



**MECANISMOS MOLECULARES DE FORMACIÓN DE
TUMORES EN MODELOS GENÉTICOS ANIMALES
CON DEFECTOS MITOCONDRIALES POR
DELECIÓN DEL GEN *SdhD***

África Millán Uclés

**Trabajo presentado para optar al grado de Doctor por la
Universidad de Sevilla**

2015

Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS)
Departamento de Fisiología Médica y Biofísica
UNIVERSIDAD DE SEVILLA
Programa de Doctorado de Biología Molecular y Biofísica

D. José Ignacio Piruat Palomo, Investigador del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS) CERTIFICA:

Que la memoria de trabajo titulada “**Mecanismos moleculares de formación de tumores en modelos genéticos animales con defectos mitocondriales por delección del gen *SdhD***” elaborada por Dña. África Millán Uclés, licenciada en Biotecnología, ha sido realizada bajo su dirección y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Para que conste, firma la presente en Sevilla, a 16 de Diciembre de 2014.

Fdo. D. José Ignacio Piruat Palomo

*...Llevo un tiempo dándole vueltas a la forma en la que agradecer el apoyo que ha hecho posible que pudiera estar ahora sentada frente al ordenador escribiendo estas palabras...En un principio consideré la posibilidad de adoptar el formato clásico (o cómo a mi me gusta llamarlo: Vintage...) de agradecimiento. Algo breve y conciso. Pero no me pareció suficiente. Después pensé en algo moderno (...Trendy), pero se me escapaba la esencia de la verdadera emoción que me supone poner **punto y seguido** a esta etapa. Así que, finalmente, he recurrido a lo que algunos llamarían “examen de conciencia” para dar marcha atrás en el tiempo, recorrer el camino que me ha traído hasta aquí y reencontrarme con todos mis compañeros de viaje...incluido Julián R.P., profesor al que recuerdo con mucho cariño, y gran investigador al que agradezco mi primer contacto con la ciencia y el trabajo de laboratorio en el LAI...*

Muchísimas gracias a Piru, por darme la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral con él, por dirigirme y enseñarme, por su infinita paciencia, por dedicarme su tiempo y priorizar pensando en mí y en mis plazos. Gracias a Pepe también por tutorizar este trabajo, y por los dos años que formé parte de su laboratorio en los que tanto aprendí. A Blanca, mi predecesora, mi *hermanita grande* cuando llegué al grupo, y compañera durante algún tiempo de esas clases de inglés para las que no me importaba madrugar porque sabía que me iba a reír tanto...Gracias también a tod@s mis antiguos compañeros del laboratorio 101 y, cómo no, a mis *IBiSencas* Clara, Dori, Inma, María, Maricarmen, Marta, Piluca, Raquel y Ros, a las que he tenido abandonadísimas para poder estar hoy escribiendo estas líneas. Muchísimas gracias, por todas las risas, las cenas, las copitas, los cafés, las pechugas a la plancha en “Las Niñas”, pero sobre todo por ser, ante todo, mis compañeras y mis amigas.

Gracias a José Antonio P.S y Nacho por acogerme en su grupo, cederme una poyata en la que trabajar en su laboratorio, contribuir a la corrección de esta Tesis y ayudarme con las gestiones del Tribunal. Y por supuesto, gracias a todos sus miembros porque cada uno de ellos ha colaborado de una manera u otra en este trabajo: Gracias a Jorge por prestarme su ordenador siempre con una sonrisa, sin importarle que lo interrumpiera, por escanear y hacer fotos con su super-iPhone y por asimilar que cada vez que entrara por la puerta del labo iba a ser yo la que

estuviera sentada en su silla pegada a tu teclado. Gracias a las Técnicas- Ana, M^a José, Paola y Tinoco- por su apoyo, colaboración en la búsqueda de muestras, por las risas y las historias que nos amenizaban las horas en la poyata y en el escritorio. Gracias a Fanny, vecina de poyata, de escritorio, de rack en el -80°C, en el -20°C, en la nevera...y compinche –junto con Isa y Mayte-de las visitas a la cafetería a última hora de la tarde en busca de... “mentas poleo”. No creas que se me olvida que tenemos que hacer una recopilación con las “frases célebres” acumuladas durante este tiempo. ¡Ese documento el día de mañana valdrá millones! Mi agradecimiento también a Ivan, por ayudarnos con el modelo de ratón y su citometría, a Teresa por ayudarme con el mundo de la Hematología y también a José Antonio B., por recordarme lo que suponen los inicios y liberarme del genotipado.

Indudablemente, gracias por todo a las amigas *Antonias* y *Maris*- Ali, Cuca, Isa, Mayte y Marina-. Habéis sido, sois y seréis un gran apoyo y una fuente inagotable de cariño, anécdotas, risas y “marujeo” del bueno. Sólo nos ha faltado fundar la revista “La sangre es *asís*”, pero tiempo al tiempo porque...¡eso sí que puede acabar valiendo millones!

No podría- ni quiero- olvidarme de mis amigos del “Master del Universo/Master and Comander/ ÉL master”, y a las geniales incorporaciones posteriores a esta gran familia: Alan, Clara, Costela (Capitán), Dani, David, Fran, Larisa, Lucho (todavía me acuerdo y me río), Lucía, Paloma, Pamper, RRomero y RGuerra. No concibo Sevilla sin vosotros. Ni Sevilla, ni Valencia, ni Toledo, ni Murcia, ni Barcelona...Si en el mundo hubiera más gente como vosotros sin duda sería un mundo mucho mejor.

A mis mejores amigas de toda la vida -o casi-: Cris, Elena, Gemma, Isa y Mamen. Aunque –por ahora- estamos siguiendo caminos muy diferentes, y nos veamos en contadas ocasiones, siempre volvemos al mismo punto: a la amistad verdadera. Muchas gracias por estar ahí siempre.

Muchas gracias a mis padres y mi hermana, que siempre me han apoyado y me han animado a seguir hacia delante a pesar de que eso supusiera estar cada vez más lejos de casa.

Y a David. Que siempre ha venido conmigo a donde “la ciencia” me ha llevado sin cuestionarlo, a pesar de que eso supusiera dejar su casa y su trabajo. Que siempre me ha esperado a la salida de la Facultad, de la biblioteca, de la residencia, del laboratorio...de dónde fuera sin importar el tiempo ni la hora. Que siempre mira hacia delante y pocas veces hacia atrás. Que siempre ha estado conmigo. Que siempre ha estado por mí y para mí. Que siempre me ha ayudado. Que siempre ha madrugado conmigo cuando he tenido que estudiar o ir a trabajar, a pesar de que él empezara más tarde. Que siempre se ha encargado de todo para que yo pudiera centrarme en estudiar, incluso mandar callar a los vecinos y cocinar espaguetis...muuuuchos espaguetis. **MUCHAS GRACIAS.**

“Today is where your book begins,
The rest is still unwritten”

N.B

Todo mi cariño y agradecimiento a las personas que hicieron lo posible para que
pudiera lograr mis metas, por motivarme y darme la mano cuando más lo
necesitaba.

Y en especial, a ti.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	67
1.1	LA MITOCONDRIA.....	67
1.1.1	<i>Estructura y función</i>	67
1.1.2	<i>Cadena respiratoria</i>	68
1.2	ENZIMAS METABÓLICAS MITOCONDRIALES Y CÁNCER.....	70
1.3	MECANISMOS DE TUMOROGÉNESIS ASOCIADOS A DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL.....	72
1.4	MODELOS ANIMALES DE DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL CON MUTACIONES EN ENZIMAS MITOCONDRIALES PARA EL ESTUDIO DEL CÁNCER.....	75
1.4.1	<i>Succinato deshidrogenasa</i>	76
1.4.2	<i>Fumarato hidratasa</i>	81
1.4.3	<i>Isocitrato deshidrogenasa</i>	82
1.5	PAPEL DE LA MITOCONDRIA EN LA HEMATOPOYESIS.....	83
1.6	GENERACIÓN DEL MODELO MURINO SDHD-ESR: ANTECEDENTES EXPERIMENTALES.....	85
2	OBJETIVOS	93
3	RESULTADOS	101
3.1	VALIDACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DE RATÓN SDHD-ESR101	
3.2	ESTUDIO DE LA VÍA “PSEUDO-HIPÓXICA” EN TEJIDO DEL ANIMAL SDHD-ESR 103	
3.3	DESARROLLO DE LÍNEAS CELULARES INMORTALIZADAS DERIVADAS DE ANIMALES SDHD-ESR.....	107
3.3.1	<i>Línea celular immortalizada de fibroblastos embrionarios de ratón (iMEFs)</i>	107
3.3.2	<i>Línea celular immortalizada de células epiteliales de riñón de ratón neonato (iBMKs)</i>	108
3.4	ACTIVACIÓN DE LA VÍA PSEUDO-HIPÓXICA EN LAS LÍNEAS CELULARES108	
3.4.1	<i>Estudio de la expresión de genes de respuesta a hipoxia</i>	108

Índice de contenidos

3.5 IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS RUTAS MOLECULARES QUE RESPONDEN A LA DEPLECIÓN DEL CMII MEDIANTE ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA A GRAN ESCALA.....	111
3.5.1 Estudio de expresión génica a gran escala en tejido de ratón.....	111
3.5.2 Regulación de los mecanismos de reparación del ADN y proliferación en líneas celulares derivadas del ratón SDHD-ESR.....	124
3.6 CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO DE LOS RATONES SDHD-ESR.....	127
3.6.1 Ratón SDHD-ESR como posible modelo de Síndrome Mielodisplásico....	127
3.6.2 Características de la sangre periférica de los ratones SDHD-ESR.	128
3.7 ESTUDIOS MOLECULARES DEL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO DE LOS RATONES SDHD-ESR.....	139
4 DISCUSIÓN	149
4.1 RESUMEN.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
4.2 RATÓN SDHD-ESR, P21 ^{WAF1/CIP1} Y POSIBLES MECANISMOS DE TUMOROGÉNESIS	149
4.3 ACTIVACIÓN DE LA VÍA “PSEUDO-HIPÓXICA” EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DEL MODELO SDHD-ESR.....	152
4.4 RESPUESTA TISULAR DIFERENCIAL ANTE LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL.....	153
4.5 ANIMAL SDHD-ESR COMO POSIBLE MODELO PARA EL ESTUDIO DE HEMOPATÍAS CAUSADAS POR DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL.....	153
5 CONCLUSIONES.....	165
6 MATERIAL Y MÉTODOS.....	173
6.1 PROTOCOLO DE INYECCIÓN DE TAMOXIFENO	173
6.2 GENOTIPADO POR PCR.....	173
6.2.1 PCR alelo <i>SdhD</i>	174
6.2.2 PCR recombinasa <i>CRE-ESR</i>	175
6.3 MANTENIMIENTO DE LOS ANIMALES.....	177
6.4 ENSAYO DE ACTIVIDAD DE LOS COMPLEJOS MITOCONDRIALES	178
6.4.1 Obtención de mitocondrias.....	178
6.4.2 Actividad del complejo mitocondrial I (CMI).....	178

Índice de contenidos

6.4.3	<i>Actividad del complejo mitocondrial II (CMII)</i>	179
6.5	CULTIVOS CELULARES.....	180
6.5.1	<i>Generación de líneas celulares</i>	180
6.5.2	<i>Inmortalización de líneas celulares</i>	182
6.5.3	<i>4-Hidroxitamoxifeno (4-OHT) en cultivo celular</i>	185
6.6	TÉCNICAS MOLECULARES.....	186
6.6.1	<i>Western blot para estudiar inducción de proteínas</i>	186
6.6.2	<i>PCR cuantitativa (RT-qPCR)</i>	188
6.6.3	<i>Microarray de tejido de ratón</i>	192
6.7	ESTUDIO CITOMÉTRICO DE TEJIDOS DE RATÓN.....	194
6.7.1	<i>Extracción de células</i>	194
6.7.2	<i>Citometría de flujo</i>	195
6.8	TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS EN ANIMALES RECEPTORES.....	197
6.9	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	198
7	BIBLIOGRAFÍA	205

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN		Pág.
Figura 1. Estructura de la mitocondria.		68
Figura 2. Cadena respiratoria.		69
Figura 3. Esquema del Ciclo del ácido tricarboxílico.		70
Figura 4. Esquema de tumorigénesis mediante activación aberrante de la respuesta a hipoxia por disfunción del Complejo II mitocondrial (vía pseudo-hipóxica).		74
Figura 5. Esquema de los alelos <i>SdhD⁺</i> , <i>SDHD^{lox}</i> y <i>SdhD⁻</i> .		80
Figura 6. Proceso de diferenciación en el sistema hematopoyético.		84
RESULTADOS		
Figura 7. Validación de la deleción en el ratón SDHD-ESR.		102
Figura 8. Análisis de la actividad enzimática del CMII de los ratones SDHD-ESR.		103
Figura 9. Curvas de crecimiento y supervivencia de los animales SDHD-ESR.		104
Figura 10. Análisis de los ratones SDHD-ESR tras 1 semana de tratamiento con tamoxifeno.		105
Figura 11. Vía “pseudo-hipóxica” en tejido del ratón SDHD-ESR.		106
Figura 12. Deleción del gen <i>SdhD</i> en líneas celulares.		109
Figura 13. Genes de respuesta a hipoxia en líneas celulares inmortalizadas.		110
Figura 14. Niveles de proteínas por Western blot.		111

Índice de figuras

Figura 15. Agrupamiento jerarquizado supervisado del perfil genético en médula adrenal y riñón del ratón SDHD-ESR tras 1 semana de tratamiento con tamoxifeno.	113
Figura 16. Análisis del microarray.	114
Figura 17. Análisis funcional comparativo.	117
Figura 18. Validación del cambio de expresión del gen <i>Cdkn1a</i> .	124
Figura 19. Niveles de proteínas en las líneas mediante Western Blot.	126
Figura 20. Curvas de crecimiento en las líneas celulares.	127
Figura 21. Hemograma de sangre periférica de ratón SDHD-ESR.	129
Figura 22. Inmunofenotipaje de sangre periférica del ratón SDHD-ESR.	130
Figura 23. Análisis por citometría de la población de células hematopoyéticas en médula ósea.	132
Figura 24. Análisis de linfocitos T en médula ósea de ratón SDHD-ESR.	133
Figura 25. Análisis de linfocitos B en médula ósea de ratón SDHD-ESR.	134
Figura 26. Estadios de maduración de linfocito B.	135
Figura 27. Análisis de granulocitos y macrófagos.	136
Figura 28. Análisis de las HSC por citometría en médula ósea de ratón SDHD-ESR.	137
Figura 29. Trasplante de médula ósea del animal SDHD-ESR en ratones C57/Bl6 irradiados.	138
Figura 30. Proceso de maduración y diferenciación eritroide.	138

Índice de figuras

Figura 31. Análisis de maduración eritroide por citometría de flujo en médula ósea de ratón SDHD-ESR. **140**

Figura 32. Respuesta de adaptación a hipoxia en tejido hematopoyético de animal SDHD-ESR. **141**

MATERIAL Y MÉTODOS

Figura 33. PCR de genotipado de *SdhD* y CRE-ESR. **177**

Figura 34. Esquema de la estructura del plásmido pEF321-T. **182**

Figura 35. Fotografía de iMEFs e iBMKs. **185**

Figura 36. Microarray de hibridación de dos colores. Esquema de las diferentes fases del proceso. **193**

Índice de figuras

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN		Pág.
Tabla 1. Resumen de los diferentes modelos de ratones KO y KI		77
RESULTADOS		
Tabla 2. Los 10 genes más sobre e infra-expresados en tejidos de SDHD-ESR		114
Tabla 3. Funciones biológicas con alta probabilidad de estar afectadas en médula adrenal de SDHD-ESR		118
Tabla 4. Funciones biológicas con alta probabilidad de estar afectadas en riñón de SDHD-ESR		121
Tabla 5. Características hematológicas del ratón SDHD-ESR		139

Índice de tablas

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ADNmt	ADN mitocondrial
BMKs	del inglés, <i>Baby mouse kidney cells</i>
CAT	Ciclo del ácido tricarboxílico
CC	Cuerpo Carotídeo
CTE	Cadena transportadora de electrones
Cy3	del inglés, <i>Cyanine 3</i>
Cy5	del inglés, <i>Cyanine 5</i>
ER	del inglés, <i>Estrogen receptor</i>
FH	Fumarato Hidratasa
FLOX	del inglés, <i>Flanked by loxP sites</i>
FS	Fosfatidilserina
FSC	del inglés, <i>Forward Scatter Component area</i>
KI	del inglés, <i>Knock in</i>
KO	del inglés, <i>Knock out</i>
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LOH	del inglés, <i>Loss of heterocytosity</i>
LoxP	del inglés, <i>locus of crossover from Phage 1</i>
MA	Médula adrenal
MEF	del inglés, <i>Mouse embryonic fibroblasts</i>
NOD	del inglés, <i>Non-obese diabetic</i>

Abreviaturas

OMS	Organización Mundial de la Salud
PCC	del inglés, <i>Pheochromocytoma</i>
PGL	Paraganglioma
ROS	del inglés, <i>Reactive Oxygen Species</i>
RT-PCR	del inglés, <i>real time PCR</i>
Scid	del inglés, <i>severe combined immunodeficient</i>
SMD	Síndrome Mielodisplásico
SSC	del inglés, <i>Side Scatter Component area</i>

1. INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 LA MITOCONDRIA

1.1.1 Estructura y función

La mitocondria es un orgánulo cuya función principal es generar energía para el resto de la célula mediante fosforilación oxidativa. Además, participa en funciones vitales para la célula tales como síntesis de biomoléculas, control de la diferenciación y ciclo celular, apoptosis, reserva de Ca^{2+} y señalización. En la mitocondria se producen procesos como la oxidación de piruvato y ácidos grasos y el ciclo del ácido tricarboxílico (CAT), también conocido como ciclo de Krebs.

Estructuralmente, la mitocondria está constituida por: i) la membrana externa, que contiene un alto número de canales acuosos que la hacen muy permeable a moléculas pequeñas; ii) la matriz mitocondrial, con gran cantidad de enzimas necesarias para la oxidación de piruvato, los ácidos grasos y el CAT, además de varias copias de ADN mitocondrial, ribosomas y ARN necesarios para la expresión genética; iii) la membrana interna, plegada en crestas, que contiene las proteínas que forman la cadena respiratoria o cadena de transporte de electrones (CTE), la ATP sintetasa, responsable de la síntesis de ATP, y proteínas transportadoras y canales que la hacen permeable selectivamente a determinadas moléculas; y iv) el espacio intermembrana, donde se encuentran las enzimas necesarias para utilizar el ATP de la matriz para fosforilar otros nucleótidos (Fig. 1).

El metabolismo oxidativo de la mitocondria utiliza como sustrato tanto los ácidos grasos como el piruvato producido en el citosol por la glucólisis. Ambos tipos de moléculas son transportadas desde el citosol hasta la matriz mitocondrial, donde son transformados en acetil CoA para ser incorporados en el ciclo del ácido tricarboxílico, en el que se genera poder reductor en forma de NADH y FADH_2 además de CO_2 . El NADH y FADH_2 ceden sus electrones a la CTE. El transporte de electrones a través de la CTE está acoplado a la translocación de protones (H^+)

1. Introducción

hacia el exterior de la matriz mitocondrial, formándose así un gradiente electroquímico de H^+ que permite sintetizar ATP.

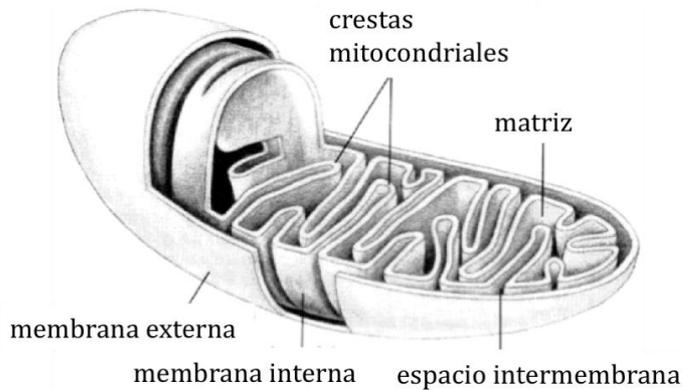


Figura 1. Estructura de la mitocondria. Representación esquemática del orgánulo indicando los componentes básicos del mismo: crestas mitocondriales, membrana externa e interna, matriz y espacio intermembrana.

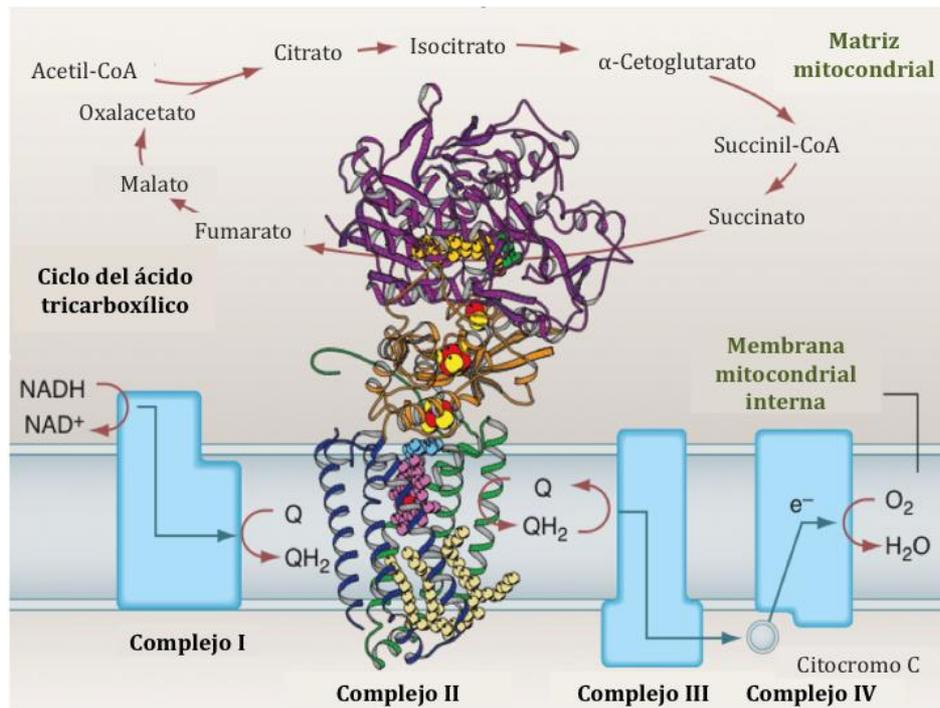
1.1.2 Cadena respiratoria

La cadena respiratoria consta de cuatro complejos multiprotéicos, denominados complejos mitocondriales I a IV (CMI a CMIV), que transportan electrones entre ellos a favor de potencial redox para lo cual cada uno contiene grupos prostéticos involucrados en una serie de reacciones de oxido-reducción. También forman parte de la cadena respiratoria dos moléculas liposolubles, la ubiquinona Q10 y el citocromo c. La cadena respiratoria junto con el complejo V mitocondrial (o ATP sintetasa) constituye el sistema de fosforilación oxidativa. El Complejo I (o NADH-ubiquinona oxidoreductasa) cataliza la primera etapa de la transferencia de electrones, captando dos electrones desde el NADH y cediéndolos a la ubiquinona. El Complejo II (succinato deshidrogenasa) cataliza la oxidación del succinato en fumarato, uno de los pasos del CAT, acoplada a la reducción de FAD^+ a $FADH_2$ el cual a su vez transfiere dos electrones a la ubiquinona. La ubiquinona reducida transfiere los electrones al Complejo III (ubiquinol-citocromo c reductasa). Éste cede los electrones al citocromo c, que a su vez los transporta hasta el Complejo IV (citocromo c oxidasa). Finalmente, el Complejo IV transfiere los electrones al O_2 , que es el último aceptor de electrones, convirtiéndose en H_2O . La ATP sintetasa, o CMV, permite el paso de protones a favor de gradiente desde el espacio

1. Introducción

intermembrana hasta la matriz mitocondrial haciendo posible la síntesis de ATP a partir de ADP y fósforo inorgánico (Pi).

De entre todos los complejos de la cadena respiratoria, el complejo II es el de menor tamaño. Está compuesto por cuatro subunidades proteicas (*SdhA*, *B*, *C* y *D*), todas codificadas en el núcleo. Las subunidades *SdhA* y *SdhB* forman un heterodímero hidrofílico, mientras que *SdhC* y *SdhD* anclan el complejo a la membrana mitocondrial (Fig. 2). La subunidad *SdhA* posee un grupo prostético flavín-adenín-dinucleótido (FAD) unido covalentemente. *SdhB* contiene tres grupos hierro-azufre ([2Fe-2S], [4Fe-4S] y [3Fe-4S]) y las subunidades *SdhC* y *SdhD* coordinan un grupo hemo, además de poseer dos sitios de unión a ubiquinona. Los electrones captados de la oxidación de succinato a fumarato por el grupo FAD se transfieren sucesivamente a través de los centros hierro-azufre de *SdhB* y de ahí, finalmente, a la ubiquinona.



Adaptación de Hederstedt, 2003.

Figura 2. Cadena respiratoria. Representación esquemática de los cuatro complejos proteicos (en azul claro los CMI, CMIII y CMIV) que constituyen la cadena respiratoria y su acoplamiento con el TAC. El Complejo II se representa mediante diagrama de lazos, donde *SdhA* se representa en color morado, *SdhB* en naranja, *SdhC* en azul y *SdhD* en verde.

1.2 ENZIMAS METABÓLICAS MITOCONDRIALES Y CÁNCER

Se han identificado mutaciones en genes que codifican tres enzimas mitocondriales del CAT que parecen ejercer un papel causal en la generación de diferentes tipos de cáncer: la succinato deshidrogenasa (SDH), que como hemos visto, es el complejo II mitocondrial, la fumarato hidratasa (FH), y la isocitrato deshidrogenasa mitocondrial (IDH). En el CAT, la IDH metaboliza el isocitrato para producir α -cetoglutarato. Después, el α -cetoglutarato es convertido a succinato por la α -cetoglutarato deshidrogenasa y la succinil Co-A sintetasa actuando secuencialmente. El succinato es deshidrogenado a fumarato por la SDH, y finalmente, el fumarato es metabolizado por la FH para producir L-malato, que se convertirá en oxalacetato y que servirá para restablecer los niveles de citrato (Fig. 3).

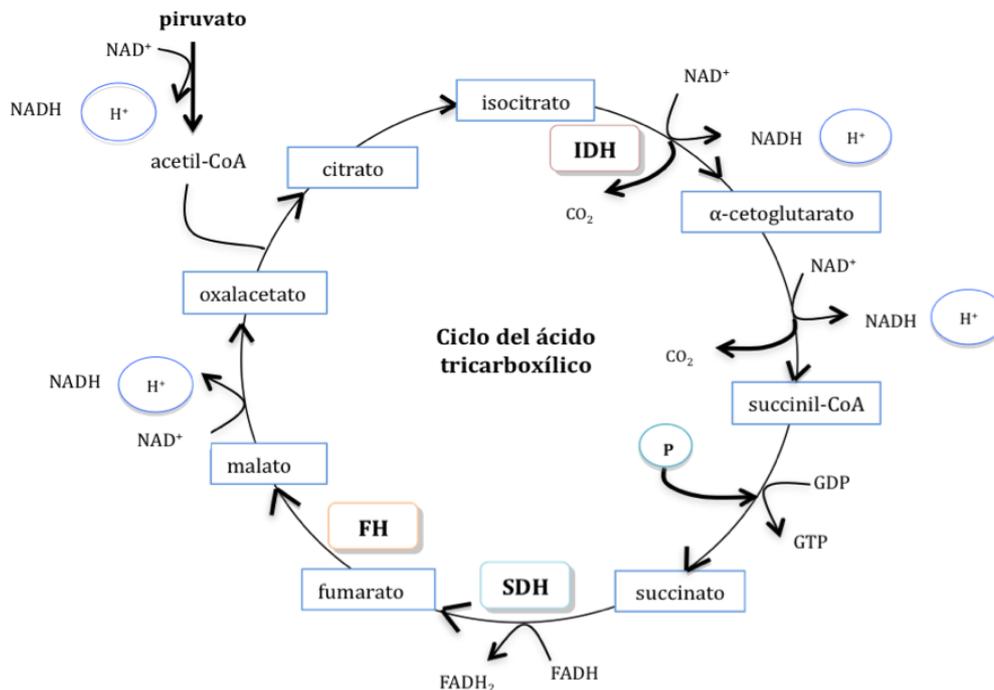


Figura 3. Esquema del ciclo del ácido tricarboxílico. Se muestran las moléculas que actúan como sustratos y productos del ciclo además de las tres enzimas implicadas en tumorigénesis: IDH, SDH y FH.

De las tres enzimas mencionadas anteriormente, el primer gen que se identificó como supresor tumoral fue *SdhD*, que codifica la subunidad D del CMII (Baysal et

1. Introducción

al., 2000). Las mutaciones de línea germinal en este gen son causa de un tipo de tumor conocido como paraganglioma familiar hereditario tipo 1 (PGL1) (Baysal 2013; Baysal et al., 2000). Los paragangliomas son un tipo de tumores del sistema paragangliónico altamente vascularizados y de crecimiento lento que generalmente tienen lugar en cabeza o cuello. En el caso de PGL1 el órgano más afectado es el cuerpo carotídeo (CC). El sistema paragangliónico, un conjunto de paraganglios derivados de la cresta neural que se distribuyen desde la base del cráneo hasta la pelvis, tiene como función producir catecolaminas durante el estadio fetal hasta la maduración completa de la médula adrenal. Cuando la tumoración tiene lugar en la médula adrenal, se conoce como feocromocitoma (PCC- del inglés, *Pheochromocytoma*). En adultos, algunos paraganglios mantienen su actividad quimiosensitiva y neuroendocrina. Tal es el caso del CC, cuya principal función consiste en detectar descensos en los niveles de O₂ en sangre, un fenómeno conocido como hipoxemia.

Tras la identificación de *SdhD* como gen supresor de tumores, se identificaron mutaciones en los genes que codifican las subunidades C y B, *SdhC* y *SdhB*, como responsables de paraganglioma familiar hereditario tipo 3 y 4 (PGL3 y PGL4) respectivamente (Astuti et al., 2001; Niemann and Muller, 2000). Las mutaciones asociadas a la subunidad A, *SdhA*, aunque muy raramente, también han sido asociadas a paraganglioma. Por último, el gen *SDHDAF2*, que codifica un factor requerido para ensamblar el grupo prostético de FAD al CMII (Hao et al., 2009), ha sido recientemente asociado con paraganglioma familiar hereditario tipo 2 (PGL2) (Burnichon et al., 2010; Korpershoek et al., 2012). Cada tipo de PGL manifiesta patrones de tumoración, localización y malignidad diferentes (Baysal, 2008; Dahia, 2006; Papathomas et al., 2013; Timmers et al., 2009). Aunque la mayoría de los tumores derivados de mutaciones en SDH son PGL y PCC, en los últimos años el espectro de tumoración ha aumentado, incluyendo tumores de estroma gastrointestinal, (Gill, 2012; Oudijk et al., 2013), carcinoma renal (Malinoc et al., 2012; Ricketts et al. 2012; Vanharanta et al., 2004), y más raramente tumores pituitarios (Xekouki et al., 2012) y leucemias (Baysal, 2007).

Mutaciones en la enzima FH mitocondrial causan leiomiomatosis hereditaria y cáncer de células renales (HLRCC- del inglés, *Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer*), un síndrome caracterizado por múltiples leiomiomas cutáneos,

1. Introducción

tumores benignos de músculo liso del útero, carcinomas renales agresivos y cáncer testicular (Carvajal-Carmona et al., 2006; Kiuru and Launonen, 2004; Lehtonen, 2011; Tomlinson et al., 2002).

Las IDHs son una familia de 3 enzimas (IDH1, 2 y 3) cuyas mutaciones relacionadas con cáncer se corresponden con sustituciones en residuos que dan lugar a una ganancia de función basada en una nueva actividad dependiente de NADPH. Esta nueva actividad le permite convertir el α -cetoglutarato en 2-hidroxiglutarato (2-HG), un metabolito con propiedades oncogénicas ausente en las células en condiciones normales (Dang et al., 2009; Ward et al., 2010). Hasta la fecha, solo las mutaciones en los genes IDH 1 y 2, este último codificando para la isoenzima mitocondrial, están asociadas a tumores del sistema nervioso central, fundamentalmente de la glía (Kim and Liau, 2012; Yan et al., 2009), leucemia mieloide aguda (LMA; Chen et al., 2013; Rakheja et al., 2012), síndrome mielodisplásico (SMD) y otros tumores sólidos (Cairns and Mak, 2013).

1.3 MECANISMOS DE TUMOROGÉNESIS ASOCIADOS A DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL

La disfunción mitocondrial está ampliamente vinculada con la tumorigénesis. Una de las características principales de las células cancerosas es el cambio desde un metabolismo oxidativo mitocondrial dependiente de oxígeno hacia un metabolismo anaeróbico en el citoplasma con inducción de la glucólisis. Esta adaptación metabólica, descrita hace casi un siglo por Otto Warburg y conocida en la literatura como “efecto Warburg”, permite a las células tumorales proliferar en condiciones limitantes de oxígeno (hipoxia) conforme el tumor va aumentando de tamaño. Tras este fenómeno de transformación metabólica de las células tumorales destaca el hecho hoy conocido de que las mutaciones en los genes que codifican a las proteínas mitocondriales mencionadas son factores etiológicos en los diferentes tipos de cáncer descritos. Esto confiere a la disfunción mitocondrial un papel causativo en la tumorigénesis y define a estos genes como genes supresores de tumores. Sin embargo, no existe aún una hipótesis clara acerca de los mecanismos a partir de los cuales la disfunción mitocondrial da lugar a la

1. Introducción

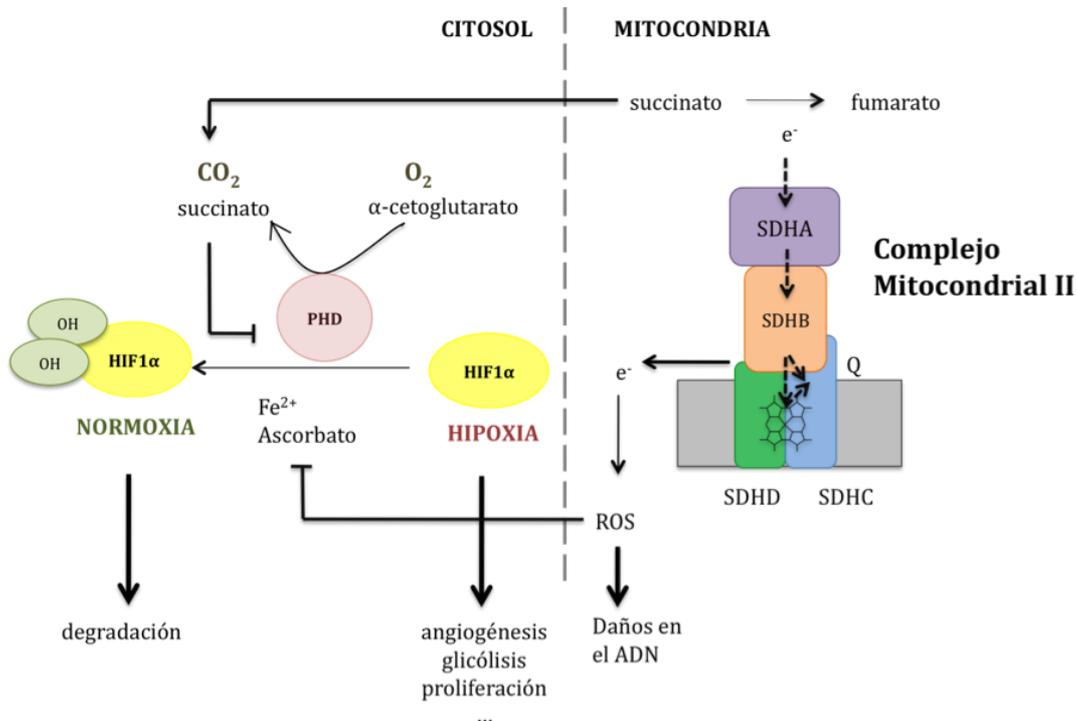
aparición del tumor.

