activarse al detectar las lesiones de ADN, formando cadenas de poli(ADP-ribosilo) (PAR), que sirven como plataforma de acoplamiento para los factores de reparación del ADN [68]. PARP1 puede ser activada tanto por SSB como por DSB, además las marcas de PARsilación sirven como andamios para reclutar las maquinarias de reparación BER y NHEJ [171]. A pesar de no encontrar cambios en los niveles de PARsilación en las condiciones basales, sí se detectaron valores altos de PARsilación en las células de siDKC y siNOP10 tratadas con etopósido (Figura 29). Estos resultados confirman que las células silenciadas para DKC1 y NOP10 son más susceptibles al daño del ADN, que el modelo celular siTIN2. Resultados que correlacionan con el de Pereboeba *et. al.,* donde observaron que las células de pacientes de DC eran más susceptibles al daño cuando las trataban con etopósido [31]. Además, estos resultados de PARsilación correlacionaban con un aumento de la expresión génica de PARP1 cuando se trataban las células silenciadas con etopósido. Por otro lado, cuando se analizaron genes clave en distintos mecanismos de reparación del ADN participante en el DDR, se observó un aumento de la expresión génica de RAD51 tanto

en condiciones basales como de estímulo para siNOP10. En este sentido, se ha descrito que p53 modula, por regulación transcripcional, la expresión del gen *RAD51* [172]. En nuestros resultados se observó un aumento de p53 lo que produciría el aumento de expresión de RAD51, aunque no hay que olvidar que RAD51 también puede empezar a detectar roturas de doble cadena en el ADN.

6.7. RELEVANCIA DE LOS RESULTADOS DE LOS MODELOS CELULARES

Por lo tanto, el silenciamiento transitorio de *DKC1*, *NOP10* y *TINF2* que afectan a distintos componentes del complejo telomerasa-telosoma y se asocian a distintos tipos de herencia de la DC, pueden ser un buen modelo para la comprensión de los eventos tempranos relacionados con la DDR que ocurren en la DC.

Pensamos que la depleción aguda de DKC1 y NOP10 interrumpe el proceso de maduración del ARN a través de las cajas H/ACA. Esta interrupción produce una desregulación transcripcional que desencadena la aparición de estrés oxidativo, como un evento temprano e independiente del acortamiento de los telómeros. Este estrés oxidativo estaría mediado por la desregulación de la ruta de p53, que a su vez afectaría a la desregulación de otros genes como los de enzimas antioxidantes, produciendo un mayor estrés oxidativo y una mayor susceptibilidad de daño al ADN (Figura 35). Por el contrario, la depleción aguda de TINF2 no pudo inducir el estrés oxidativo en estadios tempranos y tampoco pudo interrumpir el proceso de maduración del ARN, pero si se observó una desregulación transcripcional que podría producir una detención de la glicólisis (Figura 35).

Se sabe que las personas con una mutación crónicas para TINF2 presentan estrés oxidativo y tienen telómeros muy cortos. En los últimos años se le han atribuido nuevas funciones a la proteína TIN2, cómo la de asociarse con la matriz nuclear para posicionar correctamente los telómeros durante la meiosis o durante procesos de daño al ADN [5, 6]. Por lo que la pérdida de la proteína TIN2 podría desestabilizar la unión de los telómeros a la matriz nuclear y contribuir a que se produzcan procesos de fusión o rotura

de los cromosomas que a su vez producirían translocaciones, amplificaciones y eliminaciones en el genoma a tiempos mayores.

Con los resultados obtenidos en nuestro estudio, proponemos que la pérdida de la función de DKC1 y NOP10 produce estrés oxidativo, independientemente de la longitud del telómero. Además, los fallos de la biogénesis ribosomal, y el aumento en la susceptibilidad del daño al ADN se producen también con la depleción de DKC1 y NOP10. Estudios previos observaron que en células de pacientes con mutaciones en DKC1, NOP10 y TINF2, con el tiempo el estrés oxidativo se iba incrementando en todos ellos [13, 53, 66]. Este hecho junto con la acumulación de daño en el ADN en los telómeros [89] y la inestabilidad genética [173], podría explicar cómo los telómeros pueden acortarse con el tiempo.

Los estudios futuros diseñados para generar modelos que induzcan depleciones agudas y crónicas de los genes y proteínas relacionadas con la DC, podrán ayudarnos a comprender las manifestaciones y características comunes de la DC independientemente de la mutación de origen. En conclusión, el estrés oxidativo puede ser consecuencia directa de la perdida de función de DKC1 y NOP10.

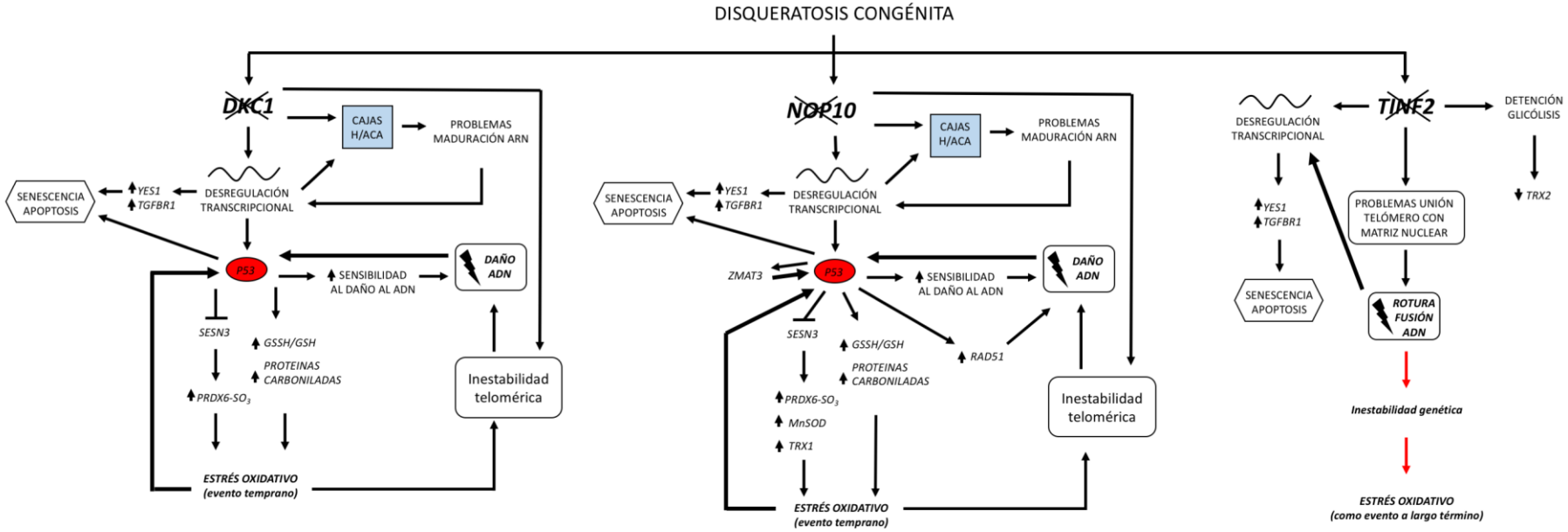


Figura 35. *Esquema general del funcionamiento de los diferentes modelos celulares. Se puede observar los dif erent que se alteraron en cada modelo celular, acorde a los resultados obtenidos. Se puede observar que DKC1 y NOP mientras que para TINF2 parece que funciona por otras vías diferentes.*

7. CONCLUSIONS

1. The experimental design led to the generation of cellular models with decreased expression of DKC1, NOP10 and TINF2, which showed affection in previously recognized functions for these genes, without telomere shortening.

2. Dyskerin and NOP10 depletion, produces oxidative stress as a telomere shortening-independent event; on the other side TIN2 silencing did not produce oxidative stress, suggesting that in this case oxidative stress might be a telomere shortening-dependent event.

3. The susceptibility to DNA damage is increased after DKC1 and NOP10 silencing, through PARP1 related-molecular pathways.

4. Single breaks at DNA may be produced as primary events after depletion of DKC1 and NOP10. However, double strand DNA breaks must occur due to the accumulation of DNA damage during chronic dysfunction of DKC1, NOP10 and TINF2 and therefore being a telomere shortening-dependent event.

