



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural (ETSIAMN)

Departamento de Biotecnología

Disminución de los niveles de glutatión en células HeLa mediante tratamiento con diamida. Consecuencias epigenéticas y posibles implicaciones en patologías progeroides.

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA



Autor/a: Cristina González Nieto

Director/a: Carlos Romá Mateo

Tutor/a UPV: José Gadea Vacas

Curso académico 2017-2018



UNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología



ciberer
CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN RED
DE ENFERMEDADES RARAS



INCLIVA
Instituto de Investigación Sanitaria

Plataforma de Investigación en Epigenética (CIBERER/UV/INCLIVA).

Agradecimientos

Principalmente, me gustaría agradecer a Federico Pallardó el haberme dejado formar parte del grupo de fisiopatología celular y orgánica del estrés oxidativo y las enfermedades raras (COPOS) de la Universidad de Valencia. Entre ellos agradezco especialmente a Carlos Romá el haberme dirigido el trabajo y ayudado en múltiples ámbitos. En general, gracias a todos los que me han aconsejado: Gisselle Pérez, Pilar González y José Luís García. A mi compañera de proyecto, Laura Robles. A los que aparte de enseñarme me han hecho pasar momentos muy divertidos y me han alegrado el día a día en el laboratorio y fuera de él: Rosa, Santi, Marta, Jesús, Diana, Pablo, Ángela, María, Guillermo, Ester, Aitor y con los que he pasado más tiempo trabajando y riendo: Alejandro, Rebeca y Paula. A todos los “raritos” os deseo lo mejor y espero que sigáis siendo una gran familia, ha sido un placer.

Por otro lado, a mi tutor de la UPV, José Gadea por resolverme en seguida toda duda surgida.

Jamás me olvidaría de agradecer a la familia valenciana que ha sufrido mis quejas y con la que he convivido y disfrutado este curso 2017-18.

Finalmente, pero nunca menos importante, recordar y dedicar todo esfuerzo a mi familia y pareja que me apoyan y me hacen tan feliz.

Resumen

El glutatión (GSH) es el antioxidante no enzimático más abundante en las células de mamífero, constituido por un tripéptido glutamato-cisteína-glicina. Gracias al grupo sulfhidrilo de la cisteína, actúa como donador de electrones para reducir enlaces disulfuro entre cisteínas, reaccionar con especies reactivas de oxígeno mediante su grupo tiol –oxidándose a glutatión disulfuro (GSSG)- o para convertir el peróxido de hidrógeno en dos moléculas de agua inocua para la célula mediante la acción de la enzima glutatión peroxidasa, entre otros antioxidantes enzimáticos. No obstante, en la actualidad se están estudiando otras funciones relacionadas con el GSH como es el caso de las modificaciones postraduccionales –glutathionilación de proteínas– o su relación con la regulación epigenética, dado que algunas moléculas y metabolitos intermediarios de la síntesis de glutatión lo son a su vez de las rutas de metilación de ADN e histonas. Con la finalidad de analizar la relación entre el estado redox celular debido a niveles de GSH y la alteración de modificaciones postraduccionales en histonas, se ha optimizado un protocolo para disminuir la concentración de GSH celular mediante tratamiento con diamida en células HeLa, y se ha analizado mediante citometría de flujo, fluorimetría y microscopía confocal.

En algunas patologías de carácter progeroide, caracterizadas por cursar con envejecimiento prematuro y en las que se ha observado alteraciones en la estructura de la cromatina, se ha comprobado que uno de los factores de relevancia es el estrés oxidativo que padecen a nivel celular, además de mostrar niveles disminuidos de GSH. Por esta razón, paralelamente se ha trabajado con líneas de fibroblastos humanos –dos controles y un paciente de la patología progeroide denominada síndrome de Werner– analizando tanto enzimas antioxidantes, como modificaciones en histonas.

Palabras clave: Glutatión (GSH), glutatión disulfuro (GSSG), diamida, progerias, síndrome de Werner, modificaciones postraduccionales, histonas.

Abstract

Glutathione (GSH) is the most abundant non-enzymatic antioxidant in mammalian cells, constituted by a glutamate-cysteine-glycine tripeptide. Thanks to its sulfhydryl residue, acts as an electron donor to reduce disulfide bonds between cysteines, to react with reactive oxygen species by means of its thiol group, or to convert hydrogen peroxide into two molecules of water -safe for the cell- through the action of the enzyme glutathione peroxidase, among other antioxidant enzymes. However, other functions related to GSH are currently being studied, as is the case of post-translational modifications –protein glutathionylation- or its relation to epigenetic regulation, since some molecules and intermediate metabolites in the synthesis of glutathione are also involved in DNA and protein methylation pathways. In order to analyze the relationship between the cellular redox state due to GSH levels and alterations in histone posttranslational modifications, a treatment has been optimized to reduce cellular GSH concentration by treatment with diamide in HeLa cells, and the effect has been analyzed by flow cytometry, fluorimetry and confocal microscopy.

In some pathology with progeroid features, characterized by premature ageing and in which alterations in chromatin structure have been observed, it has been shown that one of the relevant factors is the oxidative stress they show at the cellular level, besides having reduced levels of GSH. For this reason, in parallel we have worked with human fibroblast cell lines – two controls and a patient with Werner syndrome – analyzing antioxidant enzymes and modifications in histones.

Key words: Glutathione (GSH), glutathione disulfide (GSSG), diamide, progerias, Werner syndrome, posttranslational modifications, histones.

Abreviaturas

CAT catalasa

CuZnSOD cobre/zinc superóxido dismutasa (enzima citosólica)

DMEM *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNMT ADN metiltransferasas

ERO especie reactiva de oxígeno

FSC *Forward Scatter*

GCL ligasa glutamato cisteína

GPX glutatión peroxidasa

GRX glutarredoxina

GSH glutatión (estado reducido)

GSSG glutatión disulfuro (estado oxidado)

HG enfermedad de Hutchinson-Gilford

HMT histonas metiltransferasas

MAT metionina adenosiltransferasa

mCB monoclorobimano

MnSOD manganeso superóxido dismutasa (enzima mitocondrial)

MPT modificaciones post-traduccionales

PE *Phycoerithrin*

SAH S-adenosil homocisteína

SAHH S-adenosil homocisteína hidrolasa

SAM S-Adenosil metionina

SEM error estándar de la media

SSC *Side Scatter*

SW síndrome de Werner

TRX tiorredoxina

WB western blot

Índice de contenido

1.	Introducción	7
1.1.	Patologías progeroides.....	7
1.1.1.	Síndrome de Werner	7
1.2.	Estrés Oxidativo.....	8
1.2.1.	Sistemas antioxidantes enzimáticos	9
1.2.2.	Sistema antioxidante mediado por glutatión.....	12
1.3.	Implicación de los sistemas antioxidantes en la regulación epigenética.....	13
1.4.	Antecedentes	16
2.	Hipótesis.....	18
3.	Objetivos	19
4.	Material y métodos	20
4.1.	Cultivos celulares.....	20
4.2.	Transfección celular	21
4.3.	Tratamientos	21
4.4.	Ensayo de citotoxicidad: sulforodamina B	21
4.5.	Medida de los niveles de glutatión celular	22
4.5.1.	Citometría de flujo: monoclorobimano	23
4.5.2.	Fluorimetría.....	24
4.5.3.	Microscopía confocal: n-Grx1-roGFP2	25
4.6.	Obtención de extractos.....	26
4.6.1.	Extractos proteicos totales.....	26
4.6.2.	Extractos de histonas	26
4.7.	Cuantificación de proteínas	27
4.8.	Análisis de proteínas por western blot	27
4.9.	Análisis estadístico	28
5.	Resultados	30
5.1.	Estudio de la citotoxicidad mediada por diamida en células HeLa	30
5.2.	Análisis de los niveles de glutatión.....	31
5.2.1.	Citometría de flujo	31
5.2.2.	Fluorimetría.....	33
5.2.3.	Microscopía confocal	33
5.3.	Expresión de proteínas antioxidantes.....	35
5.4.	Modificaciones post-traduccionales de histonas.....	38
6.	Discusión	43
6.1.	Estudio del estado redox en células de pacientes	44
6.2.	Estrés oxidativo y MPT en histonas.....	46
7.	Limitaciones	49
8.	Conclusiones.....	50
9.	Referencias.....	51

Índice de tablas

Tabla 1. Características de las líneas celulares de fibroblastos humanos.....	20
Tabla 2. Comparación de la expresión relativa y actividad enzimática de SW1 (AG06300) frente a C2 (GM08402).	37

Índice de figuras

Figura 1. Misma paciente con síndrome de Werner a los 15 años (izquierda) y a los 48 años de edad (derecha).....	8
Figura 2. Reacción mediada por superóxido dismutasa.	9
Figura 3. Reacción mediada por catalasa.....	10
Figura 4. Reacción mediada por GPX.	10
Figura 5. Reacción mediada por GRX.	11
Figura 6. Reacción mediada por TRX.....	11
Figura 7. Reacción mediada por PRDX.	12
Figura 8. Reacciones dependientes del poder reductor de GSH.	13
Figura 9. Relación entre el ciclo de la metionina y la biogénesis de GSH.	15
Figura 10. Inhibición del crecimiento celular producida por la adición de diamida.	30
Figura 11. Delimitación de poblaciones.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 12. Análisis de las poblaciones	¡Error! Marcador no definido.
Figura 13. Reducción de los niveles de GSH celulares tras el tratamiento con diamida	33
Figura 14. Representación de los resultados de GSH libre normalizados en las distintas condiciones de tratamientos de 1 hora en suspensión. ..	¡Error! Marcador no definido.
Figura 15. Fotografías superpuestas del contraste de fases junto con la fluorescencia detectada en cada longitud de onda.....	34
Figura 16. Comparación del cambio en el tiempo de las ratio 405/488 nm como medición de GSSG/GSH.	34
Figura 17. Análisis de los WB en distintas condiciones de HeLa para MnSOD y TRXR1.	35
Figura 18. Análisis de los WB en distintas condiciones de HeLa para MnSOD, CAT, GPX1 y la forma oxidada de PRDX6.	36
Figura 19. Análisis de los WB en fibroblastos para TRX1 y la oxidación de PRDX6.....	38
Figura 20. Análisis de los WB en distintas condiciones de HeLa para la fosforilación de la serina 139 de la histona H2AX.....	39
Figura 21. Análisis de los WB en distintas condiciones de HeLa para las trimetilaciones de las lisinas 9, 27 y 79 de la histona H3 y acetilación de la lisina 8 de la histona H4.	39
Figura 22. Análisis de los WB en fibroblastos para γ H2AX.....	40
Figura 23. Análisis de los WB en distintas líneas de fibroblastos para las trimetilaciones de las lisinas 9, 27 y 79 de la histona H3.....	41
Figura 24. Análisis de los WB en distintas líneas de fibroblastos para la acetilación de las lisinas 9 y 27 de la histona H3 y de la lisina 8 de la histona H4.	42

1. Introducción

1.1. Patologías progeroides

Las patologías progeroides forman parte de las enfermedades poco frecuentes, minoritarias o raras, las cuales se caracterizan por presentar una prevalencia igual o menor a 1/2.000 casos en Europa (EURORDIS, 2009-2012). También llamadas progerias o síndromes progeroides, destacan por cursar con envejecimiento acelerado o prematuro y una esperanza de vida acortada. Dependiendo de la magnitud de la sintomatología se clasifican en: unimodales, cuando tan sólo se observa envejecimiento en un tejido u órgano, como en el caso de la demencia precoz de tipo Alzheimer, y segmentales, en las cuales se observan distintas afecciones fenotípicas relacionadas con la senescencia como en el caso de Hutchinson-Gilford, disqueratosis congénita y síndrome de Werner (Hisama *et al.*, 2016). Al mismo tiempo, se pueden clasificar según la función de los genes que se ven afectados, separando aquellos con déficit en la reparación del ADN (síndrome de Cockayne o síndrome de Werner), los implicados en alteraciones en componentes de la envuelta nuclear (Hutchinson-Gilford o síndrome de lipodistrofia de Marfan), los relacionados con el mantenimiento y alargamiento telomérico (disqueratosis congénita o síndrome de Hoyeraal-Hreidarsson) o incluso los que presentan causas todavía desconocidas (síndrome de Wiedemann–Rautenstrauch) (Carrero *et al.*, 2016).

1.1.1. Síndrome de Werner

Una de las patologías progeroides más estudiada es el síndrome de Werner (ORPHA902; OMIM #277700) clasificada como progeria segmental. Aunque es difícil estimar la prevalencia de la enfermedad debido al bajo número de casos, se estima una prevalencia en Europa aproximada de 1/200.000 habitantes donde la variante patogénica más común entre los caucásicos (1105C>T), cuya representación es el 20% de los alelos causantes de dicha enfermedad, se calcula su frecuencia entre 1/380.000-1/1.000.000 (Oshima *et al.*, 2002). No obstante, debido probablemente a un efecto fundador y posterior consanguinidad, se han estimado prevalencias mucho mayores en poblaciones como Japón (1/20.000-1/40.000) y Cerdeña (1/50.000) (Oshima *et al.*, 2002) (Chun *et al.*, 2011) (Masala *et al.* 2007). La esperanza de vida se encuentra en torno a 54 años de edad (Huang *et al.*, 2007).

Aunque se considera una enfermedad segmental, no presenta la totalidad de las características asociadas a un envejecimiento prematuro: cursa con la aparición de cabello canoso, cataratas bilaterales, patología dermatológica característica y baja estatura. Entre otros caracteres de menor frecuencia pueden presentar extremidades cortas, morfologías faciales pellizcadas, osteoporosis, cambios en la voz, hipogonadismo, diabetes mellitus tipo 2,

calcificación del tejido blando, neoplasma(s) y aterosclerosis (Oshima *et al.*, 2002). Además, se caracteriza por la aparición tardía de la sintomatología, siendo visible a partir de la pubertad, y por eso es conocida como la “progeria de inicio en adultos” (figura1).



Figura 1. Misma paciente con síndrome de Werner a los 15 años (izquierda) y a los 48 años de edad (derecha).
Fuente: Epstein *et al.* 1966.

El síndrome de Werner presenta una herencia autosómica recesiva donde en el 90% de los casos se encuentra afectado el gen *WRN*, que codifica para una RecQ helicasa ATP-dependiente con actividad exonucleasa de 3' a 5' encargada de regular el potencial replicativo de las células en división (Chun *et al.*, 2011), además de evitar la rotura del ADN tras alteraciones en la cromatina (Turaga *et al.*, 2007). La pérdida de la función de WRN promueve la senescencia celular y la transformación neoplásica.

Ni el síndrome de Werner ni el resto de enfermedades progeroides tienen en la actualidad tratamiento curativo, tan sólo paliativo. Por esa razón, el estudio de enfermedades progeroides es de gran relevancia, al mismo tiempo que su abordaje puede ayudar tanto a comprender procesos celulares relacionados con la proliferación y la senescencia celular como los procesos que tienen lugar durante el deterioro del organismo con el paso del tiempo. Dado que el estrés oxidativo es un factor íntimamente relacionado con el envejecimiento, la comprensión del papel de las especies reactivas de oxígeno (ERO), los mecanismos celulares que las regulan y su efecto sobre la expresión génica a distintos niveles, se presenta como una diana clave a la hora de diseñar estrategias terapéuticas (Haigis *et al.*, 2011).

1.2. Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo puede definirse como el desequilibrio entre las especies oxidantes y la capacidad antioxidante celular (Matés *et al.*, 2008). Constantemente, los organismos aeróbicos están expuestos a oxidantes, ya sea por procesos enzimáticos endógenos o contaminantes ambientales exógenos (Zhang *et al.*, 2015a). A través de reacciones metabólicas de óxido-

reducción se producen las denominadas especies reactivas de oxígeno (ERO) como el radical superóxido (O_2^-) o el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las principales fuentes de ERO intracelulares son la NADPH oxidasa, la cadena de transporte electrónico mitocondrial y las que producen la catalasa de la actividad lisosomal. En condiciones fisiológicas, las ERO participan en la señalización intracelular. No obstante, bajo condiciones de estrés oxidativo pueden interaccionar con macromoléculas (ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos y proteínas) formando parte de la fisiopatología de diversas enfermedades como en procesos inflamatorios, cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes y patologías progeroides, entre otras enfermedades raras (Palopoch *et al.*, 2015). Sin embargo, para controlar los niveles de ERO y evitar así su excesiva reactividad, las células cuentan con lo que se denominan sistemas antioxidantes. Se considera como antioxidante cualquier sustancia que en concentraciones normales posea una afinidad mayor que cualquier otra molécula para interaccionar con una ERO (Oxilia, 2010). Los sistemas antioxidantes, encargados de neutralizar el daño causado por la acumulación de ERO, pueden estar formados por moléculas no enzimáticas o por enzimas. Dentro del grupo de los sistemas antioxidantes no enzimáticos se clasifican según su naturaleza (Davies, 2000):

- a. Antioxidantes hidrofílicos: vitamina C, ácido úrico, bilirrubina y albúmina.
- b. Antioxidantes lipofílicos: vitamina E, carotenoides y ubiquinonas.
- c. Antioxidantes nucleofílicos: glutatión (GSH) del cual se habla en profundidad en el apartado 1.2.2.