Uno de los mecanismos de tumorigénesis por disfunción mitocondrial propuestos más aceptado implica al sistema de respuesta crónica a hipoxia mediada por factores inducibles por hipoxia (HIF- del inglés, *Hypoxia Inducible Factors*). En eucariotas, la hipoxia induce la expresión de un amplio conjunto de genes implicados en procesos que aumentan la disponibilidad de O₂ en los tejidos optimizando su uso para la producción de energía (Maxwell, 2005; Semenza et al., 1994). Estos genes son activados por el factor de transcripción Hif1 α (o Hif2 α), que en condiciones normales de oxígeno es degradado por el proteosoma (Wang et al., 1995). La señal que dirige la degradación de Hif1 α es su hidroxilación por una familia de prolin-hidroxilasas (PHDs) citosólicas que utilizan O₂, hierro, ascorbato y α -cetoglutarato como cofactores. Cuando la disponibilidad de O₂ es limitada, se inhibe la actividad de las PHDs, por lo que Hif1 α no se hidroxila sino que se acumula y se transloca al núcleo (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001) donde actúa activando un gran número de genes implicados en la adaptación a hipoxia (Bacon and Harris, 2004; Denko, 2008) (Fig. 4).

Diversos estudios proponen que las mutaciones en SDH, FH, e IDH dan lugar a la estabilización y acumulación de Hif1 α en condiciones normales de O₂ (normoxia), una teoría conocida como vía "pseudo-hipóxica" (Gottlieb and Tomlinson, 2005). Según esta hipótesis, el succinato acumulado en las células defectivas para SDH, difundiría al citosol y allí actuaría inhibiendo a las PHDs dependientes de α -cetoglutarato (Selak et al., 2005). En último término, la inhibición de las PHD lleva a la estabilización de Hif1 α y la consiguiente activación transcripcional de sus genes diana. Los procesos de adaptación a hipoxia implican activación de angiogénesis, metabolismo anaeróbico y en determinados casos, proliferación celular. Estos mismos procesos favorecen la formación y crecimiento de un tumor, por lo que la activación aberrante de la respuesta a hipoxia podría explicar el fenómeno de oncogénesis en los mutantes SDH. Existen estudios que demuestran que el fumarato acumulado en las células que presentan mutaciones en FH, también es capaz de unirse a las PHDs e inhibir su actividad (Hewitson et al., 2007; Isaacs et al., 2005; Koivunen et al., 2007) activando genes dependientes de Hif1 α . En el caso de las mutaciones en IDH, un descenso en los niveles de α -cetoglutarato debido a la falta de la actividad de la enzima podría dar lugar también a la

1. Introducción

inhibición de las PHDs (Zhao et al., 2009) favoreciendo la progresión del tumor.



Adaptación de Baysal (2008); Guzy et al., (2008); King et al., (2006); Slane et al., (2006); Selak et al., (2005.); Ishii et al., (2005); Pollard et al., (2005); Douwes Dekker et al., (2003); Yankoskaya et al., (2003); Gimenez-Roqueplo et al., (2001).

Figura 4. Esquema de tumorigénesis mediante activación aberrante de la respuesta a hipoxia por disfunción del Complejo II mitocondrial (vía pseudo-hipóxica). En la parte derecha de la imagen se representa esquemáticamente la estructura del CMII (SDH) acoplada a la reacción de conversión del succinato en fumarato. La acumulación de succinato y su difusión al citosol en situación de disfunción del CMII lleva a la inhibición de las PHDs y acumulación de HIF1α. Más detalles en el texto.

No obstante, la hipótesis de la activación de esta respuesta “pseudo-hipóxica” se encuentra en debate hoy en día ya que no explica completamente el fenómeno de tumorigénesis y no se reproduce consistentemente en modelos animales y celulares (ver discusión). Por ello se han propuesto otros mecanismos moleculares alternativos. Varios grupos han sugerido que células deficientes para SDH presentan altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS- del inglés, *Reactive Oxygen Species*) debido a la “fuga” de electrones del CMII y/o a la acumulación de ubiquinona en estado semi-reducido, una forma altamente reactiva con el oxígeno

1. Introducción

(Guzy et al., 2008; Waypa et al., 2006). En este sentido, se han observado daños de origen oxidativo en ratones mutantes para SDH (Díaz-Castro et al., 2012; Ishii et al., 2011) y activación de sistemas antioxidantes en mutantes de FH (Adam et al., 2013). Los radicales libres que se generan en estas condiciones podrían contribuir a la aparición del tumor mediante mecanismos independientes de Hif1 α , causando daño en el ADN que indujera mutaciones en genes supresores de tumores o protooncogenes (Ishii et al., 2005). También hay evidencias de que el succinato y/o el fumarato acumulado podría actuar inhibiendo a otras hidroxilasas dependientes de α -cetoglutarato, como las demetilinas de histonas JmJc, las PHDs del colágeno, y a las metilasas del ADN (Rose et al., 2011). Como resultado de esto, se ha observado un mayor estado de hipermetilación y silenciamiento transcripcional tanto de histonas como de ADN en células deficientes para SDH y FH (Cervera et al., 2009; Letouzé et al., 2013), siendo en este sentido más potente el efecto del succinato que del fumarato (Xiao et al., 2012). La evidencia más robusta que relaciona la modificación de histonas y los cambios epigenéticos en el ADN con procesos neoplásicos procede de estudios con individuos portadores de mutaciones en IDH. En humanos, las mutaciones en esta proteína mitocondrial, que consisten mayoritariamente en la sustitución de un residuo de arginina en el sitio activo, dan lugar a la ganancia de una nueva función de la enzima, en vez de inactivarla. Como se ha mencionado anteriormente, dicha mutación le confiere la capacidad de convertir de α -cetoglutarato en 2-hidroxiglutarato (2-HG) capaz a su vez de inhibir a hidroxilasas dependientes de α -cetoglutarato tales como metil transferasas del ADN y demetilinas de histonas (Dang et al., 2009; Ward et al., 2010; Figueroa et al., 2010; Xu et al., 2011).

1.4 MODELOS ANIMALES DE DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL CON MUTACIONES EN ENZIMAS MITOCONDRIALES PARA EL ESTUDIO DEL CÁNCER

Muchos estudios que han aportado información acerca de los posibles mecanismos tumorigénicos derivados de la disfunción mitocondrial han sido llevados a cabo a partir de análisis de biopsias humanas y cultivos celulares. Dichas aproximaciones

1. Introducción

presentan limitaciones ya que, por ejemplo, en las biopsias es difícil discernir entre las causas y las consecuencias de la generación del tumor, y por otro lado, los cultivos celulares no permiten estudiar los procesos que tienen lugar en un entorno sistémico. Es por ello que se han desarrollado modelos murinos modificados genéticamente para portar mutaciones en los genes que codifican las proteínas mitocondriales SDH, IDH y FH que han contribuido a elucidar algunos aspectos de los posibles procesos que conducen a la generación del tumor (Tabla 1).

1.4.1 Succinato deshidrogenasa

El primer modelo animal genéticamente modificado con ausencia de una proteína de la cadena respiratoria consistió en un modelo en ratón portador de la delección del gen *SdhD*, o ratón “knock-out” (KO) en *SdhD*, generado en nuestro grupo (Piruat et al., 2004) con la intención de desarrollar un modelo en ratón de PGL1. En este modelo, los animales homocigotos *SdhD*^{-/-} morían durante el desarrollo embrionario mientras que los heterocigotos *SdhD*^{+/-} presentaban una deficiencia general en la actividad del CMII, que sin embargo no repercutía en un fenotipo general, alteraciones en el peso u otras disfunciones fisiológicas importantes. Los análisis del CC mostraban hipertrofia e hiperplasia de la población de las células glómicas (tirosina hidroxilasa positivas, TH⁺) además de un aumento anormal de la actividad secretora de las mismas debido a una disminución de la conductancia de los iones K⁺ y un flujo constante de Ca²⁺ hacia el interior de estas células. A pesar de estas evidencias no se observó aparición de tumores en estos animales, ni siquiera en los más envejecidos (Piruat et al., 2004). Dado que la pérdida de los dos alelos silvestres de *SdhD* es condición necesaria en humanos para que se desarrolle el tumor, y teniendo en cuenta que los animales homocigotos nulos de *SdhD* son letales en estadios embrionarios, se creó en nuestro grupo un ratón KO condicional que portaba un alelo *SdhD* “floxeado” (*SdhD*^{flox}), es decir, flanqueado por secuencias loxP (Fig. 5), y portador de un transgén de la recombinasa de sitio específico CRE que se expresa exclusivamente en células positivas para el marcador tirosina hidroxilasa (TH; Para una revisión exhaustiva de la tecnología CRE-LoxP consultar Mouse Genetics and Transgenics: A Practical Approach, Jackson and Abbot, Oxford Univ. Press. Eds. 2000 y posteriores).

Tabla1. Resumen de los diferentes modelos de ratones “knock-out” (KO) y “knock-in” (KI) mostrando el gen (o genes) modificados, tipo de mutante, genotipo, fenotipo y referencia a su publicación.

Gen/es	Tipo de mutante	Genotipo	Fenotipo	Referencia
<u>SDH</u>				
<i>SdhD</i>	KO nulo, homocigoto	<i>SdhD</i> ^{-/-}	Letal embrionario	Piruat et al., 2004
<i>SdhD</i>	KO nulo, heterocigoto	<i>SdhD</i> ^{+/-}	Hipertrofia de CC	Piruat et al., 2004
<i>SdhD/H19</i>	Doble KO nulo, heterocigoto	<i>SdhD</i> ^{+/-} / <i>H19</i> ^{+/-}	Hipertrofia de CC	Bayley et al., 2009
<i>SdhD</i>	KO específico de tejido catecolaminérgico (TH-SDHD)	<i>SdhD</i> ^{flox/-} ; TH-Cre	Atrofia de médula adrenal y CC, neurodegeneración y daño oxidativo.	Díaz-Castro et al., 2012; Platero Luengo et al., 2014
<i>SdhD</i>	KO condicional inducible (SDHD-ESR)	<i>SdhD</i> ^{flox/-} ; Cre-ER TM	Atrofia de médula adrenal y CC, muerte prematura, sobre-expresión de p21 ^{WAF/Cip} , respuesta "pseudo-hipóxica" parcial	Díaz-Castro et al., 2012; Millán-Uclés et al., 2014
<i>SdhB</i>	KO nulo, homocigoto	<i>SdhB</i> ^{-/-}	Letal embrionario	Smith et al., 2011
<i>SdhB</i>	KO nulo, heterocigoto	<i>SdhB</i> ^{+/-}	Atrofia de CC	Smith et al., 2011
<i>SdhB/Bub1</i>	Doble KO nulo, heterocigoto	<i>SdhB</i> ^{+/-} / <i>Bub1</i> ^{+/-}	Atrofia de CC	Smith et al., 2011
<i>SdhB</i>	Portador de alelo "floxeado"	<i>SdhB</i> ^{flox/flox}	Hipermetilación de ADN e histonas en células cromafines <i>in vivo</i>	Letouzé et al., 2013

1. Introducción

Continuación Tabla1.				
<i>SdhC</i>	Mutante puntual, transgénico	<i>SdhC^{V69E}</i>	Aumento en los niveles de ROS y daño oxidativo en la mitocondria, disfunción de cadena respiratoria mitocondrial, disminución de tamaño corporal	Ishii et al., 2011
<u>FH</u>				
<i>Fh</i>	KO nulo, homocigoto	<i>Fh^{-/-}</i>	Letal embrionario	Pollard et al., 2007
<i>Fh</i>	KO específico de tejido renal	<i>Fh^{flox/flox}; Ksp-Cre</i>	Quistes reales, respuesta "pseudo-hipóxica" parcial	Pollard et al., 2007; Adam et al., 2013
<i>Fh/Hif</i>	Doble KO específico de tejido renal	<i>Fh^{flox/flox} Hif1(2)α^{flox/flox}; Ksp-Cre</i>	Quistes renales	Adam et al., 2013
<i>Fh</i>	KO específico de tejido de músculo liso	<i>Fhflox/flox; SMC22a-Cre</i>	Perfil metabólico renal alterado	Ashrafian et al., 2010
<u>IDH</u>				
<i>Idh1</i>	KI específico de linaje mielóide (LysM-KI)	<i>Lox-STOP-lox-Idh1^{R132H}; LysM-Cre</i>	Niveles elevados de 2-HG, esplenomegalia, hematopoyesis extra medular, histonas hipermetiladas, cambios en la metilación de ADN. Sin respuesta "pseudo-hipóxica"	Sasaki et al., 2012b

1. Introducción

Continuación Tabla1.				
<i>Idh1</i>	KI específico de tejido neural en desarrollo	<i>Lox-STOP-lox-Idh1^{R132H}</i> ; Nestin-Cre	Muerte prematura, síntesis de colágeno cerebral incompleta, niveles elevados de 2-HG, activación de respuesta "pseudo-hipóxica"	Sasaki et al., 2012a
<i>Idh2</i>	KO condicional inducible por doxiciclina	TRE- <i>Idh2^{R140Q}</i>	Niveles elevados de 2-HG, hematopoyesis extra medular, expansión de células madre hematopoyéticas en médula ósea, bloqueo de eritropoyésis.	Kats et al., 2014

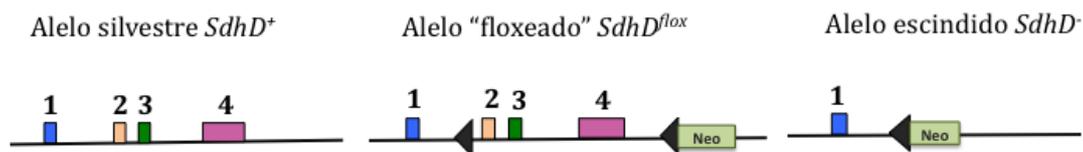


Figura 5. Esquema de los alelos $SdhD^+$, $SdhD^{lox}$ y $SdhD^-$. Se representan los 4 exones que constituyen el gen $SdhD$ numerados del 1 al 4 como rectángulos, los sitios loxP como triángulos negros, y el casete NEO que se empleó para la selección de los clones mutantes. En el alelo escindido se han perdido los exones del 2 al 4 como consecuencia del reconocimiento y corte de la CRE en los sitios loxP.

En este modelo, denominado TH-SDHD (Díaz-Castro et al., 2012), se produce la delección de $SdhD$ específicamente en aquellas células TH+, como las células glómicas del CC, las células cromafines de la médula adrenal y algunas neuronas de los sistemas nerviosos central y periférico, entre otras. Estos animales nacían y se desarrollaban de forma normal durante los primeros meses, sin embargo no mostraron indicios de tumoración a pesar de detectarse daño oxidativo en forma de elevados niveles de peroxidación lipídica. Más aún, análisis histológicos del CC mostraban degeneración de las células catecolaminérgicas, con mitocondrias defectivas y descenso en el contenido intracelular de ATP (Díaz-Castro et al., 2012; Platero-Luengo et al., 2014). Por otro lado, la estirpe de ratón portadora del alelo $SdhD^{lox}$ se cruzó con una estirpe transgénica portadora de una recombinasa CRE de expresión ubicua e inducible mediante administración de tamoxifeno, de forma que se pudiera inducir la delección del gen una vez el animal alcanzara el estado adulto. La generación de este modelo constituye los antecedentes de la presente Tesis Doctoral, que se mencionan más adelante. Después, varios autores han desarrollado modelos basados en esta enzima, como el animal KO de $SdhD$ generado por Bayley et al. (2009), en el que los individuos heterocigotos tampoco desarrollaron tumores ni ningún otro tipo de patología. Con la intención de forzar el inicio del desarrollo del tumor, esta estirpe fue cruzada con el animal knock-out de $H19$, un gen postulado como inductor de la tumorigénesis. Este doble KO heterocigoto $SdhD/H19$ mostraba tendencia a presentar mayor tamaño de CC, sin embargo, no llegaban a desarrollar tumores. Smith et al., (2011) diseñaron un

1. Introducción

modelo de ratón KO para la subunidad B de la SDH pero los animales homocigotos presentaban fenotipo de letalidad en etapas embrionarias. Aunque en los individuos heterocigotos *SdhB*^{+/-} tampoco se detectó la formación de tumores, el tamaño de los CC y el número de células glómicas era menor. Finalmente, en relación con la subunidad C, Ishii et al. (2011) desarrollaron un ratón transgénico condicional mediante la tecnología *Tet-On/Tet-Off* que expresaba el alelo *SdhC* mutado en la región de unión a ubiquinona del CMII (*SdhC*^{V69E}), sin embargo no se apreciaba descenso en actividad de la enzima SDH ni formación de tumores, a pesar de que los individuos presentaban indicios de pérdida de peso y tamaño, al igual que niveles elevados de estrés oxidativo.

1.4.2 Fumarato hidratasa

Los ratones mutantes nulos para la enzima FH (*Fh1*^{-/-}) generados por Pollard y cols. (Pollard et al., 2007) morían en las etapas tempranas de embriogénesis. Por ello, se diseñó un ratón KO condicional que portaba el alelo *Fh1* mutante “floreado” y se dirigió la expresión específica de CRE bajo el promotor de Ksp-Cadherin restringida a riñón (Pollard et al., 2007; Adam et al., 2013). Todos los animales mutantes mostraban quistes renales proliferativos macroscópicos de origen clonal, en los cuales se detectó sobreexpresión de *Hif1α*, *Hif2α*, al igual que inducción de la expresión de varios de sus genes diana implicados en angiogénesis, como el factor de crecimiento endotelial vascular (*Vegf*-del inglés, *Vascular endothelial growth factor*), en glicólisis, como el transportador 1 de glucosa (*Glut1*-del inglés, *Glucose Transporter 1*) y en proliferación, como el inhibidor 1A de quinasa dependiente de ciclina (*Cdkn1*-del inglés, *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*) (Ashrafian et al., 2010). Estudios paralelos sobre una línea celular fibroblástica derivada de embriones de ratón (MEF- del inglés, *Mouse embryo fibroblasts*) mutantes para la FH, mostraron también sobre-expresión de *Hif1α* y genes relacionados con el mismo, corroborando así los datos obtenidos de los análisis realizados sobre los quistes renales del ratón. Se realizó el análisis del perfil transcripcional del genoma completo en los riñones deficientes de *Fh1*. Los resultados mostraban que la pérdida de *Fh1* inducía rutas antioxidantes independientes de *Hif1α* a través de la sobreexpresión del factor de transcripción NRF2 (del inglés, *NF-E2-related factor 2*).

1. Introducción

Además, estudios adicionales en MEF demostraron disminución de la función de KEAP1 (del inglés, *kelch-like ECH-associated protein 1*), la cual se encarga de regular negativamente NRF2 (Zhang, 2006). A pesar de que los quistes renales detectados en los animales se asemejan a las lesiones pre-malignas encontradas en los pacientes de HLRCC, la ausencia de progresión a tumor de los ratones puede ser debida a que el fallo renal actúe impidiendo la displasia y subsecuente transformación a tumor. Para intentar recapitular la aparición de leiomiomas se generó otra estirpe de ratón deficiente para *Fh1* específico de célula de músculo liso (Ashrafian et al., 2010), pero la afectada salud que presentaban los animales provocaba la muerte prematura de los individuos, impidiendo obtener datos concluyentes.

1.4.3 Isocitrato deshidrogenasa

El primer modelo animal genéticamente modificado para portar mutación en *Idh1* fue diseñado por Sasaki et al. (Sasaki et al., 2012b). Se trata de un ratón “knock-in” (KI) condicional que expresa el alelo mutante *Idh1*^{R132H} una vez se produce la escisión de un cassette *loxP-stop-loxP* que impide su transcripción. Cuando se cruza este animal con otro de la estirpe LysM-Cre se genera el modelo KI que expresa el alelo mutado específicamente en la línea celular mieloide (Ratón KI LysM). Bajo estas condiciones, se pudo detectar acumulación de Hif1 α e inducción de sus genes diana debido a que la acumulación de 2-HG actuaba inhibiendo a las PHD, además de esplenomegalia y hematopoyesis extra medular, entre otros efectos. Recientemente Kats et al. (2014) han generado y caracterizado hematológicamente un ratón transgénico que expresa el alelo mutante *Idh2*^{R140Q} inducido por doxiciplina. Aunque la expresión de este alelo mutante por si solo da lugar a hematopoyesis extra medular, expansión de progenitores hematopoyéticos en la médula y bloqueo de la eritropoyesis, no se provoca la iniciación de leucemia en los animales, lo cual refuerza la conclusión de que las mutaciones en *Idh2* requieren de eventos adicionales para alcanzar la transformación leucémica de las células.

1.5 PAPEL DE LA MITOCONDRIA EN LA HEMATOPOYESIS

Un tipo de tumores en los que la disfunción mitocondrial parece jugar un papel etiopatogénico son las neoplasias mieloides. Éstas constituyen son un grupo de enfermedades de origen clonal caracterizadas por la proliferación descontrolada de células hematopoyéticas, en particular de los linajes mieloides. En este grupo de enfermedades se incluyen, entre otras, las leucemias mieloides agudas (LMAs) y los síndromes mielodisplásicos (SMDs) (Vardiman et al., 2009).

En el sistema hematopoyético encontramos células madre hematopoyéticas (HSC- del inglés, *Hematopoietic Stem Cells*), células progenitoras comprometidas hacia la diferenciación a distintos linajes y células maduras ó diferenciadas. Como características definitorias, las HSCs poseen capacidad de auto-renovarse dando lugar a nuevas HSCs (LT-HSC- del inglés, long term HSCs), y de diferenciarse a células progenitoras multipotentes. El mantenimiento de estas propiedades está estrechamente relacionado con el microambiente hipóxico que se da en la médula ósea (Takubo et al., 2010; Miharada et al., 2012; Mathieu et al., 2011). Una propiedad de las LT-HSC quiescentes es la baja masa mitocondrial que presentan además de su metabolismo mayoritariamente glucolítico, en contraposición a las células progenitoras, más proliferativas y con mayor número de mitocondrias (Simsek et al., 2010). En este sentido, se ha descrito un papel fundamental de la ruta $Hif1\alpha$ en el mantenimiento de las propiedades metabólicas de las HSCs en estado quiescente. En el paso de HSC a célula progenitora multipotente se produce un cambio desde este metabolismo glucolítico hacia un metabolismo oxidativo (Suda et al, 2011; Takubo and Suda, 2012; Rehn et al., 2011; Parmar et al., 2007) (Fig. 6). Por tanto, es concebible que un control apropiado de los mecanismos de adaptación a hipoxia, así como un correcto mantenimiento de la fisiología mitocondrial son necesarios para mantener el equilibrio entre los estados quiescentes, proliferativos y de diferenciación de las células hematopoyéticas. Cualquier alteración en estos procesos podría conducir hacia una transformación neoplásica. En este sentido, en pacientes de SMD se ha observado mayor densidad vascular en la médula ósea (Albitar, 2001; Savic et al., 2012), aumento en los niveles expresión de $Hif1\alpha$ (Tong et al., 2012), y activación de la vía de respuesta a

1. Introducción

hipoxia, considerándose ésta como marcador de mal pronóstico en la progresión de la enfermedad (Elias and Verma, 2012). En un trabajo recientemente publicado en nuestro grupo, se observa una activación de la transcripción de genes de respuesta a hipoxia, entre ellos *Vegf*, que promueven proliferación celular, metabolismo anaerobio y crecimiento anormal de las células sanguíneas en LMA y SMD (Falantes et al., 2014).

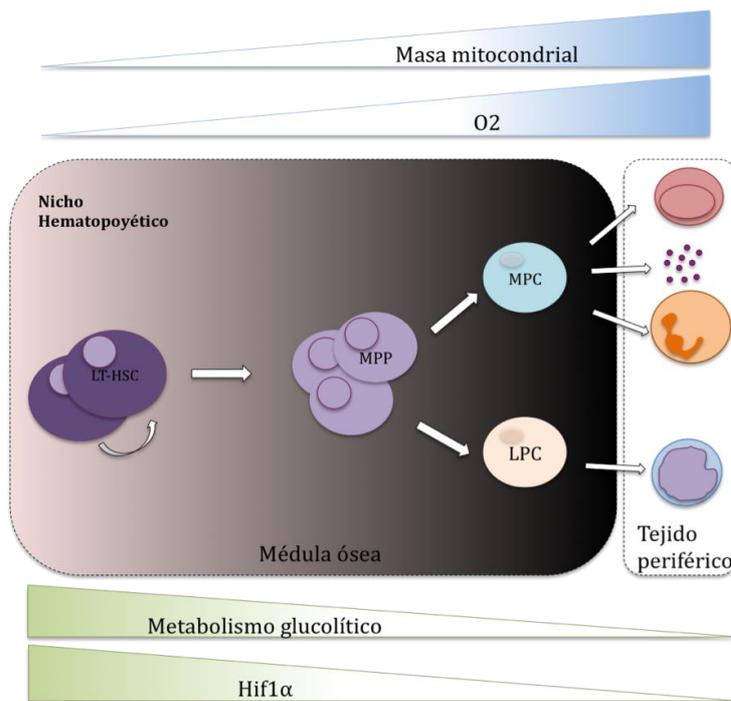


Figura 6. Proceso de diferenciación en el sistema hematopoyético. Representación esquemática del origen de los diferentes linajes de células hematopoyéticas a partir de las HSC (MPP- Multipotent progenitor cell; MPC myeloid progenitor cell; LPC Lymphoid Progenitor cell).

Por último, la evidencia más palpable de que el correcto funcionamiento de la función mitocondrial es necesario para mantener la homeostasis del tejido hematopoyético y su diferenciación a células maduras, al menos de linaje mieloides, viene del hecho de que se han observado mutaciones en el gen que codifica la enzima mitocondrial IDH en un amplio porcentaje de leucemias mieloides (Parsons et al., 2008; Mardis et al., 2009) y SMDs. De hecho, se ha descrito que la acumulación de 2-HG como consecuencia de dicha mutación está considerada hoy en día como un biomarcador de neoplasias mieloides y glioblastoma, además de promover la progresión de leucemia a SMD (Kats et al., 2014; Cimmino et al., 2011). Los efectos fisiológicos de la acumulación de este metabolito pueden seguir dos vías: por un lado, incrementando la producción de ROS y, en consecuencia, el daño en el ADN; y por otro, al ser el 2-HG estructuralmente muy parecido al α -cetoglutarato, podría unirse e inhibir a las enzimas dependientes de α -

1. Introducción

cetoglutarato, como las PHDs o las demetilinas de ADN e histonas. Esta posibilidad explicaría por qué se han detectado activación de la vía “pseudo-hipóxica” e incrementos en la expresión de genes target de *Hif1 α* en muestras de pacientes con LMA, además de un fenotipo de hipermetilación aberrante debido a la inhibición de TET2, una enzima dependiente de α -cetoglutarato (Figueroa et al., 2010).

Otros estudios describen una disfunción mitocondrial asociada a trastornos mieloproliferativos (Huckabee, 1961). Por ejemplo, se han observado reordenamientos del ADN en diversos desórdenes hematológicos entre ellos, los SMD.

En los últimos años se han encontrado evidencias que describen que las mitocondrias presentes en las células tumorales son frecuentemente resistentes a la permeabilización de la membrana mitocondrial externa. La resistencia a este proceso inhibe la apoptosis, lo cual juega un papel decisivo en la progresión de SMD a LMA (Zamzami et al., 1998; Green and Kroemer, 2004). Algunos autores proponen un modelo patogénico basado en un defecto en el metabolismo del hierro por disfunción mitocondrial debida a alteraciones en la actividad de la cadena de transporte de electrones y/o por mutaciones en el ADNmt (Gattermann et al., 1993). Finalmente, existen estudios que demuestran una reducción del potencial de membrana mitocondrial en la médula ósea de los pacientes con SMD (Matthes et al, 2000; Reddy et al., 2002).

1.6 GENERACIÓN DEL MODELO MURINO SDHD-ESR: ANTECEDENTES EXPERIMENTALES

A partir del ratón portador del alelo *SdhD*^{fl α} se generó una estirpe mutante en la que se puede inducir la pérdida de *SdhD*. Para ello cruzamos el ratón condicional *SdhD*^{fl α} con otra estirpe transgénica que expresa una recombinasa CRE fusionada al dominio de unión de estrógenos del receptor de estrógenos (ESR-del inglés, *Estrogen Receptor*; Hayashi and McMahon, 2002). A este mutante lo llamamos ratón SDHD-ESR (Díaz-Castro et al., 2012; Millán-Uclés et al., 2014). Cuando se inyecta a estos ratones tamoxifeno (Tx), un agonista sintético de estos receptores, la recombinasa se transloca al núcleo reconociendo a las secuencias diana LoxP y

1. Introducción

provocando la escisión del gen. Los análisis del CC y la médula adrenal (MA) de estos ratones, lejos de presentar tumoración o hipertrofia, muestran degeneración del tejido (Díaz-Castro et al., 2012).

En cualquier caso, el ratón SDHD-ESR es considerado como un sistema válido en el que estudiar a nivel de organismo los mecanismos moleculares que se activan en los tejidos frente a la pérdida de función del CMII y un modelo animal idóneo para identificar potenciales mecanismos que eventualmente pueden causar procesos de tumorigénesis ante la pérdida del gen *SdhD*. Además, las distintas líneas de investigación que evidencian una relación entre disfunción mitocondrial, hipoxia y neoplasias mieloides nos ha conducido al estudio y validación del ratón SDHD-ESR, al tratarse de un ratón mutante en una proteína del metabolismo oxidativo mitocondrial, como un modelo idóneo para el estudio de este tipo de desórdenes y su relación con la función mitocondrial.

2. OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

1. Caracterizar y validar la estirpe de ratón SDHD-ESR como un modelo animal de disfunción mitocondrial por delección inducida del gen *SdhD*.
2. Investigar los posibles mecanismos que inducen la aparición de tumores por disfunción del CMII, considerando como hipótesis previa la implicación de la vía de respuesta a hipoxia mediada por Hif1 α .
3. Caracterizar el sistema hematopoyético del modelo de ratón mutante SDHD-ESR y validarlo como modelo murino de síndromes mielodisplásicos y/o leucemias mieloides.
4. Determinar el potencial papel leucemogénico de los progenitores hematopoyéticos deficientes en *SdhD*.

3. RESULTADOS

3 RESULTADOS

3.1 VALIDACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DE RATÓN SDHD-ESR

Como se ha mencionado en el apartado *Introducción*, trabajos previos realizados en nuestro grupo permitieron generar una estirpe de ratón portadora de un alelo mutante “floxeado” del gen *SdhD* (*SdhD^{flox}*; Díaz-Castro et al., 2012). Para generar un animal mutante *SdhD* condicional inducible, este ratón se cruzó con una línea murina que expresa la recombinasa de sitio específico CRE fusionada al dominio de unión de ligando de un receptor de estrógenos (CRE-ESR; Hayashi and McMahon, 2002), lo que permitió llevar a cabo la delección de *SdhD* en el organismo mediante administración de derivados de estrógenos como el tamoxifeno (ratón SDHD-ESR; Díaz Castro et al., 2012).

Para poder evaluar la delección generalizada del gen *SdhD* mediada por la CRE-ESR, se analizó la presencia relativa del alelo *SdhD* mediante PCR a tiempo real (RT-PCR- del inglés, *real time PCR*) de ADN genómico extraído de riñón e hígado tres semanas después del tratamiento de los animales con tamoxifeno por inyección intraperitoneal (i.p.; 400 µg de tamoxifeno por gramo de ratón). Los resultados indicaron que la cantidad de alelo *SdhD* funcional en los tejidos de los ratones disminuyeron a un 16% en riñón y a un 54% en hígado en los animales heterocigotos que expresaban la recombinasa CRE-ESR (*SdhD^{flox/-}* CRE-ESR; denominados en adelante, SDHD-ESR) con respecto a los animales heterocigotos que no expresaban la CRE-ESR (*SdhD^{flox/-}*, denominados en adelante, +/-). Sin embargo, cuando se administraba una dosis menor de tamoxifeno (100 µg por gramo de ratón), esta pérdida del alelo *SdhD* era menor. Es decir, se observó un efecto dosis-respuesta (Fig. 7). Como referencia se usaron muestras de animales *SdhD^{flox/+}* sin la recombinasa CRE-ESR (en adelante +/+).

Además de la cuantificación molecular del alelo *SdhD*, realizamos estudios funcionales determinando la actividad succinato-ubiquinona óxido-reductasa (SQR) del CMII en los mismos tejidos tras el tratamiento con tamoxifeno a las

3. Resultados

dosis mencionadas.

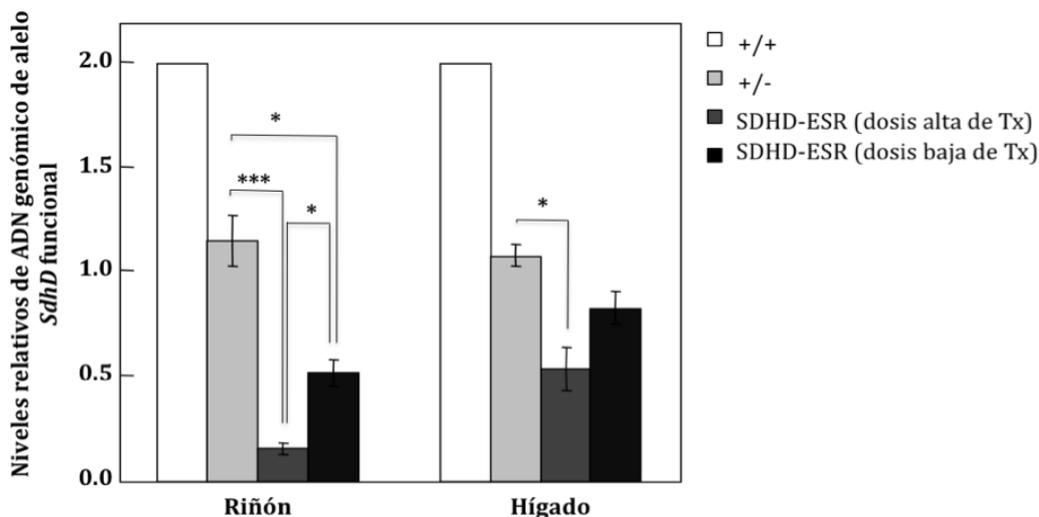


Figura 7. Validación de la delección en el ratón SDHD-ESR. Cantidad relativa del alelo funcional de *SdhD* estimada mediante PCR cuantitativa. Se representan los datos obtenidos tanto en riñón como en hígado de animales silvestres heterocigotos que no expresan la CRE-ESR (+/-), y los mutantes que sí expresan la recombinasa (SDHD-ESR) respecto a los controles silvestre con dos copias funcionales (+/+) tratados con altas dosis (400 $\mu\text{g/g}$) o bajas dosis (100 $\mu\text{g/g}$) de tamoxifeno. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. N= 3-8 animales por grupo.