5. Gene expression studies suggest that depletion of TIN2 produces dysregulation of glycolysis.

6. The acute depletion of DKC1 and NOP10 alters the pseudouridylation of the rRNA, thereby affecting the maturation of other RNAs as a telomere shortening-independent event.

7. Oxidative stress and the susceptibility to DNA damage observed after DKC1 and NOP10 silencing is increased by p53 activation.

8. LIMITACIONES

El diseño experimental de este estudio ha presentado ciertas limitaciones, que suelen ser comunes en otros estudios que tienen que ver con las enfermedades raras. La principal es que, al tratarse de una enfermedad con baja prevalencia, la Disqueratosis congénita, no ha sido posible contar con muestras de pacientes. Además, el objetivo era un estudio a tiempos muy cortos, así que ha sido necesario trabajar con células HeLa en cultivo. La segunda limitación del estudio es la cantidad de muestra utilizada, esto se debe a que el coste económico que tiene la metodología para generar los modelos celulares es muy elevado, impidiendo realizar más cantidad de muestra, debido a ello encontramos una tercera limitación. La duración del experimento también viene dada por la propia metodología, para observar tiempos mayores de cultivo no se puede utilizar esta metodología, se debe cambiar el método de siembra de los cultivos celulares. Además del tiempo como factor limitante, también hay otra limitación, se trata de los niveles de proteína silenciada para cada proteína de interés, obteniendo un valor correcto para una metodología de ARNi, pero no para un silenciamiento proteico total. No obstante, la información proporcionada en este trabajo consideramos que tiene una importancia relevante para plantear nuevos estudios que ayuden en la comprensión de estas telomeropatías.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Martinez, P. and M.A. Blasco, *Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins.* Nat Rev Cancer, 2011. **11**(3): p. 161-76.

2. Xin, H., D. Liu, and Z. Songyang, *The telosome/shelterin complex and its functions.* Genome Biol, 2008. **9**(9): p. 232.

3. Palm, W. and T. de Lange, *How shelterin protects mammalian telomeres.* Annu Rev Genet, 2008. **42**: p. 301-34.

4. Hockemeyer, D. and K. Collins, *Control of telomerase action at human telomeres.* Nat Struct Mol Biol, 2015. **22**(11): p. 848-52.

5. Kaminker, P.G., et al., *A novel form of the telomere-associated protein TIN2 localizes to the nuclear matrix.* Cell Cycle, 2009. **8**(6): p. 931-9.

6. Robin, J.D. and F. Magdinier, *Physiological and Pathological Aging Affects Chromatin Dynamics, Structure and Function at the Nuclear Edge.* Front Genet, 2016. **7**: p. 153.

7. Cong, Y. and J.W. Shay, *Actions of human telomerase beyond telomeres.* Cell Res, 2008. **18**(7): p. 725-32.

8. Opresko, P.L. and J.W. Shay, *Telomere-associated aging disorders.* Ageing Res Rev, 2017. **33**: p. 52-66.

9. Frescas, D. and T. de Lange, *A TIN2 dyskeratosis congenita mutation causes telomerase-independent telomere shortening in mice.* Genes Dev, 2014. **28**(2): p. 153-66.

10. Armanios, M., *Syndromes of telomere shortening.* Annu Rev Genomics Hum Genet, 2009. **10**: p. 45-61.

11. Holohan, B., W.E. Wright, and J.W. Shay, *Cell biology of disease: Telomeropathies: an emerging spectrum disorder.* J Cell Biol, 2014. **205**(3): p. 289-99.

12. Wong, J.M. and K. Collins, *Telomerase RNA level limits telomere maintenance in X-linked dyskeratosis congenita.* Genes Dev, 2006. **20**(20): p. 2848-58.

13. Walne, A.J., et al., *Genetic heterogeneity in autosomal recessive dyskeratosis congenita with one subtype due to mutations in the telomerase-associated protein NOP10.* Hum Mol Genet, 2007. **16**(13): p. 1619-29.

14. Dokal, I., *Dyskeratosis congenita.* Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2011. **2011**: p. 480-6.

15. Tummala, H., et al., *Poly(A)-specific ribonuclease deficiency impacts telomere biology and causes dyskeratosis congenita.* J Clin Invest, 2015. **125**(5): p. 2151-60.

16. Nelson, N.D. and A.A. Bertuch, *Dyskeratosis congenita as a disorder of telomere maintenance.* Mutat Res, 2012. **730**(1-2): p. 43-51.

17. Ballew, B.J., et al., *Germline mutations of regulator of telomere elongation helicase 1, RTEL1, in Dyskeratosis congenita.* Hum Genet, 2013. **132**(4): p. 473-80.

18. Mason, P.J. and M. Bessler, *The genetics of dyskeratosis congenita.* Cancer Genet, 2011. **204**(12): p. 635-45.

19. Savage, S.A., *Dyskeratosis Congenita*, in *GeneReviews(R)*, R.A. Pagon, et al., Editors. 1993, University of Washington, Seattle.

20. Trahan, C., C. Martel, and F. Dragon, *Effects of dyskeratosis congenita mutations in dyskerin, NHP2 and NOP10 on assembly of H/ACA pre-RNPs.* Hum Mol Genet, 2010. **19**(5): p. 825-36.

21. Henras, A., et al., *Nhp2p and Nop10p are essential for the function of H/ACA snoRNPs.* EMBO J, 1998. **17**(23): p. 7078-90.

22. Vulliamy, T., et al., *Mutations in the telomerase component NHP2 cause the premature ageing syndrome dyskeratosis congenita.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(23): p. 8073-8.

23. Ruggero, D., et al., *Dyskeratosis congenita and cancer in mice deficient in ribosomal RNA modification.* Science, 2003. **299**(5604): p. 259-62.

24. Sarek, G., et al., *Molecular basis of telomere dysfunction in human genetic diseases.* Nat Struct Mol Biol, 2015. **22**(11): p. 867-74.

25. De Zoysa, M.D. and Y.T. Yu, *Posttranscriptional RNA Pseudouridylation.* Enzymes, 2017. **41**: p. 151-167.

26. Paiva, R.C., R., *Telomere Dysfunction and Hematologic Disorders*, in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 2014, Elsevier Inc.

27. Chen, L.Y., et al., *Mitochondrial localization of telomeric protein TIN2 links telomere regulation to metabolic control.* Mol Cell, 2012. **47**(6): p. 839-50.

28. Saretzki, G., *Telomerase, mitochondria and oxidative stress.* Exp Gerontol, 2009. **44**(8): p. 485-92.

29. Singhapol, C., et al., *Mitochondrial telomerase protects cancer cells from nuclear DNA damage and apoptosis.* PLoS One, 2013. **8**(1): p. e52989.

30. Sullivan, L.B., J.H. Santos, and N.S. Chandel, *Mitochondria and telomeres: the promiscuous roles of TIN2.* Mol Cell, 2012. **47**(6): p. 823-4.

31. Pereboeva, L., et al., *DNA damage responses and oxidative stress in dyskeratosis congenita.* PLoS One, 2013. **8**(10): p. e76473.

32. Mates, J.M., et al., *Intracellular redox status and oxidative stress: implications for cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis.* Arch Toxicol, 2008. **82**(5): p. 273-99.

33. Berlett, B.S. and E.R. Stadtman, *Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress.* J Biol Chem, 1997. **272**(33): p. 20313-6.

34. Zhang, J., et al., *Effects of miR-335-5p in modulating osteogenic differentiation by specifically downregulating Wnt antagonist DKK1.* J Bone Miner Res, 2011. **26**(8): p. 1953-63.

35. Di Meo, S., et al., *Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions.* Oxid Med Cell Longev, 2016. **2016**: p. 1245049.

36. Fridovich, I., *Biological effects of the superoxide radical.* Arch Biochem Biophys, 1986. **247**(1): p. 1-11.

37. HJH., F., *Oxidation of tartaric acid in presence of iron.* J Chem Soc Trans, 1894. **65**: p. 899-911.

38. Haber F., W.J., *The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. .* Proc Roy Soc, 1932. **147**: p. 332-351.

39. Nathan, C. and Q.W. Xie, *Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls.* Cell, 1994. **78**(6): p. 915-8.

40. Pacher, P., J.S. Beckman, and L. Liaudet, *Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease.* Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 315-424.

41. von Zglinicki, T., *Oxidative stress shortens telomeres.* Trends Biochem Sci, 2002. **27**(7): p. 339-44.