1.2.1. Sistemas antioxidantes enzimáticos

Las enzimas más relevantes y estudiadas como sistemas antioxidantes son las siguientes:

- a. **Superóxido dismutasa (SOD):** enzima catalizadora de la dismutación del radical superóxido (O_2^-) en oxígeno (O_2) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), figura 2.



Figura 2. Reacción mediada por superóxido dismutasa. Modificado de: Cheng Peng *et al.*, 2014.

Dentro de las células de mamífero se han descrito dos tipos de SOD. La primera, codificada por el gen *SOD1* y denominada CuZnSOD se encuentra en el citosol, en el espacio intermembrana mitocondrial, núcleo, lisosomas y peroxisomas, y cumple su función gracias al cobre presente en su sitio activo y al zinc como estabilizador de su estructura (Fukai *et al.* 2011). El gen *SOD2*

codifica para MnSOD, localizada en las mitocondrias y con manganeso en su centro activo. Extracelularmente también se ha descrito una tercera isoforma (*SOD3* o EC-SOD) que presenta el mismo estabilizador y catalizador que CuZnSOD (zinc y cobre respectivamente), pero se encuentra en fluidos extracelulares, la superficie externa de la célula y la matriz extracelular. Debido a la alta reactividad del ion O_2^- con el monóxido de nitrógeno (NO), que da lugar a peroxinitrito ($ONOO^-$) y provoca disfunción mitocondrial y endotelial, el papel de las superóxido dismutasas es muy importante (Fukai *et al.*, 2011).

- b. Catalasa (CAT):** una de las enzimas encargadas de la reducción de H_2O_2 en dos moléculas de agua (H_2O) y oxígeno (O_2) representado en la figura 3.

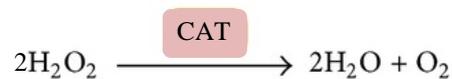


Figura 3. Reacción mediada por catalasa. Modificado de: Cheng Peng *et al.*, 2014.

Actualmente se han descrito más de 300 secuencias de catalasa en distintas especies donde la gran mayoría son monofuncionales y presentan el grupo hemo como cofactor, mientras que también se han visto catalasas bifuncionales con actividad peroxidasa y otras con contenido de manganeso como cofactor (Chelikani *et al.*, 2004). Principalmente se sitúa a la catalasa en el peroxisoma, aunque también se encuentra en el citosol y en mitocondria (Rodríguez *et al.*, 2000).

- c. Glutación peroxidasa (GPx):** enzima catalizadora de la reducción de peróxidos a alcoholes mediante GSH como donador de electrones, quedando como producto en estado oxidado glutación disulfuro (GSSG). En la figura 4, se representa la reducción del peróxido de hidrógeno; no obstante, la enzima es capaz también de reducir lipoperóxidos (LOOH) a alcoholes (LOH) (Imai *et al.*, 2003).

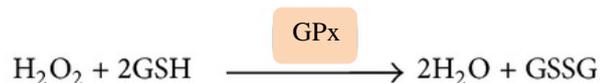


Figura 4. Reacción mediada por GPX. Modificado de: Cheng Peng *et al.*, 2014.

El cofactor de las GPx es el selenio y sus miembros se clasifican en 4 grupos donde se destaca la exclusiva función de GPX4 para reducir los fosfolípidos de membrana (Diamond, 2015).

- d. **Glutarredoxina (GRx)**: oxidorreductasa ubicua capaz de reducir puentes disulfuro entre GSH y otros tioles de bajo peso molecular o entre cisteína de proteínas (figura 5).

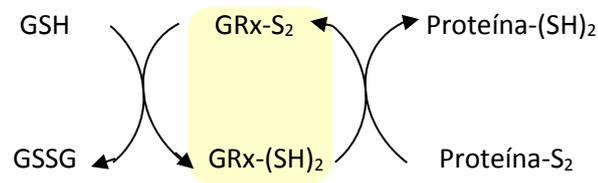


Figura 5. Reacción mediada por GRx. Mediante la oxidación de GSH reduce los puentes disulfuro entre cisteínas de proteínas. Esquema de elaboración propia.

En este caso se distinguen según la localización subcelular: GRX citosólica (GRX1) y GRX mitocondrial y nuclear (GRX2). Las GRX pueden glutationilar, entre otras proteínas, factores de transcripción como NFκB o c-jun modificando así su afinidad al ADN (Shelton *et al.*, 2005). Además, otras cascadas de señalización como la de Akt son susceptibles a estas modificaciones.

- e. **Tiorredoxina (TRx)**: enzimas oxidorreductasas que a través de un intercambio tiol-disulfuro entre cisteínas, reducen otras proteínas (figura 6). Las tiorredoxinas se mantienen en estado reducido gracias a la acción de la flavoenzima tiorredoxina reductasa dependiente de NADPH (TRXR).

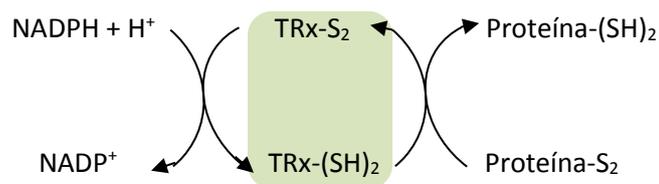


Figura 6. Reacción mediada por TRx. Tiorredoxina, mediante NADPH + H⁺ reduce los puentes disulfuro entre proteínas. Esquema de elaboración propia.

Además del poder reductor de este tipo de enzima, se le han otorgado otras funciones de gran relevancia celular tales como pueden ser el actuar como factor de crecimiento autocrino, como cofactor en la conversión de nucleótido a desoxirribonucleótido para la síntesis de ADN, o participar en la proliferación celular siendo responsable de la regulación entre ADN y factores de transcripción (Sevilla *et al.*, 2015). Hasta el momento se han descrito dos isoformas,

la TRX1 que se encuentra presente en el núcleo y citosol conjuntamente con TRXR1 (enzima encargada de la reducción de TRX1), y la TRX2 presente en la mitocondria junto con TRXR2.

- f. **Peroxirredoxina (Prdx):** las peroxirredoxinas son peroxidases dependientes de cisteína que reaccionan con peróxido de hidrógeno, sustratos de hidroperóxido más grandes y peroxinitrito (Nelson *et al.*, 2013). Se reducen posteriormente gracias a tiorredoxina (TRx) o sulfirredoxina (SRx) (Sevilla *et al.*, 2015) (figura 7).

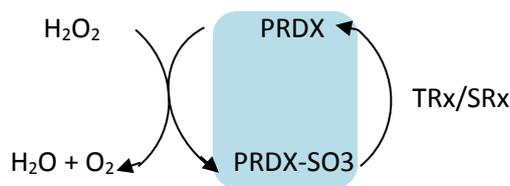


Figura 7. Reacción mediada por PRDX. La enzima se oxida para producir agua y oxígeno en este caso y puede ser reducido tanto por TRx (tiorredoxina) como por SRx (sulfirredoxina). Esquema de elaboración propia.

Se han detectado implicaciones de las PRDX en la regulación de una variedad de procesos de señalización que incluyen la proliferación celular, la diferenciación y la muerte celular (Veal *et al.*, 2007). Dentro del grupo de PRDX, se han descrito 6 miembros presentando las 5 primeras 2 residuos de cisteína (2-Cys), mientras que la PRDX6 presenta un solo residuo (1-Cys) (Fisher, 2011). La PRDX6 es de gran interés en el presente trabajo debido a que utiliza el poder reductor del GSH en vez del de la tiorredoxina como el resto de PRDX. Además, esta enzima presenta bifuncionalidad como peroxidasa y fosfolipasa A2 hidrolizando el enlace éster sn-2 (alquilo) de los fosfolípidos (Fisher, 2011). Bajo altos niveles de estrés oxidativo, las PRDX en general se encuentran hiperoxidadas y esto provoca la parada del ciclo celular en la transición G2/M (Kim *et al.*, 2008).

1.2.2. Sistema antioxidante mediado por glutatión

El glutatión (GSH) es el antioxidante no enzimático más abundante en las células de mamífero, constituido por un tripéptido glutamato-cisteína-glicina. Está presente en la mayoría de tipos celulares normalmente a altas concentraciones comprendidas entre 0,5-10 mM (Wu *et al.*, 2018).

Como se ha mostrado en el apartado anterior, gracias al grupo sulfhidrilo de la cisteína, el GSH actúa como donador de electrones para reducir enlaces disulfuro entre cisteínas y reaccionar del mismo modo con ERO, oxidándose a glutatión disulfuro (GSSG). En condiciones normales,

se encuentra mayormente en su forma reducida gracias a la acción de la enzima glutatión reductasa (GR) (figura 8).

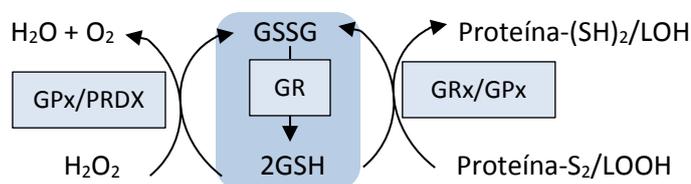


Figura 8. Reacciones dependientes del poder reductor de GSH. Esquema de elaboración propia.

El cociente entre la concentración de ambos estados del glutatión (GSH/GSSG) se utiliza como indicativo del estado redox celular. También se ha estudiado la localización de GSH durante el ciclo celular, observando un incremento en el núcleo con respecto al citosol de 4/1 durante la fase S (Markovic *et al.*, 2007). Además, se ha descrito su participación en diversas modificaciones post-traduccionales (MPT), mediante reacciones de S-glutationilación llevadas a cabo por enzimas como la glutatión S-transferasa pi (GSTP), y su implicación en procesos tales como la proliferación celular, la síntesis del ADN, los mecanismos apoptóticos o la regulación de la carcinogénesis (Ortega *et al.*, 2011). En la actualidad se están estudiando sus posibles implicaciones en la regulación epigenética, dado que se ha descrito la glutatiónilación de la histona H3 (García-Giménez *et al.*, 2013) y además algunas moléculas y metabolitos intermediarios de la síntesis de glutatión lo son a su vez de las rutas de metilación de ADN e histonas (García-Giménez *et al.*, 2017) (figura 9).

1.3. Implicación de los sistemas antioxidantes en la regulación epigenética

Se considera epigenética a los cambios en la expresión génica heredables post-mitóticamente que no implican alteraciones en la secuencia de nucleótidos del ADN, pero afectan al fenotipo celular (Robles *et al.*, 2012). El nivel de regulación epigenética consta de tres tipos de modificaciones: la metilación del ADN, los ARN no codificantes y las modificaciones post-traduccionales (MPT) de histonas. El presente trabajo abordará la relación entre GSH, estrés oxidativo y epigenética centrándose únicamente en los efectos observables sobre estas últimas.

Las histonas son proteínas de bajo peso molecular (11-21 kDa) encargadas de formar un complejo estructural ADN-histonas conocido como nucleosoma, que contribuye a la

compactación del ADN estructurado en forma de cromatina, y a la organización de la información genética. Esta estructura consta de dos copias de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. Un quinto tipo de histona (H1), conocida también como histona de enlace, se encuentra de forma extendida a lo largo del ADN confiriendo estabilidad. Las histonas nucleosomales presentan el extremo amino-terminal extendido hacia fuera de su estructura, lo que se suele conocer como “cola” de las histonas. Las colas de histonas son ricas en residuos de arginina (R) y lisina (K) en mayor proporción aparte de presentar otros residuos como serina (S), treonina (T) y tirosina (Y). Todos estos aminoácidos son susceptibles a cambios químicos que pueden modificar el grado de compactación de la cromatina al alterar la capacidad de interacción entre la carga negativa del esqueleto de fosfatos de la doble hélice y la carga positiva de los aminoácidos que forman parte de la superficie de las histonas. Las modificaciones que afectan a la interacción ADN-proteína pueden facilitar o dificultar la expresión génica dependiendo de la estructura cromatínica en subregiones específicas. Según el grado de compactación resultante se conocen dos tipos de estructura: heterocromatina (compacta y correspondiente a una expresión génica bloqueada) y eucromatina (laxa y accesible a la maquinaria de transcripción). Al mismo tiempo se distinguen dos tipos de heterocromatina; constitutiva (estable y característica de regiones teloméricas y centroméricas) y facultativa (reversible y diferente según la especialización celular).

La mayoría de modificaciones estudiadas son metilaciones y acetilaciones de las argininas y lisinas, aunque se conocen casos de citrulinación (con importancia en procesos de apoptosis y respuesta inmunológica), ubiquitinación (monoubiquitinación como represión de la transcripción y poliubiquitinación en zonas de daño al ADN para proteger la integridad genómica) e incluso glutationilación de la histona H3, entre otras modificaciones relacionadas con el estado redox celular (García-Giménez *et al.*, 2013) (Chia-Fang *et al.*, 2013). Una concisa revisión de las MPT de histonas se puede encontrar en la web (*Histome: the Histone Infobase*, 2011).

Las MPT en histonas que se han analizado en el presente trabajo son las siguientes:

- a. **γ H2AX**: sirve como indicador del daño en el ADN debido a que éste es directamente proporcional a la fosforilación de la histona H2AX (una de las variantes de la histona H2A) en el residuo serina 139 (Sharma *et al.*, 2012).
- b. **H3K9me3, H3K27me3 y H3K79me3**: la metilación suele indicar represión de la zona por compactación y por lo general se encuentra inversamente proporcional a la edad del individuo (Ghosh *et al.*, 2016) (Maleszewska *et al.*, 2016). La trimetilación de las

lisinas 9 se encuentra mayormente en zonas de heterocromatina constitutiva, mientras que la trimetilación de las lisinas 27 es más usual en zonas de heterocromatina facultativa. Por contra, H3K79me3 se relaciona con zonas de expresión activa (Zhang *et al.*, 2015b).

- c. **H3K9ac, H3K27ac y H4K8ac:** la acetilación, al contrario que la metilación, se encuentra relacionada con la formación de eucromatina y la expresión activa de genes (Brusslan *et al.*, 2015). Entre las múltiples funciones de la acetilación de la lisina 9 en la histona H3, se encuentra la de estabilizar la asociación de WRN al ADN y la acetilación de la lisina 8 en la histona H4 es requerida para el correcto transcurso de la fase S del ciclo celular.

Este tipo de modificaciones son llevadas a cabo por una serie de reguladores con actividades contrapuestas (por ejemplo, enzimas con actividad metilasa o desmetilasa) que se encargan de controlar el estado de la cromatina y los niveles de expresión génica en función de las necesidades celulares. Es interesante que algunos de los metabolitos intermediarios en estos procesos enzimáticos sean al mismo tiempo intermediarios en la biosíntesis de GSH. Esta relación está representada en la figura 9.

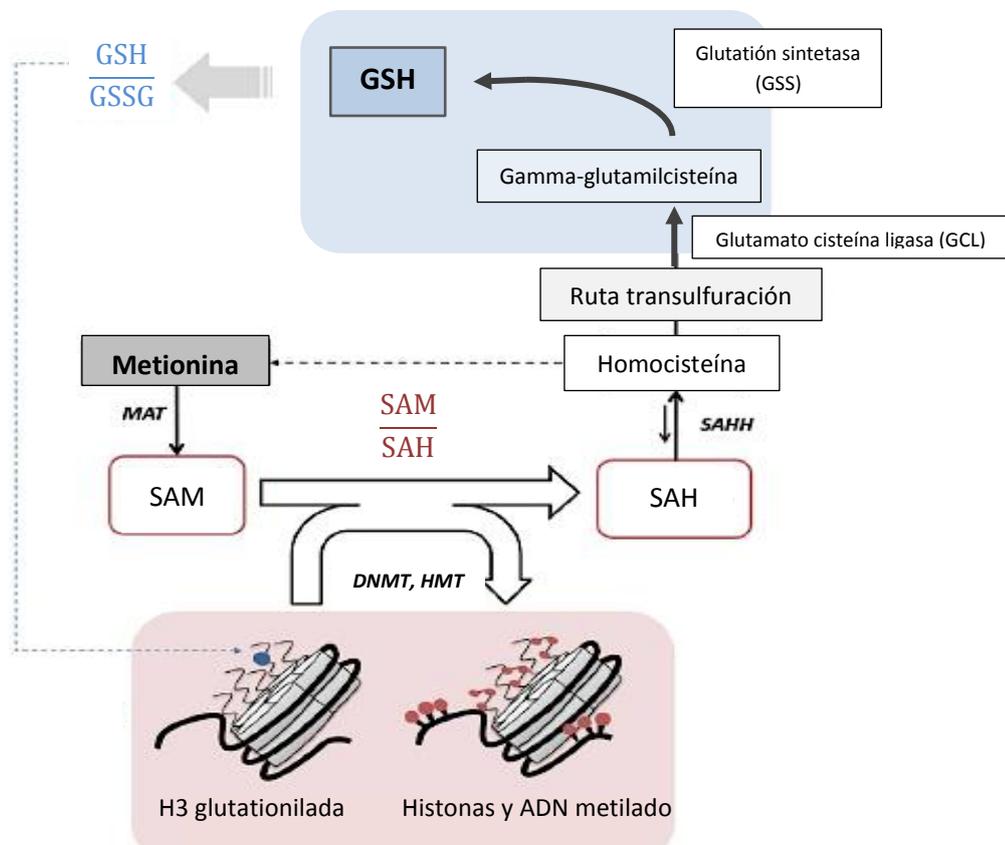


Figura 9. Relación entre el ciclo de la metionina y la biogénesis de GSH. SAM S-adenosilmetionina, SAH S-adenosil homocisteína, DNMT ADN metiltransferasas, HMT histonas metiltransferasas, MAT metionina adenosiltransferasa y SAHH hidrolasa SAH. Modificado de (García-Giménez *et al.*, 2013).