Dicha actividad fue aproximadamente un 32% y un 64% menor en hígado y riñón respectivamente en animales SDHD-ESR tratados con la dosis alta de tamoxifeno respecto a la obtenida en los animales +/-, mientras que la actividad NADH-deshidrogenasa del CMI tomada como control no se veía afectada. Se observa, de nuevo, un efecto dosis-respuesta (Fig. 8).

Respecto a la apariencia general de los ratones tras la administración de tamoxifeno, se pudo comprobar que los animales SDHD-ESR dejaban de ganar peso tras la administración de la droga a bajas dosis. Cuando se aumentaba la dosis, los animales además de perder peso, morían en promedio a las 3 semanas después del tratamiento. Los ratones SDHD-ESR tratados con las dosis menores de tamoxifeno, aunque sobrevivían más tiempo que los animales tratados con dosis altas, seguían presentando menores tasas de supervivencia cuando se comparaban con los animales control. En este caso, este grupo incluye a los animales +/+ y +/- (Fig. 9).

3. Resultados

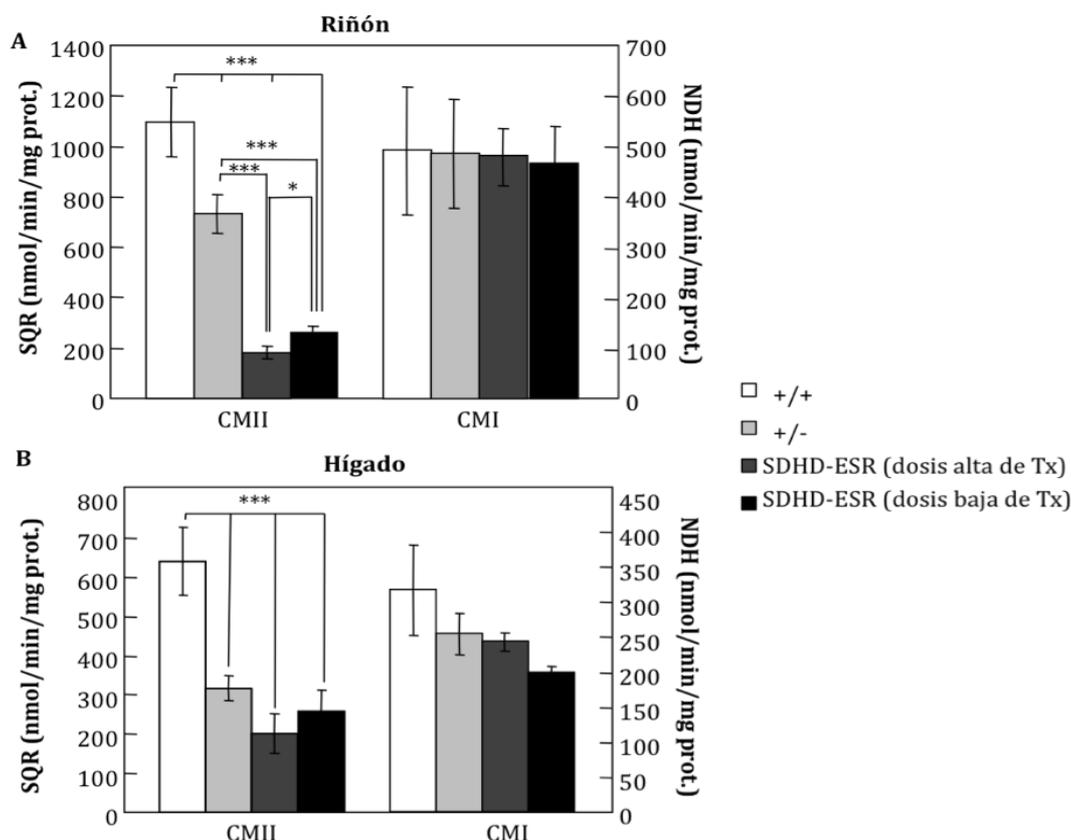


Figura 8. Análisis de la actividad enzimática del CMII de los ratones SDHD-ESR. Actividad succinato-ubiquinona óxido-reductasa (SQR) del CMII y la actividad NADH-deshidrogenasa del CMI en riñón (A) y en hígado (B) de animales silvestres (+/+), heterocigotos que no expresan la CRE-ESR (+/-), y los mutantes SDHD-ESR 3 semanas después del tratamiento con tamoxifeno a dosis alta y baja. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. N= 3-8 animales por grupo.

3.2 ESTUDIO DE LA VÍA “PSEUDO-HIPÓXICA” EN TEJIDO DEL ANIMAL SDHD-ESR

Para estudiar la posible activación de los mecanismos de la vía “pseudo-hipóxica” se analizó la expresión de varios genes diana de *Hif1 α* en riñones de animales +/+, +/- y SDHD-ESR.

Para descartar posibles efectos secundarios debidos al deterioro general de los animales tras las tres semanas de tratamiento con tamoxifeno, se analizaron también riñones y médulas adrenales procedentes de animales sacrificados una

3. Resultados

semana después del tratamiento. En ese momento del análisis se pudieron detectar cambios estadísticamente significativos en los niveles de ARNm de *SdhD* así como en la actividad SQR del CMII en riñón (Fig. 10).

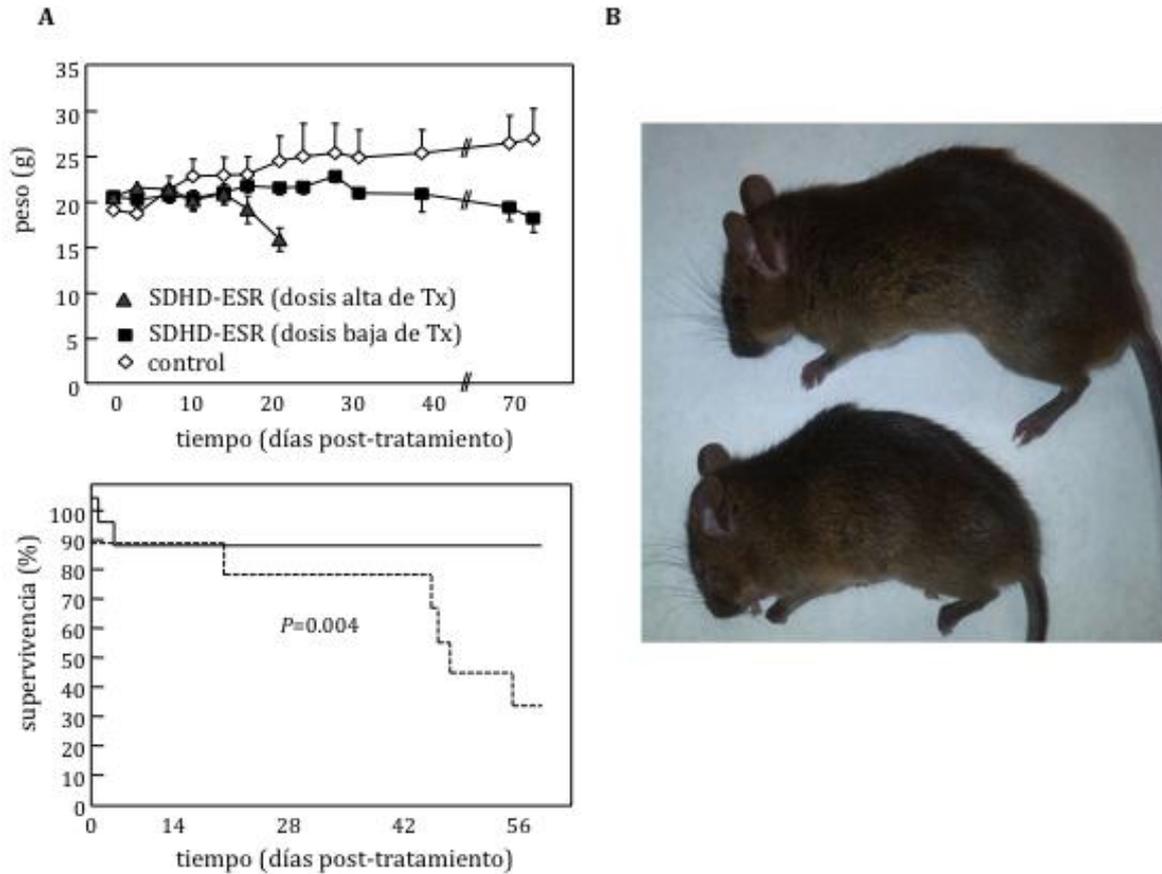


Figura 9. Curvas de crecimiento y supervivencia de los animales SDHD-ESR. En la figura superior (A) se representan la progresión de pesos de animales control (+/+) y SDHD-ESR tras el tratamiento con distintas dosis de tamoxifeno. En la figura inferior, la tasa de supervivencia de los animales SDHD-ESR tratados a bajas dosis de tamoxifeno (línea discontinua) en comparación con el grupo de animales control (+/+ y +/-). En la derecha (B) se muestra una imagen de un ratón control +/+ (arriba) y uno SDHD-ESR tras 15 días de tratamiento con tamoxifeno (abajo). N= 3-8 animales por grupo.

El análisis de la expresión de genes diana de *Hif1 α* , como los que codifican el factor de crecimiento endotelial vascular (*Vegf*), el transportador de glucosa 1 (*Glut1*) o la prolil hidroxilasa 3 (*Phd3*), no mostró diferencias entre animales heterocigotos (+/-), silvestres (+/+) y SDHD-ESR a la semana. Sin embargo, tras tres semanas de tratamiento con el tamoxifeno, en los animales SDHD-ESR, se observó una

3. Resultados

tendencia hacia mayores niveles de expresión, que sólo fue significativa para *Vegf* (Fig. 11A). A pesar de estos resultados, no se consiguió detectar acumulación de Hif1 α mediante *western blot* a partir de extractos de proteína total (Fig. 11B).

Estos resultados indican que la activación de la vía “pseudo-hipóxica” mediada por Hif1 α como consecuencia de la disfunción mitocondrial por depleción del CMII no tienen lugar de una forma evidente en los tejidos del ratón, aunque no descartamos que pudiera estar ocurriendo con poca intensidad.

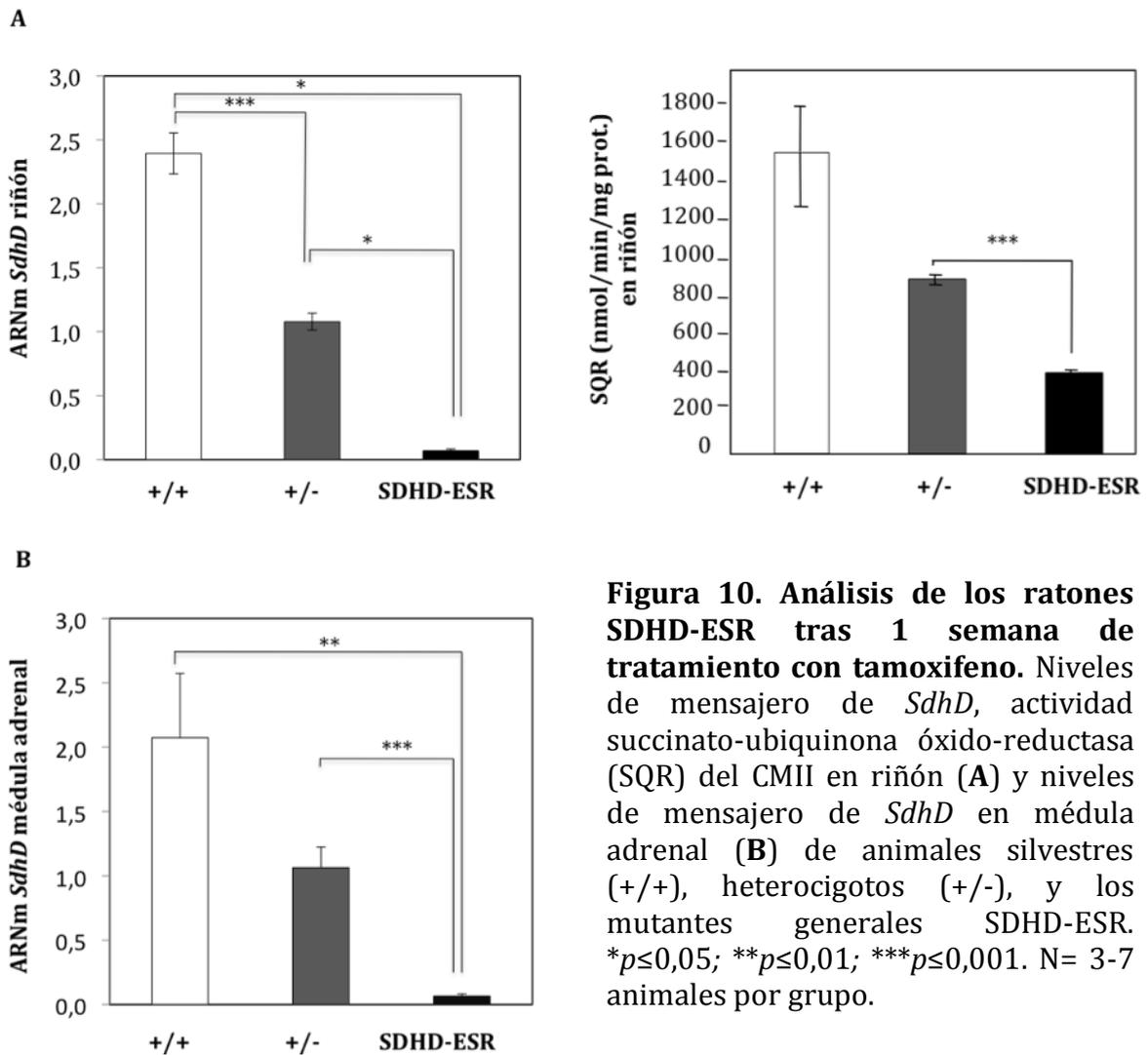


Figura 10. Análisis de los ratones SDHD-ESR tras 1 semana de tratamiento con tamoxifeno. Niveles de mensajero de *SdhD*, actividad succinato-ubiquinona óxido-reductasa (SQR) del CMII en riñón (**A**) y niveles de mensajero de *SdhD* en médula adrenal (**B**) de animales silvestres (+/+), heterocigotos (+/-), y los mutantes generales SDHD-ESR. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. N= 3-7 animales por grupo.

3. Resultados

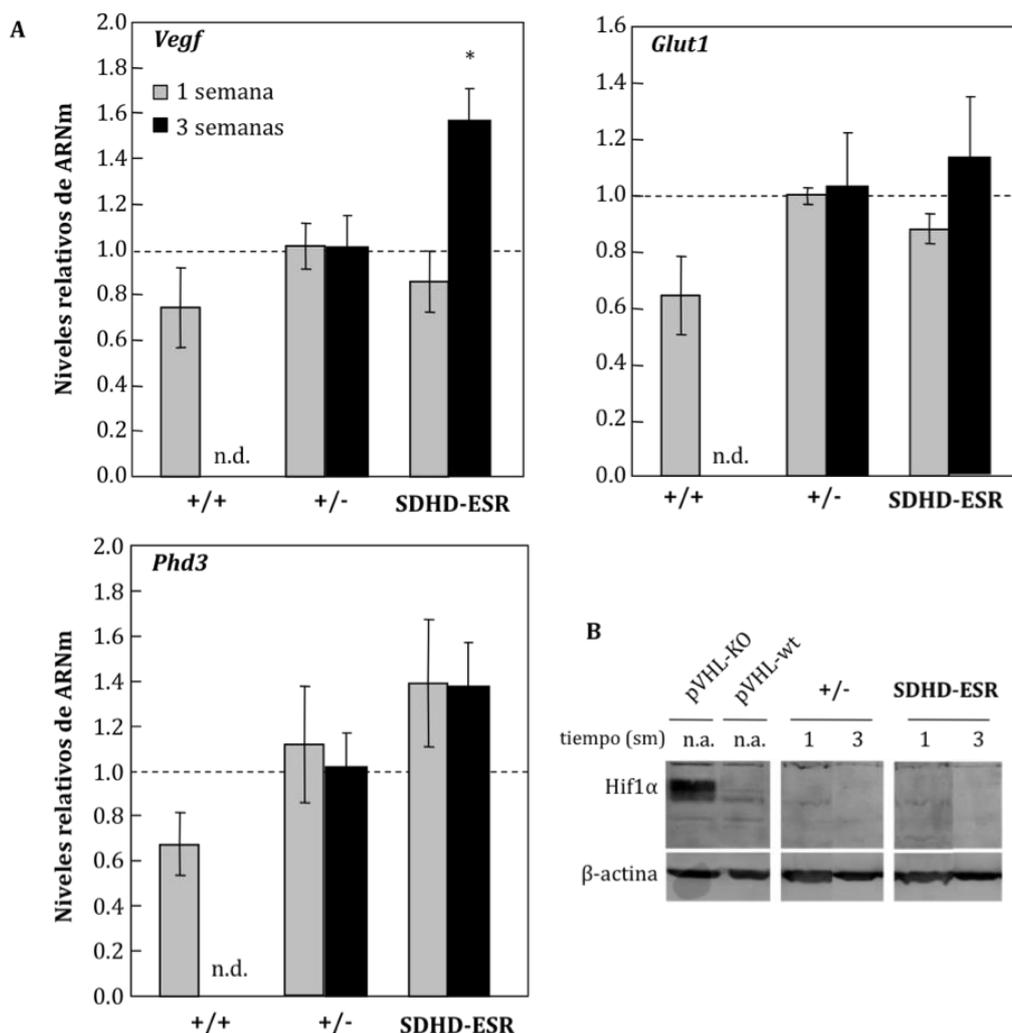


Figura 11. Respuesta “pseudo hipóxica” en tejido del ratón SDHD-ESR. Cuantificación de los niveles de ARNm de 3 genes diana de *Hif1α* (*Vegf*, *Glut1* y *Phd3*) en riñón de animales silvestres (+/+), heterocigotos (+/-) y mutantes (SDHD-ESR) tras una semana (columnas grises) o 3 semanas (columnas negras) de tratamiento con tamoxifeno en relación a los niveles en animales sin tratar (A). Western blot de extracto de proteínas totales para detectar Hif1α tras una o 3 semanas del tratamiento con la droga en animales heterocigotos y mutantes. En el primer carril se utilizó extracto de proteínas procedentes de páncreas de un ratón KO para von Hippel-Lindau (proteína implicada en ubiquitinación y subsecuente degradación vía proteasoma de Hif1α) y en el segundo carril se utilizó extracto de un ratón silvestre (B). n.d.: no determinado. * $p \leq 0,05$. N= 3-8 animales por grupo.

Una posibilidad para explicar la falta de respuesta es que la cinética de la difusión de la droga en el tejido provocara que la delección de *SdhD* se produjera paulatinamente durante un periodo extendido de tiempo y que esto supusiera que

3. Resultados

la acumulación de Hif1 α se estuviera produciendo en una proporción pequeña de células en cada momento, ya que es sabido que la acumulación de la proteína en hipoxia es transitoria debido a la reactivación de las PHDs (Berra et al., 2006). Por tanto, generamos líneas celulares inmortalizadas derivadas de los tejidos de los animales SDHD-ESR como sistema *ex vivo* en el que la delección de *SdhD* se produjera de forma coordinada.

3.3 DESARROLLO DE LÍNEAS CELULARES INMORTALIZADAS DERIVADAS DE ANIMALES SDHD-ESR

Los fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs-del inglés, *Mouse embryonic fibroblasts*) son líneas celulares derivadas de ratón comúnmente usadas. Además, dado que la mayoría de los tumores tienen origen epitelial, se consideró conveniente generar en paralelo una línea celular epitelial inmortalizada a partir de los riñones de nuestro animal SDHD-ESR (BMKs- del inglés, *Baby mouse kidney cells*) (Mathew et al., 2008).

3.3.1 Línea celular inmortalizada de fibroblastos embrionarios de ratón (iMEFs)

Los MEFs se obtuvieron a partir embriones con los genotipos +/+, +/- y SDHD-ESR. Dado que la capacidad proliferativa de los MEFs en cultivo primario disminuye considerablemente con el tiempo, decidimos generar líneas inmortalizadas con cada uno de los tres genotipos. Los dos procedimientos más empleados para inmortalizar MEFs en cultivo primario son los pases seriados antes de que las células alcancen el plató de crecimiento y la transformación de los fibroblastos mediante la sobre -expresión de uno o varios oncogenes. En nuestro caso, para evitar disparidad en los cambios genéticos que se producen cuando se buscan clones inmortalizados de forma espontánea, generamos los MEFs inmortalizados (iMEFs) por expresión del Antígeno T del oncogén SV40, cuyo gen se insertó en el genomio de los clones mediante su transformación con el plásmido pEF321-T (Ali and DeCaprio, 2001).

3. Resultados

Una vez electroporados con el plásmido, los cultivos se mantuvieron en el incubador hasta detectar colonias de células. Cada colonia se aisló y se cultivó individualmente.

3.3.2 Línea celular inmortalizada de células epiteliales de riñón de ratón neonato (iBMKs)

Se generaron líneas celulares de células epiteliales con los tres genotipos a partir de riñón de ratones de cinco días de vida. La generación de líneas inmortalizadas a partir de estas células epiteliales de ratón precisa de la inactivación simultánea de la proteína Rb (retinoblastoma) y la ruta de p53. Rb regula proliferación celular controlando la transición de la fase G1 a la S, mientras que p53 evita la entrada prematura de la célula en fase S ante la inactivación de Rb (Mathew et al., 2008). Entre los métodos más comunes de inactivación de p53 (o Rb) se encuentra la inhibición directa a través de oncoproteínas virales como E1A (White, 2006; White et al, 1991), dando lugar a la parada del crecimiento celular y apoptosis, procesos que a su vez deben ser inactivados para la inmortalización celular a través de la expresión de un mutante dominante negativo de p53 (p53DD; Shaulian et al., 1992). Por ello, para la generación de nuestra línea celular inmortalizada, se empleó dicho método a través de la electroporación con plásmidos portadores tanto de E1A como de p53DD.

3.4 ACTIVACIÓN DE LA VÍA PSEUDO-HIPÓXICA EN LAS LÍNEAS CELULARES

3.4.1 Estudio de la expresión de genes de respuesta a hipoxia

En primer lugar, se cuantificó la delección del gen *SdhD* como una forma de validar el sistema celular. El estudio de dos clones distintos de cada genotipo dio los mismos resultados. Se observó un descenso en los niveles de mensajero tras 4 y 24 horas de tratamiento con 4-OHT (metabolito activo del tamoxifeno; 66 nM) directamente en el medio de cultivo de los clones SDHD-ESR de ambas líneas (Fig. 12).

3. Resultados

Respecto a la expresión de los genes *Phd3* y *Glut1*, se observó que ambos se encontraron inducidos en los clones SDHD-ESR tras 4 y 24 horas de la exposición a 4-OHT. En la expresión de *Vegf* no se observó esta inducción sino que, muy al contrario, se detectó disminución en sus niveles de mensajero en comparación con los clones control (+/+ y +/-) tanto en iMEFs como iBMKs (Fig. 13).

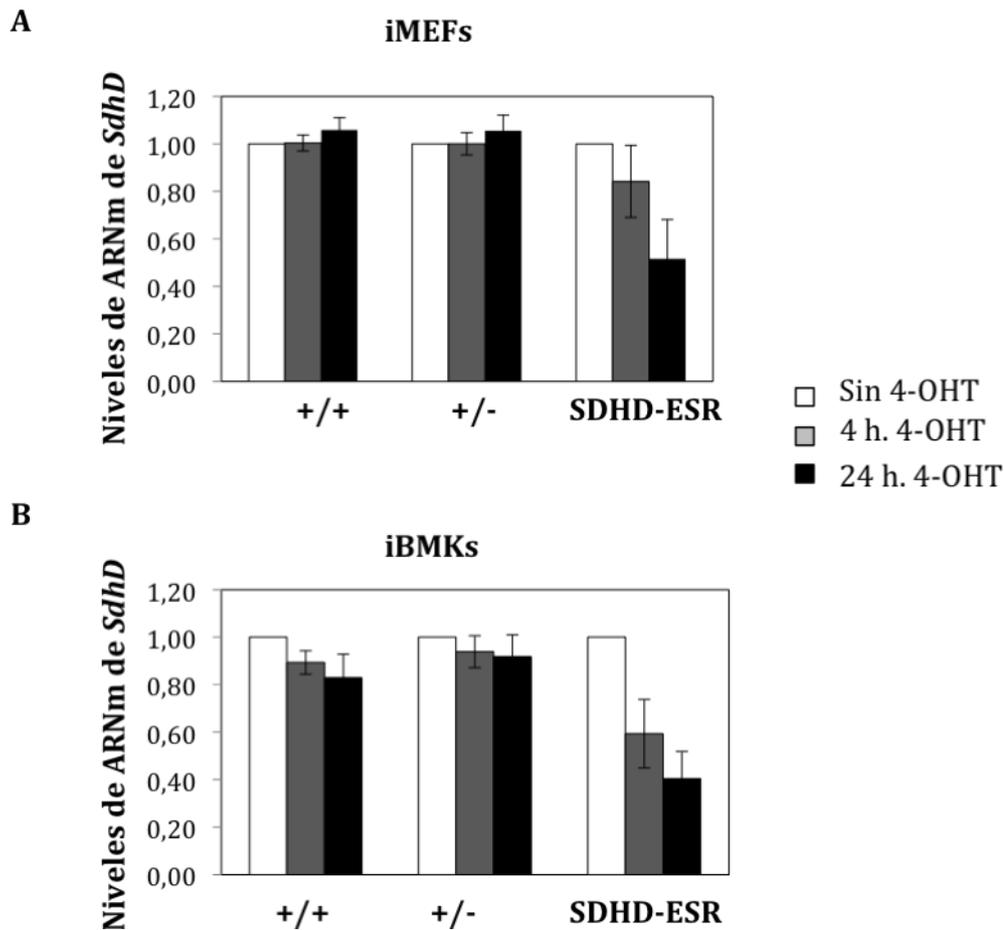


Figura 12. Deleción del gen *SdhD* en líneas celulares. Resultados obtenidos mediante RT-PCR para detectar los niveles de mensajero del gen *SdhD* en clones independientes de los tres genotipos de iMEFs (A) e iBMKs (B) después de añadir el 4-OHT al cultivo. Los datos se encuentran normalizados con respecto al gen de la proteína ácida ribosomal (Arbp) usado como control de carga. Se analizaron 2 clones diferentes por cada genotipo. Se representan los resultados obtenidos de un clon por cada grupo. El resultado obtenido en el otro clon fue similar. N=3-6 clones por genotipo por condición.

Estos resultados parecían indicar cierta activación de la vía “pseudo-hipóxica” en los clones que perdían ambos alelos del gen *SdhD*. Sin embargo, los datos no fueron

3. Resultados

consistentes con los obtenidos en los tejidos del modelo animal. Mediante *western blot* se pudo observar que mientras las líneas de iMEFs e iBMKs de genotipo +/+ y +/- no presentaban diferencias en cuanto a los niveles de proteínas de Glut1 y Hif1 α , la línea mutante SDHD-ESR sí mostraba acumulación de ambas proteínas, aunque con diferentes dinámicas de inducción.

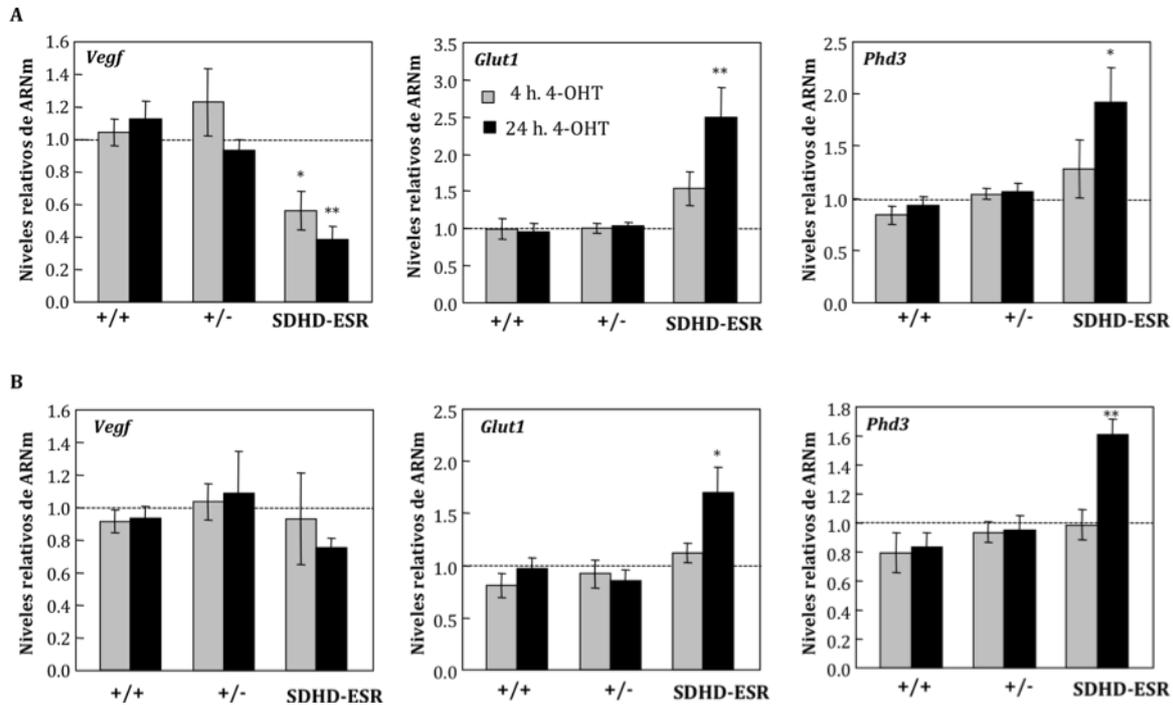


Figura 13. Genes de respuesta a hipoxia en líneas celulares inmortalizadas. Las gráficas representan los datos obtenidos a partir de RT-PCR para detectar niveles de ARNm de *Vegf*, *Glut1* y *Phd3* en iMEFs (A) e iBMKs (B) de cada uno de los genotipos. Los datos se encuentran normalizados con respecto al ARNm de la proteína ácida ribosomal (Arbp) usado como control de carga. Las barras grises y negras indican los niveles de expresión obtenidos 4 y 24 horas después de añadir el 4-OHT al cultivo respectivamente. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ respecto a la condición sin 4-OHT. Se analizaron 2 clones diferentes por cada genotipo. Se representan los resultados obtenidos de un clon por cada grupo. El resultado obtenido en el otro clon fue similar.

La mayor señal de estabilización/acumulación de Hif1 α se obtuvo a las 4 horas tras la exposición de las células a 4-OHT, tras lo cual se observó una caída de la señal, algo coherente con lo previamente descrito en otros sistemas. Por su parte, se observó una acumulación paulatina de Glut1 hasta las 24 horas (Fig.14).

3. Resultados

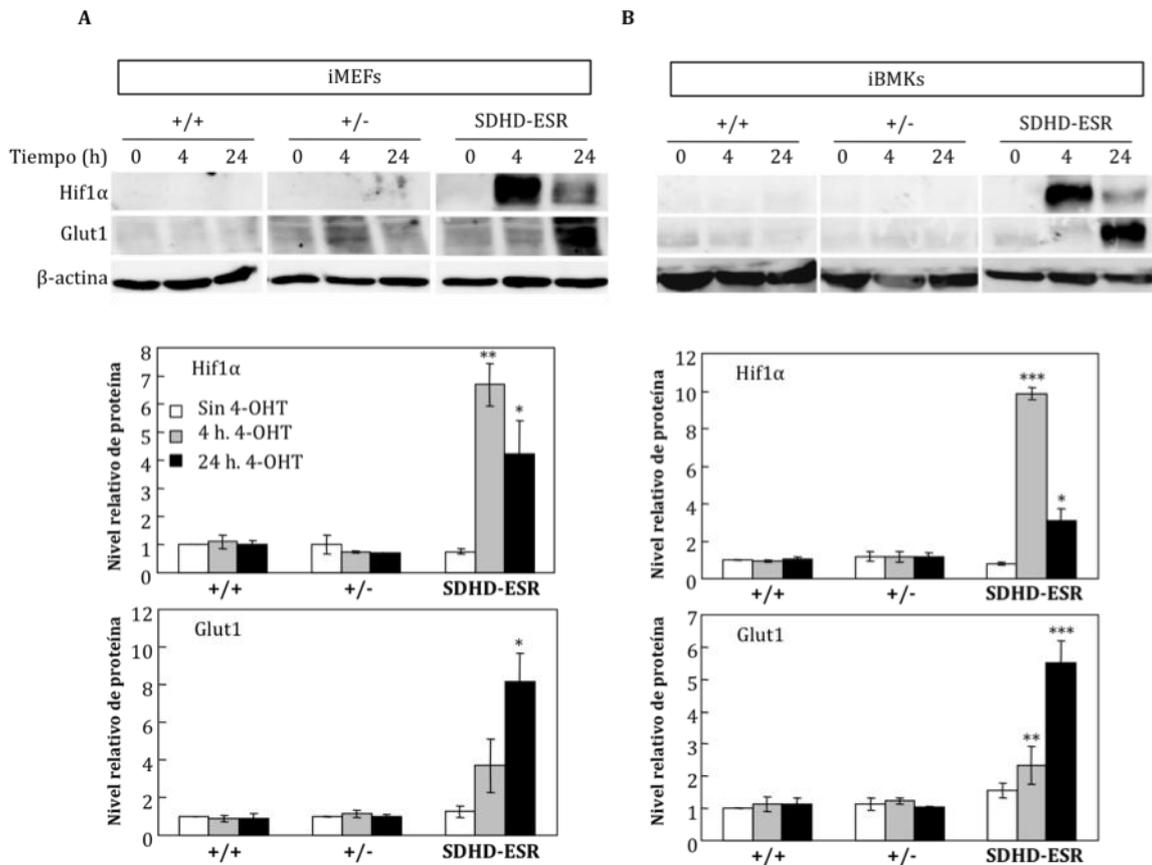


Figura 14. Niveles de proteínas por Western blot. Niveles de detección de Hif1α y Glut1, de 120 y 55 kDa aprox. respectivamente, en líneas celulares de iMEFs (A) e iBMKs (B). Se muestran los niveles de Hif1α y Glut1 sin tratar con 4-OHT, a las 4 y 24 horas después de añadir el 4-OHT tomando como control de carga la β-actina (50 kDa aprox.). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ respecto a la condición sin 4-OHT. Se muestran los resultados de uno de los clones.