42. Ahmed, S., et al., *Telomerase does not counteract telomere shortening but protects mitochondrial function under oxidative stress.* Journal of Cell Science, 2008. **121**(7): p. 1046-1053.

43. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, *The definition and measurement of antioxidants in biological systems.* Free Radic Biol Med, 1995. **18**(1): p. 125-6.

44. Halliwell, B., *Antioxidants in human health and disease.* Annu Rev Nutr, 1996. **16**: p. 33-50.

45. Díaz Cuevas, A., *Estrés oxidativo y diabetes: Papel protector de los estrógenos.* 2011: Valencia. p. pp: 42-43.

46. Lubos, E., J. Loscalzo, and D.E. Handy, *Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities.* Antioxid Redox Signal, 2011. **15**(7): p. 1957-97.

47. Pompella, A., et al., *The changing faces of glutathione, a cellular protagonist.* Biochem Pharmacol, 2003. **66**(8): p. 1499-503.

48. Miller, A.F., *Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights.* FEBS Lett, 2012. **586**(5): p. 585-95.

49. Tolbert, N.E. and E. Essner, *Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes.* J Cell Biol, 1981. **91**(3 Pt 2): p. 271s-283s.

50. Chance, B., H. Sies, and A. Boveris, *Hydroperoxide metabolism in mammalian organs.* Physiol Rev, 1979. **59**(3): p. 527-605.

51. Nakamura, H., K. Nakamura, and J. Yodoi, *Redox regulation of cellular activation.* Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 351-69.

52. Nagarajan, N., S. Oka, and J. Sadoshima, *Modulation of signaling mechanisms in the heart by thioredoxin 1.* Free Radic Biol Med, 2017. **109**: p. 125-131.

53. Manguan-Garcia, C., et al., *Expression of the genetic suppressor element 24.2 (GSE24.2) decreases DNA damage and oxidative stress in X-linked dyskeratosis congenita cells.* PLoS One, 2014. **9**(7): p. e101424.

54. Perez-Rivero, G., et al., *Telomerase deficiency promotes oxidative stress by reducing catalase activity.* Free Radic Biol Med, 2008. **45**(9): p. 1243-51.

55. Kamsler, A., et al., *Increased oxidative stress in ataxia telangiectasia evidenced by alterations in redox state of brains from Atm-deficient mice.* Cancer Res, 2001. **61**(5): p. 1849-54.

56. Suzuki, Y.J., M. Carini, and D.A. Butterfield, *Protein carbonylation.* Antioxid Redox Signal, 2010. **12**(3): p. 323-5.

57. Díaz-Acosta, A.M.-H., J., *Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos.* TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 2006.

58. Barzilai, A. and K. Yamamoto, *DNA damage responses to oxidative stress.* DNA Repair (Amst), 2004. **3**(8-9): p. 1109-15.

59. Finkel, T. and N.J. Holbrook, *Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.* Nature, 2000. **408**(6809): p. 239-47.

60. Wardman, P. and L.P. Candeias, *Fenton chemistry: an introduction.* Radiat Res, 1996. **145**(5): p. 523-31.

61. Kawanishi, S. and S. Oikawa, *Mechanism of telomere shortening by oxidative stress.* Ann N Y Acad Sci, 2004. **1019**: p. 278-84.

62. Oikawa, S. and S. Kawanishi, *Site-specific DNA damage at GGG sequence by oxidative stress may accelerate telomere shortening.* FEBS Lett, 1999. **453**(3): p. 365-8.

63. Cooke, M.S., et al., *Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease.* FASEB J, 2003. **17**(10): p. 1195-214.

64. Cheng, K.C., et al., *8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions.* J Biol Chem, 1992. **267**(1): p. 166-72.

65. Sahin, E. and R.A. DePinho, *Axis of ageing: telomeres, p53 and mitochondria.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(6): p. 397-404.

66. Pereboeva, L., et al., *Robust DNA Damage Response and Elevated Reactive Oxygen Species in TINF2-Mutated Dyskeratosis Congenita Cells.* PLoS One, 2016. **11**(2): p. e0148793.

67. Lin, P., et al., *Differential requirements for H/ACA ribonucleoprotein components in cell proliferation and response to DNA damage.* Histochem Cell Biol, 2015. **144**(6): p. 543-58.

68. Wei, H. and X. Yu, *Functions of PARylation in DNA Damage Repair Pathways.* Genomics Proteomics Bioinformatics, 2016. **14**(3): p. 131-139.

69. Schreiber, V., et al., *Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(7): p. 517-28.

70. Szabo, C., P. Pacher, and R.A. Swanson, *Novel modulators of poly(ADP-ribose) polymerase.* Trends Pharmacol Sci, 2006. **27**(12): p. 626-30.

71. Kuo, L.J. and L.X. Yang, *Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks.* In Vivo, 2008. **22**(3): p. 305-9.

72. Goodarzi, A.A., W.D. Block, and S.P. Lees-Miller, *The role of ATM and ATR in DNA damage-induced cell cycle control.* Prog Cell Cycle Res, 2003. **5**: p. 393-411.

73. Shiloh, Y., *ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity.* Nat Rev Cancer, 2003. **3**(3): p. 155-68.

74. Gu, B.W., M. Bessler, and P.J. Mason, *A pathogenic dyskerin mutation impairs proliferation and activates a DNA damage response independent of telomere length in mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(29): p. 10173-8.

75. Clancy, S., *DNA damage & repair: mechanisms for maintaining DNA integrity.* Nature Education, 2008. **1**(1): p. 103.

76. Menoni, H., J.H. Hoeijmakers, and W. Vermeulen, *Nucleotide excision repair-initiating proteins bind to oxidative DNA lesions in vivo.* J Cell Biol, 2012. **199**(7): p. 1037-46.

77. Bjoras, M., et al., *Reciprocal "flipping" underlies substrate recognition and catalytic activation by the human 8-oxo-guanine DNA glycosylase.* J Mol Biol, 2002. **317**(2): p. 171-7.

78. Fadda, E., *Role of the XPA protein in the NER pathway: A perspective on the function of structural disorder in macromolecular assembly.* Comput Struct Biotechnol J, 2016. **14**: p. 78-85.

79. Jasin, M. and R. Rothstein, *Repair of strand breaks by homologous recombination.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(11): p. a012740.

80. Kawabata, M., T. Kawabata, and M. Nishibori, *Role of recA/RAD51 family proteins in mammals.* Acta Med Okayama, 2005. **59**(1): p. 1-9.

81. Barnes, D.E., *Non-homologous end joining as a mechanism of DNA repair.* Curr Biol, 2001. **11**(12): p. R455-7.

82. Nussenzweig, A. and M.C. Nussenzweig, *A backup DNA repair pathway moves to the forefront.* Cell, 2007. **131**(2): p. 223-5.

83. Davis, A.J. and D.J. Chen, *DNA double strand break repair via non-homologous end-joining.* Transl Cancer Res, 2013. **2**(3): p. 130-143.

84. Shamanna, R.A., et al., *WRN regulates pathway choice between classical and alternative non-homologous end joining.* Nat Commun, 2016. **7**: p. 13785.

85. Mansour, W.Y., T. Rhein, and J. Dahm-Daphi, *The alternative end-joining pathway for repair of DNA double-strand breaks requires PARP1 but is not dependent upon microhomologies.* Nucleic Acids Res, 2010. **38**(18): p. 6065-77.

86. Golia, B., H.R. Singh, and G. Timinszky, *Poly-ADP-ribosylation signaling during DNA damage repair.* Front Biosci (Landmark Ed), 2015. **20**: p. 440-57.

87. Latre, L., et al., *Shortened telomeres join to DNA breaks interfering with their correct repair.* Exp Cell Res, 2003. **287**(2): p. 282-8.

88. Masutomi, K., et al., *The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(23): p. 8222-7.

89. Kirwan, M., et al., *Dyskeratosis congenita and the DNA damage response.* Br J Haematol, 2011. **153**(5): p. 634-43.

90. Kurvinen, K., S. Syrjanen, and B. Johansson, *Long-term suppression of telomerase expression in HeLa cell clones, transfected with an expression vector carrying siRNA targeting hTERT mRNA.* Int J Oncol, 2006. **29**(1): p. 279-88.

91. Tomlinson, R.L., et al., *Cell cycle-regulated trafficking of human telomerase to telomeres.* Mol Biol Cell, 2006. **17**(2): p. 955-65.