Tal y como se puede observar en la figura 9, para la formación de GSH se parte inicialmente de la metionina. Mediante la acción de la enzima metionina adenosiltransferasa (MAT), se genera la enzima S-adenosilmetionina (SAM) encargada de metilar los residuos de arginina y lisina de las histonas (mediante las histonas metiltransferasas o HMT) quedando como subproducto la enzima S-adenosil homocisteína (SAH), convertida en homocisteína por la reacción catalizada por la hidrolasa SAH (SAHH). Del mismo modo cumplen su función las enzimas encargadas de metilar el ADN (ADN metiltransferasas o DNMT). A partir de la homocisteína tiene lugar la ruta de transulfuración que termina con cisteína, la cual por la acción de la enzima glutamato cisteína ligasa (GCL) forman el precursor directo de GSH, gamma-glutamilcisteína. El último paso es la adición de la glicina mediante la acción de glutatión sintetasa (GSS).

Por lo tanto, la utilización de la metionina tanto como para formar el sustrato necesario para la metilación del ADN y proteínas, como para iniciar la síntesis de GSH celular, supone una interconexión entre los procesos de regulación epigenética y la respuesta antioxidante celular que puede arrojar importantes pistas sobre las alteraciones encontradas en ambos procesos celulares desde el punto de vista biomédico. Además, el incremento en el conocimiento de los patrones epigenéticos podrían ser de gran repercusión a la hora de encontrar biomarcadores y dianas terapéuticas en enfermedades complejas (Hamm *et al.*, 2015) (Ghosh *et al.*, 2016).

1.4. Antecedentes

En el grupo en el que se ha realizado el presente trabajo se ha abordado anteriormente el papel del estrés oxidativo celular en la fisiopatología de síndromes de carácter progeroide. Por un lado, se ha estudiado si el estrés oxidativo es un suceso primario o secundario al acortamiento telomérico en disqueratosis congénita, como ejemplo de patología progeroide (Ibañez-Cabellos *et al.*, 2017). Previamente se había estudiado el estrés oxidativo presente en fibroblastos de síndrome de Werner, observando gran afectación de las enzimas antioxidantes (Seco-Cervera *et al.*, 2014). Estos resultados, junto con la experiencia previa del grupo en cuanto al papel del GSH en el mantenimiento del estado redox y el ciclo celular (Markovic *et al.*, 2009) (Markovic *et al.*, 2010), constituyen el punto de partida para abordar el objetivo de disminuir los niveles de GSH para estudiar su repercusión en la regulación epigenética llevada a cabo por modificaciones en histonas, basándonos en la estrecha relación entre las rutas moleculares presentadas en el apartado anterior (Figura 9).

Una forma de provocar estrés oxidativo es sometiendo a las células a la presencia de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), lo cual altera la homeostasis oxidativa. Por ese motivo se ha empleado el

uso de H_2O_2 a lo largo del trabajo. No obstante, para poder rebajar los niveles de GSH de forma más específica, se pueden usar otras sustancias. En trabajos anteriores se trató de disminuir los niveles de GSH mediante L-butionina sulfoximina (BSO) encargada de bloquear la síntesis de GSH a nivel de GCL. No obstante, este compuesto modifica los niveles de GSH nucleares y mitocondriales a concentraciones superiores a $100 \mu M$, las cuales provocan daño en el ADN (Green *et al.*, 2006). En el presente trabajo se empleó la diamida como agente oxidante de tioles.

2. Hipótesis

Dados los resultados previos analizados, la disminución de los niveles de glutatión (GSH) y el consecuente estrés oxidativo provocado en células HeLa debidos a tratamientos de exposición a diamida, deberían provocar una respuesta aguda en la expresión de genes antioxidantes. Al mismo tiempo, podrían dar lugar a un cambio en el patrón de modificaciones post-traduccionales (MPT) de histonas. Los posibles cambios diamida-dependientes podrían ser semejantes a los posibles cambios observados comparando las MPT de histonas entre fibroblastos humanos control con fibroblastos de paciente con síndrome de Werner, los cuales cursan con estrés oxidativo.

3. Objetivos

El objetivo a largo plazo es entender la relación entre la regulación de la expresión génica a nivel de MPT en histonas y la respuesta al estrés oxidativo presente en las células de pacientes con patologías progeroides como la de síndrome de Werner. En el presente trabajo lo que se pretende es corroborar o refutar la hipótesis planteada en el apartado anterior. Para ello se establecieron los siguientes objetivos:

1. Optimización de un protocolo de disminución de los niveles de glutatión mediante diamida en células HeLa.
2. Análisis de cambios en la expresión de genes antioxidantes y de regulación epigenética a nivel de modificaciones post-traduccionales en histonas derivados del tratamiento de disminución del GSH con diamida.
3. Comparación de las modificaciones en la expresión de proteínas antioxidantes y de las modificaciones post-traduccionales en histonas entre las células HeLa bajo los distintos tratamientos y fibroblastos de pacientes con síndrome de Werner.

4. Material y métodos

Para llevar a cabo el estudio se ha trabajado con distintas líneas celulares y se ha analizado el efecto celular de la diamida y del peróxido de hidrógeno tanto a largo plazo (24 horas) como a tratamientos cortos de 1 hora.

4.1. Cultivos celulares

Se ha trabajado con cuatro líneas celulares humanas de tipo adherente: una línea de adenocarcinoma cérvico-uterino (HeLa), y tres líneas de fibroblastos humanos (Coriell Institute for Medical Research, Camden, EE.UU.). A continuación, se resumen las características de los fibroblastos estudiados:

Tabla 1. Características de las líneas celulares de fibroblastos humanos.

Código	Línea celular	Sexo	Edad	Características clínicas
C1	GM01652	F	11	Sana
C2	GM08402	M	32	Sano
SW1	AG06300	M	37	Síndrome de Werner (mutación F1074L en el gen WRN) Envejecimiento prematuro a la edad de 35

C1: control 1, C2: control 2, SW1: Síndrome de Werner 1, F: femenino, M: masculino.

Para el mantenimiento de las líneas, éstas han sido cultivadas en frascos de 75 cm² a una densidad de siembra de $2,1 \times 10^6$ (28,000 células/cm²) en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) *high glucose* (Biowest, Riverside, MO, EE.UU.) suplementado en el caso de la línea HeLa con 10 % de suero bovino fetal (SBF) inactivado (Biowest, Riverside, MO, EE.UU.) y 1 % de penicilina/estreptomicina (P/S) (Biowest, Riverside, MO, EE.UU.). En el caso de los fibroblastos se ha suplementado el medio con un 15 % de SBF sin inactivar, 1 % de P/S y 1 % de L-glutamina (Biowest, Riverside, MO, EE.UU.). Los cultivos se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5 % humidificada (Incubadora NUAIRE, NU-4750E CO₂).

Las células se sembraron al alcanzar un 80-90 % de confluencia. Para ello la monocapa se despegó por tripsinización empleando 1 ml de tripsina (0,25 % tripsina - EDTA 1 mM en HBSS pH 8,0 con Rojo Fenol; Biowest, Riverside, MO, EE.UU.) durante 2 minutos a 37°C. Después se recogieron con 5 ml de DMEM *high glucose* suplementado (según la línea celular con los suplementos previamente especificados), se centrifugaron a 750 rpm durante 3 min y se resuspendió el botón celular en 1 ml de medio de cultivo para su conteo en cámara de Neubauer.

Todos los experimentos se realizaron en las instalaciones del Laboratorio CIBERer de la Universitat de València y toda preparación y manipulación tuvo lugar en condiciones de asepsia haciendo uso de cabinas de flujo laminar vertical de seguridad biológica tipo II (Telstar®). Paralelamente se comprobó mediante PCR la ausencia de contaminación por micoplasma.

4.2. Transfección celular

Una parte de las células HeLa empleadas se transfectaron con un plásmido no-integrativo denominado n-Grx1-roGFP2 (proporcionado por el doctor Meng-Er Huang, Instituto Curie, Orsay, Francia) sensible al estado redox (más información en el apartado 4.5.3). Para llevar a cabo la transfección, antes que nada, se debe preparar el aparato de electroporación (4D-Nucleofector™ Core Unit, Lonza Bioscience, Suiza), ya que es un proceso muy rápido y delicado. En el instrumento se indica el programa (CN114), mediante el uso de cubeta y para células HeLa. A continuación, se insertaron 10^6 células en medio de cultivo reducido en serum Opti-MEM (Biowest, Riverside, MO, EE.UU.) junto con $1 \mu\text{l}$ de plásmido ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) en una cubeta y se introdujo en el Nucleofector. Al cabo de dos segundos se retira la cubeta y, con la ayuda de la adición de $600 \mu\text{l}$ más de Opti-MEM, se traspara a otro recipiente con DMEM completo para su posterior siembra dependiendo del diseño del experimento. Tras 24 horas post-siembra, se puede observar la fluorescencia del plásmido.

4.3. Tratamientos

Con la finalidad de disminuir el glutatión intracelular en la línea HeLa, se expusieron las células a dos agentes oxidantes: diamida y agua oxigenada. Dependiendo del ensayo se expusieron las células durante 1 o 24 horas en un rango de concentraciones para el H_2O_2 de entre $7,5$ - $1000 \mu\text{M}$ y para la diamida de entre 10 - $2000 \mu\text{M}$. Se ha partido de stocks de $40000 \mu\text{M}$ para el peróxido de hidrógeno y de $20000 \mu\text{M}$ para la diamida preparando los tratamientos mediante diluciones seriadas con DMEM *high glucose* suplementado y en ningún caso excediendo el 5 % de stock en el tratamiento.

4.4. Ensayo de citotoxicidad: sulforodamina B

Para analizar el grado de citotoxicidad provocado por los tratamientos y seleccionar un rango de concentraciones adecuado, se utilizó la técnica de la sulforodamina B (SRB). La base del ensayo consiste en la tinción del contenido proteico total como medición de la viabilidad celular mediante SRB, colorante aminoxantano brillante de tonalidad rosada que sirve tanto para células en monocapa como en suspensión y analizable por espectrofotometría. Los dos grupos sulfónicos ($-\text{SO}_3^-$) presentes en la SRB forman uniones electrostáticas con los residuos

básicos de los aminoácidos presentes en las proteínas celulares bajo condiciones acídicas suaves. Por lo tanto, la absorbancia medida del colorante extraído de las células teñidas, es directamente proporcional a la masa celular (Vichai *et al.*, 2006).

Para llevar a cabo el análisis, se emplearon placas de 96 pocillos y a los pocillos centrales, con confluencias del 40 %, se les aplicó el tratamiento a diferentes concentraciones por triplicado. Las concentraciones finales en el último ensayo se acotaron para la diamida (50 μ M; 100 μ M; 200 μ M; 300 μ M; 400 μ M; 500 μ M; 1000 μ M; 2000 μ M) y fueron disueltas en 200 μ l y aplicadas en DMEM *high glucose* suplementado durante 24 horas.

Una vez finalizado el tratamiento, se fijaron las células con 50 μ l de ácido tricloroacético (TCA) al 10 % (Sigma-Aldrich, St Louis, EEUU) y se incubó la placa durante 1 hora a 4°C. Después de desechar el sobrenadante se lavó la placa 5 veces con agua del grifo y se dejó secar. Posteriormente se añadió 100 μ l de SRB (Sigma-Aldrich, St Louis, EEUU) por pocillo al 0,4 % (p/v) disuelto en ácido acético al 1 % y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras la tinción celular se procedió a retirar el exceso mediante lavados con ácido acético al 1 % y el colorante fijado se solubilizó con 100 μ l de tampón Trizma Base (Sigma-Aldrich, St Louis, EEUU) a 10 mM, dejando reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente en agitación suave. Finalmente, se midió la absorbancia en espectrofotómetro (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices) a las longitudes de onda de 570 nm y restando el ruido de fondo medido a 620 nm para cada pocillo. Se calculó el porcentaje de viabilidad y de inhibición celular mediante las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ supervivencia celular} = \frac{\text{ODmuestra} - \text{ODblanco}}{\text{ODneg control} - \text{ODblanco}} * 100$$

$$\% \text{ inhibición celular} = 100 - \% \text{ supervivencia celular}$$

Los resultados obtenidos se utilizaron para calcular la concentración que produce el 50 % de inhibición del crecimiento celular (CI_{50}) y se construyó la curva dosis respuesta representando el % de inhibición celular en la ordenada y las concentraciones del agente oxidante en la abscisa. La CI_{50} se determinó por regresión no lineal (modelo sigmoideo) y con ayuda del programa GraphPad PRISM versión 6.0.

4.5. Medida de los niveles de glutatión celular

Con el objetivo de comprobar la eficiencia de la disminución de los niveles de glutatión en las células HeLa, se emplearon distintas técnicas de medición relativa. En primer lugar, se estableció la concentración mínima eficiente mediante citometría de flujo, y posteriormente se

comprobaron los efectos observados mediante un kit comercial basado en fluorimetría. Finalmente, haciendo uso de una sonda específica de expresión transitoria, se midieron los niveles de glutatión nucleares mediante microscopia confocal.

4.5.1. Citometría de flujo: monoclorobimano

El monoclorobimano (mCB) es un fluorocromo que emite fluorescencia cuando se encuentra conjugado con el GSH, ya que es capaz de interactuar con los grupos tiol de los péptidos de bajo peso molecular a unas longitudes de onda de absorción/emisión máxima de 394/490nm. Mediante citometría de flujo se cuantificó la fluorescencia producida por este compuesto como indicativa de la presencia de GSH intracelular.

Previamente a la realización del ensayo, se trataron las células en suspensión durante 1 hora a distintas concentraciones de diamida en DMEM *high glucose* suplementado (30 μ M; 50 μ M; 75 μ M; 100 μ M; 150 μ M; 200 μ M) por triplicado. Tras media hora de tratamiento se añadió 1 μ l de mCB 4 mM obteniendo una concentración final de 10 μ M. Al finalizar el tiempo de una hora de tratamiento y 30 minutos con mCB, se centrifugaron las células a 800 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en 200 μ l de DMEM *high glucose* suplementado pasando las muestras a una placa de 96 pocillos para su posterior medida en citómetro de flujo (FORTESSA BD FACSDIVA 8.0.1). Antes de proceder a la lectura mediante el láser violeta BV421, se aplicó 2,5 μ l de ioduro de propidio (IP) a cada pocillo y se esperó 5 minutos para poder observar al mismo tiempo las células muertas. El primer paso correspondiente al análisis de los resultados fue ajustar la medida al tamaño celular (en este caso HeLa) mediante los láseres *Forward Scatter* (FSC) y *Side Scatter* (SSC) que detectan la dispersión frontal y lateral respectivamente con la finalidad de caracterizar las células por forma y tamaño obviando tanto las células agregadas, como los restos celulares. Este ajuste se realizó en células sin tratar con diamida ni con mCB. A continuación, representando en un mismo gráfico la fluorescencia detectada con el láser BV421 y el FSC, se comprobó que la fluorescencia emitida por células tratadas únicamente con mCB fuera mayor a las células sin tratar ya que éstas se denominan AUTO por la auto-fluorescencia que emiten per sé. Además, se estableció la fluorescencia umbral para BV421, por encima de la cual las células sin tratar podían estar presentes, con la finalidad de observar el porcentaje celular de la población afectada en cuanto a la concentración de GSH. Al mismo tiempo se analizaron las medias de fluorescencia por BV421 para correlacionarlo con la disminución del GSH celular.

En paralelo a la medición de GSH por mCB, se midió la muerte celular por IP mediante la correlación establecida por FSC junto con PE-Cy7 (*Phycoerythrin-Cyanine 7*; fluorocromo

conjugado en tándem excitado a 486-575nm y con emisión entre 750-810nm), asumiendo que la población celular que emite fluorescencia por IP pertenece a células muertas (Newbold, *et al.*, 2014). Este último factor es de relevancia ya que para poder trabajar posteriormente con células con baja concentración de GSH, deben sobrevivir en esas condiciones. Finalmente, para comparar los niveles de GSH se normalizó la fluorescencia obtenida con la autofluorescencia de las muestras control y se extrapoló la proporción de fluorescencia resultante teniendo en cuenta que la fluorescencia de las células sin tratamiento oxidativo equivale al 100% de los niveles de GSH.

4.5.2. Fluorimetría

Una vez se acotó el rango de acción de la diamida como oxidante de GSH en tratamientos de 1 hora para células HeLa, se comprobó el efecto mediante un kit fluorimétrico: “*DetectX Glutathione kit*” (Arbor Assays, Michigan, EE.UU.). El objetivo del ensayo es cuantificar en una primera medida de fluorescencia el GSH libre, para a continuación añadir a las muestras un reactivo que contiene la enzima glutatión reductasa y su cofactor NADPH para liberar el GSH que se encuentre formando enlaces disulfuro (y por lo tanto en forma oxidada), para poder así cuantificar el glutatión total y establecer la proporción GSSG/GSH.