3.5 IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS RUTAS MOLECULARES QUE RESPONDEN A LA DEPLECIÓN DEL CMII MEDIANTE ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA A GRAN ESCALA.

3.5.1 Estudio de expresión génica a gran escala en tejido de ratón

Los estudios realizados en los tejidos y líneas celulares derivadas del ratón SDHD-ESR no permitieron extraer conclusiones definitivas relativas a la activación de la vía “pseudo-hipóxica”. Con el objetivo de identificar posibles mecanismos

3. Resultados

moleculares alternativos que pudieran dar lugar a la aparición del tumor o a la iniciación de los procesos que finalmente pudieran derivar en tumorigénesis, se llevó a cabo un estudio a gran escala de los cambios de expresión génica que tienen lugar ante la disfunción del CMII en riñón y médula adrenal. De nuevo, el riñón se escogió porque fue el tejido en el que mayor nivel de delección de *SdhD* se consiguió detectar en los animales mutantes tras el tratamiento con tamoxifeno además de por ser un órgano relacionado con carcinoma renal asociado a mutaciones de *SdhD*. Por otro lado, la médula adrenal se escogió por ser uno de los tejidos diana para el desarrollo de PGL y PCC. Se analizaron muestras obtenidas tras una semana de tratamiento con tamoxifeno. Como se ha mostrado, en este punto, ambos tejidos presentaban un claro descenso de los niveles de ARNm de *SdhD* en los animales SDHD-ESR (Fig. 10).

Para el estudio de la respuesta transcripcional a la delección de *ShdD* se realizaron experimentos de microarray de expresión con dos colores de la plataforma Agilent™. El ARN total procedente de las muestras de individuos silvestres +/+ se marcó con el fluoróforo cianina 3-CTP (Cy3) y se consideró como muestra de referencia. Por otro lado, las distintas preparaciones de ARN total procedente de las muestras de los animales +/- y SDHD-ESR se marcaron con el fluoróforo cianina 5-CTP (Cy5) y se emplearon como muestras experimentales. De esta forma, la abundancia relativa de cada uno de los transcritos en el microarray se obtuvo a partir del ratio entre las intensidades de la fluorescencia emitida por sendos fluoróforos. Los valores de expresión relativa para cada uno de los genotipos en los dos tejidos analizados se han depositado en la plataforma Gene Expression Omnibus del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) de Estados Unidos y son accesibles a través del número de acceso: GEO GSE52197 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE52197>). Entre los genes cuya expresión difería de forma significativa en las muestras SDHD-ESR respecto a la muestra de referencia (false discovery rate [FDR] ≤ 0.05) se identificaron aquellos en los que estas diferencias fueron a su vez significativamente diferentes respecto a las de las muestras +/- ($p \leq 0,05$). De esta forma, se seleccionaron para su posterior análisis aquellos genes que se afectaban selectivamente en el mutante SDHD-ESR. El agrupamiento jerarquizado supervisado de las muestras en función de estos genes mostraba diferentes perfiles de expresión génica entre la médula

3. Resultados

adrenal y el riñón de animales SDHD-ESR una semana después del tratamiento con tamoxifeno (Fig. 15).

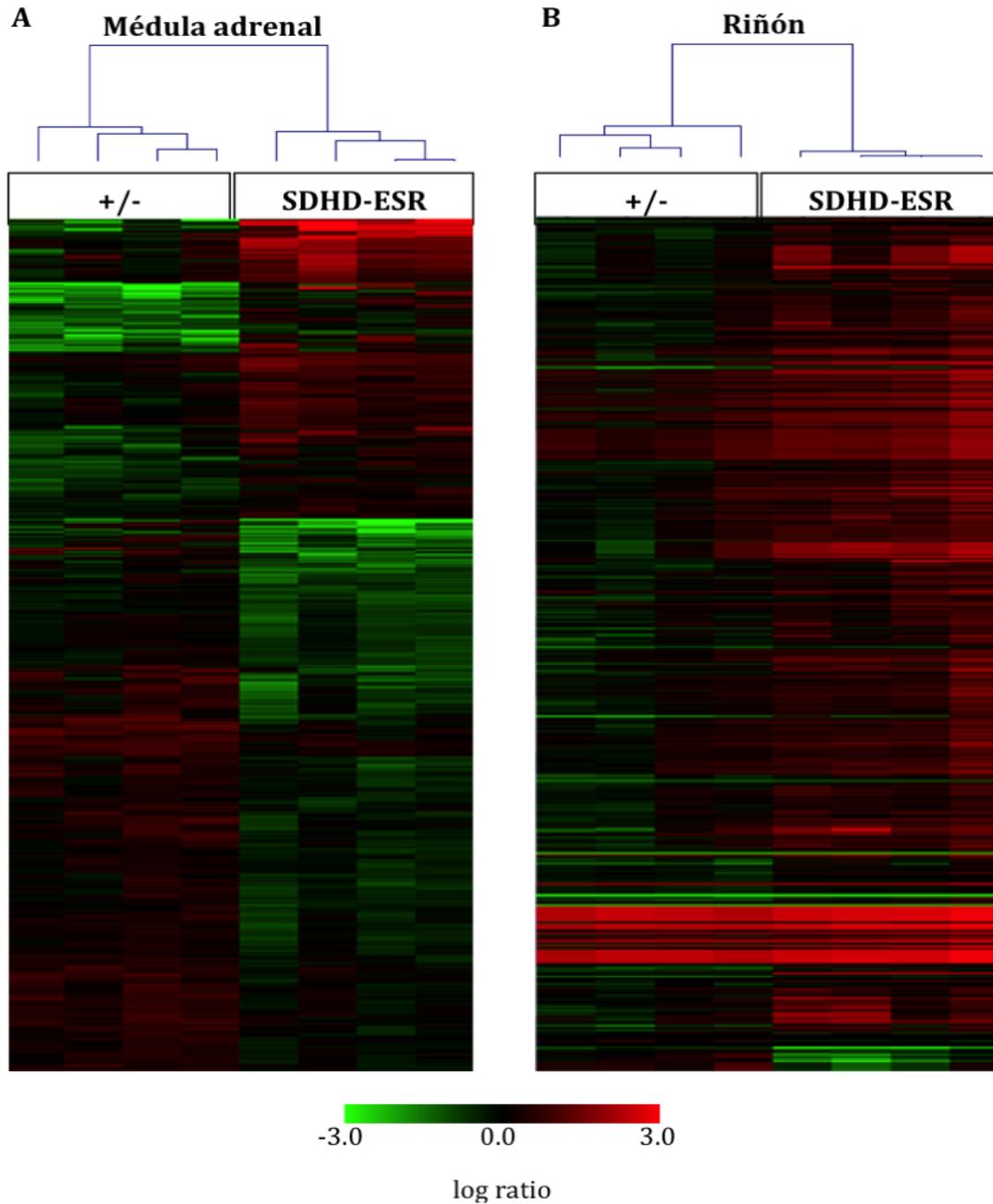


Figura 15. Agrupamiento jerarquizado supervisado del perfil genético en médula adrenal y riñón del ratón SDHD-ESR tras 1 semana de tratamiento con tamoxifeno. Representación en forma de mapa de color y árbol jerarquizado de la agrupación de las 8 muestras emparejadas por genotipo empleadas en el microarray a partir de ARN de médula adrenal (A) y riñón (B) del modelo animal SDHD-ESR. La agrupación está basada en los genes que mostraban diferencias significativas en sus niveles de expresión. Los colores rojo, verde y negro representan aquellos genes cuyo logaritmo del ratio de las intensidades de fluorescencia Cy5/Cy3 era mayor de 0, menor de 0 a igual a 0 respectivamente.

3. Resultados

Como control interno se observó un descenso de aproximadamente el 50% del nivel de ARN mensajero de *SdhD* en las muestras procedentes de tejidos de animales heterocigotos. De igual forma también pudimos detectar la caída de hasta un 2% del mensajero de *SdhD* en la médula adrenal y de un 7% en riñón de animales SDHD-ESR, confirmando los datos previamente obtenidos mediante RT-PCR (Fig. 10 y 16).

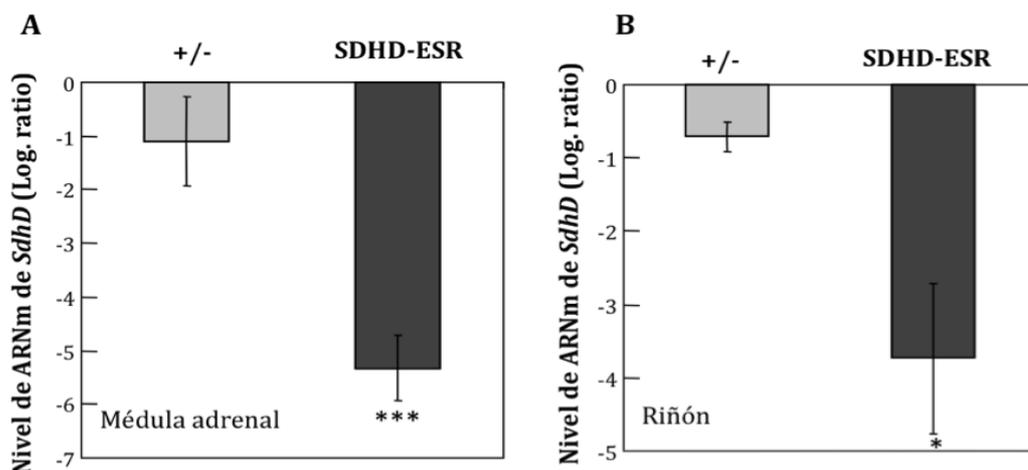


Figura 16. Análisis del microarray. Niveles de ARNm de *SdhD* en médula adrenal y riñón de animales +/- y SDHD-ESR relativos a los animales +/- tras una semana de tratamiento con tamoxifeno. * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$. N= 8 animales por cada grupo.

En la Tabla 2 se muestran los genes en los que la magnitud del efecto fue mayor. Los valores mayores que 0 indican los genes sobre-regulados. Los valores menores que 0 indican los genes infra-regulados.

Tabla 2. Los 10 genes más sobre e infra-expresados en tejidos de SDHD-ESR			
Médula Adrenal			
Log Ratio	ID	Gen	Proteína
3,035	NM_025687	TEX12	testis expressed 12
2,349	NM_001111099	CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)
2,018	NM_011356	FRZB	frizzled-related protein
1,938	NM_001081435	FBXO47	F-box protein 47
1,752	NM_133353	Oosp1	oocyte secreted protein 1
1,718	NM_178098	RIKEN	cDNA 4930486L24 gene
1,701	NM_170599	IGSF11	immunoglobulin superfamily, member 11
1,678	NM_016919	COL5A3	collagen, type V, alpha 3
1,629	NM_011228	RAB33A,	member RAS oncogene family
1,595	NM_001001979	MEGF10	multiple EGF-like-domains 10
-5,326	NM_025848	SDHD	succinate dehydrogenase complex,

3. Resultados

			subunit D
Continuación Tabla 2.			
-2,543	NM_022322	D15TNMD	tenomodulin
-2,458	NM_026713	MOGAT1	monoacylglycerol O-acyltransferase 1
-2,153	NM_008599	CXCL9	chemokine (C-X-C motif) ligand 9
-1,807	NM_134005	ENPP3	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3
-1,743	NM_001185002	Rhox13	reproductive homeobox 13
-1,698	NM_007551	CXCR5	chemokine (C-X-C motif) receptor 5
-1,679	NM_025723	HENMT1	HEN1 methyltransferase homolog 1 (Arabidopsis)
-1,565	NM_001111140	LRRC10B	leucine rich repeat containing 10B
-1,505	NM_010174	FABP3	fatty acid binding protein 3
Riñón			
Log Ratio	ID	Gen	Proteína
2,931	NM_007956	ESR1	estrogen receptor 1
2,623	NM_008239	FOXQ1	forkhead box Q1
2,245	NM_080852	Slc7a12	solute carrier family 7, member 12
2,163	NM_138595	GLDC	glycine dehydrogenase (decarboxylating)
1,964	NM_007669	CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)
1,915	NM_008256	HMGCS2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2
1,875	NM_001122660	GSTA5	glutathione S-transferase alpha 5
1,869	NM_010196	FGA	fibrinogen alpha chain
1,855	NM_145368	Acnat1/Acnat2	acyl-coenzyme A amino acid N-acyltransferase 1
1,774	NM_016668	BHMT	betaine-homocysteine S-methyltransferase
-3,737	NM_025848	SDHD	succinate dehydrogenase complex, subunit D
-2,380	AK143946	ACSM3	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 3
-1,546	NM_001081688	TMPRSS9	transmembrane protease, serine 9
-1,306	NM_009127	SCD	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)
-1,201	NM_146086	PDE6A	phosphodiesterase 6A, cGMP-specific, rod, alpha
-1,007	NM_145360	IDI1	isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1
-0,929	NM_001164466	DPYS	dihydropyrimidinase
-0,829	NM_009892	Chi3l3/Chi3l4	chitinase 3-like 3
-0,793	NM_181849	FGB	fibrinogen beta chain
-0,637	NR_002860	A130040M12Rik	RIKEN cDNA A130040M12 gene

3. Resultados

Para realizar los estudios funcionales, los genes seleccionados y sus respectivos valores de expresión relativos se analizaron a través de la aplicación *Ingenuity Pathway Analysis*TM (IPA). Se tuvo en cuenta un valor de corte para el logaritmo del ratio Cy5/Cy3 de $\pm 0,2$. Dado que nuestro objetivo inicial era identificar las rutas que se ven afectadas por la pérdida de los dos alelos de *SdhD*, se llevó a cabo el análisis funcional de los genes afectados tanto en médula adrenal como en riñón centrándonos en los animales SDHD-ESR. El análisis comparativo funcional mostraba que la mayoría de las funciones moleculares y celulares afectadas variaban significativamente entre la médula adrenal y el riñón (Fig. 17).

En la médula adrenal, las categorías funcionales con mayores valores de probabilidad de afectación fueron movimiento, mantenimiento, desarrollo, señalización, interacción, crecimiento y proliferación celular, entre otros. Por otro lado, las funciones con mayor probabilidad de cambio en el riñón estaban relacionadas con producción energética, respuesta a drogas, metabolismo de ácidos grasos, y replicación, recombinación y reparación del ADN. Posteriormente, se analizaron estas categorías funcionales a través de la aplicación IPA mediante un algoritmo capaz de predecir el efecto de los cambios de la expresión génica sobre funciones específicas. Mediante dicho algoritmo se obtuvieron valores del parámetro z (z-score) que cuando eran mayores o menores de 2, indicaban activación o disminución respectivamente de la función correspondiente. El análisis mostró, en el contexto de la médula adrenal, un descenso en las funciones relacionadas con el movimiento de las células blancas sanguíneas y la viabilidad, proliferación y producción de anticuerpos (Tabla 3). Por el contrario, en el riñón las funciones relacionadas con movimiento celular, supervivencia, diferenciación, muerte y metabolismo de carbohidratos, lípidos y aminoácidos, estaban aumentadas (Tabla 4).

3. Resultados

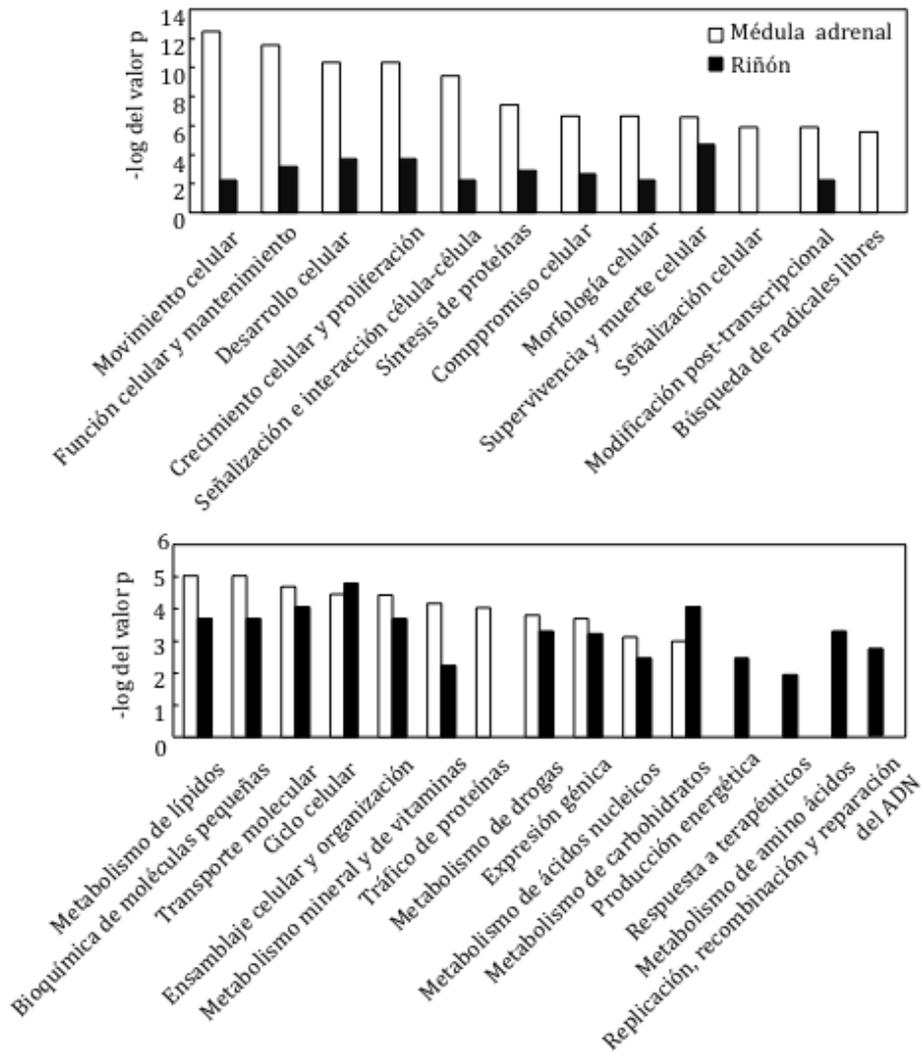


Figura 17. Análisis funcional comparativo. Representación de las categorías funcionales con mayores probabilidades de afectación obtenidos a partir del análisis de los datos del microarray de las muestras de médula adrenal (barras en blanco) y riñón (barras en negro) de SDHD-ESR agrupados por funciones celulares. La significación de cada función celular y molecular viene indicada por el negativo del logaritmo del valor p.

Tabla 3. Funciones biológicas con alta probabilidad de estar afectadas en médula adrenal de SDHD-ESR (Millán-Uclés et al., 2014)

Función	Valor <i>p</i>	Predicción del estado de activación	z- score de activación	# Genes	Genes
Migración leucocitaria	2,95E-10	Disminuida	-2,618	41	ADORA3, ANGPTL2, CASP1, CD1D, CD48, CDKN1A, CRP, CTSC, CX3CR1, CXCL14, CXCL9, CXCR3, CXCR5, CYSLTR1, DCN, FCER1G, FCGR2B, FUT4, HCK, HDC, HEBP1, IL1B, IL4R, LDLR, LGALS3, LILRB3, MDK, MMP9, MPP1, MYO1F, NCKAP1L, PRKCD, RAC2, SELPLG, SEMA4D, STAT3, SYK, TIRAP, TLR2, TYROBP, VIPR1.
Viabilidad celular de leucocitos	7,94E-04	Disminuida	-2,617	11	EGF, FCER1G, IL1B, IL2RG, LGALS3, RAC2, SEMA4D, SHH, STAT3, SYK, TYROBP.
Degranulación de mastocitos	7,86E-07	Disminuida	-2,574	11	ADORA3, DHCR7, FCER1G, FCGR2B, HCK, IL1B, IL4R, RAC2, SYK, TLR2, VAV1.
Degranulación de fagocitos	3,79E-08	Disminuida	-2,572	13	ADORA3, ANXA3, DHCR7, FCER1G, FCGR2B, HCK, IL1B, IL4R, MYO1F, RAC2, SYK, TLR2, VAV1.
Infiltración de células	1,09E-05	Disminuida	-2,507	19	CASP1, CD48, CXCR5, DCN, FCER1G, FCGR2B, FUT4, HCK, IL1B, IL4R, LDLR, LGALS3, MDK, MMP9, PRKCD, RAC2, SELPLG, STAT3, TLR2.
Movimiento de células sanguíneas (macrófagos, granulocitos, células presentadoras de antígenos, leucocitos)	8,78E-11	Disminuida	-2,477	42	ADORA3, ANGPTL2, CASP1, CD1D, CD48, CDKN1A, CRP, CTSC, CX3CR1, CXCL14, CXCL9, CXCR3, CXCR5, CYSLTR1, DCN, FCER1G, FCGR2B, FUT4, GJA1, HCK, HDC, HEBP1, IL1B, IL4R, LDLR, LGALS3, LILRB3, MDK, MMP9, MPP1, MYO1F, NCKAP1L, PRKCD, RAC2, SELPLG, SEMA4D, STAT3, SYK, TIRAP, TLR2, TYROBP, VIPR1.

3. Resultados

Continuación Tabla 3.					
Muerte de células inmunológicas	1,33E-06	Disminuida	-2,458	27	ADORA3, C1QA, CASP1, CASP3, CD27, CD79B, CDKN1A, CRP, EGF, FCER1G, FCGR2B, FLT3, IL1B, IL2RG, LDLR, LGALS3, PRKCD, RAC2, SEMA4D, SHH, ST6GAL1, STAT3, SYK, TLR2, TNFAIP8L2, TYROBP, VAV1.
Proliferación de linfocitos T	6,66E-06	Disminuida	-2,36	26	ARHGDIB, BATF, CASP3, CD1D, CD27, CD48, CD83, CDKN1A, CRP, EBI3, FCER1G, FCGR2B, HLA-DRB1, IL1B, IL2RG, IL4R, MMP9, NCKAP1L, RAC2, SHH, STAT3, SYK, TLR2, TRAF5, TYROBP, VAV1.
Activación de linfocitos T	2,81E-03	Disminuida	-2,337	12	CD1D, CD48, CDKN1A, DCT, FCER1G, IL1B, IL2RG, LDLR, SEMA4D, STAT3, TLR2, VAV1.
Fagocitosis de células	4,81E-04	Disminuida	-2,263	11	ANXA3, C1QA, CRP, FCER1G, FCGR2B, HCK, LGALS3, RAC2, SYK, TLR2, VAV1.
Adhesión de granulocitos	1,42E-03	Disminuida	-2,213	6	HCK, IL1B, LGALS3, MMP9, SELPLG, VAV1.
Producción de superóxido	1,07E-04	Disminuida	-2, 208	8	CXCL9, CYBA, GCH1, HCK, IL1B, RAC2, TLR2, TYROBP.
Respuesta inmunológica de células presentadoras de antígeno	1,60E-03	Disminuida	-2,16	8	CD1D, FCER1G, FCGR2B, HCK, LGALS3, MARCH1, SYK, TLR2.

3. Resultados

Continuación Tabla 3.					
Migración de células	1,11E-06	Disminuida	-2,157	53	ABI3, ADORA3, ANGPTL2, ANXA3, CASP1, CD1D, CD48, CDKN1A, COL3A1, CRP, CX3CR1, CXCL14, CXCL9, CXCR3, CXCR5, CYSLTR1, DCN, EGF, FCER1G, CSPG4, CTSC, FCGR2B, FUT4, GJA1, HCK, HDC, HEBP1, IL1B, IL4R, LDLR, LGAL S3, LILRB3, MDK, MMP9, MPP1, MYO1F, NCKAP1L, PRKCD, RAC2, SELPLG, SEMA4D, SHH, SORT1, ST8SIA4, STAT3, SYK, TGFB3, THRB, TIRAP, TLR2, TMSB10/TMSB4X, TYROBP, VIPR1.
Cantidad de IgM	1,83E-03	Disminuida	-2,157	8	BATF, CD83, CDKN1A, FCGR2B, IL2RG, LDLR, PRKCD, TRAF5.
Producción de anticuerpos	2,38E-08	Disminuida	-2,077	22	BATF, C1QA, CD1D, CD83, CDKN1A, CXCL9, FCER1G, FCGR2B, IL2RG, IL4R, LDLR, LGALS3, MMP9, PRKCD, SEMA4D, TIRAP, TLR1, TLR2, TNFAIP8L2, TRAF5, TYROBP, VAV1.
Fagocitosis de células sanguíneas	1,41E-04	Disminuida	-2,043	9	CRP, FCER1G, FCGR2B, HCK, LGALS3, RAC2, SYK, TLR2, VAV1.

3. Resultados

Tabla 4. Funciones biológicas con alta probabilidad de estar afectadas en riñón de SDHD-ESR

Función	Valor <i>p</i>	Predicción del estado de activación	z- score de activación	# Genes	Genes
Movimiento celular (migración de células)	4,29E-03	Aumentada	3,227	52	ANGPTL3, B4GALT1, BMP4, BTC, C3, CALML3, CD8A, CDKN1A, CEBPD, Chi3l3/Chi3l4, EPHB3, ERF, ESR1, FGA, FGB, FOSL2, HP, ID1, ID3, IL15RA, IL33, IL6R, IRS2, Klra4 (incluye otros), LCN2, MAP3K5, MCAM, MST1R, MYC, NCOA4, NFKBIA, NQO1, OSMR, Pde4d, PPARA, PRAP1, PRNP, PTPN1, PTPRJ, REST, RGS3, SCNN1A, SLC1A3, SLC37A4, SOCS2,SOCS3, SPP1, STAT3, STIM1, TNFRSF21, TNFRSF9, XDH.
Viabilidad y supervivencia celular (apoptosis)	1,85E-04	Aumentada	3,02	42	ABCC3, ATF2, BMP4, BNIP3, BTC, CD8A, CDKN1A, CEBPD, CISH, ESR1, FA2H, FGF18, FHIT, IL33, IL6R, IRS2, LCN2, MAP3K5, MCAM, MGST1, MMS22L, MYC, MYOD1, NFIL3, NFKBIA, OGG1, PPP2R2B, PRNP, PTPN1, SLC1A3, SLC22A8, SLC37A4, SOCS2, SOCS3, SPP1, STAT3, TNFRSF9, UNG, XDH, XPA.
Diferenciación celular (tubulación de células endoteliales)	4,92E-04	Aumentada	2,886	56	ATF2, BGLAP, BMP4, BNIP3, BTC, BTG1, C3, CD8A, CDKN1A, CEBPD, CLCF1, CYTL1,EPHB3, ERF, ESR1, EYA1, FGF18, FLVCR1, FOSL2, HSD11B1, ID1, ID3, IFRD1, IHH, IKZF4,IL15RA, IL33, IL6R, IRS2, LCN2, MAFF, MAP3K5, MST1R, MYC, MYOD1, NFIL3, NFKBIA, PPARA, PRNP, PTPN1, PTPRJ, REST, RPS3A, SCD, SLC1A3, SLC37A4, SMAD6, SMARCD3, SOCS2, SOCS3, SPP1, STAT3, STIM1, TNFRSF9, TRIB3, XDH.
Interfase	3,13E-03	Aumentada	2,641	23	ATF2, BMP4, BTG1, Camk2b, CDKN1A, CEBPD, ESR1, FHIT, ID1, ID3, IL6R, MAP3K5, MMS22L, MYC, NFKBIA, PPARA, PRNP, SIAH1, SMAD6, STAT3, STK38L, XPA, ZBTB10.
Transporte de Carbohidratos	5,55E-04	Aumentada	2,467	10	ABCC3, B4GALT1, C3, IRS2, MGAT4A, PPP1R3B, SLC1A3, SLC37A4, SLC5A1, TRIB3.

3. Resultados

Continuación Tabla 4.					
Oxidación de lípidos (beta oxidación de ácidos grasos)	7,60E-05	Aumentada	2,203	12	C3, CYP27A1, CYP4A11, HAACL1, HSD11B1, IRS2, PNPLA2, PON1, PPARA, Rdh1, SAT1, SCD.
Metabolismo de ácidos grasos	4,71E-03	Aumentada	2,183	8	BHMT, DDC, GLDC, GLS, KYNU, MYC, PPARA, SLC1A3.
Proliferación celular (generación de linfocitos, citostasis, proliferación de células tumorales mamarias y neuroblastos)	5,99E-03	Aumentada	2,101	84	ABCC3, APOD, Art2a-ps/Art2b, ATF2, B4GALT1, BMP4, BNIP3, BTC, BTG1, C3, CACNA1G, CBR1, CD8A, CDCA4, CDKN1A, CEBPD, CISH, CLCF1, CYP20A1, EPHA5, EPHB3, ERAL1, ERF, ESR1, EYA1, FA2H, FGA, FGF18, FHIT, FOSL2, GP2, HSD11B1, HTR3A, ID1, ID3, IHH, IL15RA, IL33, IL34, IL6R, IRS2, ITIH4, LCN2, MAFF, MAP3K5, MCAM, MST1R, MYC, MYOD1, NCOA4, NFKBIA, NMB, NQO1, OSMR, PDXK, PPARA, PRNP, PTPN1, PTPRJ, REST, RING1, RPS3A, SAT1, SF1, SIAH1, SLC1A3, SLC20A1, SMAD6, SMARCD3, SOCS2, SOCS3, SPP1, STAT3, STIM1, STK38L, SULF2, TNFRSF21, TNFRSF9, TRIM25, TSC22D1, UTP20, VPS53, XDH, XPA.
Necrosis	3,03E-04	Aumentada	2,003	69	ALDH2, ALDH3B1, Art2a-ps/Art2b, ATF2, ATXN7, BMP4, BNIP3, BTC, BTG1, C3, CD8A, CDKN1A, CEBPD, CISH, CLCF1, EHMT1, ESR1, FAM134B, FAM176C, FGA, FGF18, FHIT, GP2, ID1, ID3, IFRD1, IL15RA, IL33, IL6R, IRS2, ITIH4, Klra4, LCN2, MAP3K5, MMS22L, MST1R, MYC, MYOD1, NFIL3, NFKBIA, NQO1, OGFOD1, PNPLA2, PPARA, PPP2R2B, PRNP, PTPN1, REST, RGS3, RPS3A, SAT1, SCD, SEMA7A, SGCG, SIAH, SLC1A3, SLC20A1, SMAD6, SOCS3, SPP1, STAT3, STIM1, TNFRSF21, TNFRSF9, TRIB3, TSC22D1, UNG, XDH, XPA.

3. Resultados

Continuación Tabla 4.					
Concentración de triacilglicerol	2,35E-08	Disminuida	-2,52	21	ANGPTL3, APOD, BGLAP, BHMT, C3, CIDEA, CYP27A1, HSD11B1, IFRD1, IRS2, MGAT4A, MYC, NQO1, PNPLA2, PON1, PPARA, PTPN1, SCD, SLC37A4, SPP1, XDH.
Unión a ADN	7,09E-07	Disminuida	-2,635	18	ATF2, BTAF1, CDKN1A, CEBPD, CISH, ERF, ESR1, FOSL2, HIF3A, HP, ID1, ID3, IL33, IL6R, MYC, MYOD1, NFKBIA, PPARA, PTPN1, REST, SCD, SOCS2, SOCS3, SPP1, STAT3, TRIB3, XPA, ZBTB10.

A pesar de las diferencias observadas entre médula adrenal y riñón se pudo detectar que el gen *Cdkn1a* se mostraba entre los más sobre-expresados significativamente tanto en médula adrenal como en riñón de los animales SDHD-ESR. Este resultado se validó mediante RT-PCR (Fig. 18).

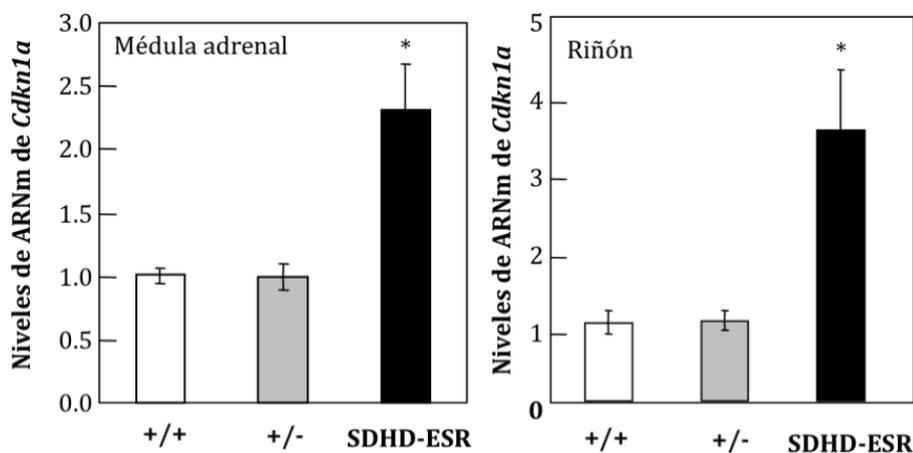


Figura 18. Validación del cambio de expresión del gen *Cdkn1a*. La sobre expresión del gen en médula adrenal y riñón detectada en los análisis del microarray se validó mediante RT-PCR de muestras de ARN de animales +/+, +/- y SDHD-ESR. * $p \leq 0,05$. N= 8 animales por grupo.

El gen *Cdkn1a* codifica el inhibidor de quinasa dependiente de ciclina p21^{WAF1/Cip1}, cuya actividad está implicada en diferentes procesos celulares tales como el ciclo celular, la proliferación, senescencia y cáncer (Abbas and Dutta, 2009; Romanov et al., 2012). Por tanto, este factor podría constituir un vínculo entre estos procesos y la disfunción mitocondrial.

3.5.2 Regulación de los mecanismos de reparación del ADN y proliferación en líneas celulares derivadas del ratón SDHD-ESR.