92. Yang, S. and C.M. Counter, *Cell cycle regulated phosphorylation of the telomere-associated protein TIN2.* PLoS One, 2013. **8**(8): p. e71697.

93. Lian, S., et al., *Small interfering RNA-mediated silencing induces target-dependent assembly of GW/P bodies.* Mol Biol Cell, 2007. **18**(9): p. 3375-87.

94. Ibanez-Cabellos, J.S., *Generación de un modelo celular para el estudio del estrés oxidativo en Disqueratosis congénita ligada al cromosoma X*, in *Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina y Odontología*. 2012, Universidad de Valencia.

95. O'Callaghan, N.J. and M. Fenech, *A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length.* Biol Proced Online, 2011. **13**: p. 3.

96. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.

97. Mender, I. and J.W. Shay, *Telomerase Repeated Amplification Protocol (TRAP).* Bio Protoc, 2015. **5**(22).

98. Shin, S.U., et al., *Gene expression profiling of calcifications in breast cancer.* Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 11427.

99. Carvalho, B.S. and R.A. Irizarry, *A framework for oligonucleotide microarray preprocessing.* Bioinformatics, 2010. **26**(19): p. 2363-7.

100. Gautier, L., et al., *affy--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level.* Bioinformatics, 2004. **20**(3): p. 307-15.

101. Ritchie, M.E., et al., *limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies.* Nucleic Acids Res, 2015. **43**(7): p. e47.

102. Kanehisa, M. and S. Goto, *KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes.* Nucleic Acids Res, 2000. **28**(1): p. 27-30.

103. Rocchi, L., et al., *Inhibition of human dyskerin as a new approach to target ribosome biogenesis.* PLoS One, 2014. **9**(7): p. e101971.

104. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.* Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.

105. Seco-Cervera, M., *Identification of new biomarkers for phenotypical characterization in peripheral neuropathies*, in *Faculty of Medicine and Dentistry*. 2017, University of Valencia. p. 200.

106. Nakamura, A. and S. Goto, *Analysis of protein carbonyls with 2,4-dinitrophenyl hydrazine and its antibodies by immunoblot in two-dimensional gel electrophoresis.* J Biochem, 1996. **119**(4): p. 768-74.

107. Seco-Cervera, M., et al., *Oxidative stress and antioxidant response in fibroblasts from Werner and atypical Werner syndromes.* Aging (Albany NY), 2014. **6**(3): p. 231-45.

108. Olive, P.L., *Detection of DNA damage in individual cells by analysis of histone H2AX phosphorylation.* Methods Cell Biol, 2004. **75**: p. 355-73.

109. Kunzmann, A., et al., *Flow-cytometric assessment of cellular poly(ADP-ribosyl)ation capacity in peripheral blood lymphocytes.* Immun Ageing, 2006. **3**: p. 8.

110. Fay, M.P. and M.A. Proschan, *Wilcoxon-Mann-Whitney or t-test? On assumptions for hypothesis tests and multiple interpretations of decision rules.* Stat Surv, 2010. **4**: p. 1-39.

111. Yoon, A., et al., *Impaired control of IRES-mediated translation in X-linked dyskeratosis congenita.* Science, 2006. **312**(5775): p. 902-6.

112. Townsley, D.M., B. Dumitriu, and N.S. Young, *Bone marrow failure and the telomeropathies.* Blood, 2014. **124**(18): p. 2775-83.

113. Houben, J.M., et al., *Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress?* Free Radic Biol Med, 2008. **44**(3): p. 235-46.

114. Lin, P., M.E. Mobasher, and F. Alawi, *Acute dyskerin depletion triggers cellular senescence and renders osteosarcoma cells resistant to genotoxic stress-induced apoptosis.* Biochem Biophys Res Commun, 2014. **446**(4): p. 1268-75.

115. Fumagalli, M., et al., *Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation.* Nat Cell Biol, 2012. **14**(4): p. 355-65.

116. Carrillo, J., et al., *p53 pathway activation by telomere attrition in X-DC primary fibroblasts occurs in the absence of ribosome biogenesis failure and as a consequence of DNA damage.* Clin Transl Oncol, 2014. **16**(6): p. 529-38.

117. Borras, C., et al., *Glutathione regulates telomerase activity in 3T3 fibroblasts.* J Biol Chem, 2004. **279**(33): p. 34332-5.

118. Correia-Melo, C., G. Hewitt, and J.F. Passos, *Telomeres, oxidative stress and inflammatory factors: partners in cellular senescence?* Longev Healthspan, 2014. **3**(1): p. 1.

119. Alawi, F. and P. Lin, *Dyskerin is required for tumor cell growth through mechanisms that are independent of its role in telomerase and only partially related to its function in precursor rRNA processing.* Mol Carcinog, 2011. **50**(5): p. 334-45.

120. Di Maio, N., et al., *A new role for human dyskerin in vesicular trafficking.* FEBS Open Bio, 2017. **7**(10): p. 1453-1468.

121. Taulli, R. and P.P. Pandolfi, *"Snorkeling" for missing players in cancer.* J Clin Invest, 2012. **122**(8): p. 2765-8.

122. Turano, M., et al., *Intron retention: a human DKC1 gene common splicing event.* Biochem Cell Biol, 2013. **91**(6): p. 506-12.

123. Pereboom, T.C., et al., *A zebrafish model of dyskeratosis congenita reveals hematopoietic stem cell formation failure resulting from ribosomal protein-mediated p53 stabilization.* Blood, 2011. **118**(20): p. 5458-65.

124. Giordano, E., et al., *minifly, a Drosophila gene required for ribosome biogenesis.* J Cell Biol, 1999. **144**(6): p. 1123-33.

125. Riccardo, S., et al., *The coding/non-coding overlapping architecture of the gene encoding the Drosophila pseudouridine synthase.* BMC Mol Biol, 2007. **8**: p. 15.

126. Tortoriello, G., J.F. de Celis, and M. Furia, *Linking pseudouridine synthases to growth, development and cell competition.* FEBS J, 2010. **277**(15): p. 3249-63.

127. Vicidomini, R., et al., *Loss of Drosophila pseudouridine synthase triggers apoptosis-induced proliferation and promotes cell-nonautonomous EMT.* Cell Death Dis, 2015. **6**: p. e1705.

128. Kaymaz, B.T.K., B. , *Advances in Therapeutic Approaches Using RNA Interference as a Gene Silencing Tool.* Adv Tech Biol Med, 2013. **1**(2).

129. Savage, S.A. and A.A. Bertuch, *The genetics and clinical manifestations of telomere biology disorders.* Genet Med, 2010. **12**(12): p. 753-64.

130. Freed, E.F., et al., *When ribosomes go bad: diseases of ribosome biogenesis.* Mol Biosyst, 2010. **6**(3): p. 481-93.

131. Glousker, G., et al., *Unraveling the pathogenesis of Hoyeraal-Hreidarsson syndrome, a complex telomere biology disorder.* Br J Haematol, 2015. **170**(4): p. 457-71.

132. Vulliamy, T., et al., *Telomere length measurement can distinguish pathogenic from non-pathogenic variants in the shelterin component, TIN2.* Clin Genet, 2012. **81**(1): p. 76-81.

133. Yang, D., et al., *TIN2 protein dyskeratosis congenita missense mutants are defective in association with telomerase.* J Biol Chem, 2011. **286**(26): p. 23022-30.

134. Kirwan, M., et al., *Exogenous TERC alone can enhance proliferative potential, telomerase activity and telomere length in lymphocytes from dyskeratosis congenita patients.* Br J Haematol, 2009. **144**(5): p. 771-81.

135. Li, L., et al., *MiR-17-5p up-regulates YES1 to modulate the cell cycle progression and apoptosis in ovarian cancer cell lines.* J Cell Biochem, 2015. **116**(6): p. 1050-9.

136. Heldin, C.H., M. Landstrom, and A. Moustakas, *Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition.* Curr Opin Cell Biol, 2009. **21**(2): p. 166-76.

137. Westin, E.R., et al., *The p53/p21(WAF/CIP) pathway mediates oxidative stress and senescence in dyskeratosis congenita cells with telomerase insufficiency.* Antioxid Redox Signal, 2011. **14**(6): p. 985-97.

138. Dansie, L.E., et al., *Physiological roles of the pantothenate kinases.* Biochem Soc Trans, 2014. **42**(4): p. 1033-6.