En primer lugar, se tripsinizaron células a un 80 % de confluencia, se contaron haciendo uso de una cámara de Neubauer y se prepararon alícuotas de 500.000 células. A continuación, se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos y se les añadió por triplicado tratamientos de 200 μ M de diamida en medio suplementado o tratamiento de H₂O₂ en una concentración de 500 μ M como control positivo. Pasada la hora de tratamiento, se centrifugaron las células de nuevo a 1000 rpm durante 5 minutos, se hizo un lavado con PBS 1x y se volvieron a centrifugar. Una vez retirado todo el sobrenadante, se añadieron 50 μ L de ácido 5-sulfosalicílico (SSA) al 5 % y se resuspendió mediante pipeteo, lo que permitió la rotura mecánica de las células y la agregación de las proteínas. A continuación, se incubaron a 4°C durante 10 minutos. Pasado ese tiempo, se agitaron las muestras en vórtex y se centrifugaron durante 10 minutos a 14000 rpm a una temperatura de 4°C. Tras la centrifugación se trasvasó el sobrenadante a un tubo nuevo diluyendo las muestras 1:5 con el tampón de ensayo proporcionado por el kit. El pellet resultante se resuspendió en 50 μ l de NaOH y se cuantificó mediante el método Bradford para poder normalizar posteriormente los resultados obtenidos en base a la cantidad de proteína total de cada muestra.

En una placa de 96 pocillos se añadieron 50 μ l de las muestras, los estándares preparados de forma seriada y los controles usando como blanco 50 μ l de diluyente. Al resto de pocillos se

añadió 25 µl de ThioStar Reagent, se agitaron suavemente y se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente, tras los cuales se midió la señal de fluorescencia en un fluorímetro spectraMAX GEMINI (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) a una longitud de onda de emisión de 510 nm, y registrando a 396 nm de excitación. Este valor corresponde a la concentración de GSH libre. Para la obtención de la concentración de GSH total se añadieron 25 µl de una mezcla de reacción aportada por el kit, dejándose a temperatura ambiente durante 15 minutos y midiendo la fluorescencia a 510 nm con excitación de 396 nm de nuevo.

La cantidad de GSSG se obtuvo aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{GSSG} = (\text{GSH}_{\text{total}} - \text{GSH}_{\text{libre}}) * 2$$

Para la obtención del cociente GSSG/GSH, se dividieron los valores correspondientes a ambas medidas, y se multiplicaron por 100.

4.5.3. Microscopía confocal: n-Grx1-roGFP2

Con la finalidad de comprobar que las posibles variaciones en los niveles de GSH son reproducibles en tratamientos en placa y que los niveles nucleares se ven comprometidos, se empleó una técnica basada en microscopia confocal puesta a punto por una de las compañeras en el grupo de investigación, Laura Robles.

Primeramente, se transfectaron las células HeLa siguiendo el protocolo detallado en el apartado 4.3. con el plásmido n-Grx1-roGFP2 sensible al estado redox nuclear. El plásmido no es integrativo por lo que presenta expresión transitoria en el núcleo gracias a una señal nuclear. Se trata de un sensor ratiométrico que permite adquirir información fluorescente mediante su excitación en dos longitudes de onda equivalentes al estado químico del glutatión (405 nm para GSSG y 488 nm para GSH). Para ello, la fluorescencia de GFP va ligada a la actividad de GRX1 permitiendo el equilibrio redox entre la sonda y el glutatión debido a la interacción de GRX1 con GSSG que posteriormente S-glutationila roGFP2 creando un puente entre sus dos cisteínas (C147-C204) de forma reversible.

Tras 24 horas post-transfección, se trataron las células con 200 µM de diamida, en medio sin rojo fenol para no interferir la fluorescencia, durante una monitorización de 30 minutos de ambas longitudes de onda previamente detalladas.

Finalmente, las fotografías fueron densitometradas y analizadas las ratios mediante el uso del programa ImageJ.

4.6. Obtención de extractos

Se llevaron a cabo dos protocolos de extracción distintos, para analizar por un lado los niveles de expresión de proteínas a partir de extractos totales, y, por otro lado, las modificaciones post-traduccionales en histonas a partir de extractos celulares enriquecidos en histonas. Dependiendo de la procedencia de las muestras se trabajó a partir de un pellet celular lavado con PBS 1x (cuando se trataron las HeLa en suspensión o en el caso de los fibroblastos), o a partir de una placa p100, cuando se recogió muestra de células HeLa tratadas adheridas.

4.6.1. Extractos proteicos totales

Para la obtención de las proteínas totales de las muestras se preparó un tampón de lisis con los siguientes componentes: HEPES pH 7,4 20 mM, NaCl 100 mM, tritón X-100 1 %, NaF 50 mM, β -glicerofosfato 10 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM, ortovanadato 10 μ l/ml de tampón, cóctel inhibidor de proteasas (PIC) 2 μ l/ml de tampón y la cantidad de agua MiliQ necesaria según las soluciones madre de la que parten los componentes.

Se añadieron 150 μ l de tampón de lisis y se resuspendió bien los botones celulares y, en el caso de las extracciones en placa, se rascaron mecánicamente con la ayuda de un *scraper* y se pasó la solución a tubos eppendorf de 1'5 ml. Seguidamente se incubaron en hielo durante 15 minutos agitando las muestras de vez en cuando. A continuación se agitaron en vórtex intensamente durante 30 segundos antes de centrifugar las células durante 10 minutos a 13000 g a 4 °C. Para finalizar, se guardó el sobrenadante a -20 °C.

4.6.2. Extractos de histonas

Para la obtención de las histonas se preparó un tampón de lisis hipotónico con los siguientes componentes: Tris-HCl 10 pH 8 10 mM, KCl 1 mM, MgCl₂ 1,5 mM y 1 mM de DTT. Las muestras centrifugadas y lavadas con PBS 1x se resuspendieron en 1 ml de tampón con la adición de ortovanadato 10 μ l/ml de tampón y PIC 2 μ l/ml de tampón. Se incubaron 30 minutos en rotación constante a 4 °C. A continuación, se centrifugaron 10 minutos a 10000 rpm a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Los botones celulares se resuspendieron en 400 μ l de H₂SO₄ 0,4N y se dejó en rotación a 4 °C durante toda la noche.

Al día siguiente se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 13000 rpm a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a nuevos tubos con la adición de 132 μ l de ácido tricloroacético (TCA) al 100% para que las histonas precipiten. Agitando de vez en cuando se dejaron en hielo durante 30 minutos y luego se centrifugaron las muestras de nuevo durante 10 minutos a 13000 rpm a 4 °C. Seguidamente se lavaron un par de veces los pellets resultantes con 0,5 ml

de acetona centrifugando las muestras cada vez durante 10 minutos a 13000 rpm. Finalmente, se resuspendió en H₂O MiliQ mediante agitación vigorosa.

4.7. Cuantificación de proteínas

El método que se ha llevado a cabo para cuantificar las proteínas es el método de Bradford (Bradford, 1976), basado en el cambio de coloración del reactivo Bradford (5 mg de Azul de Coomassie G-250, 2,5 ml de etanol, 5 ml de ácido fosfórico y agua MiliQ hasta 50 ml) bajo un entorno proteico. La intensidad del color azul en ambiente hidrofóbico es directamente proporcional a la cantidad de proteína de la muestra.

Para poder saber los gramos que hay en una muestra se preparan diluciones seriadas de concentración conocida de sero-albúmina bovina (bovin seroalbumin; BSA): 10 µg/µl; 6 µg/µl; 4 µg/µl; 2 µg/µl; 1 µg/µl; 0,75 µg/µl; 0,5 µg/µl; 0,25 µg/µl; 0 µg/µl. Se midieron por triplicado los puntos de la recta patrón y las muestras a analizar. Para ello se utilizó una placa de 96 pocillos y se introdujo en cada pocillo 200 µl de reactivo Bradford diluido 1:5 con agua MiliQ y 1 µl de muestra o punto de la recta patrón. Pasados 5 minutos de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. Una vez recogidos los resultados, se extrapolaron los µg de las muestras en la ecuación de la recta obtenida representando en el eje x los µg conocidos introducidos y en el eje y la absorbancia medida.

4.8. Análisis de proteínas por western blot

A cada muestra de extracto de proteínas se le añadió 5µl de tampón de carga LDS (Tris 40 mM, EDTA, azul de bromofenol 0,01 %, sacarosa 40 %, SDS 4 %, β-mercaptoetanol 10 %) en un volumen final de 25 µl. Antes de cargar las muestras en el gel de poliacrilamida, se desnaturalizaron por incubación durante 5 minutos a 95 °C. Se cargaron 20 µg por pocillo para el análisis de proteínas totales, mientras que los extractos de histonas se ajustaron a 2 µg por pocillo.

Para la separación de las proteínas se prepararon geles separadores al 15 % (2,75 ml agua MiliQ, 3 ml acrilamida al 40 %, 2,08 ml de solución II (Tris-HCl 1 M a pH 6,8 i SDS al 0,4 %), 160 µl de persulfato de amonio (APS) al 10 % i 9,6 µl de TEMED) con un gel apilador previo al 4,5 % (1,87 ml de agua MiliQ, 3337,5 ml de acrilamida al 40 %, 750 µl de solución III (Tris-HCl 2 M pH 6,8, SDS 20 %), 100 µl de APS al 10 % y 6 µl de Tetrametiletildiamina (TEMED)). Se sumergieron los geles en una cubeta (BRAND, Wertheim, Alemania) y se cubrió con un tampón (running buffer: Tris 25 mM, Glicina 190 mM, SDS 0,1 %, pH 8,3). Se aplicaron 80 V hasta pasar

el gel apilador y se mantuvo aproximadamente 1 hora a 120 V. Para la transferencia de las muestras del gel a la membrana de nitrocelulosa (*Nitrocellulose Blotting Membrane* 0,45 μm , GE Healthcare Life Sciences), se prepararon los geles junto con las membranas entre papel whatman y esponjas dejando el montaje sumergido en tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20 %, pH 8,3) durante 1 hora a 100 V y a 4 °C. Se tiñó el gel con azul comassie (*Coomassie Brilliant Blue G-250*, BIO-RAD) para comprobar tanto la carga de las muestras como la eficiencia de la transferencia. A continuación, se bloquearon las membranas durante 1 hora en agitación; las membranas con muestras de histonas se bloquearon con BSA al 5 % en TBS-Tween 20 (Tris-HCl 20 mM 150 mM NaCl, Tween 0,1 %, pH 7,5) y las del resto de muestras con leche desnatada al 5 % en TBS-Tween. A continuación, se incubaron las membranas toda la noche a 4 °C en agitación suave con los anticuerpos primarios específicos diluidos en la solución de bloqueo. Los anticuerpos empleados fueron los siguientes: β -actina (1:1000, Santa Cruz BioTech, USA), MnSOD (1:1000, Stressgen, Ann Arbor, MI, EE.UU.), catalasa (1:1000, Sigma, St. Louis, EE.UU.), GPX1 (1:750, Abcam, Cambridge, Reino Unido), TRXR1 (1:1000, Cell Signaling, Danvers, EE.UU.), PRDX6 (1:1000, Abcam, Cambridge, Reino Unido), PRDX6-SO3 (1:1000, Abcam, Cambridge, Reino Unido), H2AX (1:5000, Abcam, Cambridge, Reino Unido), γ H2AX (1:5000, Abcam, Cambridge, Reino Unido), H3 (1:1000, Cell Signaling, Danvers, EE.UU.), H3K9me3 (1:1000, Abcam, Cambridge, Reino Unido), H3K27me3 (1:1000, Abcam, Cambridge, Reino Unido), H3K79me3 (1:1000, Abcam, Cambridge, Reino Unido), H3K9ac (1:1000, Cell Signaling, Danvers, EE.UU.), H3K27ac (1:1000, Abcam, Cambridge, Reino Unido), H4 (1:1000, Cell Signaling, Danvers, EE.UU.), H4K8ac (1:1000, Cell Signaling, Danvers, MA). Al día siguiente se hicieron 3 lavados de 5 minutos con TBS-Tween y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente –anti-ratón (1:7500, Calbiochem, EE.UU.) o anti-conejo (1:2500, Cell Signaling, Danvers, EE.UU.) ambos de cabra y conjugados con el enzima peroxidasa de rábano- en agitación suave. Pasado ese tiempo, se realizaron otros tres lavados con TBS-Tween y se procedió a la detección quimioluminiscente mediante la incubación de las membranas con los reactivos del kit de revelado ECL™ *Western Blotting Detection Reagents* (Amersham GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Suecia) mezclados 1:1 durante 5 minutos y se detectó la señal gracias al escáner (*Image Quant LAS-4000, General Electrics*). Las imágenes obtenidas se densitometraron haciendo uso del programa ImageJ.

4.9. Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado, y los resultados de los mismos se muestran en forma de media \pm error estándar de la media (SEM). Dependiendo del análisis se han comprobado que los cambios son significativos mediante test ANOVA (para comparar

todas las medias entre sí) o T-student (para comparar la condición control con cada una de las otras medias). En todo test aplicado se ha considerado estadísticamente significativos aquellos contrastes con un valor de p inferior a 0,05. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo con el software GraphPad 6.0.

5. Resultados

El objetivo principal del presente trabajo se basa en el análisis de la relación entre los niveles de estrés oxidativo regulados por glutatión y las modificaciones epigenéticas a nivel de histonas. Para ello, el primer paso consistió en la optimización de un método de inhibición del glutatión celular que no afectase de manera significativa a la viabilidad celular.

5.1. Estudio de la citotoxicidad mediada por diamida en células HeLa

Se escogió la diamida para disminuir los niveles de GSH mediante su oxidación directa y el H_2O_2 como agente oxidante control. Ambas sustancias han sido empleadas en distintos estudios con anterioridad, y utilizadas por miembros de nuestro grupo de investigación; sin embargo, la sensibilidad a dichas sustancias puede variar según cada tipo celular y por ese motivo decidimos testar la citotoxicidad del agente diamida mediante ensayo por SRB (Kosower *et al.*, 1995) (Mironova *et al.*, 2014).

Los resultados representados en la figura 10 muestran el porcentaje de inhibición del crecimiento celular tras 24 horas de tratamiento a diferentes concentraciones de diamida. Se obtuvo una media de crecimiento inhibitorio del 50% (CI_{50}) a la concentración de 300 μM .

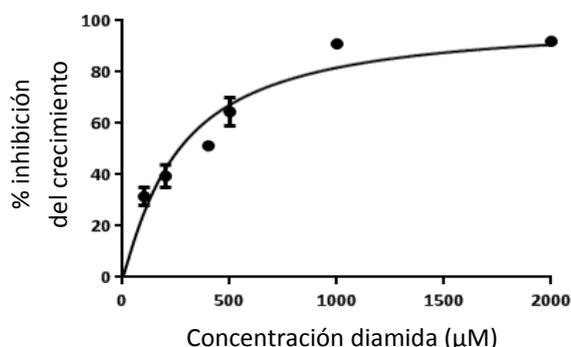


Figura 10. Inhibición del crecimiento celular producida por la adición de diamida. El mismo número de células se incubó en ausencia o en presencia de concentraciones crecientes del compuesto, y la viabilidad celular se estimó en función del ensayo colorimétrico basado en sulfurodamina B como se describe en el tercer apartado de "Material y métodos". Los resultados se muestran como porcentaje de inhibición del crecimiento celular, tomando como 0% el obtenido para la condición control.

Los experimentos para comprobar los efectos de la disminución de GSH requieren de tratamientos a corto plazo. Por este motivo, y en base a los resultados obtenidos, se establecieron tratamientos de 1 hora y en un rango de concentraciones de entre 30-200 μM . En el caso del H_2O_2 , se siguió la bibliografía para establecer concentraciones entre 100-1000 μM .

5.2. Análisis de los niveles de glutatión

Para poder cuantificar el efecto de los tratamientos sobre los niveles de glutatión, se han llevado a cabo distintas técnicas.

5.2.1. Citometría de flujo

Mediante citometría de flujo se utilizó la fluorescencia producida por mCB para determinar el glutatión celular detectada por el láser BV421. Esta técnica permite a su vez la medición en paralelo de fluorescencia de ioduro de propidio gracias al láser PE-Cy7, para estimar la muerte celular en las condiciones ensayadas.

Las células se trataron en suspensión durante 1 hora con distintas concentraciones de diamida, mCB (exceptuando las AUTO para detectar la autofluorescencia) y con IP, tal y como se especifica en el correspondiente apartado de “Material y métodos”. Para poder estimar el porcentaje poblacional positivo para la disminución de GSH (equivalente a la disminución de la fluorescencia de mCB) se delimitaron las poblaciones celulares observadas en la figura 11.