Para poder obtener mayor información acerca del efecto de la sobre-expresión de p21^{WAF1/Cip1} detectada en los tejidos del ratón SDHD-ESR a través del análisis de los datos del microarray, se estudió si dicha inducción también ocurría en las líneas celulares derivadas del ratón. Para ello, se tomaron clones independientes de cada uno de los genotipos, y se estudió el curso temporal a 4 y 24 horas tras adición de 4-OHT al medio de cultivo, incluyendo para cada clon una condición control sin

3. Resultados

tratamiento con la droga. En ambos tipo celulares, p21^{WAF1/Cip1} se encontraba inducido en los clones mutantes SDHD-ESR después de 4 horas tras el tratamiento con 4-OHT. Dicha inducción se mantenía hasta las 24 horas en el cultivo. Sin embargo, no se detectó acumulación de la proteína ni en la línea +/+ ni en la +/- que no expresaban la CRE-ESR en ningún punto del curso temporal (Figura 19). Dado que la acumulación de p21^{WAF1/Cip1} está asociada con daños en el ADN así como con la senescencia replicativa celular, analizamos la presencia de daño en el ADN y los efectos en la proliferación celular de ambas líneas inmortalizadas. La respuesta al daño en el ADN se evidenció mediante la acumulación de la histona H2AX en su forma fosforilada en los clones heterocigotos procedentes tanto de iMEFs como de iBMKs en *western blot*. La fosforilación de la Ser-139 de la histona H2AX es una de las primeras modificaciones que sufren las histonas en respuesta a la inestabilidad genómica (Bonner et al., 2008). Sorprendentemente, se observó una acumulación de H2AX en el animal +/- . Este resultado se observó en ambas líneas celulares. Por el contrario, la pérdida de ambos alelos de *SdhD* que tiene lugar en los animales SDHD-ESR no parece incrementar los niveles de daño en el ADN sino que éstos disminuyen hasta alcanzar los niveles de los animales silvestres o incluso menores (Fig. 19).

Cuando se evaluó la capacidad proliferativa de las células en cultivo tras el tratamiento con 4-OHT a través del conteo de células de los tres genotipos en ambas líneas celulares, sólo se observaron indicios de descenso en los clones SDHD-ESR que perdían ambos alelos de *SdhD* tras el tratamiento con 4-OHT. En el resto de clones no se observaron diferencias en cuanto a los niveles de proliferación en las células tras añadir 4-OHT al cultivo (Fig. 20).

3. Resultados

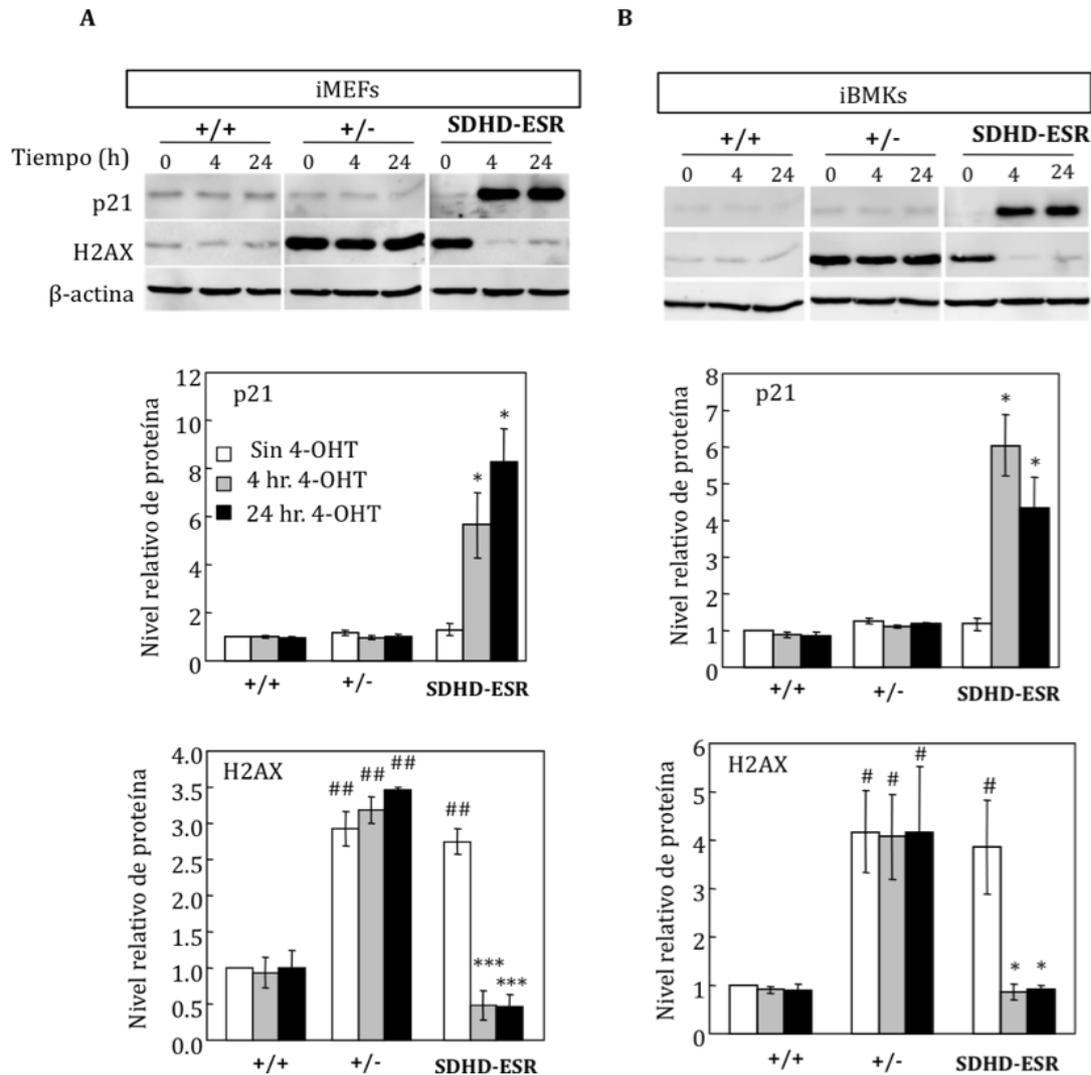


Figura 19. Niveles de proteínas en las líneas mediante Western Blot. Niveles de detección de p21^{WAF1/Cip1} (21 kDa) e histona H2AX fosforilada (16kDa) en extracto total de proteína procedente de clones independientes de iMEFs (**A**) e iBMKs (**B**) sin tratar con 4-OHT, a las 4 y 24 horas después de añadir el 4-OHT considerando como control de carga la β-actina. * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$ respecto a la condición sin 4-OHT; # $p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$ respecto a los valores del +/+. Se analizaron 2 clones diferentes por cada genotipo. Se representan los resultados obtenidos de un clon por cada grupo. El resultado obtenido en el otro clon fue similar.

3. Resultados

marcadores genéticos o moleculares que podrían estar implicados en su etiopatogenia. Se ha descrito un incremento de la densidad vascular en algunos pacientes con SMD, con niveles aumentados de *Vegf* y una mayor expresión de *Hif1 α* . De hecho, tal y como se describió en el apartado de *Introducción*, la disfunción mitocondrial se relaciona con enfermedades hematológicas tumorales posiblemente debido a que una actividad mitocondrial defectiva podría actuar alterando el metabolismo celular hacia rutas anaeróbicas de forma similar a la que tiene lugar en hipoxia, resultando en su transformación tumoral (Suda et al., 2011; Takubo and Suda, 2012; Rehn et al., 2011; Parmar et al., 2007). Esto, unido al hecho de que mutaciones en *Idh*, estrechamente relacionada con *Sdh*, son causa de leucemia mieloide aguda (LMA), una enfermedad que en muchos casos representa un estadio más avanzado de SMD, nos indujo a estudiar el sistema hematopoyético de nuestro modelo, así como a investigar posibles mecanismos moleculares que vincularan el defecto mitocondrial de nuestro modelo murino con un posible fenotipo hematológico.

3.6.2 Características de la sangre periférica de los ratones SDHD-ESR.

Se analizaron las poblaciones en sangre periférica en animales +/+, +/- y SDHD-ESR tras 3 semanas del tratamiento con tamoxifeno. En relación a la serie roja, los animales SDHD-ESR mostraban cierta tendencia al descenso en el número de hematíes, al igual que en la cantidad de hemoglobina y en hematocrito. Respecto a la serie blanca, en los individuos SDHD-ESR se observó un aumento en el conteo de los monocitos sin alcanzar la significación estadística. También se observó un descenso significativo en el conteo de plaquetas (trombocitopenia) en los animales SDHD-ESR en comparación con el resto de individuos (Fig. 21).

Para el inmunofenotipado de los animales, se llevó a cabo la detección de las poblaciones positivas para el antígeno leucocitario común (CD45), que solo lo expresan las células nucleadas del sistema hematopoyético. Además, también se estudió la población de linfocitos T maduros mediante marcaje con el anticuerpo monoclonal anti-CD3 y las poblaciones de granulocitos y macrófagos mediante marcaje con el anticuerpo monoclonal anti-CD11b, ambas poblaciones incluidas en la población CD45⁺.

3. Resultados

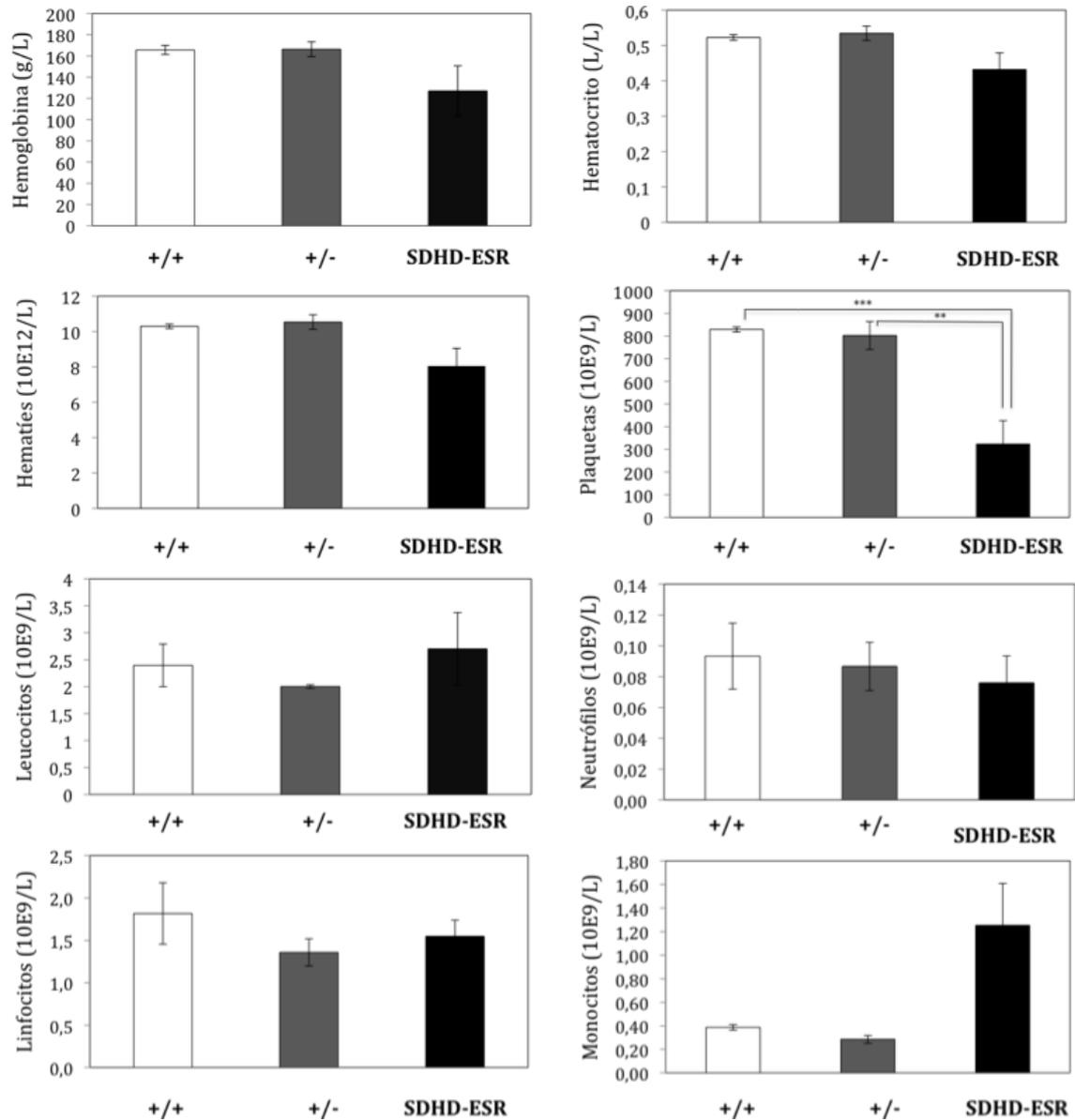


Figura 21. Hemograma de sangre periférica de ratón SDHD-ESR. En la imagen se presentan aquellos parámetros en los que se detectó mayores variaciones entre los diferentes genotipos tras 3 semanas de tratamiento con tamoxifeno. $**p \leq 0,03$. N= 5-6 animales por grupo.

3. Resultados

Considerando sólo el grupo de células positivas para CD45, tanto en los animales +/- , como en los SDHD-ESR, no se apreció diferencia en el porcentaje de células positivas para el marcaje de CD3 y CD11b con respecto a los animales +/+ (Fig. 22).

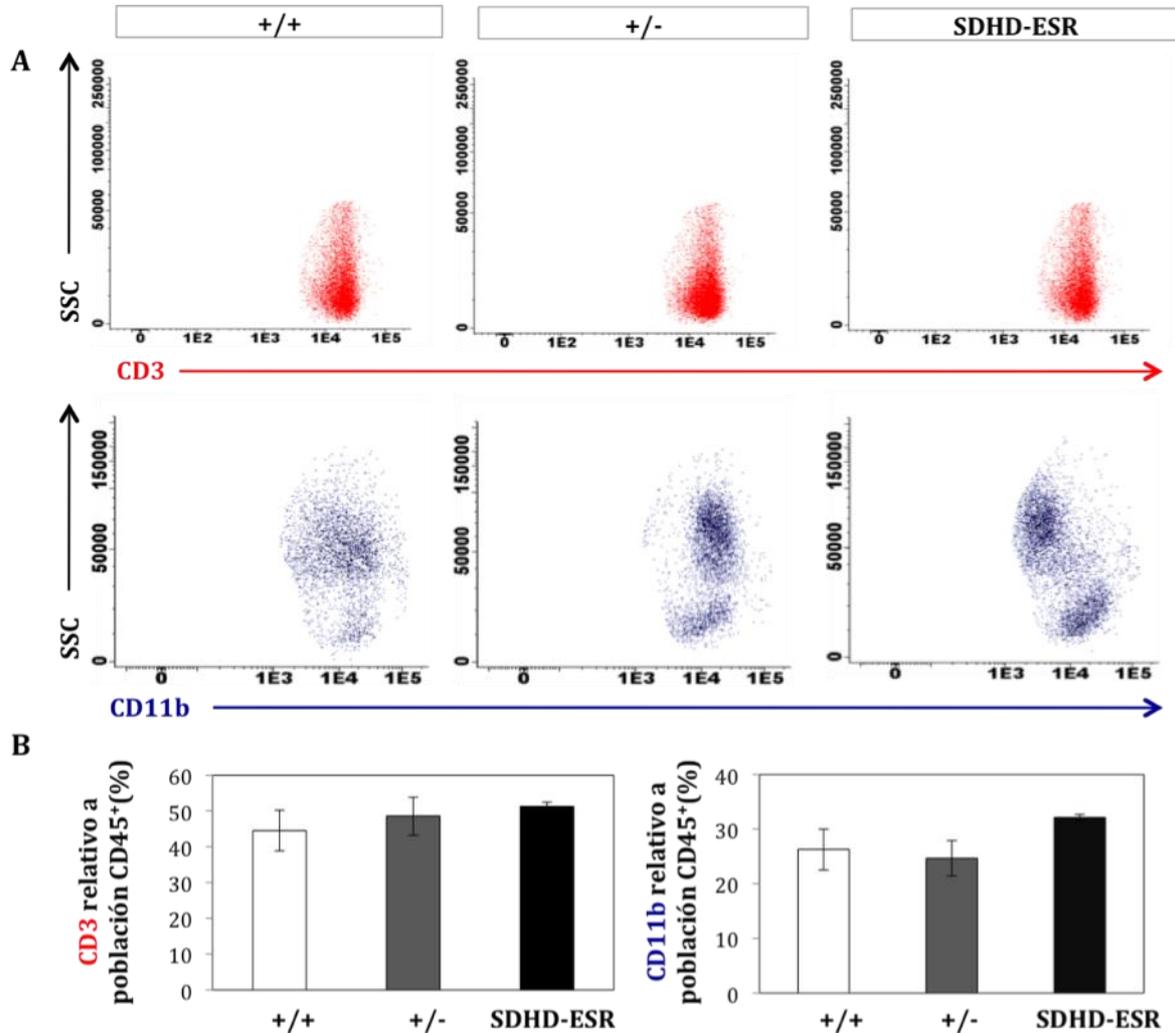


Figura 22. Inmunofenotipaje de sangre periférica del ratón SDHD-ESR. En la parte superior (A) se muestran diagramas representativos adquiridos a partir de los valores de los parámetros SSC-A (del inglés, *Side Scatter Component Area*), CD3 y CD11b para un animal +/+, otro +/- y un animal SDHD-ESR. Cada célula viene representada por punto de color rojo si es positiva para CD3 ó azul si es positiva para CD11b. En la parte inferior de la figura (B) se representan las cuantificaciones obtenidas para cada marcaje en el total de animales empleados para el experimento. N= 2-5 animales por grupo.

3. Resultados

3.6.2.1 Características de la médula ósea de los ratones SDHD-ESR

En paralelo a los estudios de la sangre periférica del ratón, se analizaron las poblaciones celulares presentes en la médula ósea de los mutantes SDHD-ESR. Se analizaron animales +/+, +/- y SDHD-ESR tras 2 semanas (SDHD-ESR grupo I) del tratamiento con tamoxifeno, es decir, antes de que se observara un deterioro general de los mutantes, y tras 3 semanas del tratamiento con tamoxifeno (SDHD-ESR grupo II), momento en el que los animales presentaban cierto nivel de deterioro (Fig. 8 y 9). En el caso de los individuos con genotipos +/+ y +/-, los animales sacrificados a los dos tiempos se analizaron como un solo grupo al no mostrar diferencias entre ellos. De nuevo, se llevó a cabo la detección de las poblaciones positivas para CD45, además de poblaciones específicas mediante el diseño de diferentes combinaciones con anticuerpos monoclonales.

En primer lugar se evaluó la viabilidad de las células. Para ello se realizó un doble marcaje que incluía anexina V y 7-amino-actinomicina (7-AAD). La apoptosis es un proceso fisiológico normal que se caracteriza, entre otros aspectos, por la translocación del fosfolípido de membrana fosfatidilserina (FS) desde el interior hacia el exterior de la membrana plasmática, exponiéndose en la superficie de la célula. Anexina V, al tratarse de una proteína de unión a fosfolípido dependiente de calcio que tiene una alta afinidad por la FS, se une a las células en las que dicho fosfolípido se encuentra expuesto hacia el exterior celular. Por lo tanto sirve como sonda sensible para análisis de citometría de flujo de células apoptóticas. La tinción con anexina V se usa típicamente en conjunción con el marcador 7-AAD para permitir identificar las células apoptóticas de las células que presentan daños en la membrana. De esta forma, únicamente se considerarán células viables aquellas que sean negativas para ambos marcadores; las células que están en apoptosis temprana serán positivas para anexina V positivas y negativas para 7-AAD y las células que se encuentran en la apoptosis tardía o muertas serán aquellas que sean positivas tanto para anexina V y 7-AAD. En los estudios de viabilidad también se incluyeron los marcadores CD45 y CD3 específicos de linfocitos T.

En los animales SDHD-ESR I se observó un descenso en el número de células

3. Resultados

viables CD45⁺ pero no en las totales, respecto a los controles +/+ y +/- . Tras tres semanas de tratamiento con el tamoxifeno (SDHD-ESR II) se detectó la caída de la viabilidad total (Fig. 23).

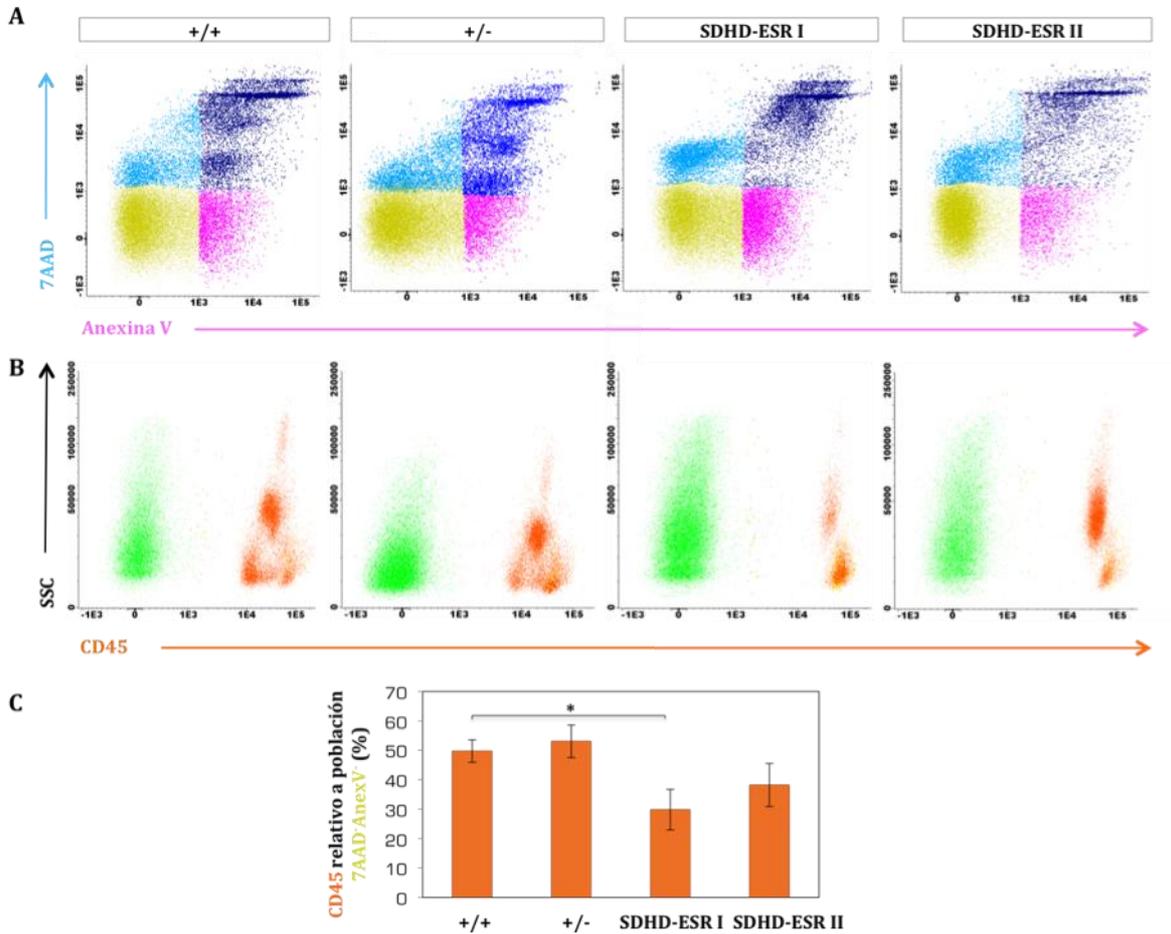


Figura 23. Análisis por citometría de la población de células hematopoyéticas en médula ósea. En la parte superior (A) se representan las proporciones de células vivas (Anexina V⁻/7AAD⁻; amarillento), muertas (Anexina V⁺/7AAD⁻; azul oscuro), apoptóticas (Anexina V⁺/7AAD⁺; rosa) o con membrana dañada (Anexina V⁻/7AAD⁺; azul claro). En (B) están representados por punto de color verde claro, si se trata de célula negativa para el marcaje con CD45 y naranja si es positivo para CD45. Incluida dentro de la población CD45⁺ en encuentra marcada de color amarillo las células CD3⁺. En la parte inferior de la figura (C) se representa la cuantificación obtenida para la población positiva de CD45 pertenecientes a la fracción de células viables. * $p=0,032$. N= 5-10 animales por grupo.

3. Resultados

Para poder analizar los granulocitos y los macrófagos entre la población de células hematopoyéticas CD45⁺, se incluyó el anticuerpo monoclonal anti CD11b. A pesar de que no se observaron diferencias significativas en la proporción de células que expresan este marcador en los diferentes grupos de animales analizados, se observaron alteraciones en el patrón de distribución de las células en función del tamaño y la complejidad (Fig. 24).

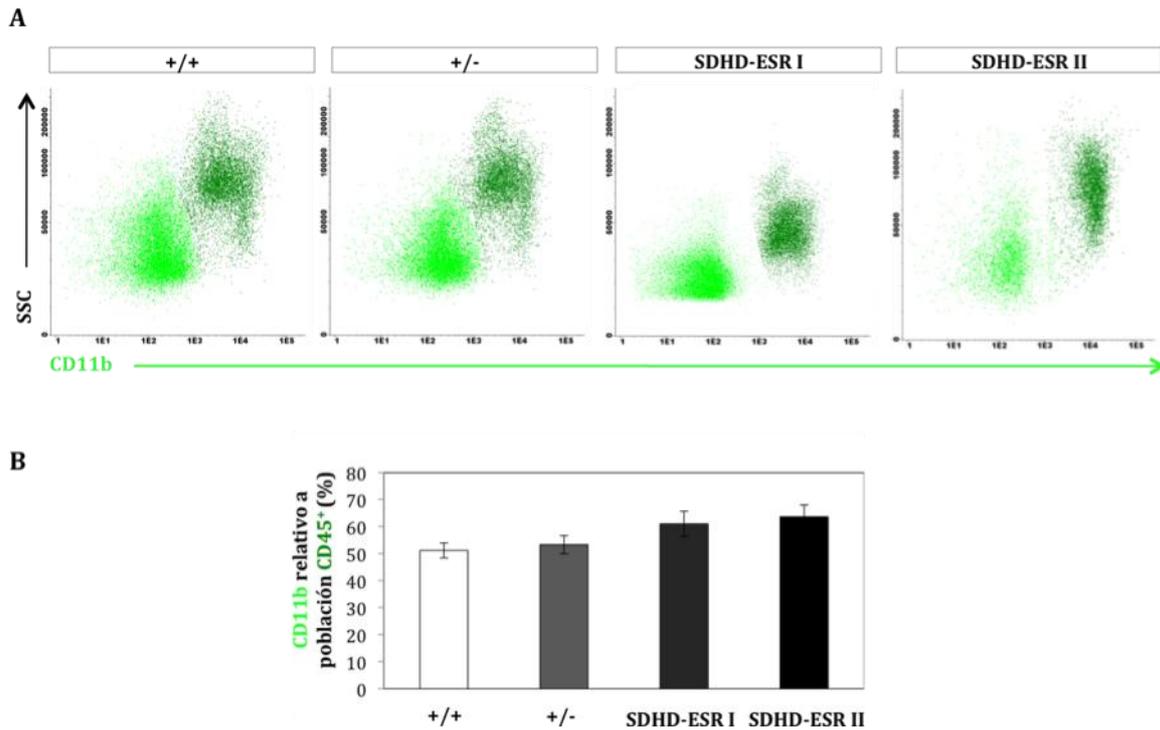


Figura 24. Análisis de granulocitos y macrófagos. En la parte superior (A) están representados los diagramas de los parámetros SSC-A y la intensidad de fluorescencia del anticuerpo anti-CD11b para los animales +/+, +/- , SDHD-ESR I y II. La población verde claro representa las células negativas para el marcador CD11b (CD11b⁻) mientras que la verde oscuro representa a las células positivas para CD11b (CD11b⁺). En la parte inferior de la figura (B) se representa la cuantificación obtenida para la intensidad de fluorescencia de CD11b relativa a la población CD45⁺ para cada grupo de animales. N= 7-13 animales por grupo.

Para poder detectar específicamente la población linfocitaria entre las células de la serie blanca diferenciada, también se incorporó al procedimiento experimental el marcaje con los anticuerpos monoclonales CD3 como marcador específico de células T maduras (linfocitos T). En la fracción CD45⁺, la cuantificación de CD3

3. Resultados

mostraba una tendencia clara al aumento en los animales SDHD-ESR I y II sin llegar a alcanzar significación estadística por la dispersión de los datos. (Fig. 25)

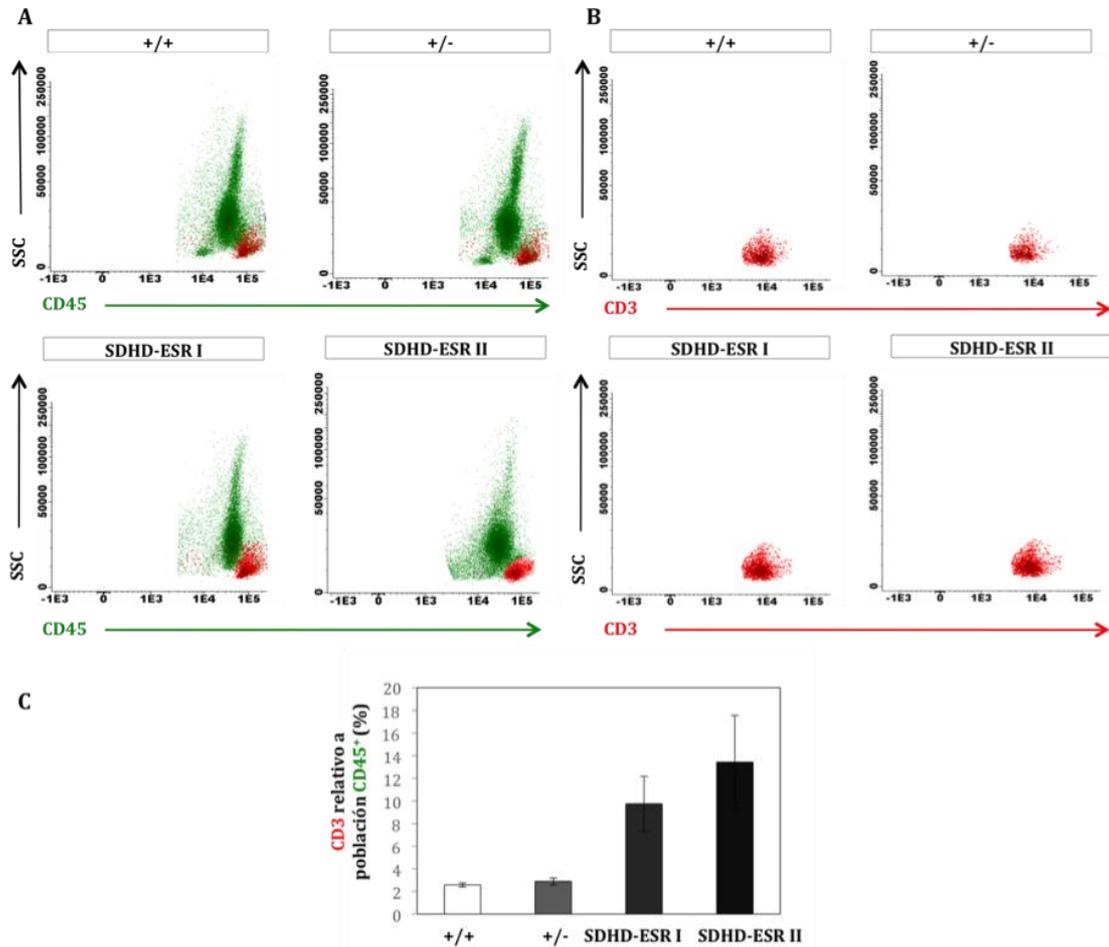


Figura 25. Análisis de linfocitos T en médula ósea de ratón SDHD-ESR. En la parte superior están representados los diagramas de los valores de los parámetros SSC-A y la intensidad de fluorescencia del anticuerpo anti-CD45 (A) y anti-CD3 (B) para los animales +/+, +/-, SDHD-ESR I y II. Cada célula viene representada por punto de color verde oscuro si es positivo para CD45. Incluida dentro de la población CD45⁺ en encuentra marcada de color rojo las células CD3⁺. En la parte inferior de la figura (C) se representa la cuantificación obtenida para la fluorescencia de CD3 relativa a CD45⁺ para cada grupo de animales. N= 6-11 animales por grupo.

Sin embargo, al analizar la población de células B (linfocitos B) y precursoras de B a través del marcador B220 (estos últimos con un marcaje CD45 más bajo en relación a los B220 maduros), sí se consiguió obtener diferencias significativas en animales SDHD-ESR I y II con respecto a los animales +/- y +/+ (Fig. 26).

3. Resultados

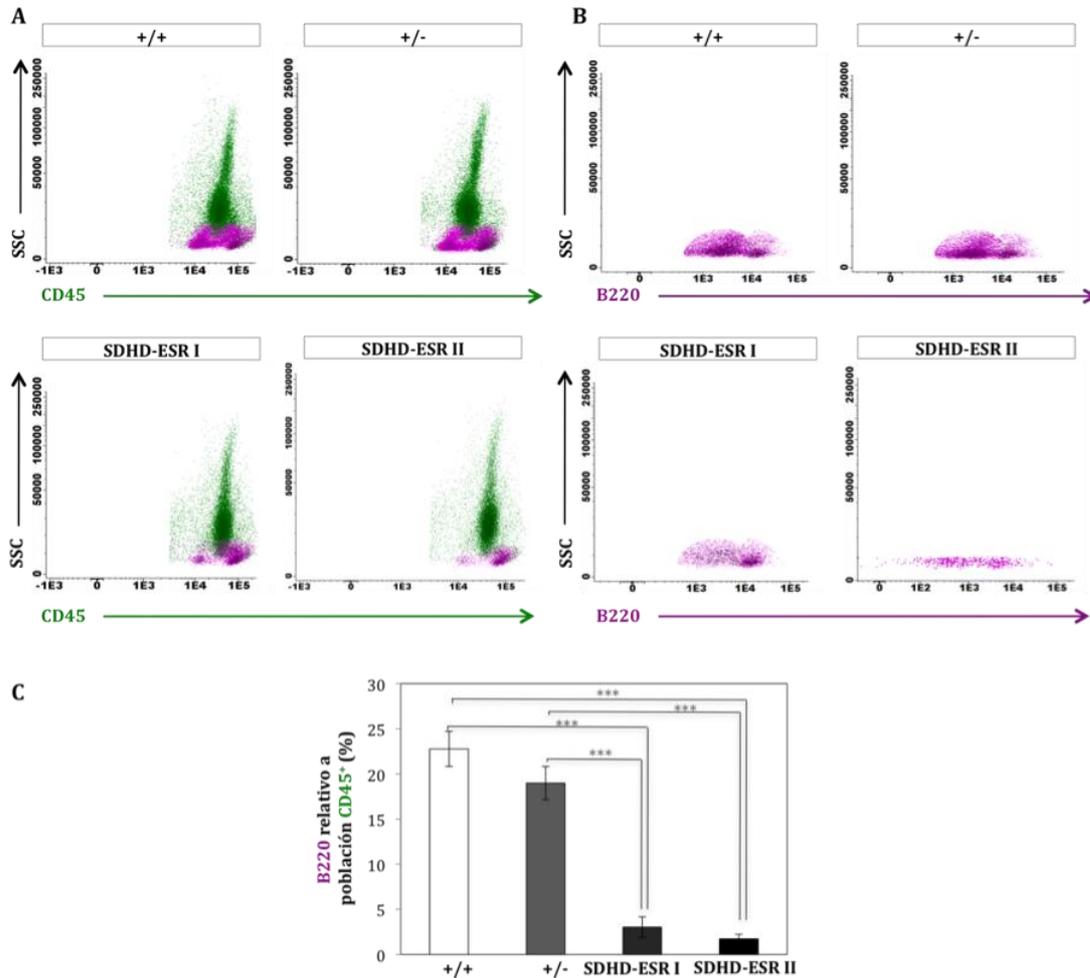


Figura 26. Análisis de linfocitos B en médula ósea de ratón SDHD-ESR. En la parte superior están representados los diagramas de los valores de los parámetros SSC-A y la intensidad de fluorescencia del anticuerpo anti-CD45 (A) y anti-B220 (B) para los animales +/+, +/-, SDHD-ESR I y II. Cada célula viene representada por punto de color verde oscuro si es positivo para CD45. Incluida dentro de la población CD45⁺ en encuentra marcada de color morado las células B220⁺. En la parte inferior de la figura (C) se representa la cuantificación obtenida para la fluorescencia de B220 relativa a CD45⁺ para cada grupo de animales. *** $p < 0,001$. N= 6-11 animales por grupo.