139. O'Toole, N. and M. Cygler, *The final player in the coenzyme A biosynthetic pathway.* Structure, 2003. **11**(8): p. 899-900.

140. Moussaieff, A., et al., *Glycolysis-mediated changes in acetyl-CoA and histone acetylation control the early differentiation of embryonic stem cells.* Cell Metab, 2015. **21**(3): p. 392-402.

141. Wolosker, H., et al., *Molecularly cloned mammalian glucosamine-6-phosphate deaminase localizes to transporting epithelium and lacks oscillin activity.* FASEB J, 1998. **12**(1): p. 91-9.

142. Gaglio, D., et al., *Oncogenic K-Ras decouples glucose and glutamine metabolism to support cancer cell growth.* Mol Syst Biol, 2011. **7**: p. 523.

143. Damdimopoulos, A.E., et al., *Human mitochondrial thioredoxin. Involvement in mitochondrial membrane potential and cell death.* J Biol Chem, 2002. **277**(36): p. 33249-57.

144. Moller, I.M., *Mitochondrial metabolism is regulated by thioredoxin.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(11): p. 3180-1.

145. Montanaro, L., et al., *Dyskerin expression influences the level of ribosomal RNA pseudo-uridylation and telomerase RNA component in human breast cancer.* J Pathol, 2006. **210**(1): p. 10-8.

146. Machado-Pinilla, R., et al., *Mechanism of the AAA+ ATPases pontin and reptin in the biogenesis of H/ACA RNPs.* RNA, 2012. **18**(10): p. 1833-45.

147. Fisher, A.B., *Peroxiredoxin 6: a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A(2) activities.* Antioxid Redox Signal, 2011. **15**(3): p. 831-44.

148. Poynton, R.A. and M.B. Hampton, *Peroxiredoxins as biomarkers of oxidative stress.* Biochim Biophys Acta, 2014. **1840**(2): p. 906-12.

149. Perkins, A., et al., *Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling.* Trends Biochem Sci, 2015. **40**(8): p. 435-45.

150. Budanov, A.V., *Stress-responsive sestrins link p53 with redox regulation and mammalian target of rapamycin signaling.* Antioxid Redox Signal, 2011. **15**(6): p. 1679-90.

151. Nogueira, V., et al., *Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis.* Cancer Cell, 2008. **14**(6): p. 458-70.

152. Budanov, A.V., et al., *Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD.* Science, 2004. **304**(5670): p. 596-600.

153. Budanov, A.V., J.H. Lee, and M. Karin, *Stressin' Sestrins take an aging fight.* EMBO Mol Med, 2010. **2**(10): p. 388-400.

154. Dalle-Donne, I., et al., *Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress.* Clin Chim Acta, 2003. **329**(1-2): p. 23-38.

155. Villeneuve, N.F., et al., *Nrf2 and p21 regulate the fine balance between life and death by controlling ROS levels.* Cell Cycle, 2009. **8**(20): p. 3255-6.

156. Jones, D.P., *Redefining oxidative stress.* Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(9-10): p. 1865-79.

157. Rhee, S.G. and S.H. Bae, *The antioxidant function of sestrins is mediated by promotion of autophagic degradation of Keap1 and Nrf2 activation and by inhibition of mTORC1.* Free Radic Biol Med, 2015. **88**(Pt B): p. 205-211.

158. Bersani, C., et al., *Wig-1 regulates cell cycle arrest and cell death through the p53 targets FAS and 14-3-3sigma.* Oncogene, 2014. **33**(35): p. 4407-17.

159. Liu, D. and Y. Xu, *p53, oxidative stress, and aging.* Antioxid Redox Signal, 2011. **15**(6): p. 1669-78.

160. Yang, K., et al., *A redox mechanism underlying nucleolar stress sensing by nucleophosmin.* Nat Commun, 2016. **7**: p. 13599.

161. James, A., et al., *Nucleolar stress with and without p53.* Nucleus, 2014. **5**(5): p. 402-26.

162. Lindstrom, M.S., *NPM1/B23: A Multifunctional Chaperone in Ribosome Biogenesis and Chromatin Remodeling.* Biochem Res Int, 2011. **2011**: p. 195209.

163. Deregowska, A., et al., *Shifts in rDNA levels act as a genome buffer promoting chromosome homeostasis.* Cell Cycle, 2015. **14**(21): p. 3475-87.

164. Vlatkovic, N., M.T. Boyd, and C.P. Rubbi, *Nucleolar control of p53: a cellular Achilles' heel and a target for cancer therapy.* Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(5): p. 771-91.

165. Pederson, T., *The plurifunctional nucleolus.* Nucleic Acids Res, 1998. **26**(17): p. 3871-6.

166. Tsekrekou, M., K. Stratigi, and G. Chatzinikolaou, *The Nucleolus: In Genome Maintenance and Repair.* Int J Mol Sci, 2017. **18**(7).

167. Nunez Villacis, L., et al., *New Roles for the Nucleolus in Health and Disease.* Bioessays, 2018: p. e1700233.

168. Ting, T.J., R.; Harun, R.; Ngah, WZ.; Mokhtar, NM., *RNA Interference-Mediated Knockdown on DKC1 Gene in Chemosensitized Colorectal Cancer Cell Lines.* Int J Cancer Res Mol Mech, 2015. **1 (2)**.

169. Ting R., H.R., Ngah W.Z., Mokhtar N.M., *RNA interference-mediated knockdown on DKC1 gene in chemosensitized colorectal cancer cell lines.* Int. J. Cancer Res. Mol. Mech., 2015. **1(2)**.

170. Mahaseth, T. and A. Kuzminov, *Prompt repair of hydrogen peroxide-induced DNA lesions prevents catastrophic chromosomal fragmentation.* DNA Repair (Amst), 2016. **41**: p. 42-53.

171. Beck, C., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerases in double-strand break repair: focus on PARP1, PARP2 and PARP3.* Exp Cell Res, 2014. **329**(1): p. 18-25.

172. Arias-Lopez, C., et al., *p53 modulates homologous recombination by transcriptional regulation of the RAD51 gene.* EMBO Rep, 2006. **7**(2): p. 219-24.

173. Calado, R.T. and N.S. Young, *Telomere maintenance and human bone marrow failure.* Blood, 2008. **111**(9): p. 4446-55.

10. ANEXO

Tabla Anexo 1. *Rutas obtenidas en el análisis bioinformático del modelo celular siDKC1 respecto a siCONTROL. Obtenidos los genes significativos para el modelo de siDKC1, se realizó el análisis de las rutas significativas en KEGG según los genes significativos. Se puede observar las rutas significativas obtenidas y los genes significativos, con su nombre, que participan en estas.*

RUTAS SIGNIFICATIVAS DKC1	ID ENTREZ	SÍMBOLO	NOMBRE
Ruta de señalización de p53	143686	SESN3	Sestrina 3
	3486	IGFBP3	Proteína 3 de unión al factor de crecimiento parecido a la insulina
	64393	ZMAT3	Matrina tipo 3 proteina de la familia dedos de Zn
	55240	STEAP3	Metaloreductasa STEAP3
Metabolismo de la cisteína y metionina	1786	DNMT1	ADN metiltransferasa 1
	27430	MAT2B	Metionina adenosiltransferasa 2B
Secreción del ácido gástrico	5332	PLCB4	Fosfolipasa C beta 4
	481	ATP1B1	ATPasa Na + / K + subunidad transportadora beta 1
	3710	ITPR3	Receptor de inositol 1,4,5-trifosfato tipo 3
Exportación de proteínas	10952	SEC61B	Subunidad beta translocon Sec61
	11231	SEC63	Homólogo SEC63, regulador de translocación de proteínas
Procesamiento de proteínas en el retículo endoplasmático	10294	DNAJA2	Miembro de la familia de proteínas de choque térmico DnaJ (Hsp40) A2
	10952	SEC61B	Subunidad beta translocon Sec61
	11231	SEC63	Homólogo SEC63, regulador de translocación de proteínas
	51128	SAR1B	Secreción asociada a la GTPasa relacionada con Ras 1B
	5611	DNAJC3	Familia de proteínas de choque térmico DnaJ (Hsp40) miembro C3