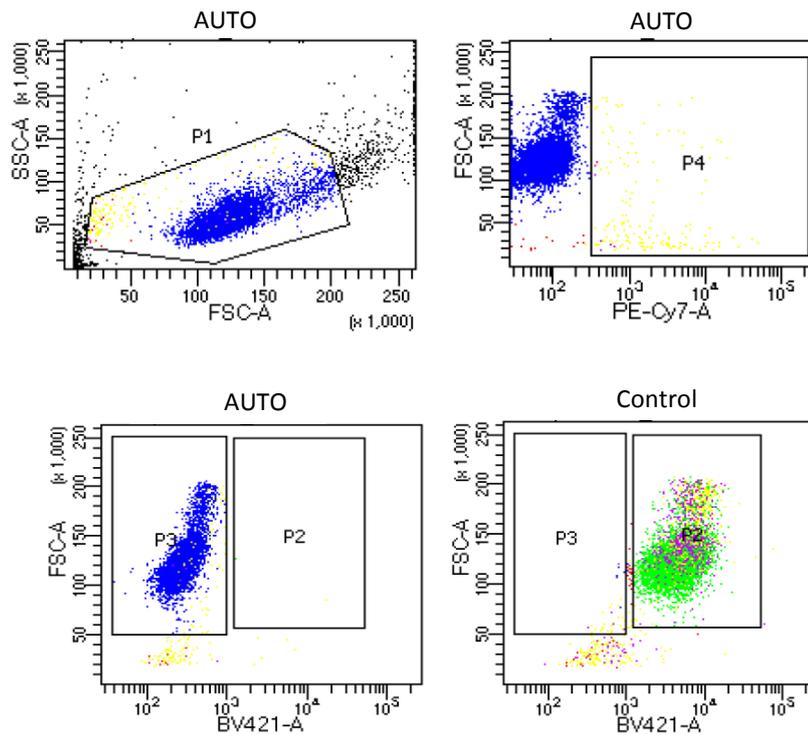


Figura 11. Delimitación de poblaciones. Gráficas obtenidas por citómetro de flujo al pasar células HeLa control sin tratamiento de agente oxidante ni mCB (AUTO) para determinar la morfología correcta (P1), la muerte celular (P4) y comprobar que la autofluorescencia (P3) es distinguible a la fluorescencia emitida bajo tratamiento de mCB (P2 en Control). Las células con mCB y tratamiento observadas en la región P3 se consideran positivas para niveles disminuidos de GSH.

En base a las poblaciones delimitadas, considerando positivas para la disminución de GSH aquellas con emisión de fluorescencia por mCB situada en la región P2, se calculó el porcentaje de células vivas y positivas para disminución de los niveles de GSH (figura 12) tras el tratamiento con concentraciones crecientes de diamida (30-200 μM).

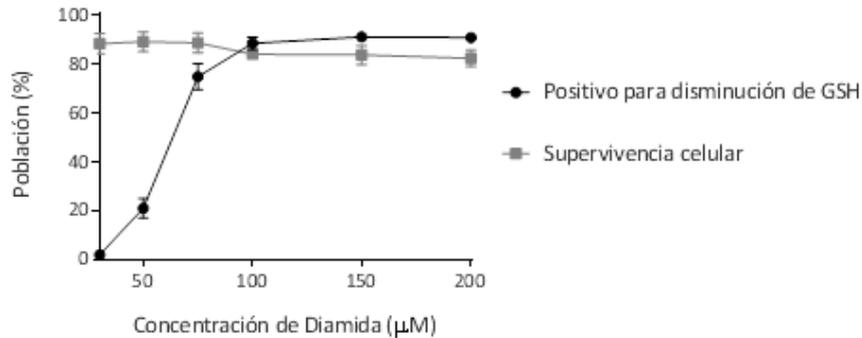


Figura 12. Análisis de las poblaciones. Representación del porcentaje poblacional considerados con disminución de los niveles de GSH y del porcentaje de supervivencia al tratamiento según las concentraciones de diamida escogidas (media \pm SEM).

Tal y como muestra la figura 12, con tratamientos de hasta 200 μM de diamida durante 1 hora en suspensión, no se observa una supervivencia celular menor al 80%. En cuanto a la población categorizada con niveles disminuidos de GSH, ésta va aumentando gradualmente hasta parecer estabilizarse en torno al 90% a partir del tratamiento con 100 μM de diamida. A continuación, se representa en la figura 13 el porcentaje de intensidad de fluorescencia del mCB obtenido de las células HeLa tratadas durante 1 hora bajo las distintas concentraciones de diamida, estableciendo la intensidad de fluorescencia control como el 100% de GSH.

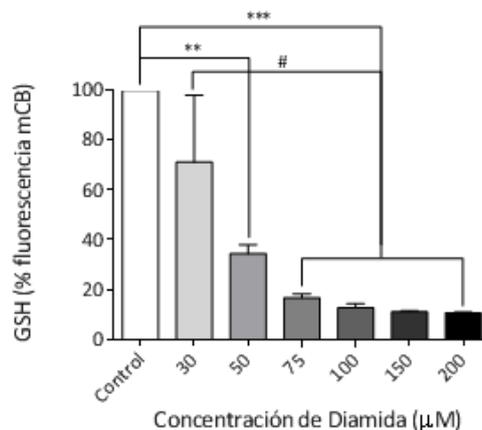


Figura 13. Reducción de los niveles de GSH celulares tras el tratamiento con diamida. Niveles de GSH normalizados con la autofluorescencia celular y estableciendo como 100% de los niveles a la fluorescencia por mCB detectada en células no expuestas a diamida (Control). Análisis de significatividad mediante test ANOVA obteniendo (#) un p-valor $<0,05$ en 30 μM respecto a 75 μM ; 100 μM ; 150 μM y 200 μM , (**) un p-valor $<0,01$ en 50 μM respecto el control y (***) un p-valor $<0,001$ con tratamientos a partir de 75 μM de diamida respecto al control. Tratamientos en suspensión de 1 hora.

Como se puede observar en la figura 13 a partir de 50 μM de diamida se observa una concentración de GSH significativamente inferior a la registrada para las células control, estabilizándose los niveles de GSH entorno a un 10% respecto a las células sin tratar conforme se va aumentando la concentración.

5.2.2. Fluorimetría

Con la finalidad de corroborar la oxidación de GSH a GSSG, y el consiguiente aumento de la proporción GSSG/GSH, se usó el kit “*DetectX Glutathione kit*” (Arbor Assays, Michigan, EE.UU.) siguiendo las instrucciones especificadas en el apartado 4.4.2. A pesar de repetir el ensayo, hubo problemas con el GSH basal dificultando el cálculo de las proporciones GSSG/GSH. No obstante, en los resultados normalizados del nivel de GSH libre (figura 14), se puede observar una posible tendencia a disminuir, aunque en ningún caso es significativo en los tratamientos testados.

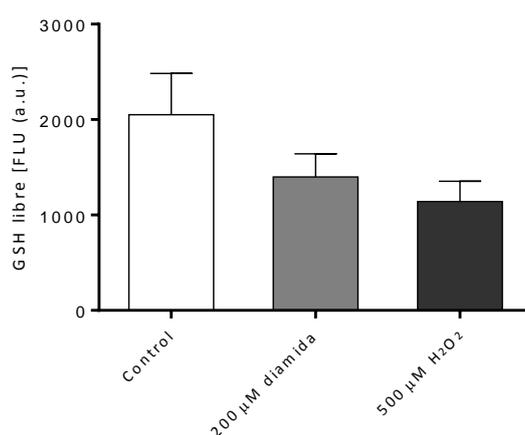


Figura 14. Representación de los resultados de GSH libre normalizados en las distintas condiciones de tratamientos de 1 hora en suspensión. Análisis estadístico test ANOVA.

Por lo tanto, mediante este kit fluorimétrico se observa una tendencia al descenso del nivel de GSH libre.

5.2.3. Microscopía confocal

Además de los niveles totales de GSH celular, en el contexto de la regulación génica ya comentada en la introducción reviste gran relevancia conocer los niveles de GSH nucleares. Para ello, se utilizó el plásmido n-Grx1-roGFP con localización nuclear, para su transfección en células HeLa de cara a monitorizar los cambios entre el GSH y GSSG en el núcleo. En la figura

15 se puede observar el cambio de fluorescencia entre dos células control y una célula tratada con 200 μ M de diamida a x63 aumentos, pasados 30 minutos de tratamiento con diamida.

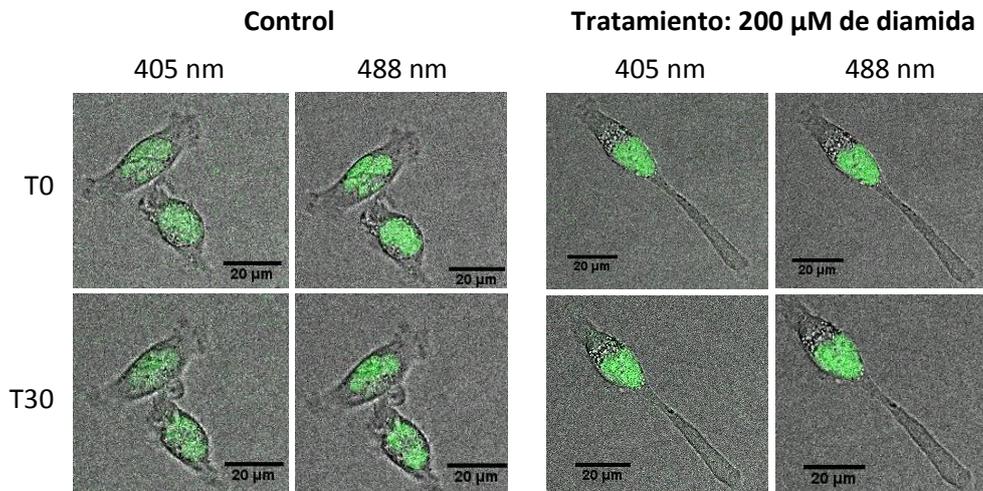


Figura 15. Fotografías superpuestas del contraste de fases junto con la fluorescencia detectada en cada longitud de onda. 405 nm equivaldría a la detección de GSSG y 488 nm a GSH. Las mediciones corresponden al tiempo inicial (T0) y pasados 30 minutos bajo las condiciones pertinentes (T30). El aumento es de 63x.

En la siguiente figura (figura 16) se puede observar los resultados numéricos tras densitometrar con la ayuda del programa ImageJ.

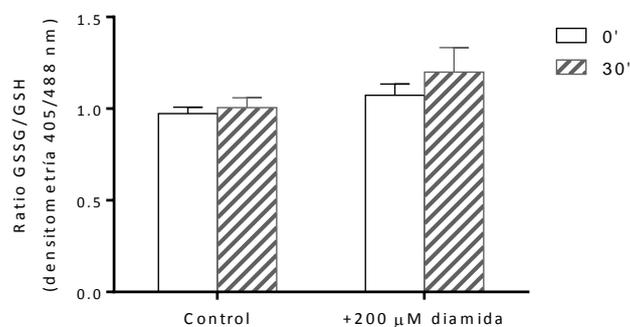


Figura 16. Comparación del cambio en el tiempo de las ratios 405/488 nm como medición de GSSG/GSH. Representación densitométrica mediante ImageJ de n=3 en cada grupo (media \pm SEM) y test T-student entre tiempos de cada condición y entre condiciones.

Tal y como se puede observar en la gráfica anterior (figura 15), la proporción GSSG/distribución de GSH se mantiene constante pasados 30 minutos en el caso de las células control. Bajo tratamiento con diamida, las células tienden a aumentar la proporción GSSG/GSH aunque los resultados no llegan a ser estadísticamente significativos tras 30 minutos expuestas a 200 μ M de diamida.

5.3. Expresión de proteínas antioxidantes

Para poder comparar el estado de los sistemas antioxidantes según el tratamiento establecido, se realizó un análisis de la expresión de diferentes proteínas implicadas en la respuesta antioxidante celular mediante WB. En primer lugar, se analizó el estado de los sistemas antioxidantes en las células HeLa según el tratamiento, teniendo en cuenta las condiciones utilizadas en los apartados anteriores. Debido a que la citometría de flujo se realizó con los tratamientos en suspensión y la microscopía confocal se llevó a cabo con las células adheridas para poderlas visualizar y monitorizar, se realizaron los análisis para ambos tipos de tratamientos (en placa y en suspensión). En la figura 17 se muestra el resultado obtenido para las enzimas estudiadas según los distintos tratamientos con H₂O₂ (MnSOD y TRXR1), mientras que en la figura 18, según condiciones con diamida (MnSOD, CAT, GPX1 y PRDX6-SO3).

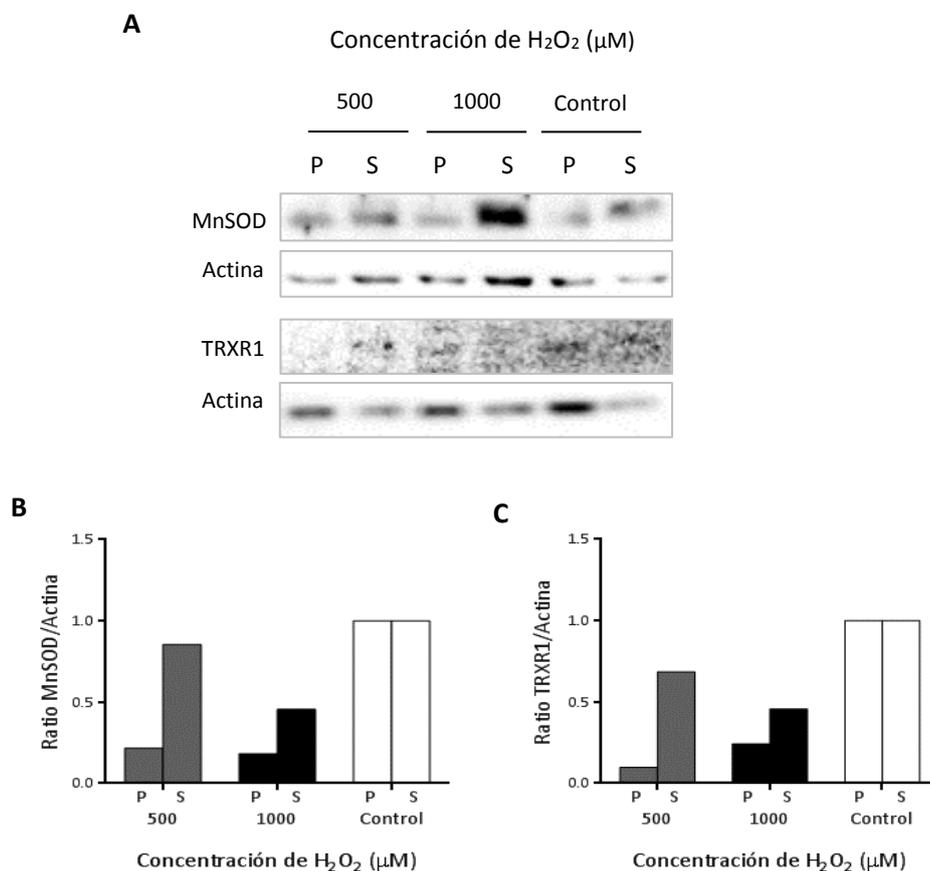


Figura 17. Análisis de los WB en distintas condiciones de HeLa para MnSOD y TRXR1. Representación densitométrica mediante ImageJ de: (A) revelado de las membranas; (B) ratio de MnSOD/Actina y (C) ratio TRXR1/Actina. P: tratamiento en placa, S: tratamiento en suspensión.