El marcador B220 identifica todos los estadios madurativos del linaje de linfocitos B. Durante la maduración a linfocito B encontramos precursores en estadio pro-B (estadio 1), el más inmaduro y en el que no se producen inmunoglobulinas, y estadio pre-B (estadio 2), en el que se produce pseudo-inmunoglobulina M (p-IgM). Finalmente, el estadio de célula B madura (estadio 3), se produce IgM. Por lo tanto, la combinación de marcadores B220 e IgM nos sirvió para poder discriminar

3. Resultados

específicamente que el tipo de célula B previamente descrito como precursor de célula B era el que realmente se estaba viendo afectado y, como indican las cuantificaciones mostradas en la figura anterior, deplecionado en nuestro modelo animal (Fig. 27).

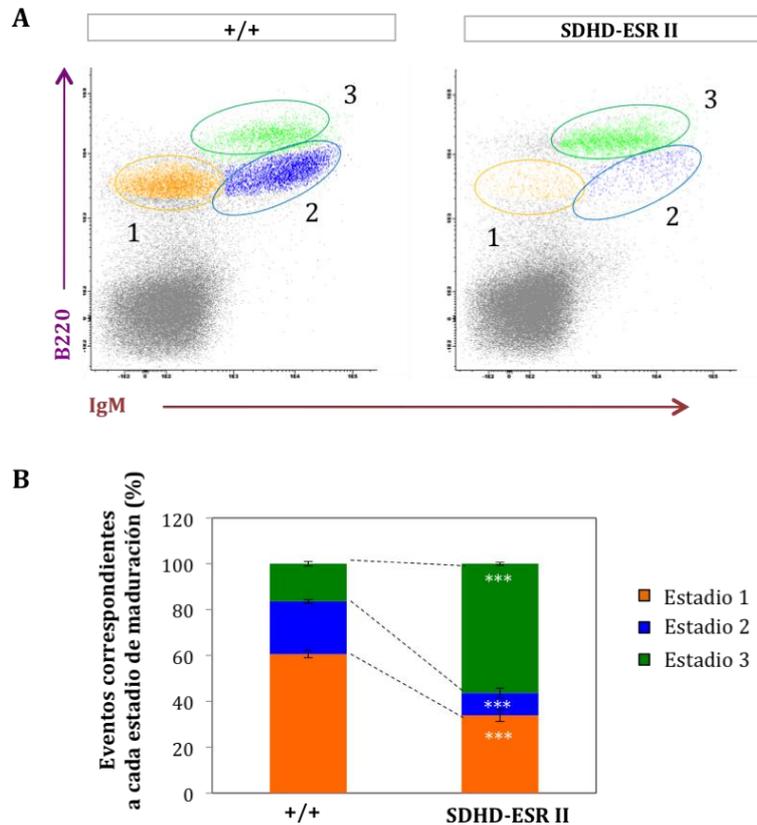


Figura 27. Estadios de maduración de linfocito B. Representación de la combinación de marcadores B220 e IgM de cada una de las células adquiridas para los animales +/+ y SDHD-ESR II. En naranja, estadio 1; en azul estadio 2; en verde, estadio 3. En la parte inferior, cuantificación obtenida para los animales +/+ y SDHD-ESR II. *** $p=0,001$. N= 4-6 animales por grupo.

Una característica que define a los progenitores inmaduros es que no expresan ninguno de los marcadores específicos de los distintos linajes maduros, entre ellos, CD3, CD4, CD8, CD11b, Gr1, B220, Ter-119, CD11c ó FcεR1α. Por tanto, desde el punto de vista inmunológico se consideran negativos para linaje maduro (Lin⁻). Se utilizó una mezcla de anticuerpos frente a estos marcadores para identificar al conjunto células maduras y de precursores diferenciados. Con la fracción restante, Lin⁻, y con la combinación de los marcadores c-Kit y Sca-I identificamos las HSC

3. Resultados

murinas. En concreto, podemos diferenciar progenitores mieloides (LK= Lin⁻ Sca1⁻ c-Kit⁺) de las HSC propiamente dichas (LKS= Lin⁻ Sca1⁺ c-Kit⁺). El análisis realizado muestra un incremento transitorio de la población de células LK y LKS en las médulas óseas procedentes de los animales mutantes SDHD-ESR I al compararlas con los animales control +/+ y +/- . Este aumento revierte en los animales SDHD-ESR II. En el caso de las LKS, el aumento fue significativo estadísticamente (Fig. 28)

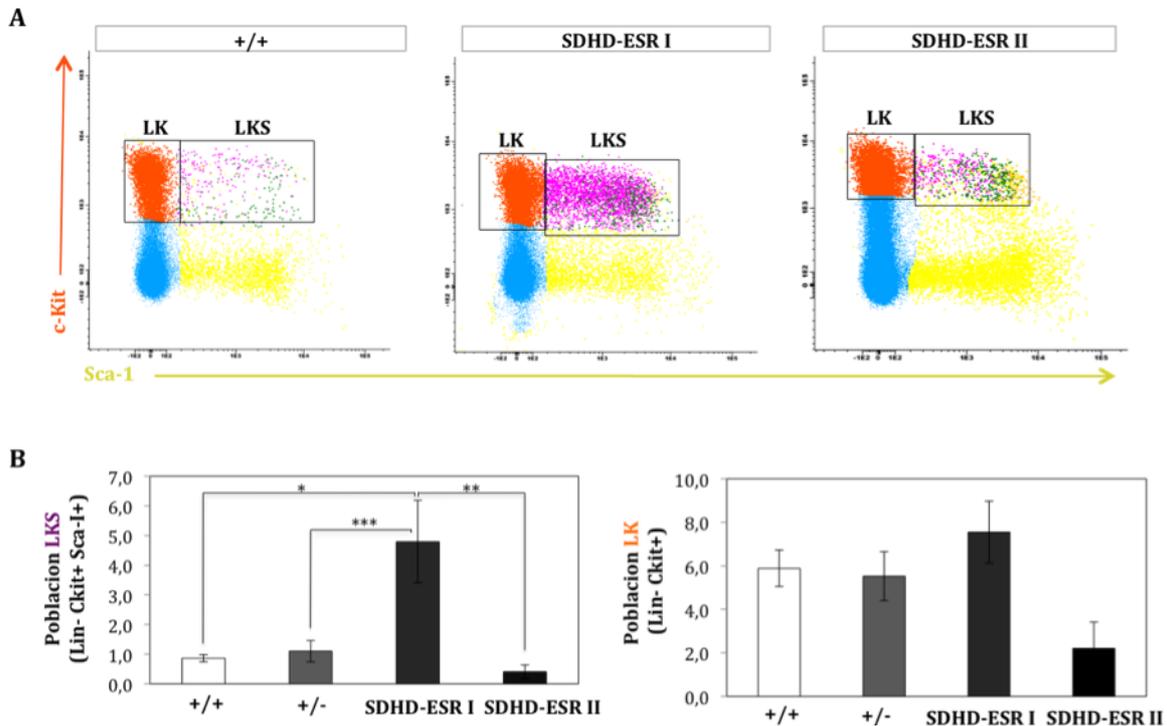


Figura 28. Análisis de las HSC por citometría en médula ósea de ratón SDHD-ESR. En la parte superior (A) están representados la combinación de marcadores c-Kit y Sca-1 para los animales +/+, SDHD-ESR I y II. Delimitadas por rectángulos de destacan las poblaciones LK y LKS. En la parte inferior de la figura (B) se representa la cuantificación obtenida para ambos tipos de poblaciones. * $p=0,037$; ** $p=0,025$; *** $p=0,008$. N= 4-11 animales por grupo.

Los progenitores de la médula ósea tienen la capacidad de formar colonias en el bazo de ratones sometidos a irradiación mieloablativa y además, dichas colonias tienen carácter clonal, es decir, que proceden de una única célula. Con el objetivo de analizar las HSCs con capacidad formadora de colonias se trasplantó la médula ósea procedente de animales +/+ y SDHD-ESR II en animales C57/Bl6 sometidos a irradiación. Los resultados obtenidos hasta el momento muestran una menor

3. Resultados

cantidad de colonias en los bazo de los animales trasplantados con médulas óseas procedentes de SDHD-ESR II (Fig. 29).

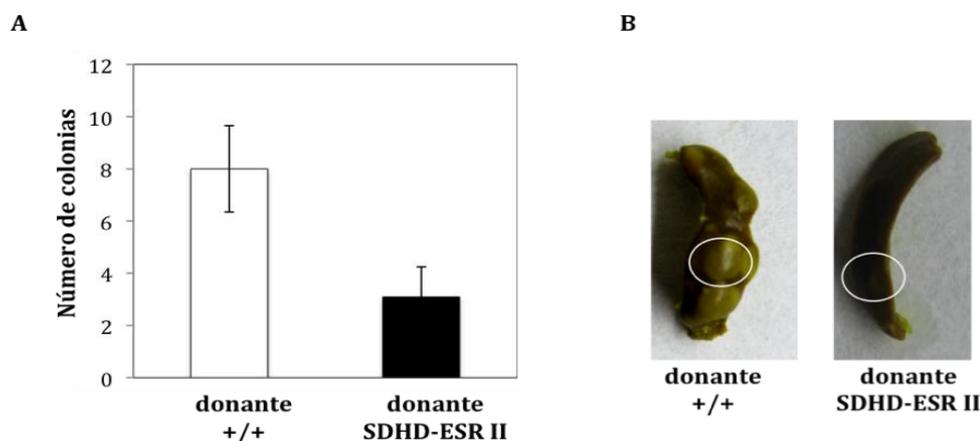


Figura 29. Trasplante de médula ósea del animal SDHD-ESR en ratones C57/Bl6 irradiados. Contaje del número de colonias observadas en los bazo de los animales trasplantados. Junto a cada barra de datos se muestra una imagen de un caso representativo donde se rodea con un círculo blanco una de las colonias detectadas en cada caso. N=11-13 animales por grupo.

Dado que el análisis hematimétrico mostró ligeras diferencias en los parámetros de los hematíes, decidimos evaluar el estado madurativo de la población eritroide en nuestro modelo animal. Para ello analizamos los marcadores de superficie característicos de células eritroides (TER-119) en combinación con el marcador del receptor de transferrina (CD71) en médula ósea. El nivel de expresión del receptor transferrina es mayor en los precursores eritroides durante la fase inmaduras e intermedias, tras lo cual, la expresión decrece durante la fase de reticulocito. La maduración de los eritrocitos da lugar a una pérdida en la expresión del receptor transferrina, en combinación con la regulación descendente de la maquinaria de síntesis de hemoglobina (Fig. 30).

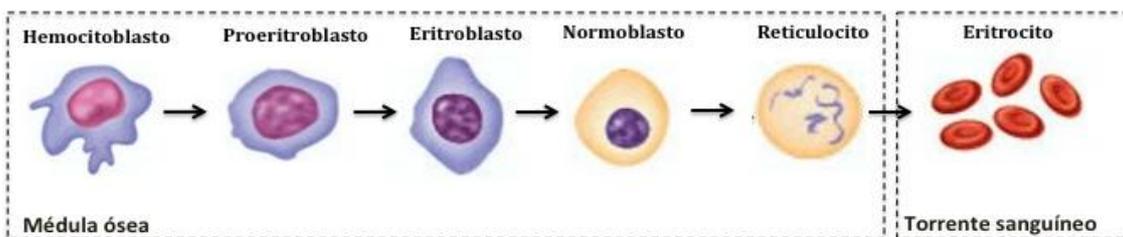


Figura 30. Proceso de maduración y diferenciación eritroide. Dicho proceso se origina en la médula ósea, a partir de los precursores eritroides y culmina con la maduración del eritrocito en el torrente sanguíneo.

3. Resultados

Por ello, la combinación de CD71 y Ter119 nos permite diferenciar cuatro estadios teóricos de maduración: el estadio más inmaduro ó estadio 1 (Ter119⁻ CD71⁺), estadio 2 (Ter119⁺ CD71⁺ alto), estadio 3 (Ter119⁺ CD71⁺ bajo), y estadio 4 (Ter119⁺ CD71⁻). Se observaron diferencias significativas en cuanto a los dos primeros estadios de maduración en los animales SDHD-ESR II, tratándose estas de un incremento del estadio más inmaduro (estadio 1) y de un descenso en el estadio 2 con significancia estadística. Sin embargo, no se consiguieron detectar diferencias significativas en los otros dos estadios de maduración (Fig. 31).

En conjunto, el fenotipo hematológico descrito en el ratón SDHD-ESR, resumido en la Tabla 5, muestra una afectación diferencial de algunos linajes mieloides, así como un efecto en la maduración de los linfocitos B y en las HSCs. En principio, estos rasgos fenotípicos satisfacen los criterios para constituir un modelo de síndrome mielodisplásico (Kogan et al., 2012).

Tabla 5. Características hematológicas del ratón SDHD-ESR

Tejido	Fenotipo
Sangre periférica	Descenso de hematíes, hemoglobina y hematocrito. Descenso de plaquetas.
Médula ósea	Descenso de viabilidad de células hematopoyéticas nucleadas. Descenso de células precursoras de B. Aparente no afectación de linfocitos T a la delección de <i>SdhD</i> . Acumulación transitoria de células madre hematopoyéticas. Retención de la maduración eritroide en estadios inmaduros.

3.7 ESTUDIOS MOLECULARES DEL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO DE LOS RATONES SDHD-ESR

Se realizó un estudio molecular sobre tejido hematológico, a partir de médula ósea total obtenida de los animales tras 3 semanas de tratamiento con tamoxifeno, mediante *western blot* de proteínas relacionadas con la activación de los mecanismos de adaptación a hipoxia (Hif1 α y Hif2 α), así como de p21^{WAF/Cip1} y H2AX, implicadas en la respuesta a la pérdida de *SdhD*. Además, se analizaron los

3. Resultados

niveles de ARN mensajero de *Glut1* mediante RT-qPCR (Fig. 32).

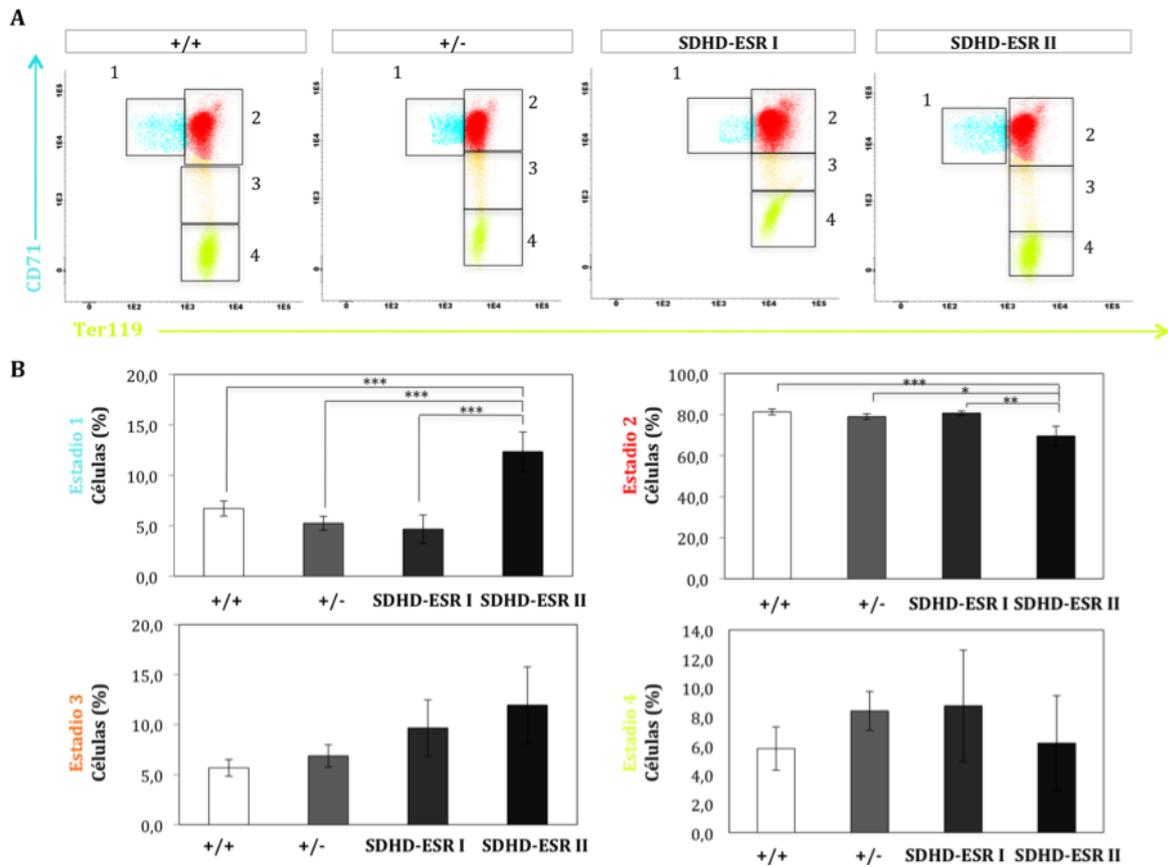


Figura 31. Análisis de maduración eritroide por citometría de flujo en médula ósea de ratón SDHD-ESR. Representación de la intensidad de fluorescencia de CD71 y Ter119 para una médula ósea de un animal de cada genotipo. Cada estadio de maduración se encuentra enmarcado en un rectángulo (A). Celularidad (células en porcentaje) registrada para cada uno de los estadios de maduración para los animales +/+, +/-, SDHD-ESR I y II (B). Estadio 1: *** $p < 0,008$; Estadio 2: * $p = 0,036$, ** $p = 0,024$, *** $p = 0,005$; Estadios 3 y 4 sin significación estadística. N= 5-8 animales por grupo.

No se detectó la acumulación de ninguna de estas proteínas en ninguna muestra de médula ósea, a pesar de observarse en los carriles correspondientes a los extractos de proteínas de iMEFs tomados como control. Sin embargo, en las médulas procedentes de animales SDHD-ESR, se detectó un aumento en los niveles de ARN mensajero de *Glut1*.

3. Resultados

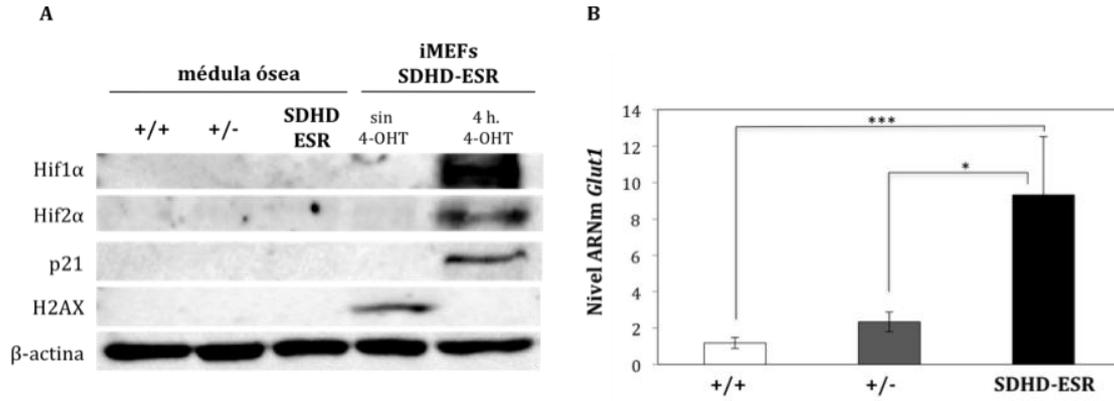


Figura 32. Respuesta de adaptación a hipoxia en tejido hematopoyético de animal SDHD-ESR. Niveles de detección de Hif1 α , (120 kDa) Hif2 α (118 kDa), p21^{WAF1/Cip1} (21 kDa) e histona H2AX fosforilada (16 kDa) en extracto total de proteína (**A**) y niveles de mensajero de *Glut1* (**B**) en médula ósea total de animal SDHD-ESR tras 3 semanas de tratamiento con tamoxifeno. * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$. En el western blot se incluyeron extractos de proteína total de clones iMEFs de genotipo SDHD-ESR sin y tras 4 horas de tratamiento con 4-OHT en el cultivo.

3. Resultados

4. DISCUSIÓN

4 DISCUSIÓN

4.1 RESUMEN

En el trabajo experimental desarrollado en la presente Tesis Doctoral, se ha profundizado en la caracterización de un ratón mutante “knock-out” en el gen *SdhD*, que codifica una de las cuatro subunidades de la succinato deshidrogenasa (SDH), y que ha sido descrito como gen supresor de tumores. Este modelo, denominado SDHD-ESR y generado en nuestro laboratorio (Díaz-Castro et al., 2012), permite deplecionar la función del CMII mitocondrial mediante la inducción de la pérdida de ambos alelos de *SdhD* mediada por tamoxifeno.

4.2 RATÓN SDHD-ESR, p21^{WAF1/Cip1} Y POSIBLES MECANISMOS DE TUMOROGÉNESIS

En este estudio se ha tenido como uno de los objetivos principales identificar los eventos moleculares con potencial implicación en tumorigénesis desencadenados tras la inducción de la pérdida del segundo alelo *SdhD in vivo* en el modelo de ratón SDHD-ESR. Con este fin, una vez validada la caracterización básica del animal desde el punto de vista de la delección del gen *SdhD* y la alteración de la actividad mitocondrial, caracterizamos la vía de respuesta a hipoxia mediada por Hif1 α , uno de los mecanismos más aceptados hasta esa fecha como responsable de tumorigénesis. En los resultados obtenidos del análisis de la expresión de genes diana de Hif1 α , a pesar de observarse una tendencia hacia mayores niveles de expresión, ésta tendencia solo fue significativa para *Vegf*. Además, a pesar de estos resultados, no se consiguió detectar acumulación de Hif1 α mediante *western blot* a partir de extractos de proteína total en los tejidos del ratón. Estos resultados, no permitieron establecer claramente la teoría de la pseudo-hipoxia como definitiva.

Para extender el estudio a un sistema *ex vivo* que permitiera un mayor control de

4. Discusión

la delección de *SdhD* se han desarrollado dos líneas celulares inmortalizadas derivadas del animal SDHD-ESR.

En este nuevo contexto de estudio, se han obtenido resultados inconsistentes con los hallados en el tejido del animal, en la medida en que sí se recapitulaba la respuesta pseudo-hipóxica. Para identificar otras moléculas o rutas implicadas en la respuesta a la delección del gen *SdhD* se ha realizado un análisis del perfil de expresión génica de médula adrenal y riñón del ratón. Con este procedimiento se ha podido identificar el gen *Cdkn1a*, que codifica para el inhibidor de quinasa dependiente de ciclina p21^{WAF1/Cip1} como uno de los genes que se encontraba sobre-expresado en ambos tejidos procedentes de animales mutantes deficientes para *SdhD*. Al estar implicada esta proteína en diversos aspectos del ciclo celular, la proliferación, y la senescencia, consideramos interesante comprobar si esta proteína estaba afectada en las nuevas líneas celulares derivadas del ratón. En ambos tipos celulares se ha observado un aumento del daño en el ADN (inferido de la acumulación de la histona fosforilada H2AX) en las células heterocigotas, sin que dicho daño supusiera un incremento de la proteína p21^{WAF1/Cip1}. Sin embargo, la pérdida de ambos alelos de *SdhD* inducida en las células SDHD-ESR devuelve este daño a los niveles detectados en las células homocigotas +/- acompañada a su vez por una acumulación de p21^{WAF1/Cip1}.

Este fenómeno detectado podría ser clave para proponer un link hasta ahora no establecido entre el gen supresor de tumores *SdhD* y la inducción de p21^{WAF1/Cip1}. A pesar de no estar identificado, está ampliamente aceptado que tras la pérdida de las dos copias del gen *SdhD*, es necesario que tenga lugar un evento adicional para que se inicie el proceso de tumoración (Baysal, 2013). Este requerimiento parece ser específico para tumores dependientes de *SdhD* y de *SDHFA2*, ambos localizados en el cromosoma 1 en humanos, ya que la pérdida de los dos alelos de los genes que codifican para el resto de subunidades del CMII-*SdhA*, *SdhB* y *SdhC*- es condición suficiente para la aparición del tumor.

Hasta ahora, se desconoce la naturaleza de este hipotético “evento extra”. Los resultados obtenidos y la implicación de p21^{WAF1/Cip1} en el ciclo celular, la proliferación y la senescencia nos permiten proponer que la inducción de p21^{WAF1/Cip1} derivada de la pérdida de *SdhD* podría constituir un punto de control

4. Discusión

(“check-point”) de parada del ciclo celular ante la disfunción mitocondrial. Por ello, cualquier evento molecular que permita a la maquinaria de división celular “escapar” a este punto de control conduce a las células a procesos replicativos aberrantes y a la acumulación de mutaciones, que darán lugar en último término a la transformación oncogénica. En este sentido, con los datos obtenidos hasta la fecha no podemos establecer un mecanismo molecular que explique la acumulación del daño en el ADN de los individuos heterocigotos, y por qué ese daño es revertido en los mutantes con ausencia completa de *SdhD*.

Estudios realizados en humanos, basados en los perfiles de expresión génica y en agrupamientos jerárquicos no supervisados, describen una diferenciación entre los feocromocitomas (FCC) con mutaciones en *Vhl* y *SdhD* y los feocromocitomas con mutaciones en MEN2, RET y NF1 (Dahia et al., 2005; Favier et al., 2009; López-Jiménez et al., 2010). Entre los genes implicados en dicha diferenciación, el gen que codifica p21^{WAF1/Cip1}, *Cdkn1a*, presentaba niveles de expresión diferentes en un estudio realizado por López-Jiménez (2010). Además, la expresión diferencial de *Cdkn1a* también se detectó en el trabajo desarrollado por Merlo et al. (2012) en el que se comparaba tejido paragangliónico con tejido de paraganglio normal. Todas estas evidencias apoyan la implicación de p21^{WAF1/Cip1} en los tumores humanos relacionados con mutaciones en SDH.

El hecho de que el evento adicional a la pérdida de ambos alelos de *SdhD* necesario para la tumoración no haya tenido lugar en nuestro modelo animal puede ser atribuido a diferentes circunstancias. Por ejemplo, la reducción del tiempo de vida de los animales como consecuencia del tratamiento con tamoxifeno para generar la delección de *SdhD* podría impedir que la tumorigénesis tuviera lugar. Además, otros factores genéticos como la redundancia genética, la distinta organización cromosómica o diferentes susceptibilidades derivadas de la ausencia de un alelo de *SdhD* podrían ser la causa de las diferencias entre humanos y ratón.

Un papel alternativo de p21^{WAF1/Cip1} como onco-proteína en tejidos deficientes para *SdhD* también puede ser considerado. Aunque el papel de p21^{WAF1/Cip1} como supresor de tumores se opone al mecanismo mediante el cual su inducción está asociada a tumorigénesis (Abbas and Dutta, 2009; Romanov et al., 2007), se ha podido demostrar que bajo ciertas condiciones, p21^{WAF1/Cip1} puede promover la

proliferación celular y la oncogenicidad (Abbas and Dutta, 2009; Cheng et al., 2010). La activación transcripcional del gen *Cdkn1a* parece ser independiente de p53, al menos en nuestras líneas celulares derivadas del ratón SDHD-ESR, ya que ambas fueron inmortalizadas a través de la expresión de la forma dominante negativa de p53 y de la expresión del antígeno T de SV40, que a su vez actúa inactivando a p53. Tal regulación del gen *Cdkn1a* independiente de p53 ha sido, de hecho, descrita en otras situaciones (Degenhardt et al., 2002).

4.3 ACTIVACIÓN DE LA VÍA “PSEUDO-HIPÓXICA” EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DEL MODELO SDHD-ESR

La pérdida de ambos alelos de *SdhD* da lugar a la sobre-expresión del gen que codifica para el transportador de glucosa 1 (*Glut1*) en las líneas celulares generadas (iMEFs e iBMKs), lo cual indica un cambio metabólico hacia la glucólisis. Este cambio en el perfil de expresión génica parece estar mediado por la activación de la respuesta “pseudo-hipóxica” en la que Hif1 α juega un papel esencial (Briere et al., 2005; Selak et al., 2005; Pollard et al., 2005). De hecho, en nuestros sistemas celulares observamos una clara y rápida acumulación de Hif1 α . Sin embargo, aunque la inducción de Glut1 puede estar causada por la estabilización de Hif1 α , la pérdida de la función mitocondrial podría estar forzando a las células a producir dicho cambio metabólico a través de alteraciones en la expresión de genes independientes de Hif1 α .

Los datos obtenidos de los cultivos celulares también mostraban que la estabilización de Hif1 α en nuestro modelo es transitoria, lo que podría ser la razón por la cual no hemos sido capaces de detectar la acumulación de dicha proteína en los tejidos del animal tras el tratamiento con tamoxifeno vía intraperitoneal. Por otro lado, los datos obtenidos de los estudios de perfil de expresión génica en tejido del ratón no mostraron evidencias de una activación de la vía “pseudo-hipóxica”. Por lo tanto, no se puede concluir que la pérdida de *SdhD* implique directamente la acumulación de Hif1 α y la activación de la vía “pseudo-hipóxica”. Sin embargo, es importante considerar que Hif1 α puede desempeñar un papel esencial en el progreso del tumor una vez éste se ha formado.

4.4 RESPUESTA TISULAR DIFERENCIAL ANTE LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL

Un aspecto interesante en relación a los tumores originados por mutaciones en el CMII o en sus proteínas relacionadas es la tendencia a localizarse en tejidos derivados del sistema paragangliónico. La razón propuesta para dicha especificidad de tejido es que la habilidad intrínseca de dichos órganos para detectar oxígeno, ente otras características biológicas, podría estar implicada de alguna manera en la predisposición que presentan a formar tumores (Baysal, 2013).

De hecho, la diferencia en cuanto a los cambios en los perfiles de expresión génica entre la médula adrenal y el riñón que han sido detectados en nuestro estudio evidencia que dichos tejidos responden de manera diferente a la delección de *SdhD*. En la médula adrenal, la respuesta observada apunta hacia la inhibición de la respuesta inflamatoria y la disminución de la actividad inmunológica a través de cambios en la expresión de quimiocinas, citoquinas y sus receptores. Por otro lado, los datos revelan que el riñón actúa promoviendo reajustes metabólicos, y procesos implicados en la viabilidad y supervivencia celular. Si estas diferencias subyacen de alguna forma a la predisposición diferencial hacia la transformación tumoral es algo que será objeto de estudio en investigaciones futuras.

4.5 ANIMAL SDHD-ESR COMO POSIBLE MODELO PARA EL ESTUDIO DE HEMOPATÍAS CAUSADAS POR DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL

Además de las evidencias clínicas, resultados recientes obtenidos a partir de un modelo murino confirman el vínculo entre la disfunción mitocondrial generada por mutaciones en la enzima *Idh*, localizada tres pasos por delante de la enzima *Sdh* en el ciclo de Krebs, y la aparición de desórdenes hematológicos malignos (Sasaki et al., 2012b). Este modelo consiste en un ratón KI condicional, que expresa el alelo mutante *Idh1*^{R132H} tras la escisión de un cassette loxP-stop-loxP mediada por la recombinasa CRE regulada por el promotor específico de línea mieloide *LysM*, generado para el estudio de la leucemia, pero que no desarrollaban finalmente la

4. Discusión

enfermedad.

Por ello, considerando la necesidad de obtener modelos animales robustos que recapitulen las enfermedades hematológicas, y teniendo en cuenta la posible implicación de la disfunción mitocondrial en la aparición de algunas de estas entidades, nosotros proponemos nuestro modelo animal SDHD-ESR de disfunción mitocondrial como posible modelo para SMD/LMA.

El subcomité del Consorcio de Hematopatología de los Modelos Murinos de Cánceres Humanos, reconoció la necesidad de una clasificación de las neoplasias hematopoyéticas no linfoides murinas que pudiera ser comparable a la de humanos. De esta forma se permitía a los investigadores diagnosticar lesiones como entidades bien definidas según una serie de criterios aceptados basados en hallazgos de sangre periférica, características citológicas de los tejidos hematopoyéticos, histopatología, inmunofenotipo, características genéticas, y curso clínico (Kogan et al., 2002). Dicho diagnóstico, a su vez, permitía clasificar las lesiones en 4 categorías de neoplasias hematopoyéticas, que a pesar de identificarse a través del incremento de la población de células hematopoyéticas no linfoides en bazo y/o médula ósea, presentan características diferenciales: leucemias no linfoides, sarcomas hematopoyéticos no linfoides, displasias mieloides, y las proliferaciones mieloides no reactivas. Los SMD se encuentran dentro de la categoría de las displasias mieloides, cuyos criterios poblacionales definidores son:

1. Presencia en sangre periférica de una o más de las siguientes manifestaciones:
 - a. Neutropenia (con o sin anemia y con o sin trombocitopenia)
 - b. Trombocitopenia con leucocitosis o eritrocitosis
 - c. Anemia sin leucocitosis o trombocitosis
2. Defectos en la maduración de células hematopoyéticas de origen no linfoide evidenciados por:
 - a. Disgranulopoyesis, diseritropoyesis, y/o megacariocitos displásicos con o sin aumento de blastos inmaduros, en cuyo caso será subclasificado como SMD
 - b. Al menos 20% de blastos en médula ósea y/o bazo, en cuyo caso

4. Discusión

será subclasificado como citopenia con elevado número de blastos.

3. Desórdenes que no cumplen los criterios de leucemia no linfocítica

Desde el punto de vista morfológico, se han de tener en cuenta alteraciones tanto en células eritroides como en megacariocitos y neutrófilos.