Toxoplasmosis	330	BIRC3	Repeticion que contiene 3 de IAP baculoviral
	3588	IL10RB	Subunidad beta del receptor de interleuquina 10
	3655	ITGA6	Subunidad alfa 6 de integrina
	7040	TGFB1	Factor de crecimiento transformante beta 1

Tabla Anexo 2. *Rutas obtenidas en el análisis bioinformático del modelo celular siNOP10 respecto a siCONTROL. Obtenidos los genes significativos para el modelo de siNOP10, se realizó el análisis de las rutas significativas en KEGG según los genes significativos. Se puede observar las rutas significativas obtenidas y los genes significativos, con su nombre, que participan en estas.*

RUTAS SIGNIFICATIVAS NOP10	ID ENTREZ	SÍMBOLO	NOMBRE
Uniones Adherentes	1459	CSNK2A2	Caseína quinasa 2 alfa 2
	1956	EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
	4008	LMO7	LIM dominio 7
	4087	SMAD2	Miembro 2 de la familia SMAD
	4233	MET	Proto-oncogen MET, Receptor tirosina quinasa
	51701	NLK	Quinasa tipo nemo
	5770	PTPN1	Proteína tirosina fosfatasa, no-receptor tipo 1
	5795	PTPRJ	Proteína tirosina fosfatasa, receptor tipo J
	6934	TCF7L2	Factor de transcripción 7 tipo 2
	7046	TGFBR1	Receptor 1 del factor de crecimiento transformante beta
	7082	TJP1	Proteína de unión estrecha 1
	7525	YES1	Proto-oncogen YES1, SRC familia tirosina quinasa
	8826	IQGAP1	Motivo IQ conteniendo proteína GTPasa activadora 1
	8936	WASF1	Proteína miembro de la familia WAS 1
Metabolismo de la alanina, aspartato y glutamato	122622	ADSSL1	Adenilsuccinato sintetasa tipo 1
	158	ADSL	Adenilosuccinato liasa
	2673	GFPT1	Glutamina-fructosa-6-fosfato transaminasa 1

	440	ASNS	Asparagina sintetasa (glutamina-hidrolizante)
	445	ASS1	Argininosuccinato sintasa 1
	5471	PPAT	Fosforibosil pirofosfato aminotransferasa
	7915	ALDH5A1	Miembro A1 de la familia Aldehido deshidrogenasa 5
	9945	GFPT2	Glutamina-fructosa-6-fosfato transaminasa 2
Biosíntesis del aminoacil-ARNt	124454	EARS2	Glutamil-ARNt sintetasa 2 mitocondrial
	2193	FARSA	Fenilalanil-ARNt sintetasa subunidad alfa
	3376	IARS	Isoleucil-ARNt sintetasa
	51520	LARS	Leucil-ARNt sintetasa
	55157	DARS2	Aspartil-ARNt sintetasa 2, mitocondrial
	6301	SARS	Seril-ARNt sintetasa
	833	CARS	Cisteinil-ARNt sintetasa
	8565	YARS	Tirosil-ARNt sintetasa
Apoptosis	5576	PRKAR2A	Subunidad reguladora alfa de la proteina quinasa dependiente de cAMP tipo II
	330	BIRC3	Repetición 3 conteniendo el baculoviral IAP
	317	APAF1	Factor activador de la peptidasa apoptótica 1
	7157	TP53	Proteína tumoral p53
	3654	IRAK1	Quinasa 1 asociada al receptor de interleucina 1
	8503	PIK3R3	Subunidad regulatoria 3 de fosfoinositidina-3-quinasa

	9020	MAP3K14	Proteína mitogeno activada quinasa quinasa quinasa 14
	23052	ENDOD1	Dominio endonucleasa conteniendo 1
	5534	PPP3R1	Subunidad B regulatoria de la proteína fosfatasa 3, alfa
	7186	TRAF2	Factor 2 asociado al receptor TNF
	3656	IRAK2	Quinasa 2 asociada al receptor de interleucina 1
	5566	PRKACA	Subunidad catalítica alfa de la proteina quinasa cAMP activada
	596	BCL2	BCL2 regulador de apoptosis
	8797	TNFRSF10A	Miembro 10a de la superfamilia del receptor TNF
Cardiomiopatía arritmogénica de ventrículo derecho (CAVD)	1674	DES	Desmina
	1824	DSC2	Desmocolina 2
	1829	DSG2	Desmogleína 2
	1832	DSP	Desmoplaquina
	2697	GJA1	Proteína alfa 1 de unión GAP
	3685	ITGAV	Subunidad alfa V de la Integrina
	3696	ITGB8	Subunidad beta 8 de la Integrina
	488	ATP2A2	ATpasa 2 del sarcoplasma/retículo endoplásmico transportadora de Ca+2
	5318	PKP2	Placofilina 2
	6443	SGCB	Sarcoglicano beta
	6934	TCF7L2	Factor de transcripción 7 tipo2
	781	CACNA2D1	Subunidad alfa2delta1 auxiliar del canal de calcio dependiente de voltaje
Invasión bacteriana de células epiteliales	10059	DNM1L	Dinamina tipo 1
	10092	ARPC5	Subunidad 5 de la proteína relacionada con la actina del complejo 2/3

	10095	ARPC1B	Subunidad 1B de la proteína relacionada con la actina del complejo 2/3
	10552	ARPC1A	Subunidad 1A de la proteína relacionada con la actina del complejo 2/3
	1398	CRK	Proto-oncogen CRK, proteína adaptadora
	2335	FN1	Fibronectina 1
	23607	CD2AP	Proteína asociada a CD2
	399694	SHC4	Proteína 4 adaptadora de SHC
	4233	MET	Proto-oncogen MET, Receptor tirosina quinasa
	8503	PIK3R3	Subunidad regulatoria 3 de fosfoinositidina-3-quinasa
	8936	WASF1	Proteína miembro de la familia WAS 1
Factores de transcripción basales	27097	TAF5L	Factor asociado 5 tipo proteína de unión a la caja TATA
	2965	GTF2H1	Factor general de transcripción IIH subunidad 1
	51616	TAF9B	Factor asociado 9b tipo proteína de unión a la caja TATA
	6873	TAF2	Factor asociado 2 tipo proteína de unión a la caja TATA
	6874	TAF4	Factor asociado 4 tipo proteína de unión a la caja TATA
	6884	TAF13	Factor asociado 13 tipo proteína de unión a la caja TATA
Cáncer de vejiga	1029	CDKN2A	Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina
	1956	EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico

	4609	MYC	Proto-oncogen MYC, Factor de trascripción bHLH
	5925	RB1	Co-repressor transcripcional 1 RB
	595	CCND1	Ciclina D1
	7057	THBS1	Tromboespondina 1
	7157	TP53	Proteína tumoral p53
Ciclo Celular	1017	CDK2	Quinasa ciclina dependiente 2
	1021	CDK6	Quinasa ciclina dependiente 6
	1027	CDKN1B	Inhibidor 1B de quinasa dependiente de ciclina
	1029	CDKN2A	Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina
	10735	STAG2	Antigeno estromal 2
	25847	ANAPC13	Subunidad 13 del complejo promotor de anafase
	3065	HDAC1	Histona desacetilasa
	4087	SMAD2	Miembro 2 de la familia SMAD
	4171	MCM2	Componente 2 del complejo de mantenimiento del minicromosoma
	4173	MCM4	Componente 4 del complejo de mantenimiento del minicromosoma
	4609	MYC	Proto-oncogen MYC, Factor de trascripción bHLH
	5111	PCNA	Antígeno nuclear de células proliferantes
	5925	RB1	Co-repressor transcripcional 1 RB
Leucemia mieloide crónica	1021	CDK6	Quinasa 6 dependiente de ciclina
	1027	CDKN1B	Inhibidor 1B de quinasa dependiente de ciclina
	1029	CDKN2A	Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina