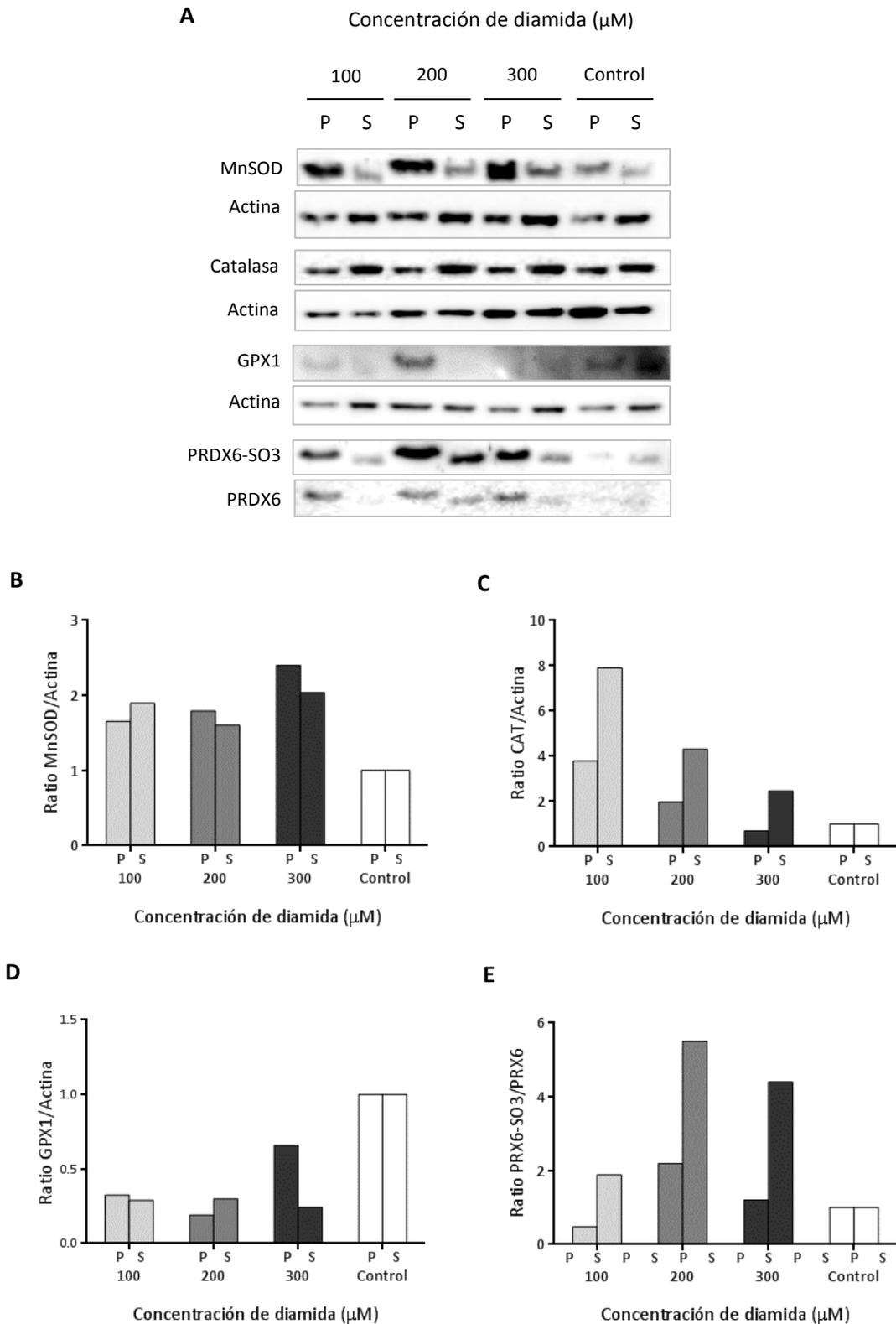


Figura 18. Análisis de los WB en distintas condiciones de HeLa para MnSOD, CAT, GPX1 y la forma oxidada de PRDX6. Representación densitométrica mediante ImageJ de (A) revelados, (B) ratio de MnSOD/Actina, (C) ratio CAT/Actina, (D) ratio de GPX1/Actina y (E) ratio de PRDX6-SO3/PRDX6. P: tratamiento en placa, S: tratamiento en suspensión.

Independientemente de las condiciones de ensayo (tanto si los tratamientos se han realizado en placa como en suspensión) se observan las mismas tendencias para diamida y para H₂O₂, aunque en este último caso parece obtenerse un mayor efecto en placa. En el caso de MnSOD, para todas las concentraciones se observa un aumento frente al control tras tratamientos con diamida y se observa una disminución frente al control al tratar con H₂O₂. CAT, por el contrario, parece ser inversamente proporcional al aumento de dosis de diamida, pero en el revelado la actina se presenta con una intensidad gradual en las muestras intuyéndose probables errores técnicos. GPX1 parece estar disminuido desde las concentraciones más bajas de diamida, aunque parece tender a restablecerse; y la forma oxidada de PRDX6 para el mismo agente oxidante, aumenta con la dosis aplicada de forma más notoria para los tratamientos en suspensión. Finalmente, TRXR1 disminuye de la misma forma que MnSOD al aplicarse H₂O₂.

Previamente en el grupo (Seco-Cervera *et al.*, 2014) se estudió el estado de las proteínas antioxidantes en fibroblastos obtenidos de pacientes con SW, resumidos en la siguiente tabla (tabla2).

Tabla 2. Comparación de la expresión relativa y actividad enzimática de SW1 (AG06300) frente a C2 (GM08402).

	CuZnSOD	MnSOD	CAT	GPX1	GPX4	TRX1	TRX2
Expresión relativa	ss	si	ns	si	ns	ns	ss
Actividad enzimática	si	si	ns	ns	ns	-	-

ns: no significativo, ss: significativamente superior, si: significativamente inferior y -: falta de datos.

Fuente: Seco-Cervera *et al.*, 2014.

En este trabajo se ha analizado el comportamiento de dos enzimas más (TRXR1 y PRDX6). Tal y como se puede observar en la figura 19, no se han encontrado cambios significativos en las proteínas estudiadas, TRXR1 y la forma oxidada de PRDX6 (PRDX6-SO₃), entre las distintas líneas celulares (SW, procedente de paciente; y C1-C2, procedentes de donante sanos).

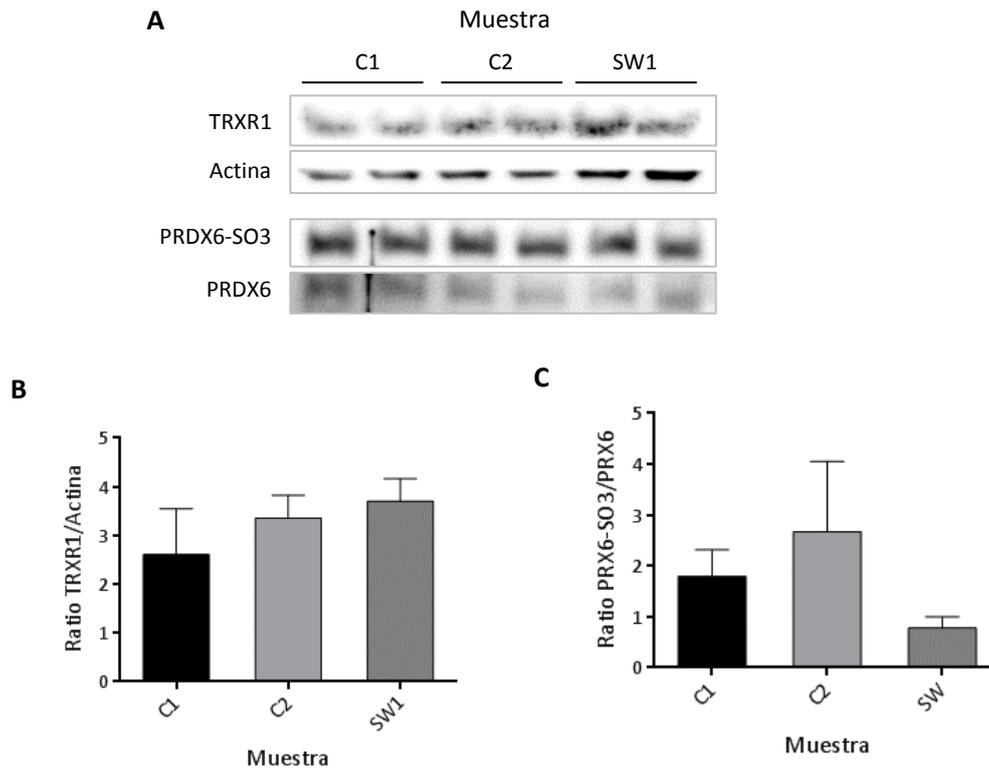


Figura 19. Análisis de los WB en fibroblastos para TRX1 y la oxidación de PRDX6. Representación densitométrica mediante ImageJ (media \pm SEM) de (A) revelados obtenidos, (B) la ratio de TRX1/Actina y (C) la ratio PRDX6-SO3/PRDX6. Análisis estadístico ANOVA. C1: control 1, C2: control 2, SW1: Síndrome de Werner 1

5.4. Modificaciones post-traduccionales de histonas

Con el propósito de encontrar patrones epigenéticos característicos del síndrome de Werner y/o consecuentes con los resultados observados tras la disminución de GSH, se han analizado por WB distintas MPT de histonas tanto en las células HeLa tratadas como en las líneas celulares control y de pacientes. Inicialmente se muestran los resultados de las MPT de histonas dependientes del estrés oxidativo provocado. En el caso de las células HeLa sometidas a tratamientos de 1 hora con diamida y H_2O_2 , las modificaciones estudiadas fueron la fosforilación de la serina 139 de la histona H2AX (figura 20), las trimetilaciones de las lisinas 9, 27 y 79 de la histona H3 y la acetilación de la lisina 8 de la histona H4 (figura 21). Al presentar las mismas tendencias habiendo tratado las células tanto en placa como en suspensión, se presentan únicamente los resultados obtenidos en placa.

La marca de γ H2AX, relacionada con el daño al ADN, tiende a aumentar en el tratamiento con 1000 μ M de H_2O_2 durante 1 hora en placa. Por el contrario, la diamida no parece afectar a esta MPT en la condición analizada.

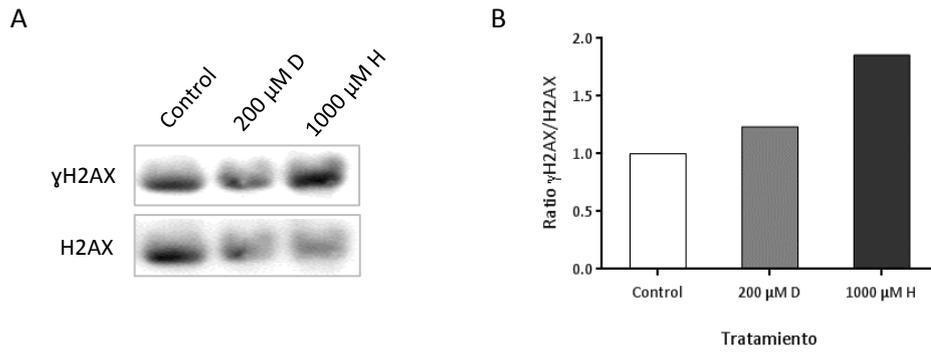


Figura 20. Análisis de los WB en distintas condiciones de HeLa para la fosforilación de la serina 139 de la histona H2AX. Representación densitométrica mediante ImageJ de (A) revelados obtenidos y (B) la ratio de γ H2AX/H2AX. D: diamida, H: peróxido de hidrógeno.

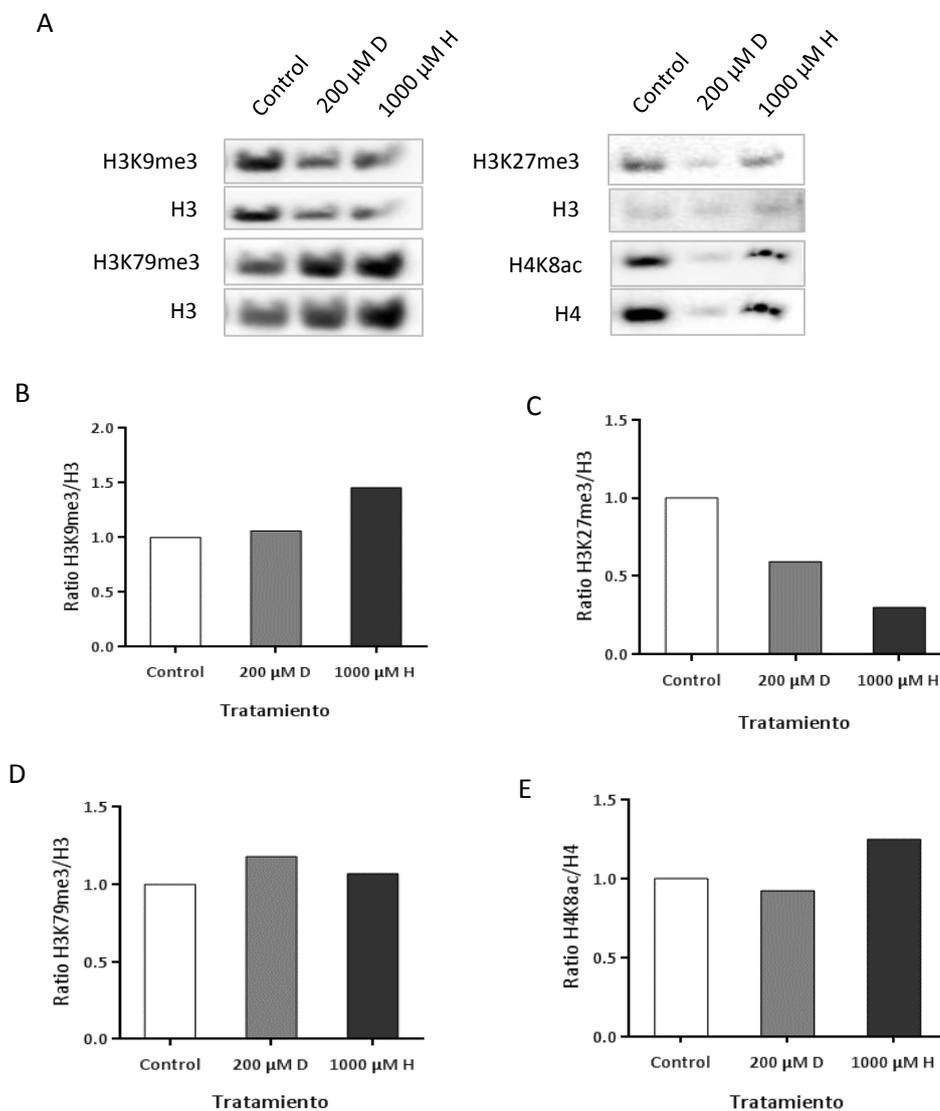


Figura 21. Análisis de los WB en distintas condiciones de HeLa para las trimetilaciones de las lisinas 9, 27 y 79 de la histona H3 y acetilación de la lisina 8 de la histona H4. Representación densitométrica mediante ImageJ de (A) revelados obtenidos, (B) la ratio de H3K9me3/H3, (C) la ratio de H3K27me3/H3, (D) la ratio de H3K79me3/H3 y (E) la ratio H4K8ac/H4. D: diamida, H: peróxido de hidrógeno.

El estrés oxidativo provocado por el H₂O₂ según la figura 21, parece aumentar los casos de trimetilación de la lisina 9 de H3, mientras que H3K27me3 tiende a descender. H3K79me3 y H4K8ac no parecen verse influenciadas por la acción de la diamida, aunque sí que tiende a aumentar H4K8ac cuando se trata con 1000 μM de H₂O₂ durante 1 hora en placa.

A continuación, se han analizado las siguientes MPT en las líneas celulares de fibroblastos: γH2Ax (figura 22), trimetilación de las lisinas 9, 27 y 79 de la histona H3 (figura 23) y las acetilaciones de las lisinas 9 y 27 de la histona H3 y 8 de la H4 (figura 24).

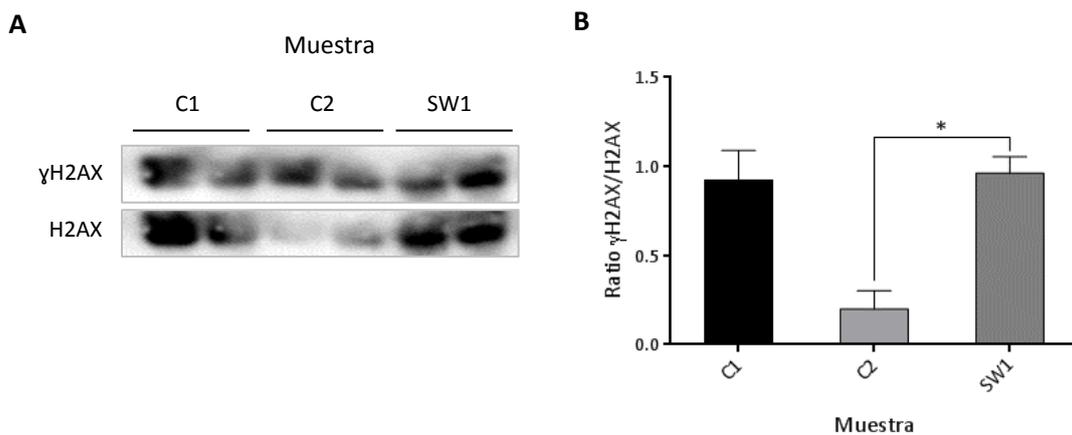


Figura 22. Análisis de los WB en fibroblastos para γH2AX. Representación densitométrica mediante ImageJ (media ± SEM) de (A) revelados obtenidos y (B) ratio de γH2AX/H2AX. Test estadístico ANOVA considerando significativo los p-valor <0,05. C1: control 1, C2: control 2, SW1: síndrome de Werner 1.

Según los resultados de la figura 22, existe un aumento de γH2AX en SW1 frente a C2, y, por consiguiente, es probable que el perjuicio de la integridad genómica también se vea afectado en SW1 del mismo modo que las células HeLa tras ser tratadas con H₂O₂.

En relación a las metilaciones de histonas estudiadas, tan sólo se observa un descenso relevante de SW1 con respecto a C1 en la MPT H3K9me3. Este resultado es contrario al observado en las células HeLa bajo tratamiento con H₂O₂. Las metilaciones en la lisina 27, sin embargo, siguen la tendencia provocada por la adición de H₂O₂, tendiendo a disminuir en C2 y SW1 con respecto a C1 pero no de forma estadísticamente significativa. La MPT H3K79me3 no muestra ninguna diferencia.