En el proceso de caracterización del animal SDHD-ESR desde el punto de vista hematológico como posible modelo de SMD, se ha observado un incremento en la población monocítica en los animales que han perdido ambos alelos del gen *SdhD*, aunque dicho aumento no se ha confirmado por citometría de flujo. Otros rasgos que se han detectado en nuestro modelo consisten en una tendencia al descenso en la cantidad de neutrófilos y una reducción significativa en el número de plaquetas en animales mutantes. Los animales SDHD-ESR mostraban una tendencia al descenso en el número de hematíes, al igual que en la cantidad de hemoglobina y en hematocrito. Esta reducción en el número de hematíes podría estar relacionada con el fenotipo de bloqueo de la maduración en los estadios más inmaduros detectado en la médula ósea del animal SDHD-ESR.

En la médula ósea, la cuantificación por citometría ha mostrado un descenso significativo de la viabilidad de las células CD45⁺. Los animales SDHD-ESR sacrificados tanto a las 2 como a las 3 semanas del tratamiento con tamoxifeno mostraron un descenso específico de la población los precursores de las células B sin que se detectaran diferencias significativas en la población linfocítica T. De hecho, este fenotipo en las células precursoras de B es el efecto más robusto y reproducible observado en el sistema hematopoyético de nuestro animal SDHD-ESR. Al analizar la población de granulocitos y macrófagos a través del marcador CD11b, no hemos detectado diferencias cuantitativas significativas entre los animales mutantes y los controles, sin embargo el perfil de distribución de este tipo de células en función de su tamaño y granularidad (o complejidad celular interna) es diferente al comparar un animal control con un animal mutante, pudiéndose considerar este aspecto como un rasgo característico de los animales mutantes a tener en cuenta en la caracterización del modelo. No obstante, un análisis morfológico preliminar tanto de sangre como de médula ósea no reflejó una traducción de estos hallazgos en rasgos morfológicos de displasias (datos no mostrados).

4. Discusión

En cualquier caso nuestro modelo presenta trombocitopenia, afectación de la maduración de la serie roja, y linfopenia B más llamativa en los precursores, y no afectación de los linfocitos T. Respecto a las HSC observamos una activación transitoria de la médula ósea, posiblemente como consecuencia de los defectos antes mencionados, aunque no podemos descartar que las HSCs adquieran cierta capacidad proliferativa cuando pierden la función mitocondrial. Todo esto sugiere que el modelo *SdhD* es válido como modelo de SMD y adquiere el valor añadido de que el agente etiopatogénico sería la función mitocondrial. Sin embargo, aún considerando que los resultados obtenidos hasta ahora parecen afirmar la validez experimental de nuestro modelo, será necesario llevar a cabo más experimentos para poder concluir la caracterización del animal SDHD-ESR como posible modelo de estudio de SMD.

Por otra parte, discutimos la posibilidad de que las HSC de los animales SDHD-ESR que pierden ambos alelos del gen *SdhD*, podrían presentar un potencial leucemogénico. La proliferación clonal de este tipo células madre mutadas dentro de la médula ósea y la detención del proceso de diferenciación de las mismas puede provocar una acumulación de progenitores indiferenciados en la médula ósea que inhibe a las células madre normales que todavía pueden producir progenie normal. Así, se produce una carencia de hematíes, plaquetas y leucocitos. En este sentido, la acumulación de la población de HSC LKS observada en nuestro modelo animal SDHD-ESR podría constituir una evidencia que vincula la transformación de células como consecuencia de la mutación en una enzima mitocondrial con el potencial de dar lugar a una neoplasia mieloproliferativa.

Para profundizar en la confirmación el carácter neoplásico detectado en las médulas óseas de los animales consideramos estudiar las características de las poblaciones de progenitores a través de su capacidad de desarrollo monoclonal y a través de la capacidad de expansión en trasplante en un animal inmunodeprimido. Para ello, se recurrirá al trasplante de médula ósea procedente de animales SDHD-ESR en animales Balb/c y NOD/Scid gamma (del inglés, *non-obese diabetic/ severe combined immunodeficient gamma*; NSG).

Finalmente, como se comentó en el apartado de *Introducción*, existen de evidencias que demuestran inducción de la respuesta de adaptación a hipoxia

4. Discusión

mediada por Hif1 α en muestras obtenidas de biopsias humanas con SMD (Albitar, 2001; Savic et al., 2012; Tong et al., 2012). Además, diversos estudios proponen que la disfunción mitocondrial podría alterar el metabolismo celular hacia rutas anaeróbicas, de forma similar a la que tiene lugar en hipoxia, lo que podría dar lugar a la transformación tumoral de la hematopoyesis (Parmar et al., 2007; Rehn et al., 2011; Suda et al., 2011; Takubo and Suda, 2012). Teniendo en cuenta estas evidencias, se han llevado a cabo experimentos preliminares para detectar la posible activación de la respuesta de adaptación a hipoxia mediada por Hif1 α en tejido hematopoyético del animal SDHD-ESR. Hasta la fecha, no se ha conseguido detectar inducción de Hif1 α ni de proteínas relacionadas en las médulas óseas de los animales +/+, +/- y SDHD-ESR. Esto puede ser debido a que esta técnica no sea la más adecuada para el análisis propuesto o porque en la médula ósea de estos animales no esté teniendo lugar la respuesta de adaptación a hipoxia. Sin embargo, sí se ha detectado un incremento significativo de los niveles de mensajero de *Glut1*, dato consistente con la tendencia previamente descrita en riñón y con lo observado en las líneas celulares. Por tanto, no podemos concluir que la activación de la respuesta a hipoxia esté teniendo lugar de una forma evidente en la médula ósea de los animales con pérdida de función mitocondrial por delección de *SdhD*.

4. Discusión

5. CONCLUSIONES

5 CONCLUSIONES

1. En el ratón SDHD-ESR, la delección de *SdhD* de forma generalizada provoca disfunción de la actividad enzimática del CMII con una consiguiente pérdida de peso progresiva y muerte prematura.
2. La activación de la respuesta “pseudo-hipóxica” como consecuencia de la depleción del CMII no tiene lugar de forma generalizada en los tejidos analizados del ratón SDHD-ESR. La respuesta “pseudo-hipóxica” que tiene lugar en las líneas celulares derivadas de tejidos de ratón es inconsistente con los resultados obtenidos en dichos tejidos.
3. La disfunción mitocondrial inducida por la delección de los dos alelos del gen *SdhD* del CMII desencadena cambios en los perfiles de expresión génica diferentes en médula adrenal y riñón en los ratones SDHD-ESR. En la médula adrenal, las funciones más afectadas fueron movimiento, mantenimiento, desarrollo, señalización, interacción, crecimiento y proliferación celular, entre otras. Por otro lado, las funciones afectadas en el riñón están relacionadas con producción energética, respuesta a drogas, metabolismo de ácidos grasos, y replicación, recombinación y reparación del ADN.
4. Ambos tejidos muestran sobre expresión del gen *Cdkn1a*, que codifica para el inhibidor de quinasa dependiente de ciclina p21^{WAF/Cip} implicado en ciclo celular, senescencia y cáncer. Así mismo, esta respuesta se observa en las líneas celulares derivadas de los tejidos e inmortalizadas.
5. Los estudios realizados en las líneas celulares derivadas del ratón SDHD-ESR muestran que la pérdida de un solo alelo del gen *SdhD* da lugar a un aumento de daño en el ADN, lo que deriva en la acumulación de la proteína fosforilada H2AX. Este fenómeno revierte cuando se pierde totalmente el gen por la delección de ambos alelos. Por tanto existe un vínculo, no propuesto hasta la fecha, entre la pérdida del gen, la activación de p21^{WAF/Cip} y el daño en el ADN.
6. La delección de *SdhD* afecta al desarrollo normal de la hematopoyesis, lo que resulta en un descenso en el número de plaquetas y hematíes en sangre

5. Conclusiones

- periférica. Además, la delección de *SdhD* da lugar a una reducción en el número de precursores de linfocitos B presente en la médula.
7. El análisis de las células madre hematopoyéticas de los ratones SDHD-ESR tratados con tamoxifeno muestra una acumulación transitoria en médula ósea.
 8. El ratón SDHD-ESR constituye un modelo válido de SMD, en tanto que el fenotipo hematológico mostrado hasta ahora satisface los criterios requeridos tanto en sangre periférica como en médula ósea. Nuestro modelo podría constituir el primer modelo ratón con SMD por disfunción mitocondrial, lo que indicaría que ésta juega un papel central en la etiopatogenia de la enfermedad.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 PROTOCOLO DE INYECCIÓN DE TAMOXIFENO

Para inducir la delección de *SdhD in vivo* se administró tamoxifeno (Sigma) mediante inyección intraperitoneal en nuestro modelo murino KO condicional. En un primer momento, para los experimentos de la caracterización del modelo se emplearon dos dosis de tamoxifeno, una baja (50 µg de tamoxifeno /g de ratón durante 2 días consecutivos) y una alta (100 µg de tamoxifeno/g de ratón durante 4 días consecutivos). Para la caracterización del fenotipo hematológico, los ratones fueron tratados con una dosis de 150 µg de tamoxifeno/g de ratón durante 4 días consecutivos. Las inyecciones se hicieron a partir de una dilución de 20 mg de tamoxifeno / ml de aceite de maíz preparada el mismo día en que se iniciaban las inyecciones. La dilución se mantuvo a 4°C hasta 3 horas ante de las inyecciones, momento en el que se pasaba a temperatura ambiente para su atemperación. Los ratones de genotipo +/+ y +/- también se inyectaron con las mismas dosis de tamoxifeno.

En los estudios hematológicos, se establecieron dos cursos temporales de tratamiento con tamoxifeno: el grupo I, que se sacrificó una vez transcurridas 2 semanas desde la primera inyección del tamoxifeno; y el grupo II, sacrificado a las 3 semanas.

6.2 GENOTIPADO POR PCR

La extracción de ADN genómico para el genotipado de los ratones se hizo a partir de biopsias bien de parte de los deditos que se usan para el marcaje, o bien de un trozo de cola o de embriones. Las biopsias se mantuvieron a -20 °C hasta su uso. Para la digestión del tejido se añadió 600 µl de SNET y 0,1 mg de proteinasa K (Roche). Las muestras se incubaron a 57°C con agitación leve durante 2 horas y 15 minutos. Luego se subió la temperatura a 85 °C durante 50 minutos sin agitación,

6. Material y métodos

para inactivar la proteinasa K. Una vez digerido el tejido se guardó a 4 °C. Cuando la muestra estuvo fría se dio un pulso de centrifuga para enviar las sales precipitadas al fondo del tubo, y se tomó el ADN para la PCR del sobrenadante.

Composición de SNET	
Producto	Concentración
<i>SDS</i>	1%
<i>NaCl</i>	400 mM
<i>EDTA</i>	5 mM
<i>Tris HCl (pH 8)</i>	20 mM

El genotipado de los embriones se realizó a través de dos reacciones de PCR: una para genotipar el alelo *SdhD* y otra para detectar la expresión de la recombinasa CRE-ESR

6.2.1 PCR alelo *SdhD*

Se diseñó una PCR capaz de amplificar el alelo silvestre de *SdhD* (*SdhD*⁺), el alelo nulo (*SdhD*⁻) y el alelo *SdhD* “floxeado” (*SdhD*^{flox}) con un trío de oligonucleótidos:

<i>SdhD</i>	
Oligo	Secuencia (5'-3')
<i>SDHEx5_2</i>	GACTAAGTGATAAACTGTCTTC
<i>SDHNeo_2</i>	GTGATATTGCTGAAGAGC
<i>SDHIn5R_2</i>	ACCCAGAACACAGACTG

Reacción de PCR	
Reactivo	Volumen (μl)
<i>ADN</i>	1 μl
<i>SDHEx5_2 (20 μM)</i>	0,5 μl

6. Material y métodos

<i>SDHNeo_2 (20 μM)</i>	<i>0,5 μl</i>
<i>SDHIn5R_2 (20 μM)</i>	<i>1 μl</i>
<i>dNTP (10 mM)</i>	<i>1 μl</i>
<i>MgCl₂ (50mM)</i>	<i>2 μl</i>
<i>Buffer 10x</i>	<i>5 μl</i>
<i>Taq polimerasa</i>	<i>0,3 μl</i>
<i>H₂O destilada</i>	<i>38,7 μl</i>
Volumen Final Reacción = 50 μl	

Esquema de PCR		
Ciclo	Temperatura (°C)	Duración
<i>1</i>	<i>95</i>	<i>5 min.</i>
<i>2</i>	<i>95</i>	<i>30 seg.</i>
<i>3</i>	<i>57</i>	<i>45 seg.</i>
<i>4</i>	<i>72</i>	<i>2 min.</i>
<i>5</i>	<i>volver a ciclo 2 34 veces</i>	
<i>6</i>	<i>72</i>	<i>10 min.</i>
<i>4</i>	<i>4</i>	<i>∞</i>

6.2.2 PCR recombinasa CRE-ESR

Para identificar los animales portadores del gen de la recombinasa Cre se realizó una reacción de PCR capaz de amplificar un fragmento de este gen con dos oligonucleótidos:

CRE-ESR	
Oligo	Secuencia (5'-3')
<i>Cre_lo</i>	<i>ACGGGCACTGTGTCCAG</i>
<i>Cre_up</i>	<i>TGTTTCAGGGATCGCCAG</i>

6. Material y métodos

Reacción de PCR	
Reactivo	Volumen (μ l)
<i>ADN</i>	<i>1 μl</i>
<i>Cre_lo (20 μM)</i>	<i>1 μl</i>
<i>Cre_up (20 μM)</i>	<i>1 μl</i>
<i>dNTP (10 mM)</i>	<i>1 μl</i>
<i>MgCl₂ (50mM)</i>	<i>2 μl</i>
<i>Buffer 10x</i>	<i>5 μl</i>
<i>Taq polimerasa</i>	<i>0,3 μl</i>
<i>H₂O destilada</i>	<i>38,7 μl</i>
Volumen Final Reacción = 50 μl	

Esquema de PCR		
Ciclo	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Duración
<i>1</i>	<i>95</i>	<i>5 min.</i>
<i>2</i>	<i>95</i>	<i>30 seg.</i>
<i>3</i>	<i>57</i>	<i>30 seg.</i>
<i>4</i>	<i>72</i>	<i>1 min.</i>
<i>5</i>	<i>volver a ciclo 2 30 veces</i>	
<i>6</i>	<i>72</i>	<i>10 min.</i>
<i>4</i>	<i>4</i>	∞

6. Material y métodos

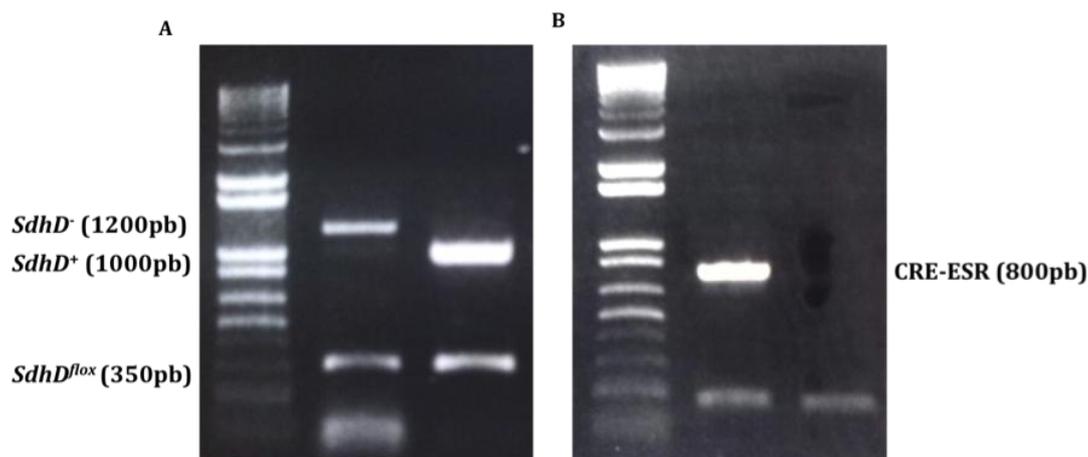


Figura 33. PCR de genotipado de *SdhD* y CRE-ESR. Electroforesis de los productos de PCR para el genotipado de los alelos de *SdhD* (A) y CRE-ESR (B). Entre paréntesis se indican los pares de bases (pb) correspondientes a los tamaños de cada fragmento amplificado.

De esta forma, a los animales portadores de un alelo *SdhD*^{fllox} y otro silvestre *SdhD*⁺ que no expresaban el gen de la recombinasa CRE-ESR los llamaremos +/+; a los animales portadores de un alelo *SdhD*^{fllox} y otro *SdhD*⁻ que no expresaban el gen de la recombinasa CRE-ESR, +/-, y nos referiremos a los animales portadores de un alelo *SdhD*^{fllox} y otro *SdhD*⁻ que sí expresaban el gen de la recombinasa CRE-ESR como SDHD-ESR.

Los animales SDHD-ESR que pertenecían al grupo I de sacrificio (2 semanas post-tamoxifeno) se nombraron como SDHD-ESR I y los del grupo II (3 semanas post-tamoxifeno) como SDHD-ESR II. Los animales con genotipo +/+ y +/- sacrificados a los dos tiempos se analizaron como un solo grupo al no mostrar diferencias entre ellos.

6.3 MANTENIMIENTO DE LOS ANIMALES

Los animales se han mantenido estabulados en grupos en racks ventilados, con comida y agua *ad libitum* y monitorizados para poder estudiar el posible desarrollo de fenotipos. Los animales tuvieron seguimientos semanales para la detección

6. Material y métodos

precoz de anomalías. En ningún caso se permitió que los animales alcanzaran niveles severos de sufrimiento, en cuyo caso se sacrificaban inmediatamente.

6.4 ENSAYO DE ACTIVIDAD DE LOS COMPLEJOS MITOCONDRIALES

Las actividades de los complejos mitocondriales se ensayaron por espectrofotometría en mitocondrias aisladas mediante fraccionamiento de extractos de tejidos.

6.4.1 Obtención de mitocondrias

El proceso de extracción de mitocondrias se llevó a cabo a 4 °C. Los extractos de hígado y riñón se trocearon y homogeneizaron (homogenizador Dounce) en medio L/K. El homogeneizado se centrifugó en tubos de 15 ml a 4°C durante 10 minutos a 1.000 g. El sobrenadante, que contenía las mitocondrias y el precipitado los núcleos, membranas y otros restos celulares, se repartió en tubos de 1'5 ml y se centrifugó de nuevo a 4°C durante 5 minutos a 12.000 g. Tras esta centrifugación, el nuevo precipitado contenía las mitocondrias. Se resuspendieron los pellet en 350 µl de medio B y se dividió en alícuotas de 50 µl/tubo, se congelaron en N₂ líquido y luego se conservaron a 80 °C.

Composición de medio L/K	
Producto	Concentración
EDTA	1 mM
Tris HCl pH 7,4	10 mM
Sacarosa	320 mM
Composición de medio B	
Producto	Concentración
EGTA	0,1 mM
Hepes	2 mM
Sacarosa	250 mM

6.4.2 Actividad del complejo mitocondrial I (CMI)

La actividad NADH-ubiquinona-oxidoreductasa se llevó a cabo a 30°C y se midió

6. Material y métodos

mediante espectrofotometría. Las mitocondrias se prepararon diluyéndolas 1:4 en solución C1/C2. Tras incubarlas 5 minutos a 30°C, se centrifugaron 10 minutos a máxima velocidad. Una vez eliminado el sobrenadante se volvió a añadir la misma cantidad de solución C1/C2 y se congelaron y descongelaron en N₂ líquido 3 veces. Después se incubaron 5 minutos a 30 °C y se inició el ensayo, basado en la medida de la actividad NADH ubiquinona-oxidoreductasa del CMI.

Para ello se midió la caída de absorbancia a 340 nm. La absorbancia se midió cada 10 segundos durante 2 minutos tras añadir 10 µg de proteína, 13 µl de Ubiquinona 10 mM (Sigma), 950 µl de solución C1/C2, 10 µl de NADH 13 mM (Roche) y 2 µl de Antimicina 1 mg/ml (Sigma). Tras los 2 minutos de medida e incubación se añadieron 2 µl de rotenona 1 mg/ml, y se midió la absorbancia durante 2 minutos más. La actividad del CMI se tomó como la diferencia entre la tasa de consumo de NADH antes y después de la adición de rotenona. La actividad se determinó como la cantidad de nmoles de NADH metabolizados por minuto y por mg de proteína:

$$\Delta \text{ concentración NADH } (\mu\text{M}/\text{min}) = \Delta \text{ absorbancia}/\text{min (tasa)} \times 1/E (6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times 1.000 (\mu\text{M}/\text{mM}) \times \text{volumen final } (\mu\text{l})/\text{volumen de la muestra } (\mu\text{l}) \times \text{factor de dilución.}$$

Donde E= coeficiente de extinción molar

Composición de solución C1/C2 (pH 7.2)	
Producto	Concentración
KH ₂ PO ₄ pH 7,2	25 mM
MgCl ₂	5 mM
KCn	3 mM
BSA	2,5 mg/ml

6.4.3 Actividad del complejo mitocondrial II (CMII)

La actividad succinato-ubiquinona-oxidoreductasa también se llevó a cabo a 30°C mediante espectrofotometría. Las mitocondrias se prepararon de la misma forma que en el caso de la actividad de CMI. Una vez diluidos los complejos en solución C1/C2 se comenzó el ensayo añadiendo a la muestra 950 µl más de solución C1/C2,

6. Material y métodos

20 μl de succinato sódico 1 M (Sigma). Se dejó incubar durante 10 minutos y seguidamente se añadió 10 μl de DCPIP (2,6-diclorofenol-indofenol) 5 mM (Sigma), 2 μl de antimicina 1 mg/ml (SIGMA) y 2 μl de rotenona 1 mg/ml. Se midió la absorbancia a 600 nm durante 2 minutos hasta alcanzar una línea base, luego se añadieron 7 μl de ubiquinona 10 mM y se tomaron medidas cada 10 segundos durante 2 minutos más. Para el cálculo de la Δ de concentración DCPIP (μM /min) se usó la misma fórmula que para el CMI, pero en este caso el coeficiente de extinción (E) de $19,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

6.5 CULTIVOS CELULARES

6.5.1 Generación de líneas celulares

Con la finalidad de obtener embriones de los 3 genotipos (+/+, +/- y SDHD-ESR) se diseñaron los cruces de ratones escogiendo ratonas jóvenes en edad fértil, que fueron introducidas en la jaula de un macho joven en proporción 2/1, y se las dejó durante la noche. A la mañana siguiente, se procedió a la detección del tapón mucoso vaginal como signo de fecundación. A partir de ese momento se contó el tiempo de desarrollo embrionario.

Para la generación de la línea de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs- del inglés, *Mouse Embryonic Fibroblasts*) se sacrificó a las hembras mediante dislocación cervical tras 14 días de desarrollo embrionario (E14.5). Para la línea de células epiteliales de ratón (BMKs-del inglés, *Baby Mouse Kidney Cells*) se sacrificaron a las crías 5 días después del nacimiento (P5).

6.5.1.1 Extracción de fibroblastos embrionarios de ratón

Tras realizar una incisión en la pared abdominal de las hembras preñadas, se extrajeron los úteros que portaban los embriones y se colocaron en un tubo con etanol 70%. Rápidamente se cambiaron a una placa en la que se realizaron dos lavados con PBS 1x (Gibco). En condiciones de esterilidad dentro de la campana de flujo laminar y con ayuda de unas pinzas se realizó un corte en la pared uterina

6. Material y métodos

que facilitó el acceso a los embriones. Se separó cada embrión de la placenta y del saco vitelino, dejando únicamente la carcasa y la cabeza, que fue empleada para genotipado. Cada carcasa se pasó a un pocillo de una placa multiwell en la que previamente se habían añadido entre 250 y 500 μ l de PBS 1x, se fragmentaron en trozos más pequeños con unas tijeras y se aspiraron repetidamente con una pipeta para disgregar el tejido. Se añadió 1ml de Tripsina+EDTA 0,25% (Gibco) a cada pocillo y se dejó actuar durante 20 minutos en un incubador a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo de tripsinización se trasladó el contenido de cada pocillo a un tubo de centrifugación con 15 ml de medio de cultivo DMEM (Lonza) suplementado con 10% SBF (PAA), 1% penicilina/estreptomicina/glutamina (Gibco) y 1% aminoácidos no esenciales (Gibco). Se dejó decantar y, con ayuda de una pipeta serológica, se recogió la fase superior y se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Cada pellet se resuspendió en 3ml de medio de cultivo fresco y se sembraron las células en los pocillos de una placa de 6 pocillos, quedando las células de cada embrión en un pocillo diferente. Al día siguiente se realizó un lavado con PBS 1x en cada pocillo y se añadió medio fresco. Se mantuvieron las células en cultivo hasta alcanzar confluencia.

6.5.1.2 Extracción de células epiteliales de riñón de ratón

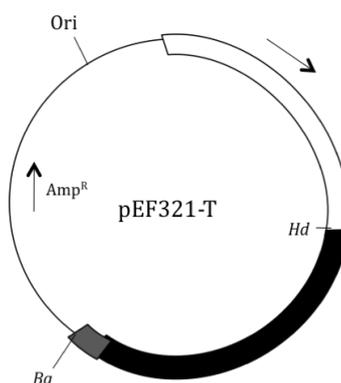
Con ayuda de un bisturí y una lupa se realizó un corte longitudinal en la superficie dorsal para exponer a los riñones a ambos lados de la columna espinal. Se congeló un trozo de la cola de cada cría para el genotipado. Se depositaron los riñones de cada cría en una placa con PBS1x para realizar dos lavados, se cortaron en trozos pequeños y después se disgregó el tejido en una solución de colagenasa/dispasa. Se trasladó el contenido de cada placa a un tubo con medio DMEM (Lonza) suplementado con 10% SBF (PAA), 1% Penicilina/Streptomicina/Glutamina (Gibco) y 1% Aminoácidos no esenciales (Gibco) y se dejó decantar el debris al fondo del tubo. La suspensión de células se trasladó a un nuevo tubo y se centrifugó durante 5 minutos a 1000 rpm. El pellet de células se resuspendió en medio fresco.

6. Material y métodos

El genotipado de los embriones y de las crías del ratón se realizó según lo descrito en el apartado 6.2 *Genotipado*.

6.5.2 Inmortalización de líneas celulares

La capacidad proliferativa de los MEFs en cultivo primario disminuye considerablemente con el tiempo. Los dos procedimientos más empleados para inmortalizar MEFs en cultivo primario son los pases seriados antes de que las células alcancen el plató de crecimiento y la transformación de fibroblastos primarios mediante la sobre expresión de uno o varios oncogenes. En nuestro caso, para poder generar MEFs inmortalizados (iMEFs) con las características de crecimiento conservadas, recurrimos a la transformación de los fibroblastos previamente obtenidos con el plásmido pEF321-T para inducir la sobre expresión del Antígeno T del oncogén SV40 (Fig. 34).



Adaptado de Kim et al. (1990)

Figura 34. Esquema de la estructura del plásmido pEF321-T. El fragmento de color negro entre el sitio de corte de la enzima HindIII (Hd) y BamHI (Ba) representa la región codificante para el Antígeno T. Amp^R representa la secuencia que confiere resistencia a Ampicilina. Los fragmentos blanco y gris representan el promotor EF1 y la cola poli(A) añadida al plásmido respectivamente. Las flechas indican la dirección de lectura.

La generación de líneas inmortalizadas a partir de células epiteliales de ratón precisa de la inactivación simultánea del retinoblastoma (Rb) y la ruta de p53. Rb regula proliferación celular controlando la transición de la fase G1 a la S, mientras que p53 evita la entrada de la célula en fase S ante la inactivación de Rb. Para llevar

6. Material y métodos

a cabo la inactivación de p53 recurrimos a la inhibición directa a través de la oncoproteínas virales E1A, que da lugar al arresto del crecimiento celular y apoptosis, que a su vez, inactivamos a través de la expresión de un mutante dominante negativo de p53 (p53DD).

6.5.2.1 Purificación y linearización de los plásmidos

Se transformaron bacterias competentes con los plásmidos pEF321-T, pCMVE1A y pCMV53DD. pCMVE1A y pCMV53DD portaban la onco-proteína viral E1A y p53DD respectivamente, ambos cedidos por la Dr. Eileen White. Se extrajo ADN mediante lisis alcalina y se realizaron análisis de restricción previos a las linearizaciones.

Dado que el plásmido pEF321-T es circular, consideramos conveniente linearizarlo para así aumentar la eficiencia de la transformación. Finalmente se decidió linearizar 30 µg de plásmido con la enzima de restricción BamHI para su uso en la electroporación de los fibroblastos en cultivo. De igual modo, siguiendo las instrucciones de Dra. Eileen White, tanto el plásmido pCMVE1A como pCMV53DD se linearizaron por separado utilizando la enzima de restricción Sca-I para la electroporación en las células epiteliales de riñón.

6.5.2.2 Electroporación de los plásmidos

Para generar los MEFs inmortalizados (iMEFs), se seleccionó una placa con fibroblastos de cada genotipo y se tripsinizó para despegar las células y tenerlas en suspensión. Se añadió medio fresco y se recogieron las células de cada placa en un tubo de 15 ml. Se centrifugaron durante 5 minutos a 1200 rpm y el pellet se resuspendió en 700 µl de medio fresco junto con:

- ADN de plásmido pEF321-T linearizado y precipitado
- ADN de plásmido YFP (del inglés, *Yellow Fluorescent Plasmid*), portador de la secuencia codificante de la proteína fluorescente amarilla que se empleó como control de la eficiencia de la electroporación.

En el caso de los BMKs inmortalizados (iBMKs) cada tubo de suspensión de células producto de la digestión de los riñones se centrifugó durante 5 min. a 1200 rpm. Se

6. Material y métodos

realizaron tres alícuotas de 500 µl de cada suspensión de células y se prepararon 3 posibles combinaciones.

- Combinación 1
 - ADN de plásmido pCMVE1A linearizado y precipitado
 - ADN de plásmido pCM53DD linearizado y precipitado
 - ADN de esperma de salmón como transportador de DNA
- Combinación 2
 - ADN de plásmido pCMVE1A linearizado y precipitado
 - ADN de esperma de salmón como transportador de DNA
- Combinación 3
 - ADN de plásmido pCMV53DD linearizado y precipitado
 - ADN de esperma de salmón como transportador de DNA

Se trasladaron las mezclas de las células con los plásmidos a la cubeta de electroporación y se utilizó el electroporador (Biorad) a 0,35 V fijando los parámetros intensidad a 500 amperios y la capacitancia a 960 micro Faradios. Una vez finalizada la electroporación en cada cubeta, se dejaron reposar las células durante 10 minutos a temperatura ambiente y, posteriormente, se pasaron a placas de 10 cm con medio fresco que se mantuvieron en el incubador.

6.5.2.3 Selección de clones

Tras dejar las placas con las células en el incubador durante, al menos, cinco días tras la electroporación, comenzamos a observar en el microscopio la formación de pequeñas colonias o agrupaciones de las mismas. Con ayuda de una punta de pipeta amarilla se trasladaron algunas de estas colonias a placas independientes con la finalidad de desarrollar clones de células generadas a partir de una única célula recombinante precursora (que han incorporado el plásmido), desechar las células que no han incluido el plásmido.

6. Material y métodos

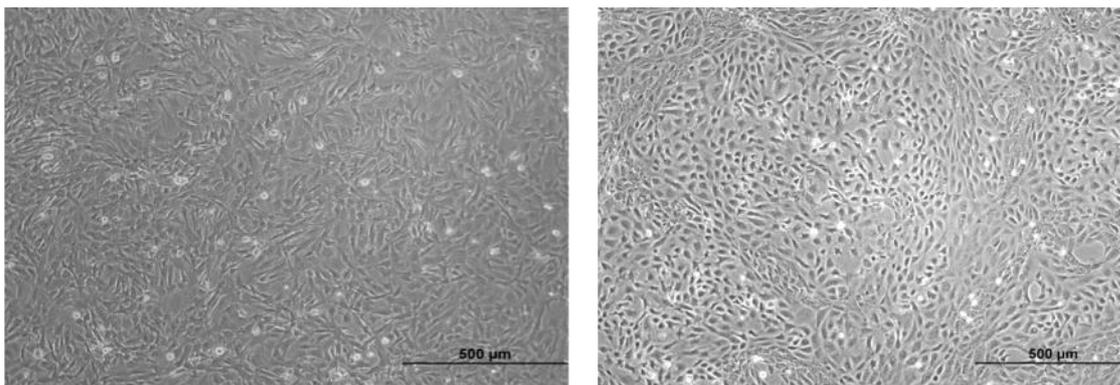


Figura 35. Fotografía de iMEFs e iBMKs. Imagen adquirida en el microscopio de placas de cultivo en monocapa adherida expandidas a partir de un clon inmortalizado de MEF (izquierda) y BMK (derecha). Objetivo 40x.

6.5.3 4-Hidroxitamoxifeno (4-OHT) en cultivo celular

Una vez se constituyó nuestra línea de células inmortalizadas, tanto de iMEFs como iBMKs, se diseñaron los experimentos de cultivo para estudiar el comportamiento de las células en cultivo celular cuando éstas presentan los dos alelos de *SdhD*, un alelo o ningún alelo tras la delección total por adición del metabolito activo del tamoxifeno, el 4-OHT (Sigma, H7904), directamente al medio de cultivo. Para ello se expandieron células de los tres genotipos objeto de estudio de ambas líneas inmortalizadas en placas de 12 pocillos a tres densidades diferentes ($3E+04$, $1E+05$ y $3E+05$ células) con 4 puntos de curso temporal (día 3, 6, 9 y 12) en los que se realizaba el conteo de células viables en presencia o ausencia de 4-OHT.

El 4-OHT se reconstituyó en etanol 96% y se almacenó a -20°C en alícuotas a una concentración final 2mM. Previo a la adición al cultivo, se realizó una dilución 1:100 con medio de cultivo fresco y se añadieron 5 μl por cada 1,5 ml de medio en placas de 12 pocillos siendo la concentración final de 4-OHT en cada pocillo de 66nM. Cada vez que se cumplía el periodo de mantenimiento de las células en los pocillos establecidos en el curso temporal se retiraba el medio de cultivo de cada pocillo y se tripsinizaban las células para poder contarlas y generar curvas de crecimiento (n° de células vivas vs. días de exposición a 4-OHT).

6.6 TÉCNICAS MOLECULARES

6.6.1 Western blot para estudiar inducción de proteínas

6.6.1.1 Extracción de proteínas

Las células se centrifugaron en frío durante 5 min. a 6000 rpm. Se retiraron los sobrenadantes y los pellets se resuspendieron en Buffer de extracción de proteínas.

Buffer de Extracción de Proteínas		
Producto		Concentración Final
Buffer HEN	<i>Hepes pH 7,3</i>	<i>50 mM</i>
	<i>EDTA 0,5 M pH 8</i>	<i>5 mM</i>
	<i>NaCl 2,5 M</i>	<i>250 mM</i>
<i>DTT 0,1M</i>		<i>5 mM</i>
<i>Na3VO4 0,1 M</i>		<i>1 mM</i>
<i>IGEPAL 20%</i>		<i>0,20%</i>
<i>Coktail Inhibidor Proteínas</i>		

Tras una incubación de 5 minutos en hielo, los tubos se centrifugaron a velocidad máxima durante 30 minutos. El sobrenadante resultante se recolectó y se mantuvo a 4°C, para la cuantificación de la concentración de proteína total mediante Bradford (BioRad Protein Assay) siguiendo las instrucciones del fabricante o bien se mantuvieron a -80°C hasta su análisis.