	1398	CRK	Proto-oncogen CRK, proteína adaptadora
	2885	GRB2	Proteína 2 de unión al receptor del factor de crecimiento
	3065	HDAC1	Histona desacetilasa
	399694	SHC4	Proteína 4 adaptadora de SHC
	4609	MYC	Proto-oncogen MYC, Factor de trascripción bHLH
	5925	RB1	Co-repressor transcripcional 1 RB
	595	CCND1	Ciclina D1
	7046	TGFBR1	Receptor 1 del factor de crecimiento transformante beta
	7157	TP53	Proteína tumoral p53
	8503	PIK3R3	Subunidad regulatoria 3 de fosfoinositidina-3-quinasa
Interacciones del receptor ECM	1278	COL1A2	Cadena 2 alfa del colágeno tipo I
	1288	COL4A6	Cadena 6 alfa del colágeno tipo IV
	1289	COL5A1	Cadena 1 alfa del colágeno tipo V
	1290	COL5A2	Cadena 2 alfa del colágeno tipo V
	2335	FN1	Fibronectina 1
	3685	ITGAV	Subunidad alfa V de la Integrina
	3696	ITGB8	Subunidad beta 8 de la Integrina
	3910	LAMA4	Subunidad alfa 4 de la laminina
	6385	SDC4	Sindecano 4
	6696	SPP1	Fosfoproteína secretada 1
	7057	THBS1	Tromboespondina 1
	948	CD36	Molécula CD36
Adhesiones focales	10398	MYL9	Cadena ligera 9 de la miosina
	10451	VAV3	Factor 3 intercambiador de nucleótidos de guanina vav
	1278	COL1A2	Cadena 2 alfa del colágeno tipo I

	1288	COL4A6	Cadena 6 alfa del colágeno tipo IV
	1289	COL5A1	Cadena 1 alfa del colágeno tipo V
	1290	COL5A2	Cadena 2 alfa del colágeno tipo V
	1398	CRK	Proto-oncogen CRK, proteína adaptadora
	1956	EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
	2335	FN1	Fibronectina 1
	2885	GRB2	Proteína 2 de unión al receptor del factor de crecimiento
	2889	RAPGEF1	Factor 1 intercambiador de nucleótidos de guanina Rap
	2909	ARHGAP35	Proteína 35 activadora de la GTPasa Rho
	330	BIRC3	Repetición 3 conteniendo el baculoviral IAP
	3685	ITGAV	Subunidad alfa V de la Integrina
	3696	ITGB8	Subunidad beta 8 de la Integrina
	3725	JUN	Proto-ongogen JUN, subunidad del factor de transcripción AP-1
	3910	LAMA4	Subunidad alfa 4 de la laminina
	399694	SHC4	Proteína 4 adaptadora de SHC
	4233	MET	Proto-oncogen MET, Receptor tirosina quinasa
	595	CCND1	Ciclina D1
	596	BCL2	BCL2 regulador de apoptosis
	6696	SPP1	Fosfoproteína secretada 1
	7057	THBS1	Tromboespondina 1
	7094	TLN1	Talina 1
	8503	PIK3R3	Subunidad regulatoria 3 de fosfoinositidina-3-quinasa
	896	CCND3	Ciclina D3

	9475	ROCK2	Proteína quinasa 2 conteniendo una cola enroscada asociada a Rho
Glioma	1956	EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
	2885	GRB2	Proteína 2 de unión al receptor del factor de crecimiento
	399694	SHC4	Proteína 4 adaptadora de SHC
	5925	RB1	Co-repressor transcripcional 1 RB
	595	CCND1	Ciclina D1
	7157	TP53	Proteína tumoral p53
	817	CAMK2D	Proteína quinasa II delta dependiente de Calcio/calmodulina
	8503	PIK3R3	Subunidad regulatoria 3 de fosfoinositidina-3-quinasa
Biosíntesis de la lisina	51166	AADAT	Aminoadipato aminotransferasa
	501	ALDH7A1	Miembro A1 de la familia de aldehído deshidrogenasa 7
Ruta de señalización MAPK	10125	RASGRP1	Proteína 1 liberadora de guanil RAS
	10746	MAP3K2	Proteína mitogeno activada quinasa quinasa quinasa 2
	11221	DUSP10	Fosfatasa 10 específica dual
	1386	ATF2	Factor 2 de activación de la transcripción
	1398	CRK	Proto-oncogen CRK, proteína adaptadora
	1845	DUSP3	Fosfatasa 3 específica dual
	1849	DUSP7	Fosfatasa 7 específica dual
	1956	EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
	2885	GRB2	Proteína 2 de unión al receptor del factor de crecimiento

	3315	HSPB1	Miembro 1 de la familia B de proteínas de choque térmico (pequeñas)
	3725	JUN	Proto-ongogen JUN, Subunidad del factor de transcripción AP-1
	3727	JUND	Proto-oncogen JunD, subunidad del factor de transcripción AP-1
	4208	MEF2C	Factor 2C potenciador del miocito
	4214	MAP3K1	Proteína mitogeno activada quinasa quinasa quinasa 1
	4609	MYC	Proto-oncogen MYC, Factor de trascripción bHLH
	4791	NFKB2	Subunidad 2 del factor nuclear kappa B
	51701	NLK	Quinasa tipo nemo
	51776	MAP3K20	Proteína mitogeno activada quinasa quinasa quinasa 20
	5494	PPM1A	Proteína fosfatasa 1A dependiente de Mg2+/Mn2+
	5534	PPP3R1	Subunidad B regulatoria de la proteína fosfatasa 3 , alfa
	5566	PRKACA	Subunidad catalítica alfa de la proteína quinasa activada por cAMP
	57551	TAOK1	Quinasa TAO 1
	5921	RASA1	Activador 1 de la proteína p21 RAS
	6789	STK4	Quinasa 4 de serina/treonina
	7046	TGFBR1	Receptor 1 del factor de crecimiento transformante beta
	7157	TP53	Proteína tumoral p53
	7186	TRAF2	Factor 2 asociado al receptor TNF
	781	CACNA2D1	Subunidad alfa2delta1 auxiliar del canal de calcio dependiente de voltaje

	9020	MAP3K14	Proteína mitogeno activada quinasa quinasa quinasa 14
	9448	MAP4K4	Proteína mitogeno activada quinasa quinasa quinasa quinasa 4
Cáncer de pulmón de células no pequeñas	1021	CDK6	Quinasa 6 dependiente de ciclina
	1029	CDKN2A	Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina
	1956	EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
	2885	GRB2	Proteína 2 de unión al receptor del factor de crecimiento
	5925	RB1	Co-repressor transcripcional 1 RB
	595	CCND1	Ciclina D1
	6789	STK4	Quinasa 4 de serina/treonina
	7157	TP53	Proteína tumoral p53
	8503	PIK3R3	Subunidad regulatoria 3 de fosfoinositidina-3-quinasa
Reservas de un carbono por folato	10797	MTHFD2	Metilenotetrahidrofolato deshidrogenasa (dependiente de NADP+) 2, meteniltetrahidrofolato ciclohidrolasa
	160428	ALDH1L2	Miembro L2 de la familia Aldehido deshidrogenasa 1
	1719	DHFR	Dihidrofolato reductasa
	6472	SHMT2	Serina hidrometiltransferasa 2
Ruta de señalización p53	1017	CDK2	Quinasa 2 dependiente de ciclina
	1021	CDK6	Quinasa 6 dependiente de ciclina
	1029	CDKN2A	Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina
	143686	SESN3	Sestrina 3

	1643	DDB2	Proteína 2 de unión al ADN especifica de daño
	27244	SESN1	Sestrina 1
	317	APAF1	Factor 1 activador de la peptidasa apoptótica
	3486	IGFBP3	Proteína 3 de unión al factor de crecimiento tipo insulina
	50484	RRM2B	Subunidad M2B inducible de la Ribonucleotido reductasa regulatoria de TP53
	595	CCND1	Ciclina D1
	64393	ZMAT3	Matrina tipo 3 proteína de la familia dedos de Zn
	7057	THBS1	Trombospondina 1
	7157	TP53	Proteína tumoral p53
	8493	PPM1D	Proteína fosfatasa 1D dependiente de Mg2+/Mn2+
	896	CCND3	Ciclina D3
	900	CCNG1	Ciclina G1
	9134	CCNE2	Ciclina E2
	9538	EI24	EI24, proteína transmembrana asociada a la autofagia
Cáncer de páncreas	1021	CDK6	Quinasa 6 dependiente de ciclina
	1029	CDKN2A	Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina
	1956	EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
	3716	JAK1	Quinasa Janus 1
	4087	SMAD2	Miembro 2 de la familia SMAD
	5899	RALB	RAS tipo proto-oncogén B
	5925	RB1	Co-repressor transcripcional 1 RB