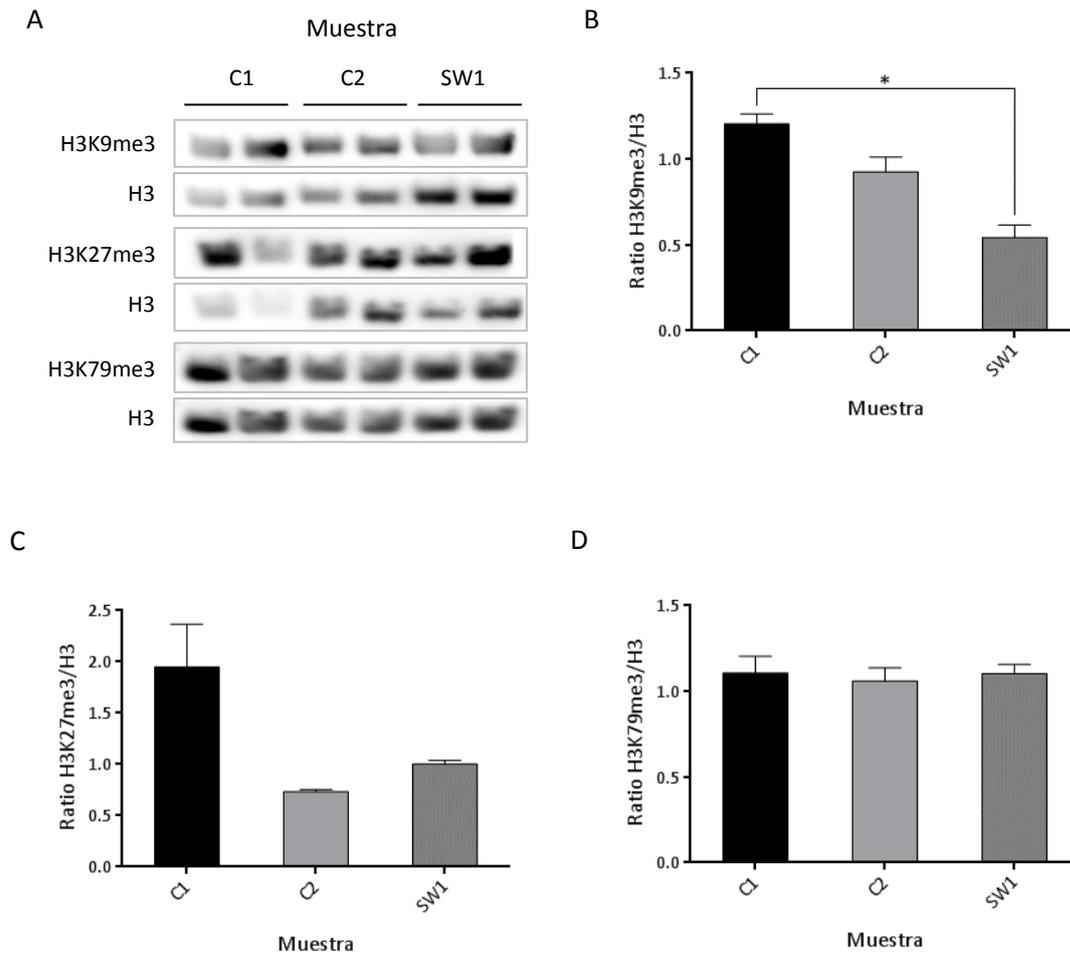


Figura 23. Análisis de los WB en distintas líneas de fibroblastos para las trimetilaciones de las lisinas 9, 27 y 79 de la histona H3. Representación densitométrica mediante ImageJ (media \pm SEM) de (A) revelados obtenidos, (B) la ratio de H3K9me3/H3, (C) la ratio de H3K27me3/H3 y (D) la ratio de H3K79me3/H3. Test estadístico ANOVA considerando significativo los p-valor $<0,05$. C1: control 1, C2: control 2, SW1: síndrome de Werner 1.

Con respecto a las acetilaciones analizadas en la figura 24, ninguna presenta cambios significativos, aunque H3K9ac parece estar aumentada en C2, H3K27ac.

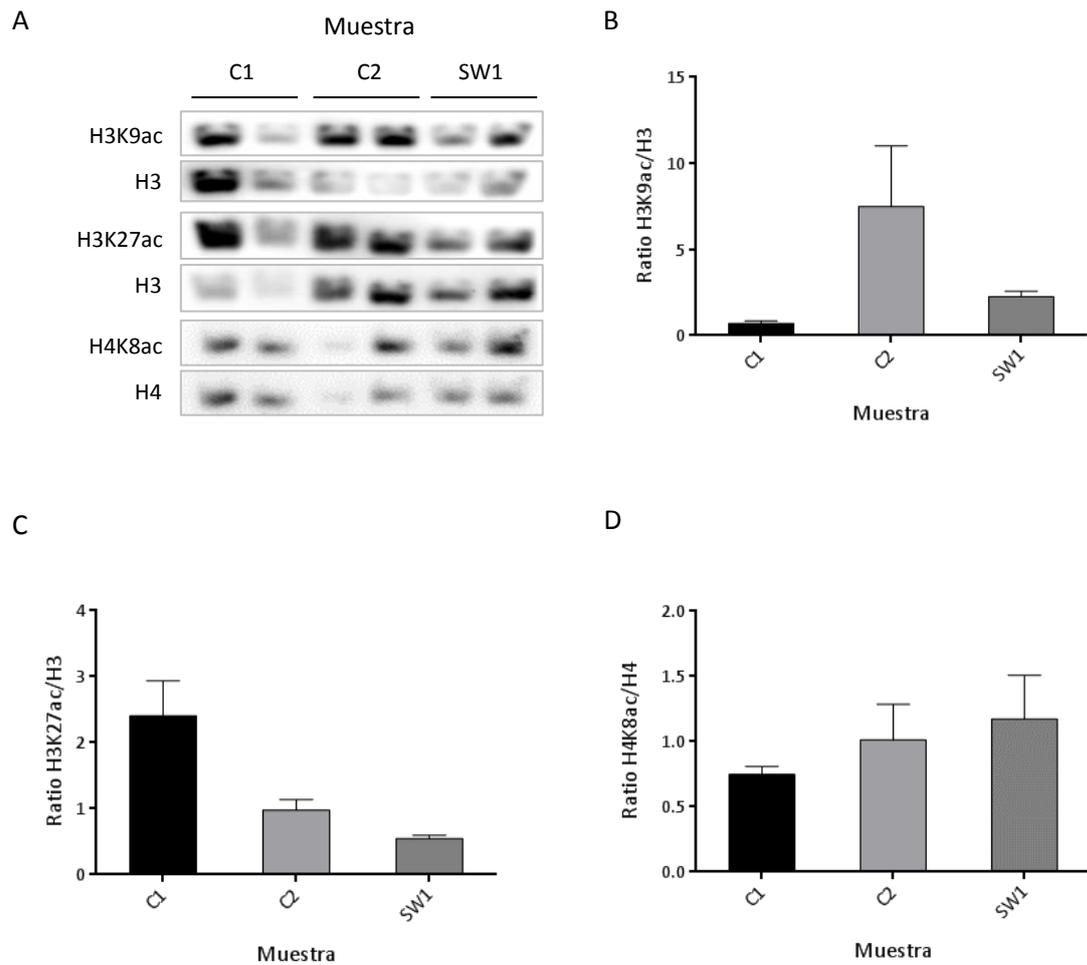


Figura 24. Análisis de los WB en distintas líneas de fibroblastos para la acetilación de las lisinas 9 y 27 de la histona H3 y de la lisina 8 de la histona H4. Representación densitométrica mediante ImageJ (media \pm SEM) de (A) revelados obtenidos, (B) la ratio de H3K9mac/H3, (C) la ratio de H3K27mac/H3 y (D) la ratio de H4K8ac/H4. Test estadístico ANOVA considerando significativo los p-valor $<0,05$. C1: control 1, C2: control 2, SW1: síndrome de Werner 1.

6. Discusión

Las enfermedades progeroides, y en concreto el síndrome de Werner (SW), se caracterizan por cursar con envejecimiento acelerado o prematuro y una esperanza de vida acortada. Entre los signos comunes presentes en estos pacientes se encuentra el estrés oxidativo, puesto que muestran un desequilibrio entre las especies reactivas de oxígeno (ERO) y la capacidad antioxidante del organismo. El sistema antioxidante no enzimático más importante en los mamíferos es el del glutatión. Este donador de electrones ayuda tanto a reducir enlaces disulfuro entre cisteínas como a reaccionar con ERO de forma directa o mediante reacciones secundarias, oxidándose a glutatión disulfuro (GSSG). De hecho, la proporción GSSG/GSH es usada habitualmente como índice de estrés oxidativo. A pesar del importante papel del GSH en el estado redox celular, también se ha relacionado con múltiples procesos tales como: modificaciones post-traduccionales (MPT) en proteínas S-glutacionilación, proliferación celular, síntesis del ADN, mecanismos apoptóticos y regulación de la carcinogénesis. Además, su ruta biosintética, comparte precursores con el ciclo de la metionina pudiendo tener efecto en procesos de metilación del ADN y de histonas (García-Giménez *et al.*, 2017). De hecho, el estudio de la epigenética podría ser de gran ayuda para encontrar nuevos biomarcadores y posibles dianas terapéuticas, como ya se están investigando en otras progerias como Hutchinson-Gilford (Ghosh *et al.*, 2016). El análisis del metabolismo del GSH y las alteraciones en el balance GSSG/GSH en el contexto de enfermedades que cursan con estrés oxidativo puede tener una gran relevancia, por tanto, en mecanismos de regulación epigenética relacionados con todos los procesos mencionados más arriba, y sirven como modelo experimental para el estudio de la fisiopatología de enfermedades progeroides. En la bibliografía se pueden encontrar diversas sustancias ya empleadas para disminuir los niveles de GSH. En este trabajo se ha escogido el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como control del proceso, ya que su adición produce una respuesta antioxidante celular bien documentada. Por otro lado, también se conocen las múltiples afecciones que el H_2O_2 puede presentar, como daño en el ADN y en su reparación, alteración del ciclo celular e inducción de apoptosis (Cadet *et al.*, 2017). Por consiguiente, se escogió una sustancia con un efecto oxidante más relacionado con los niveles de GSH, puesto que la diamida es un oxidante de tioles y, GSH el péptido con grupo tiol mayoritario en las células.

Tal y como se muestra en los resultados, y después de evaluar la toxicidad hacia las células HeLa empleadas, se procedió a caracterizar la concentración de diamida en la que se consiguiera disminución los niveles de GSH sin causar una elevada muerte celular en tratamientos cortos (1 hora) mediante citometría de flujo. En este primer análisis se comprobó

que la supervivencia celular no bajaba del 80% aunque los niveles de GSH disminuyeron significativamente, a partir de exposiciones de 50 μ M de diamida. Como estrategia complementaria, se empleó un ensayo por microscopia confocal donde tras 24 horas de transfectar las células con el plásmido n-Grx1-roGFP2, se pudiera observar y monitorizar la fluorescencia de dos longitudes de onda equivalentes a la observación de GSSG y GSH nuclear. Para poder llevar a cabo este estudio, las células debían estar tratadas adheridas en placa durante 30 minutos. Al densitometrar las fotografías obtenidas a tiempo 0 y pasados 30 minutos con el tratamiento, se pudo comprobar que la ratio GSSG/GSH tiende a aumentar de forma más notoria cuando se aplica diamida al medio, aunque la metodología requiere de una puesta a punto más precisa para ser utilizada como metodología de evaluación de los niveles de GSH nucleares.

En definitiva, podemos afirmar que a concentraciones de entre 50-200 μ M de diamida durante tratamientos de 1 hora en suspensión, disminuyen los niveles de GSH y que la ratio GSSG/GSH parece incrementar tras 30 minutos con 200 μ M de diamida en las células adheridas. Además, en ningún caso se confirma la inducción de la apoptosis ni se detecta muerte celular. Sería conveniente, para poder achacar todos los resultados tan solo a la disminución de los niveles de GSH, el analizar de nuevo las células tras incorporar GSH o un precursor y comprobar si se restauran los cambios observados.

Sin embargo, podría haber discrepancias debidas a la disposición de las células ya que el hecho de ser tratadas en suspensión, las expone en mayor superficie y además el ciclo celular se queda parado obteniendo una baja probabilidad (alrededor del 8%) en progresar a la fase S (Alberts *et al.*, 2002). Debido a que podría haber ciertas diferencias en la respuesta a diamida según exponer las células en suspensión o en adhesión, se consideró conveniente analizar las proteínas antioxidantes y las MPT de histonas, mediante experimentos de WB, a partir de extractos de células tratadas tanto en suspensión como en placa.

6.1. Estudio del estado redox en células de pacientes

El estrés oxidativo es uno de los signos del envejecimiento y, por tanto, de enfermedades progeroides como el SW. Esta patología cursa con anomalías en el gen *WRN* característico por su papel en la reparación del daño en el ADN, siendo más susceptible y pudiendo llegar de forma prematura a estados de senescencia. En estudios anteriores del grupo (Seco-Cervera *et al.*, 2014), se caracterizó la expresión y la actividad de diversas enzimas antioxidantes (tabla 2). En el presente trabajo se compararon las diferencias entre células de pacientes con SW y el estado basal de células control (procedentes de individuos sanos), con los efectos provocados

en las células HeLa tras ser tratadas con diamida y H_2O_2 . Los tratamientos se llevaron a cabo en el modelo celular HeLa debido a que se trata de una línea inmortal de crecimiento rápido con requerimientos muy exigentes en cuanto a los niveles de GSH y que previamente se utilizó en otros ensayos realizados por el grupo de investigación para otras enfermedades progeroides. Las líneas celulares de SW e individuos control provienen de biopsias de piel (fibroblastos), tejido con repercusiones notorias en el envejecimiento y cuya manipulación no permite tratarlas fácilmente con compuestos con actividad farmacológica.

En los resultados obtenidos se ha observado una disminución de la enzima MnSOD tanto en SW como en células HeLa tratadas con H_2O_2 , mientras que en las células tratadas con diamida se ha visto un incremento. Esta enzima cataliza la reacción de dismutación del radical superóxido (O_2^-) en oxígeno (O_2) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en la mitocondria. Las discrepancias observadas entre diamida y H_2O_2 se podrían explicar debido a que, por un lado, la función que catalizan las SOD genera aún más H_2O_2 . Por otro lado, es una de las pocas enzimas antioxidantes GSH-independientes, por lo que el decremento de GSH podría promover otras vías de homeostasis redox celular. Por el contrario, no se han encontrado cambios concluyentes en la enzima CAT, aunque no se ha analizado para las células tratadas con H_2O_2 . De todos modos, se ha descrito una mayor actividad de CAT cuando se expone de manera prolongada a ERO debido a la hipermetilación de las islas CpG en el promotor Oct-1 (Quan *et al.*, 2011). Por lo tanto, es posible que en exposiciones agudas o de niveles bajos de ERO no se observen cambios. En cuanto a su relación con el envejecimiento, se han descrito múltiples relaciones contradictorias, sin embargo, se la asocia con la inhibición de la proliferación celular en tumores (Kodydková *et al.*, 2014).

En el caso de la enzima GPX1, se observa un descenso tanto en las células tratadas con diamida como en SW. La saturación de la ratio GSSG/GSH hace que no haya suficiente sustrato para que esta proteína pueda catalizar la reducción de peróxidos a alcoholes. Tras analizar los niveles de TRXR1, encargada de reducir a TRX1, se ha detectado cierta disminución de TRXR1 en las células tratadas con H_2O_2 , pero ningún cambio en fibroblastos de SW. TRX1 se encarga de reducir proteínas y no interacciona directamente con ERO, lo cual podría ser relevante para que disminuyeran sus niveles primando la expresión de otras enzimas antioxidantes. En estados de estrés oxidativo, lo lógico podría ser que aumentara su efecto para reducir proteínas; no obstante, el poder reductor celular (en este caso NADPH) podría ser esencial para otras enzimas tales como GR para reestablecer la ratio GSSG/GSH.

El estrés oxidativo es sinónimo de estado de mayor oxidación celular lo que debería equivaler a un aumento de la ratio PRDX6-SO3/PRDX6. En el caso de la diamida sí se ha observado, pero no en SW; dado que se observa un mayor aumento en las células tratadas en suspensión frente a las tratadas en placa, podría suceder que el estado oxidativo celular en suspensión fuera mayor que en placa debido a que no se encuentran en un estado óptimo para la proliferación. Cabe destacar la importancia del estudio de todas las enzimas involucradas ya que pueden otorgar mayor información de la red redox celular aparte de poder analizar los cambios en cada orgánulo celular. De hecho, se podría hacer extracciones más específicas para observar los posibles cambios, ya que los cambios en el núcleo son los que afectarían al daño en el ADN y tendrían repercusiones en la expresión de proteínas y el ciclo celular.

En resumen, los cambios detectados en los sistemas antioxidantes enzimáticos en SW se asemejan en mayor medida a las células tratadas con H₂O₂ durante 1 hora. El introducir ERO en las células podría ser una mejor aproximación a lo que sucede en esta enfermedad ya que con la diamida se estaría causando una repercusión que podría ser provocada por desajustes repentinos en el genoma. El H₂O₂ daña el ADN y la patología de SW se caracteriza por presentar una mayor sensibilidad al daño en el genoma, la cual podría provocar la saturación de la capacidad reductora frente a las ERO de forma prematura.

6.2. Estrés oxidativo y MPT en histonas

Las MPT de histonas determinan la conformación del tipo de cromatina. En este estudio se ha analizado la modificación γ H2AX (fosforilación de la serina 139 en la histona H2AX), indicativa del daño en el ADN, aumentando sus niveles de forma directamente proporcional (Sharma *et al.*, 2012). En los resultados expuestos se puede comprobar que los fibroblastos con SW tienen un incremento significativo con respecto a la línea control C2, mientras que C1 no presenta diferencias relevantes con ninguna de las otras dos líneas celulares. En cuanto a las HeLa bajo tratamientos de 1 hora, se observa daño provocado por el incremento en las ERO en tratamientos con H₂O₂, mientras que con diamida no se observa modificación respecto al control.

Se ha descrito que, durante el envejecimiento, por norma general se desajustan los niveles de metilación tendiendo a decrecer. La modificación H3K9me3 se suele encontrar en zonas de heterocromatina constitutiva, como son las zonas centroméricas y teloméricas. Los fibroblastos con SW, debido al envejecimiento prematuro, tienen menores niveles de esta modificación. Sin embargo, en algunos estudios en modelos de la progeria Hutchinson-Gilford (HG), se han detectado niveles incrementados de dicha modificación (Liu *et al.*, 2013). De

hecho, silenciando la metiltransferasa Suv39h1 (encargada de metilar H3K9), Liu y colaboradores conseguían restaurar los niveles de H3K9me3 haciendo que la longevidad se prolongara debido a una menor condensación de la cromatina. En nuestro estudio los niveles de H3K9me3 aumentan con H₂O₂. En el caso de la diamida, no se han observado cambios. Por lo tanto, los niveles bajos de la trimetilación de la lisina 9 en la histona H3 en la línea de SW podría ser debida a un mecanismo celular para contrarrestar la disfunción característica de la enfermedad, o que sus niveles se relacionen con el envejecimiento.

Otra trimetilación estudiada es la de la lisina 27 en la histona H3. Tal como muestran los resultados y siguiendo la predicción del decrecimiento de la metilación con el envejecimiento, los niveles de esta MPT tienden a menguar en los pacientes con SW. En este caso, C2 también presenta unos niveles similares a SW; no obstante, cabe destacar la diferencia de edad entre ambos controles (11 años para C1 y 32 para C2). Aunque el tratamiento con diamida no parece afectar a los niveles de H3K27me3, el H₂O₂ parece provocar el mismo efecto observado en los fibroblastos SW. En el caso de H3K27me3, dicha modificación se suele localizar en zonas de regulación transcripcional (heterocromatina facultativa) junto con la modificación H3K4me3 que provoca el efecto contrario y, por tanto, elevada transcripción. Aunque se han publicado estudios afirmando el aumento de estas marcas con el envejecimiento, no se aprecian modificaciones en ningún análisis de este trabajo.

La acetilación se encuentra relacionada con la formación de eucromatina y la expresión activa de genes (Brusslan *et al.*, 2015). A lo largo del estudio se han analizado tres ejemplos de esta MPT entre fibroblastos control y SW. La MPT H3K9ac parece verse aumentada tan sólo en la línea celular C2, aunque no se han obtenido resultados estadísticamente significativos. Sin embargo, existen indicios del aumento de los niveles de H3K9ac durante el envejecimiento debidos al descenso de la enzima que cataliza su desacetilación (Sirt6), inversamente proporcional a la edad del individuo y, al mismo tiempo, al descenso de la adición de metilos en el residuo K9 de la histona H3 previamente descrito. De un modo similar, H3K27ac podría aumentar sus niveles con la edad; a pesar de ello, en los resultados obtenidos tiende a decrecer con respecto a los controles C1 y C2. Esta MPT en concreto, se ha descrito como indicador de zonas de elevada expresión con respecto a otras marcas propuestas (Creyghton *et al.*, 2010), así que es posible que realmente no haya una expresión significativa, aunque la conformación cromatínica se vuelva más laxa. De hecho, en un estudio de las MPT de histonas a lo largo del ciclo celular, se pudo comprobar que los niveles de H3K4me3, los cuales se relacionan con la expresión génica, no variaban en ninguna fase del proceso ya que quedaban enmascarados por otras dos alteraciones que implicaban la fosforilación de H3T3 y H3T6 (Sinc,

2016). En nuestro estudio, H4K8ac es la única acetilación que parece aumentar con el envejecimiento presentando niveles ligeramente mayores en la línea celular con SW.

Teniendo en cuenta las variaciones en las marcas epigenéticas analizadas, se observa que el paciente con SW muestra un patrón más afín al producido en las células HeLa tras exponerlas a tratamientos agudos de H₂O₂. La disminución del GSH en HeLa provocado por diamida no parece tener apenas consecuencias en las modificaciones de histonas planteadas debido posiblemente a su falta de repercusión en los niveles de GSH nucleares puesto que éstos no han aumentado de forma significativa durante los 30 minutos analizados. Sin embargo, antes de descartar la diamida como agente oxidante, sería interesante ensayar su uso en otro modelo celular ya que, en este caso, las células HeLa parten con niveles elevados de GSH y aunque se haya comprobado la disminución de los niveles de GSH en los ensayos, el nivel basal restante podría ser suficiente para evadir los efectos provocados y ser fisiológicamente funcional. Otra opción planteada es la de cambiar de agente oxidante y tratar las células HeLa con dietil maleato (DEM), sustancia empleada con anterioridad en estudios sobre el GSH (Markovic *et al.*, 2009).

7. Limitaciones

Las MPT de histonas son cambios reversibles relacionados con múltiples factores que dificultan su estudio. En primer lugar, es determinante el comparar las líneas celulares con un pase celular equivalente, sobre todo cuando se pretenden estudiar los efectos relativos al envejecimiento. El hecho de que una de las líneas analizadas procedente de un paciente de SW, el número de pases de partida fuese desconocido antes de su utilización, por lo tanto, ha sido una limitación importante. Otro factor a tener en cuenta a lo largo del estudio habría sido la fase del ciclo celular en que se encontraban las células comparadas. Además, para conseguir unos resultados robustos, es preciso el análisis de un mayor número de muestra y de repeticiones; sin embargo, la baja frecuencia de la enfermedad y consecuente limitación en cuanto a la obtención de líneas celulares con SW, también ha resultado un factor determinante a lo largo del estudio. Al mismo tiempo, es de destacar el lento crecimiento que presentan los cultivos de fibroblastos sobre todo en el caso de líneas celulares de pacientes con enfermedades progeroides. Dado que el tiempo ha sido un factor limitante a lo largo del presente trabajo, los problemas mencionados anteriormente, junto con la dificultad de poner a punto técnicas de análisis nuevas en el grupo de investigación, ha impedido realizar el número de réplicas experimentales suficientes para obtener una adecuada robustez estadística.

8. Conclusiones preliminares

1. Los niveles de GSH en células HeLa disminuyen tras tratar 1 hora con diamida a partir de una concentración 50 μM y hasta 200 μM sin repercutir en su supervivencia celular.
2. Tratamientos de 1 hora con 200 μM de diamida no parecen provocar cambios significativos en cuanto a las MPT de histonas analizadas.
3. Los tratamientos de 1 hora con 1000 μM de H_2O_2 parecen ser suficientes para provocar cambios en las MPT de histonas en células HeLa, observándose un aumento de γH2AX , H3K9me3 y H4K8ac .
4. Los pacientes con síndrome de Werner presentan diferencias en las MPT de histonas en comparación con los individuos sanos analizados, presentando un aumento en γH2AX , tendencia ascendente en H4K8ac , un descenso en H3K9me3 y tendencias de disminución en H3K27me3 y H3K27ac .
5. Con tratamientos de 1 hora comprendidos entre 500-1000 μM de H_2O_2 se consigue una mayor aproximación a los cambios redox que tienen lugar en la progeria de síndrome de Werner que con tratamientos de 1 hora con 100-300 μM diamida.

9. Referencias

- Alberts B. *et al.* (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science. Extracellular Control of Cell Division, Cell Growth, and Apoptosis. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26877/>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2), 248-254.
- Brusslan, J. A., Bonora, G., Rus-canterbury, A. M., Tariq, F., & Jaroszewicz, A. (2015). A Genome-Wide Chronological Study of Gene Expression and Two Histone Modifications, H3K4me3 and H3K9ac, during Developmental Leaf Senescence 1 [OPEN]. *Plant Physiology*, 168, 1246–1261.
- Cadet, J. & Davies, J. A. K. (2017). Oxidative DNA damage & repair: an introduction. *Free radical biology & medicine*, 17, 1-21.
- Carrero, D., Soria-Valles, C. & López-Otín, C. (2016). Hallmarks of progeroid syndromes: lessons from mice and reprogrammed cells. *Disease Models & Mechanisms*, 9(7), 719-735. Recuperado de <http://dmm.biologists.org/content/9/7/719.abstract>
- Chelikani, P., Fita, I. & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61, 192–208.
- Chun, S. G., Shaeffer, D. S. & Bryant-greenwood, P. K. (2011). The Werner 's Syndrome RecQ Helicase / Exonuclease at the Nexus of Cancer and Aging. *Hawai'i Medical Journal*, 70, 52–55.
- Creyghton, P. M. *et al.* (2010). Histone H3K9ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proceedings of the National Academy of Science*, 107(50), 21931-21936.
- Davies, K. J. A. (2000). Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and Damage Removal, Repair, and Replacement Systems. *IUBMB Life*, 50(4–5), 279–289.
- Epstein, C. J. *et al.* (1966). Werner's syndrome a review of its symptomatology, natural history, pathologic features, genetics and relationship to the natural aging process. *Medicine (Baltimore)* 45, 177–221.
- EURORDIS-Rare Disease Europe (2009-2012). ¿Qué es una enfermedad rara? Barcelona, España.: La voz de los pacientes con enfermedades raras en Europa. Recuperado de <https://www.eurordis.org/es/content/%C2%BFque-es-una-enfermedad-rara>
- Fisher, A. B. (2011). Peroxiredoxin 6: A Bifunctional Enzyme with Glutathione Peroxidase and Phospholipase A 2 Activities. *Antioxidants & redox signaling*, 15(3), 831–844.
- Fukai, T. & Ushio-fukai, M. (2011). Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(6), 1583–1606.

- García-Giménez, J. L. *et al.* (2013). Histone H3 Glutathionylation in Proliferating Mammalian Cells Destabilizes Nucleosomal Structure. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(12), 1305–1320.
- García-Giménez, J. L. *et al.* (2017). Free Radical Biology and Medicine Role of glutathione in the regulation of epigenetic mechanisms in disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 112, 36–48.
- Ghosh, S., & Zhou, Z. (2016). Epigenetics of physiological and premature aging. Epigenetic Gene Expression and Regulation. Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-799958-6.00014-7>
- Haigis, M. C. & Yankner, B. A. (2011). The Aging Stress Response. *Molecular Cell*, 40(2), 333–344.
- Hamm, C. A. & Costa, F. F. (2015). Epigenomes as therapeutic targets. *Pharmacology & therapeutics*, 151, 72-86.
- Hisama, F. M., Oshima, J. & Martin, G. M. (2016). How research on human progeroid and antigeroid syndromes can contribute to the longevity dividend initiative. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(4), 1–23.
- Huang, S. *et al.* (2007). NThe Spectrum of *WRN* Mutations in Werner Syndrome Patients. *Human Mutation*, 27(6), 558–567.
- Ibañez-Cabellos, J. S. *et al.* (2018). Acute telomerase components depletion triggers oxidative stress as an early event previous to telomeric shortening. *Redox Biology*, 14, 398-408.
- Kim, S. Y. *et al.* (2008). H₂O₂-dependent Hyperoxidation of Peroxiredoxin 6 (Prdx6) Plays a Role in Cellular Toxicity via Up-regulation of. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(48), 33563–33568.
- Kodytková, J. *et al.* (2014). Review Article Human Catalase, Its Polymorphisms, Regulation and Changes of Its Activity in Different Diseases. *Folia Biologica*, 60, 153–167.
- Kosower, N. S., & Kosower, E. M. (1995). Diamide: An Oxidant Probe for Thiols. *Methods in Enzymology*, 251, 123–133.
- Liu, B. *et al.* (2013). Depleting the methyltransferase Suv39h1 improves DNA repair and extends lifespan in a progeria mouse model. *Nature Communications* 4(1868), 1-12.
- Maleszewska, M., Mawer, J. S. P., & Tessarz, P. (2016). Histone Modifications in Ageing and Lifespan Regulation. *Current Molecular Biology Reports*, 2, 26–35.
- Markovic, J. *et al.* (2007). Glutathione Is Recruited into the Nucleus in Early Phases of Cell Proliferation. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(28), 20416–20424.
- Markovic, J. *et al.* (2009). The depletion of nuclear glutathione impairs cell proliferation in 3t3 fibroblasts. *PLOS ONE* 4(7), e6413.

- Markovic, J. *et al.* (2010). Role of glutathione in cell nucleus. *Free radical research* 44(7), 721-733.
- Masala, M. V. *et al.* (2007). Epidemiology and clinical aspects of Werner's syndrome in North Sardinia: description of a cluster. *European Journal of Dermatology*, 17(3), 213-216.
- Matés, J. M., Segura, J. A. & Alonso, F. J. (2008). Intracellular redox status and oxidative stress: implications for cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Archives of Toxicology*, 82, 273–299.
- Mironova, A. A., Barykina, N. V. & Zatssepina, O. V. (2014). [Cytological analysis of the reaction of the nucleolar RNA and RNA-binding proteins stress in HeLa cells]. *Tsitologia*, 56(7), 489-499.
- Nakagawa, H. I. Y. (2003). Serial Review: Regulatory and Cytoprotective Aspects of Lipid Hydroperoxide Metabolism. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(2), 145–169.
- Nelson, K. J. & Parsonage, D. (2013). Measurement of peroxiredoxin activity. *Current Protocols in Toxicology*, 7(7), 1–33.
- Newbold, A. *et al.* (2014) Detection of apoptotic cells using propidium iodide staining. *Cold spring harbor protocols*, 11, 1202-1206.
- Ortega, A. L., Mena, S. & Estrela, J. M. (2011). Glutathione in Cancer Cell Death. *Cancers*, 3(1), 1285–1310.
- Oshima, J., Martin, G. M. & Hisama, F. M. (2002). Werner Syndrome. Adam, M. P. *et al.* (Eds.), GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2018. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1514/>
- Oxilia, R. M. (2010). Oxidative Stress and Antioxidant Defense System. *Revista Del Instituto de Medicina Tropical*, 5(2), 23–29.
- Palipoch, S. & Koomhin, P. (2015). Oxidative Stress-Associated Pathology: A Review. *Sains Malaysiana*, 44(10), 1441–1451.
- Quan, X., Lim, S. O. & Jung, G. (2011). Reactive oxygen species downregulate catalase expression via methylation of a CpG island in the Oct-1 promoter. *Federation of European Biochemical Societies* 585(21), 3436-3441.
- Robles, R., Ayala Ramírez, P., & Perdomo Velásquez, S. (2012). Epigenética: definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana. *Revista Ciencias de la Salud*, 10(1), 59-71. Recuperado de <https://revistas.urosario.edu.co/index.php/revsalud/article/view/2020>
- Rodríguez, A. M. *et al.* (2000). Respiratory chain activity, net atp production, and decreasing the steady state levels of H₂O₂. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(9), 801–813.
- Seco-Cervera, M. *et al.* (2014). Oxidative stress and antioxidant response in fibroblasts from Werner and Atypical Werner Syndromes. *Aging*, 6(3), 231–245.

- Sevilla, F. *et al.* (2015). The thioredoxin/peroxiredoxin/sulfiredoxin system: Current overview on its redox function in plants and regulation by reactive oxygen and nitrogen species. *Journal of Experimental Botany*, 66(10), 2945–2955.
- Sharma A., Singh K. & Almasan A. (2012). Histone H2AX Phosphorylation: A Marker for DNA Damage. In: Bjergbæk L. (Eds) DNA Repair Protocols. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 920. Humana Press, Totowa, NJ. Recuperado de https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-61779-998-3_40#citeas
- Shelton, M. D., Chock, B. P. & Miessler, J. J. (2005). Glutaredoxin: role in reversible protein S-glutathionylation and regulation of redox signaling transduction and protein translocation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 7(3–4), 348–367.
- Sinc (2016). Una combinación de señales en las histonas salvaguarda la información epigenética durante la división celular. Sinc, la ciencia es noticia. Recuperado de <https://www.agenciasinc.es/Noticias/Una-combinacion-de-senales-en-las-histonas-salvaguarda-la-informacion-epigenetica-durante-la-division-celular>
- Turaga, R. V. N. *et al.* (2007). Werner syndrome protein prevents DNA breaks upon chromatin structure alteration. *Aging Cell*, 6, 471–481.
- Veal, E. A., Day, A. M. & Morgan, B. A. (2007). Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling. *Molecular Cell*, 26(1), 1–14.
- Vichai, V. & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols* 1(3), 1112–1116.
- Wu, G. *et al.* (2018). Glutathione Metabolism and Its Implications for Health 1. *The Journal of Nutrition*, 134(3), 489–492.
- Zhang, H., Davies, K. J. A., & Forman, H. J. (2015a). Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 88(0 0), 314–336.
- Zhang, T., Cooper, S. & Brockdorff, N. (2015b). The interplay of histone modifications – writers that read. *EMBO reports* 16(11), 1467-1481.