	595	CCND1	Ciclina D1
	7046	TGFBR1	Receptor 1 del factor de crecimiento transformante beta
	7157	TP53	Proteína tumoral p53
	8503	PIK3R3	Subunidad regulatoria 3 de fosfoinositidina-3-quinasa
Rutas en Cáncer	1017	CDK2	Quinasa 2 dependiente de ciclina
	1021	CDK6	Quinasa 6 dependiente de ciclina
	1027	CDKN1B	Inhibidor 1B de quinasa dependiente de ciclina
	1029	CDKN2A	Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina
	1288	COL4A6	Cadena 6 alfa del colágeno tipo IV
	1398	CRK	Proto-oncogen CRK, proteína adaptadora
	1956	EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
	2335	FN1	Fibronectina 1
	2885	GRB2	Proteína 2 de unión al receptor del factor de crecimiento
	3065	HDAC1	Histona desacetilasa
	330	BIRC3	Repetición 3 conteniendo el baculoviral IAP
	3569	IL6	Interleuquina 6
	3685	ITGAV	Subunidad alfa V de la Integrina
	3716	JAK1	Quinasa Janus 1
	3725	JUN	Proto-ongogen JUN, subunidad del factor de transcripción AP-1
	3910	LAMA4	Subunidad alfa 4 de la laminina
	405	ARNT	Translocador nuclear del receptor de arilo hidrocarburo

	4087	SMAD2	Miembro 2 de la familia SMAD
	4233	MET	Proto-oncogen MET, Receptor tirosina quinasa
	4609	MYC	Proto-oncogen MYC, Factor de trascripción bHLH
	4791	NFKB2	Subunidad 2 del factor nuclear kappa B
	5467	PPARD	Receptor delta activado por proliferador de peroxisoma
	5899	RALB	Proto-oncogén B tipo RAS
	5925	RB1	Co-repressor transcripcional 1 RB
	595	CCND1	Ciclina D1
	596	BCL2	BCL2 regulador de apoptosis
	6502	SKP2	Proteína 2 asociada a quinasa fase S
	6789	STK4	Quinasa 4 de serina/treonina
	6934	TCF7L2	Factor de transcripción 7 tipo 2
	7046	TGFBR1	Receptor 1 del factor de crecimiento transformante beta
	7157	TP53	Proteína tumoral p53
	7186	TRAF2	Factor 2 asociado al receptor TNF
	7187	TRAF3	Factor 3 asociado al receptor TNF
	7188	TRAF5	Factor 5 asociado al receptor TNF
	8503	PIK3R3	Subunidad regulatoria 3 de fosfoinositidina-3-quinasa
	9063	PIAS2	Proteína inhibidora de STAT 2 activado
	9134	CCNE2	Ciclina E2
Metabolismo de las purinas	10606	PAICS	Fosforibosilaminoimidazola carboxilasa y fosforibosilaminoimidazola-succinocarboxamida sintasa
	9615	GDA	Guanina deaminasa

	5147	PDE6D	Fosfodiesterasa 6D
	9060	PAPSS2	3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato sintasa 2
	122622	ADSSL1	Adenilosuccinato sintasa similar 1
	5558	PRIM2	Subunidad primasa (ADN) 2
	50484	RRM2B	Ribonucleótido reductasa reguladora TP53 subunidad inducible M2B
	10622	POLR3G	Subunidad G de la ARN polimerasa III
	5430	POLR2A	Subunidad A de ARN polimerasa A
	5471	PPAT	Fosforibosil pirofosfato aminotransferasa
	27115	PDE7B	Fosfodiesterasa 7B
	158	ADSL	Adenilsuccinato liasa
	6240	RRM1	Subunidad catalítica ribonucleótido reductasa M1
	113	ADCY7	Adenilato ciclasa 7
	4907	NT5E	5'-nucleotidasa ecto
	5422	POLA1	ADN polimerasa alfa 1, subunidad catalítica
	56985	ADPRM	ADP-ribosa/CDP-alcohol difosfatasa, manganeso dependiente
	5150	PDE7A	Fosfodiesterasa 7ª
	171568	POLR3H	Subunidad H de la ARN polimerasa III
	10201	NME6	NME/NM23 nucleósido difosfato cinasa 6
Cáncer de pulmón de células pequeñas	1017	CDK2	Quinasa 2 dependiente de ciclina
	1021	CDK6	Quinasa 6 dependiente de ciclina
	1027	CDKN1B	Inhibidor 1B de quinasa dependiente de ciclina
	1288	COL4A6	Cadena 6 alfa del colágeno tipo IV
	2335	FN1	Fibronectina 1

	317	APAF1	Factor activador de la peptidasa apoptótica 1
	330	BIRC3	Repetición 3 conteniendo el baculoviral IAP
	3685	ITGAV	Subunidad alfa V de la Integrina
	3910	LAMA4	Subunidad alfa 4 de la laminina
	4609	MYC	Proto-oncogen MYC, Factor de trascripción bHLH
	5925	RB1	Co-repressor transcripcional 1 RB
	595	CCND1	Ciclina D1
	596	BCL2	BCL2 regulador de apoptosis
	6502	SKP2	Proteína 2 asociada a quinasa fase S
	7157	TP53	Proteína tumoral p53
	7186	TRAF2	Factor 2 asociado al receptor TNF
	7187	TRAF3	Factor 3 asociado al receptor TNF
	7188	TRAF5	Factor 5 asociado al receptor TNF
	8503	PIK3R3	Subunidad regulatoria 3 de fosfoinositidina-3-quinasa
	9063	PIAS2	Proteína inhibidora de STAT 2 activado
	9134	CCNE2	Ciclina E2

Tabla Anexo 3. *Rutas obtenidas en el análisis bioinformático del modelo celular siTINF2 respecto a siCONTROL. Obtenidos los genes significativos para el modelo de siTINF2, se realizó el análisis de las rutas significativas en KEGG según los genes significativos. Se puede observar las rutas significativas obtenidas y los genes significativos, con su nombre, que participan en estas.*

RUTAS SIGNIFICATIVAS TINF2	ID ENTREZ	SÍMBOLO	NOMBRE
Uniones adherentes	7525	YES1	Proto-oncogen YES
	7046	TGFBR1	Receptor del factor de crecimiento transformante beta 1
	5792	PTPRF	Proteína tirosina fosfatasa, receptor tipo F
Enfermedad de Chagas	51135	IRAK4	Quinasa 4 asociada al receptor de interleucina 1
	6347	CCL2	C-C motivo ligando quimioquina 2
	7040	TGFB1	Factor de crecimiento transformante beta 1
	7046	TGFBR1	Receptor del factor de crecimiento transformante beta 1
Ritmo Cardiaco	9575	CLOCK	Regulador circadiano CLOCK
	8945	BTRC	Repetición beta-transducina que contiene la proteína ligasa ubiquitina E3
Interacción citoquina-receptor de citosinas	3556	IL1RAP	Proteína accesoria del receptor de interleucina 1
	3572	IL6ST	Interleukin 6 signal transducer
	3589	IL11	Interleuquina 11
	6347	CCL2	C-C motivo ligando quimioquina 2
	7040	TGFB1	Factor de crecimiento transformante beta 1
	7046	TGFBR1	Receptor del factor de crecimiento transformante beta 1

Leishmaniosis	51135	IRAK4	Quinasa 4 asociada al receptor de interleucina 1
	5743	PTGS2	Prostaglandina-endoperóxido sintasa 2
	7040	TGFB1	Factor de crecimiento transformante beta 1
Vía de señalización del receptor tipo NOD	22861	NLRP1	Dominio 1 de pirin de la familia NLR
	330	BIRC3	Repetición que contiene 3 de IAP baculoviral
	6347	CCL2	C-C motivo ligando quimioquina 2
Biosíntesis de pantotenato y CoA	79646	PANK3	Pantothenate kinase 3
	79717	PPCS	Fosfopantotenoilcisteína sintetasa
Artritis reumatoide	3589	IL11	Interleuquina 11
	537	ATP6AP1	ATPase H + transportando la proteína accesoria 1
	6347	CCL2	C-C motivo ligando quimioquina 2
	7040	TGFB1	Factor de crecimiento transformante beta 1
Uniones estrechas	7525	YES1	Proto-oncogen YES
	8573	CASK	Calcio/calmodulina dependiente de serina proteín-quinasa
	5590	PRKCZ	Proteína quinasa C zeta
	8777	MPDZ	Proteína de dominio múltiple PDZ
	9076	CLDN1	Claudina 1