6.6.1.2 Electroforesis en gel de acrilamida y transferencia a membrana de PVDF

Los geles de acrilamida-SDS para proteínas y la transferencia a membranas se hicieron según protocolos estándar. La separación de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida 10% en condiciones desnaturizantes y con un gel empaquetador al 5%, que cumple la función de alinear las proteínas de la muestra antes de ser separadas.

6. Material y métodos

Las muestras se incubaron a 99°C durante 5 minutos una vez diluidas con 3 µl de tampón de carga (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 20% SDS, 10% glicerol, β-mercaptoetanol y azul de bromofenol) y la electroforesis se llevó a cabo a 110 V constantes. Se empleó un marcador de pesos moleculares pre-teñido (Dual Color BioRad). A continuación, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF(6 cm x 8,5 cm) previamente activada en metanol 100% (ECL, GE Healthcare) empleando el dispositivo *Trans blot Turbo* (BioRad) a 65 mV constantes durante 2 horas y media en tampón de transferencia. Después se realizaron dos lavados de las membranas en PBS 1X suplementada con 0,1% Tween 20 (PBTween).

6.6.1.3 Bloqueo e incubación con anticuerpos

Para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo primario, se realizó un bloqueo de la misma en una solución PBTween suplementada con 5% leche desnatada en polvo durante al menos 1 hora y media en agitación y a temperatura ambiente. A continuación, se incubó con el anticuerpo primario correspondiente diluido en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C en agitación. Al día siguiente, tras tres lavados de 5 minutos. a temperatura ambiente con PBTween, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa disuelto en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron tres nuevos lavados de 5 minutos con PBTween a temperatura ambiente.

Anticuerpo primario	Origen	Dilución	Casa comercial	Referencia
HIF1α	conejo	1:500	Cayman	CAY-1006421
HIF2α	conejo	1:500	Abcam	ab199
GLUT-1	conejo	1:800	Millipore	07-1401
β-Actina	ratón	1:5000	Abcam	ab6276
p21	conejo	1:200	Santa Cruz Biotech.	sc397
anti-gammaH2AX	conejo	1:5000	Abcam	ab11174
Anticuerpo secundario	Origen	Dilución	Casa comercial	Referencia
HRP anti-rabbit IgG	cabra	1:10000	Thermo	31460
HRP anti-mouse IgG	oveja	1:10000	ECL	NA931V

6. Material y métodos

6.6.1.4 Revelado de membranas

La detección de la señal se lleva a cabo por quimioluminiscencia (Clarity western ECL substrate, BioRad) en la cámara Image Quant LAS-4000 Mini Gold (GE Healthcare). Los posteriores análisis, así como el tratamiento de la imagen y las cuantificaciones de las bandas, fueron realizados con el programa ImageJ (National Institute of Health).

6.6.1.5 Stripping de membranas

Para reutilizar las membranas e incubarlas con otros anticuerpos, éstas se lavaron 3 veces durante 5 minutos con PBTween y se sumergieron en acetonitrilo durante media hora con agitación. Se volvieron a lavar las membranas en PBTween y se pasaron a solución previamente calentada a 50°C de *stripping* (Tris-HCl 1 M pH 6,7, β-mercaptoetanol y 2% SDS) durante 30 minutos en agitación suave, para eliminar los anticuerpos de la primera incubación. Tras tres lavados con abundante PBTween las membranas se bloquearon nuevamente durante al menos 1 hora para ser incubadas con otro anticuerpo primario.

6.6.2 PCR cuantitativa (RT-qPCR)

Para poder detectar los productos de la amplificación, se empleó el sistema de SYBR-Green, una molécula que se une al ADN de doble cadena, por lo que a medida que la cantidad de producto de PCR aumenta también aumenta la cantidad de moléculas fluorescentes que se unen al ADN bicatenario.

6.6.2.1 PCR cuantitativa para medir niveles de alelo *SdhD^{flox}*

Los núcleos procedentes de los extractos de hígado y riñón se obtuvieron siguiendo el mismo procedimiento mediante el cual se extrajeron las mitocondrias. La extracción de ADN a partir de estos núcleos se realizó incubándolos a 37°C

6. Material y métodos

durante toda la noche en 500 µl de solución de lisis SNET con proteinasa K a 100 µg/ml. Posteriormente, el ADN se precipitó mediante el protocolo convencional con fenol y cloroformo-isoamílico.

Se diseñaron cebadores que flanqueaban la secuencia LoxP (Sdhlox-1 y Sdhlox-2). En el caso de que el gen hubiera sido delecionado, estas parejas de cebadores no serían capaces de amplificar. De esta forma, el nivel de deleción se expresó como caída de los niveles del alelo *SdhD^{lox}* en los ratones mutantes con respecto a los controles. Los resultados se normalizaron al gen *GusB*, que codifica la Beta-glucuronidasa, cuya detección se llevó a cabo con los cebadores LG51 y LG52.

<i>SdhD^{lox}</i>	Sdhlox-1: 5'-CTATGTAGGAGTCTGCAGCCAAGCT-3' Sdhlox-2: 5'-ACTCAAGGTCAGCCTCACCTACCTAT-3'
<i>GusB</i>	LG51: 5'-CATTTCAGTTCTGGATCAGAAACGTA-3' LG52: 5'-CATGAAGTCGGCGAAATTCC-3'

La reacción se efectuó mediante la siguiente mezcla:

5 µl	ADN a 10 ng/µl
5 µl	5 µl de sdhlox-1 a 2 µM o LG51 1 µM
5 µl	5 µl de sdhlox-2 a 2 µM o LG52 1 µM
15 µl	Power SYBR® Green (AppliedBiosystems)

6.6.2.2 PCR cuantitativa para medir niveles de ARN mensajero

La enzima RNasa puede introducirse accidentalmente a la preparación del ARN por un manejo inadecuado en cualquier punto de la extracción. Por ello, todo el proceso que implicó el manejo de ARN se realizó siempre usando guantes desechables libres de polvo, material estéril y puntas de pipetas con filtro.

6.6.2.2.1 **Extracción de ARN**

Para los cultivos celulares, se aspiró el medio de las placas y se añadió 1 ml de Trizol (Reagent® Invitrogen™ Life Technologies) en cada una y se dejó actuar

6. Material y métodos

durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se despegaron las células de las placas con rascadores y se pasaron a un tubo eppendorf. A continuación se añadieron 200µl de cloroformo, se dejó actuar durante 3 minutos y se centrifugaron los tubos durante 15 minutos a 12000 rpm con la centrífuga previamente a temperatura a 4°C. Después de la centrifugación pudimos observar la formación de dos fases, de las cuales recolectamos la fase acuosa que quedó en la parte superior como sobrenadante y se pasó a un tubo eppendorf nuevo. Se añadieron 500µl de isopropanol y se dejó que precipitara el RNA a temperatura ambiente durante 30 min. Transcurrido este tiempo se centrifugaron los tubos durante 10 min. a 12000 rpm con la centrífuga en frío. Se resuspende el pellet de ARN resultante en 1 ml de etanol al 70% en H₂O libre de RNasa y se volvió a centrifugar a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet. Una vez seco se añadieron 50µl de libre de RNasa. La suspensión de ARN se almacenó a -80°C hasta el momento de su cuantificación y uso.

La extracción de ARN a partir de médula adrenal y riñón se llevó a cabo con RNeasy Micro Kit (Quiagen) y homogenizador Politron. Los fragmentos de tejido se sumergieron en un tubo eppendorf con 350µl de solución de homogeneización, compuesta de β-Mercaptoetanol y tiocianato, y se lisaron con ayuda de las cuchillas del Politron previamente lavadas con SDS 0,1%, etanol 70% y H₂O libre de RNasa. El lisado se mezcló con un volumen de etanol 70% y se filtró a través de una columna con membrana de sílica suministrada en el kit mediante centrifugación a velocidad máxima durante 15 segundos. El eluido se descartó y se limpió la membrana centrifugando la columna sólo con etanol quedando el ARN retenido en la membrana. Se realizó tratamiento del ARN retenido en la membrana con DNasa I durante 15 minutos a temperatura ambiente para eliminar los posibles restos de ADN que pudieran contaminar la muestra y se volvió a lavar con etanol. Finalmente, se colocó la columna con la membrana en un nuevo tubo eppendorf y se eluyó el ARN centrifugando a velocidad máxima durante 1 minuto con 14µl de H₂O libre de RNasa. La suspensión de ARN se almacenó a -80°C hasta el momento de su cuantificación y uso.

6. Material y métodos

6.6.2.3 Evaluación de cantidad y pureza del ARN obtenido en Nanodrop™.

La cuantificación de la cantidad de ARN aislado en cada muestra se llevó a cabo midiendo la absorbancia de 1µl del eluido obtenido con el espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific) a una longitud de onda de 260nm para obtener la concentración de la suspensión, teniendo en cuenta que una unidad de A260 equivale a 50µg/ml de ARN. Para la estimación de su pureza también se realizaron lecturas a 280nm y se obtuvo el cociente A_{260}/A_{280} , índice que informa de la pureza del ARN extraído. Valores cercanos a 1,8 – 2 indican una pureza óptima de la muestra.

6.6.2.3.1 Retrotranscripción

La síntesis de ADN complementario (ADNc) se realizó a partir del ARN obtenido y cuantificado previamente utilizando el kit *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Quiagen), que además de la retrotranscriptasa reversa incluye buffer de reacción, y una mezcla de nucleótidos aleatorios optimizada para la síntesis de ADNc a partir del ARN mensajero.

Para un volumen final de 20µl por reacción se añadieron 1µg de ARN total, 4µl de buffer de reacción 1µl de la mezcla de nucleótidos, 1µl de retrotranscriptasa reversa, y H₂O libre de RNasa. También se incluyó un control negativo en cada ciclo de retrotranscripción que constaba de los mismos componentes de reacción excepto de la retrotranscriptasa. Posteriormente se incubó 15 minutos a 42°C y 3 minutos a 95°C. El ADNc resultante se conservó a -20°C hasta su utilización.

6.6.2.3.2 Medición del nivel de ARN mensajero mediante RT-qPCR

Los niveles de expresión de los diferentes genes de interés se determinaron mediante la amplificación de parte de la secuencia del ADNc. Se utilizaron las siguientes combinaciones de cebadores:

6. Material y métodos

<i>SdhD</i>	5'-CCAGCACATTCACCTGTCA-3' 5'-ATCAGCCCCAAGAGCAGAA-3'
<i>Glut1</i>	5'-CCAGCTGGGAATCGTCGTT-3' 5'-CAAGTCTGCATTGCCCATGAT-3'
<i>Vegf</i>	5'-CGCAAGAAATCCCGGTTTAA-3' 5'-CAAATGCTTTCTCCGCTCTGA-3'
<i>Phd3</i>	5'-CAGACCGCAGGAATCCACAT-3' 5'-CATCGAAGTACCAGACAGTCATAGC-3'
<i>Cdkn1a</i>	5'-TCCACAGCGATATCCAGACATT-3' 5'-CGGACATCACCAGGATTGG-3'
<i>Arbp</i>	5'-TCCAGGCTTTGGGCATCA-3' 5'-CTTTATCAGCTGCACATCACTCAGA-3'

Las reacciones se efectuaron mediante las siguientes mezclas:

5 µl	ADNc a 10 ng/µl
5 µl	oligo 1 de <i>SdhD</i> , <i>Glut1</i> , <i>Vegf</i> , <i>Phd3</i> , <i>Cdkn1a</i> ó <i>Arbp</i> 1pmol/ µl
5 µl	oligo 2 de <i>SdhD</i> , <i>Glut1</i> , <i>Vegf</i> , <i>Phd3</i> , <i>Cdkn1a</i> ó <i>Arbp</i> 1pmol/ µl
15 µl	Power SYBR® Green (Applied Biosystems)

Los resultados de la amplificación de cada gen se normalizaron a los niveles de ADNc del gen *Arbp*.

6.6.3 Microarray de tejido de ratón

Se realizaron experimentos de microarray de expresión en dos colores de la plataforma de Agilent. La característica principal de esta plataforma es que la hibridación entre ARN de las muestras control y las “muestras problema” es de tipo competitiva ya que ambas muestras son colocadas al mismo tiempo sobre el mismo soporte. Se extrajo ARN total de médula adrenal y riñón siguiendo la metodología anteriormente descrita. Se retro-transcribieron 200 ng de ARN de riñón y 45 ng de ARN de médula adrenal para convertirlo en ARNc y se marcaron con el kit de marcaje de dos colores para Microarray (Two-Color Microarray Low Input Quick Amp Labeling Kit; Agilent Technologies). Las muestras procedentes de 8 animales silvestres +/+ se mezclaron, se marcaron con cianina 3-CTP (Cy3) y

6. Material y métodos

fueron consideradas como las muestras de referencia. Por otro lado, se mezclaron las muestras procedentes de 8 animales +/- y 8 animales SDHD-ESR, se marcaron con cianina 5-CTP (Cy5) y fueron consideradas como las muestras experimentales. Los ARNc marcados se hibridaron con los soportes de oligonucleótidos del Microarray (oligonucleotide microarray slides Mouse GE 4x44k V2; Agilent Technologies). Tras la hibridación, la intensidad es detectada y cuantificada por un escáner. Con los datos numéricos de las intensidades, el software del escáner es capaz de generar la imagen del microarray y los datos de los perfiles de expresión de las muestras. Estos datos son normalizados para eliminar al máximo cualquier tipo de variación de causa experimental. Posteriormente, el tratamiento estadístico de los datos permite asignar a cada muestra un valor probabilístico referente a la variación observada entre los valores de muestras control experimental (Fig.39).

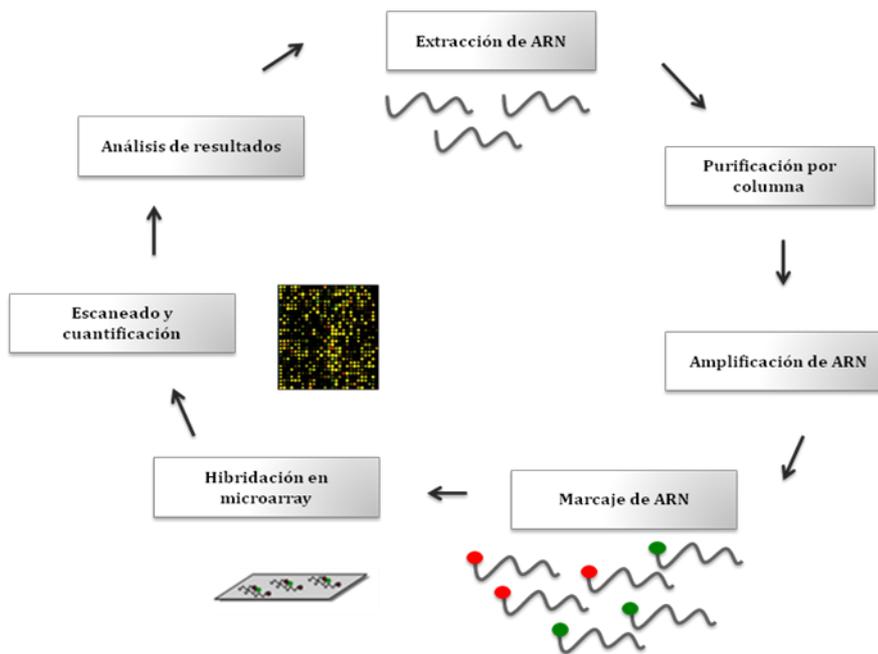


Figura 36. Microarray de hibridación de dos colores. Esquema de las diferentes fases del proceso.

6.6.3.1 Análisis de datos

Los Microarrays se escanearon en un lector GenePix® aplicando unas longitudes de onda de 635nm y 532nm para Cy3 y Cy5 respectivamente. Los datos obtenidos se analizaron con el software gratuito Multi-Experiment Viewer y los análisis

6. Material y métodos

funcionales posteriores se realizaron a través del software on-line Pathways Analysis (Ingenuity Systems®, www.ingenuity.com).

6.7 ESTUDIO CITOMÉTRICO DE TEJIDOS DE RATÓN

6.7.1 Extracción de células

6.7.1.1 Extracción de células de médula ósea de fémures y tibias

Una vez sacrificado el animal por dislocación cervical o mediante dosis letales de anestésico (Tiobarbital Braun 0,5G; 150 µl para un animal de 25 gr) se accedió a los huesos de las patas traseras con material quirúrgico. Los huesos se extrajeron y se sumergieron en RPMI antes de terminar de limpiarlos con una gasa para eliminar restos de fibras, tendones y músculos. Se introdujo RPMI a presión por el canal medular de los huesos usando agujas de 25G (0,5 x 16mm). La solución celular resultante se hizo pasar a través de filtros de 40µm de poro y se realizó un lavado de las células con PBS centrifugando durante 5 minutos a 1200 rpm.

6.7.1.2 Extracción de células de bazo

Una vez sacrificado el animal por dislocación cervical o mediante dosis letales de anestésico, se accedió al bazo mediante una incisión abdominal lateral con material quirúrgico. Los bazos se extrajeron y se sumergieron en RPMI. La extracción de células se realizó a través de fricción con portas esmerilados humedecidos con RPMI. La solución celular resultante se hizo pasar a través de filtros de 40µm de poro y se realizó un lavado de las células con PBS centrifugando durante 5 minutos a 1200 rpm.

6.7.1.3 Extracción de sangre periférica para citometría

Para ello, en el momento del sacrificio de los animales se extrajo sangre periférica mediante punción cardiaca con una jeringa acoplada a una aguja previamente

6. Material y métodos

heparinizada. Previamente al marcaje con anticuerpos monoclonales específicos empleados para la citometría, la sangre se lisó para eliminar los glóbulos rojos de la muestra empleando una solución de lisis que mantiene intactos a los leucocitos (Lysis Solution; Becton Dickinson cat. 349202).

6.7.2 Citometría de flujo

Una vez obtenidas las suspensiones de células de cada tejido diluidas en PBS (excepto la sangre periférica, que no se diluye) se distribuyen en tubos de citometría para proceder al marcaje de superficie con anticuerpos monoclonales. En esta distribución se tuvo en consideración que para los estudios de viabilidad, células mieloides, linfoides, granulocitos-macrófagos y maduración eritroide se adquirirían 100, 000 células por tubo, y que para los estudios de HSC se requería adquirir 3,500,000 de células de una selección previa de un 3% aproximado sobre el total de células presentes en el tubo, por lo que el volumen de células depositado en los tubos destinados al marcaje de los anticuerpos para HSC fue mayor.

6.7.2.1 Marcaje de citometría para sangre periférica

Estudio	Antígeno	Dye	Cantidad (µl/tubo)	Referencia	Casa Comercial
Población linfocitaria y células B	CD4	FITC	5	731999	Beckman Coulter
	B220	PE	1	553089	BD Pharmigen
	CD3	PerCP.Cy5	5	551163	BD Pharmigen
	CD45	APC	3	559864	BD Pharmigen
Población macrófagos-granulocitos	CD4	FITC	5	731999	Beckman Coulter
	CD11b	PE	5	733270	Beckman Coulter
	CD3	PerCP.Cy5	5	551163	BD Pharmigen
	CD45	APC	3	559864	BD Pharmigen

6.7.2.2 Marcaje de citometría para médula ósea

Estudio	Antígeno	Dye	Cantidad (µl/tubo)	Referencia	Casa Comercial
Población linfocitaria y células B	CD4	FITC	5	731999	Beckman Coulter
	B220	PE	1	553089	BD Pharmigen
	CD3	PerCP.Cy5	5	551163	BD Pharmigen
	CD45	APC	3	559864	BD Pharmigen

6. Material y métodos

Población macrófagos-granulocitos	CD4	FITC	5	731999	Beckman Coulter
	CD11b	PE	5	733270	Beckman Coulter
	CD3	PerCP.Cy5	5	551163	BD Pharmigen
	CD45	APC	3	559864	BD Pharmigen
Viabilidad	CD4	FITC	5	731999	Beckman Coulter
	ANEX	PE	5	559763	BD Pharmigen
	7AAD	auto	5	559763	BD Pharmigen
	CD45	APC	3	559864	BD Pharmigen
HSC	Lin	FITC	5 (del mix)		
	<i>CD3</i>	<i>FITC</i>	<i>5 µl/mix</i>	<i>11-0031-82</i>	<i>eBioscience</i>
	<i>CD4</i>	<i>FITC</i>	<i>5 µl/mix</i>	<i>130308</i>	<i>BDPharmigen/Biolegend</i>
	<i>CD8</i>	<i>FITC</i>	<i>5 µl/mix</i>	<i>553031</i>	<i>BD Pharmigen</i>
	<i>B220</i>	<i>FITC</i>	<i>5 µl/mix</i>	<i>553088</i>	<i>BD Pharmigen</i>
	<i>Mac1</i>	<i>FITC</i>	<i>5 µl/mix</i>	<i>11-0112-85</i>	<i>eBioscience</i>
	<i>Gr1</i>	<i>FITC</i>	<i>5 µl/mix</i>	<i>11-5931-85</i>	<i>eBioscience</i>
	<i>Ter119</i>	<i>FITC</i>	<i>5 µl/mix</i>	<i>557915</i>	<i>BD Pharmigen</i>
	<i>Fc3Rα</i>	<i>FITC</i>	<i>5 µl/mix</i>	<i>11-5898-85</i>	<i>eBioscience</i>
	<i>CD11c</i>	<i>FITC</i>	<i>5 µl/mix</i>	<i>11-0114-81</i>	<i>eBioscience</i>
	CD1632	PE	1,25	732123	Beckman Coulter
	c-Kit	PerCP.Cy5	1,25	105824	Biolegend
	CD34	(efluor) APC	1,25	50-0341-82	eBioscience
Sca-I	PE.Cy7	1,25	25-5981-82	eBioscience	
Maduración eritroide	Ter119	FITC	1	557915	BD Pharmigen
	CD71	PE	1	553267	BD Pharmigen
	CD45	APC	3	559864	BD Pharmigen

6.7.2.3 Procedimiento de marcaje

Una vez añadidos los anticuerpos a la suspensión de células se dejó incubar durante 30 min. a temperatura ambiente en oscuridad, excepto el tubo de HSC que se incubó durante 2 horas aproximadamente. Tras las incubaciones se añadió 1 ml de PBS y se centrifugó durante 5 minutos a 1200 rpm. Los pellets obtenidos se resuspendieron en 300 µl de PBS y se mantuvieron a temperatura ambiente en oscuridad hasta el momento de la adquisición en el citómetro. Este procedimiento presentaba dos excepciones:

- En los tubos de sangre periférica, una vez concluida la incubación con los anticuerpos se procedía a la lisis previamente descrita.
- En los tubos de viabilidad, los anticuerpos correspondientes a la Anexina V y la 7AAD se añadían 15 minutos antes de proceder a la adquisición en el citómetro. Por lo tanto, una vez terminada la incubación con los anticuerpos

6. Material y métodos

CD4 y CD45 se centrifugaban las células y se resuspendían en 100 µl de Binding Buffer 1x.

6.8 TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS EN ANIMALES RECEPTORES

Para poder llevar a cabo los estudios sobre la capacidad de repoblación de las HSC procedentes de las médulas óseas de animales SDHD-ESR, se diseñaron diferentes grupos de animales experimentales +/+ , +/- y SDHD-ESR, que fueron tratados con tamoxifeno en las mismas condiciones hasta ahora establecidas. Tras tres semanas, los animales se sacrificaron y se extrajo la médula ósea de fémures y tibias en condiciones de esterilidad. Este mismo día, los animales NSG se sometieron a una única dosis subletal de irradiación (1 sola sesión de 300 cGy) para poder deplecionar la posible respuesta autoinmune generada ante la médula ósea procedentes de los animales SDHD-ESR debido a la presencia de células T reactivas remanentes en los animales hospedadores y se trasplantaron 5×10^6 células en un volumen final de 200 µl de medio de cultivo RPMI (25×10^6 células/ml) a través de la vena de la cola. A partir del momento del trasplante se realizó un seguimiento del estado de los animales y se establecieron 2 puntos temporales de sacrificio: 8 días post-trasplante y 20 días post-trasplante.

Para realizar el recuento de precursores hematopoyéticos procedentes de animales SDHD-ESR con capacidad formadora de colonias se realizó el mismo procedimiento experimental llevado a cabo para trasplantar la médula ósea en animales NSG, siendo en esta ocasión 100,000 las células trasplantadas. Horas antes del trasplante los animales hospedadores, ratones de la cepa C57/Bl6, fueron sometidos a irradiación subletal (1 dosis 1020 cGy) para más tarde introducirles la suspensión de células procedentes de las médulas óseas de los animales SDHD-ESR a través de la vena de la cola. 10 días después del momento del trasplante los animales eran sacrificados para extraer los bazo, que se sumergían en Solución de Bouin (SB) durante 24 horas. La SB es un fijador compuesto de ácido pícrico, ácido acético y formaldehído en una solución acuosa, ampliamente utilizado en

6. *Material y métodos*

histología, que tiñe las colonias del bazo de color amarillo facilitando la tarea del conteo.

6.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En caso de comparación de dos grupos, si los datos seguían una distribución normal, la significación estadística se obtuvo mediante la Prueba T con test de Levene para la homogeneidad de varianzas. Para comparaciones múltiples se realizó un test ANOVA. Cuando las distribuciones no fueron normales, la significación estadística se obtuvo mediante el test no paramétrico U-Mann Witney.

7. BIBLIOGRAFIA

7 BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, T., and Dutta, A. 2009. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature reviews* ;9(6):400-14.
- Ackrell, B. A. 2002. Cytopathies involving mitochondrial complex II. *Mol. Aspects Med.* 23:369–384.
- Adam, J., Hatipoglu, E., O'Flaherty, L., Ternette, N., Sahgal, N., Lockstone, H., Baban, D., Nye, E., Stamp, G.W., Wolhuter, K., et al. 2013. Renal cyst formation in Fh1-deficient mice is independent of the Hif/Phd pathway: roles for fumarate in KEAP1 succination and Nrf2 signaling. *Cancer cell* 20, 524-537.
- Aggerholm, A., Holm, M. S., Guldberg, P., Olesen, L. H. and Hokland, P. 2006. Promoter hypermethylation of p15INK4B, HIC1, CDH1, and ER is frequent in myelodysplastic syndrome and predicts poor prognosis in early-stage patients. *Eur. J. Haematol.*76, 23-32.
- Albitar, M. 2001. Angiogenesis in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Acta Haemat*;106(4):170-6.
- Ali, SH., and DeCaprio, JA. 2001. Cellular transformation by SV40 large T antigen: interaction with host proteins. *Semin Cancer Biol*;11(1):15-23.
- Alirol, E., and Martinou, JC. 2006. Mitochondria and cancer: is there a morphological connection?. *Oncogene*25: 4706–4716.
- Ashrafian, H., O'Flaherty, L., Adam, J., Steeples, V., Chung, Y.L., East, P., Vanharanta, S., Lehtonen, H., Nye, E., Hatipoglu, E., et al. 2010. Expression profiling in progressive stages of fumarate-hydratase deficiency: the contribution of metabolic changes to tumorigenesis. *Cancer research* 70, 9153-9165.
- Astuti, D., Latif, F., Dallol, A., Dahia, P.L., Douglas, F., George, E., Skoldberg, F., Husebye, E.S., Eng, C., and Maher, E.R. 2001. Gene mutations in the succinate dehydrogenase subunit SDHB cause susceptibility to familial pheochromocytoma and to familial paraganglioma. *American journal of human genetics* 69, 49-54
- Bacon, A.L., and Harris, A.L. 2004. Hypoxia-inducible factors and hypoxic cell death in tumour physiology. *Annals of medicine* 36, 530-539.

7. Bibliografía

- Bardella, C., El-Bahrawy, M., Frizzell, N., Adam, J., Ternette, N., Hatipoglu, E., Howarth, K., O'Flaherty, L., Roberts, I., Turner, G., et al. 2011. Aberrant succination of proteins in fumarate hydratase-deficient mice and HLRCC patients is a robust biomarker of mutation status. *The Journal of pathology* 225, 4-11.
- Bayley, J.P., van Minderhout, I., Hogendoorn, P.C., Cornelisse, C.J., van der Wal, A., Prins, F.A., Teppema, L., Dahan, A., Devilee, P., and Taschner, P.E. 2009. Sdhb and SDHD/H19 knockout mice do not develop paraganglioma or pheochromocytoma. *PloS one* 4, e7987.
- Baysal, B. E., R. E. Ferrell, J. E. Willett-Brozick, E. C. Lawrence, D. Myssiorek, A. Bosch, A. van der Mey, P. E. Taschner, W. S. Rubinstein, E. N. Myers, C. W. Richard III, C. J. Cornelisse, P. Devilee, and B. Devlin. 2000. Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene in hereditary paraganglioma. *Science* 287:848-851.
- Baysal, B.E. 2007. A recurrent stop-codon mutation in succinate dehydrogenase subunit B gene in normal peripheral blood and childhood T-cell acute leukemia. *PloS one* 2, e436.
- Baysal, B.E. 2008. Clinical and molecular progress in hereditary paraganglioma. *Journal of medical genetics* 45, 689-694.
- Baysal, B.E. 2013. Mitochondrial complex II and genomic imprinting in inheritance of paraganglioma tumors. *Biochimica et biophysica acta*. 1827, 573-577.
- Berger, G., Hunault-Berger, M., Rachieru, P., Fontenay-Roupie, M., Baranger, L., Ifrah, N., et al. 2001. Increased apoptosis in mononucleated cells but not in CD34+ cells in blastic forms of myelodysplastic syndromes. *Hematol J*, 2:87-96.
- Bernasconi P., Klersy C., Boni M., Cavigliano PM., Calatroni S., Giardini I., Rocca B., Zappatore R., Caresana M., Dambruoso I., Lazzarino M., and Bernasconi C. 2007. World Health Organization classification in combination with cytogenetic markers improves the prognostic stratification of patients with de novo primary myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol.* 137, 193-205.
- Berra, E., Ginouvès, A., and Pouysségur, J. 2006. The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signalling. *EMBO Rep.* Jan;7(1):41-5
- Bonner, WM., Redon, CE., Dickey, JS., Nakamura, AJ., Sedelnikova, OA., Solier, S., et al. 2008. Gamma H2AX and cancer. *Nature reviews*; 8(12):957-67.

7. Bibliografía

- Brenner, C., and Grimm, S. 2006. The permeability transition pore complex in cancer cell death. *Oncogene* 25: 4744–4756.
- Briere, JJ., Favier, J., Benit, P., Ghouzzi, V., Lorenzato, A., et al. 2005. Mitochondrial succinate is instrumental for HIF1 α nuclear translocation in SDHA-mutant fibroblasts under normoxic conditions. *Hum Mol Genet* 14:3263–3269.
- Burnichon, N., Briere, JJ., Libe, R., Vescovo, L., Riviere, J., Tissier, F., Jouanno, E., Jeunemaitre, X., Benit, P., Tzagoloff, A., et al. 2010. SDHA is a tumor suppressor gene causing paraganglioma. *Human molecular genetics* 19, 3011-3020.
- Cairns, R.A., and Mak, T.W. 2013. Oncogenic isocitrate dehydrogenase mutations: mechanisms, models, and clinical opportunities. *Cancer discovery* 3, 730-741.
- Calin, G. A. and Croce, C. M. 2006a. MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale. *Cancer Res.* 66, 7390-7394.
- Calin, G. A. and Croce, C. M. 2006b. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat. Rev. Cancer*; 6, 857-866.
- Carvajal-Carmona, L.G., Alam, N.A., Pollard, P.J., Jones, A.M., Barclay, E., Wortham, N., Pignatelli, M., Freeman, A., Pomplun, S., Ellis, I., et al. 2006. Adult leydig cell tumors of the testis caused by germline fumarate hydratase mutations. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91, 3071-3075.
- Cereghetti, GM., and Scorrano, L. 2006. The many shapes of mitochondrial death. *Oncogene* 25: 4717–4724.
- Cervera, A.M., Bayley, J.P., Devilee, P., and McCreath, K.J. 2009. Inhibition of succinate dehydrogenase dysregulates histone modification in mammalian cells. *Molecular cancer* 8, 89.
- Chatterjee, T., Dixit, A., Mohapatra, M., Tyagi, S., Gupta, PK., Mishra, P., Bhattacharya, M., Karan, AS., Pati, HP., Saxena, R., and Choudhry, VP. 2004. Clinical, haematological and histomorphological profile of adult myelodysplastic syndrome. Study of 96 cases in a single institute. *Eur. J. Haematol.* 73, 93-97.
- Chen, C., Liu, Y., Lu, C., Cross, J.R., Morris, J.P.t., Shroff, A.S., Ward, P.S., Bradner, J.E., Thompson, C., and Lowe, S.W. 2013. Cancer-associated IDH2 mutants drive an acute myeloid leukemia that is susceptible to Brd4 inhibition. *Genes & development* 27, 1974-1985.
- Cheng, WC., Berman, SB., Jonas, EA., Lee, SJ., Chen, Y., Pineda, F. et al. 2006.

7. Bibliografía

- Mitochondrial factors with dual roles in death and survival. *Oncogene*; 25: 4697–4705.
- Cheng, X., Xia, W., Yang, JY., Hsu, JL., Chou, CK., et al. 2010. Activation of p21(CIP1/WAF1) in mammary epithelium accelerates mammary tumorigenesis and promotes lung metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 403: 103–107.
- Dahia, P.L. 2006. Evolving concepts in pheochromocytoma and paraganglioma. *Current opinion in oncology* 18, 1-8.
- Dahia, PL., Ross, KN., Wright, ME., Hayashida, CY., Santagata, S., Barontini, M. et al. 2005. A HIF1 α regulatory loop links hypoxia and mitochondrial signals in pheochromocytomas. *PLoS Genet* 1: 72–80.
- Dang, L., White, D.W., Gross, S., Bennett, B.D., Bittinger, M.A., Driggers, E.M., Fantin, V.R., Jang, H.G., Jin, S., Keenan, M.C., et al. 2009. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 462, 739-744.
- Degenhardt, K., Sundararajan, R., Lindsten, T., Thompson C., and White, E. 2002. Bax and Bak independently promote cytochrome C release from mitochondria. *J Biol Chem* 277: 14127–14134.
- Denko, N.C. 2008. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nature reviews Cancer* 8, 705-713.
- Díaz-Castro, B., Pintado, C.O., Garcia-Flores, P., Lopez-Barneo, J., and Piruat, JI. 2012. Differential impairment of catecholaminergic cell maturation and survival by genetic mitochondrial complex II dysfunction. *Mol Cell Biol* 32: 3347–3357.
- DiMauro, S., and Schon, E.A. 2003. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *The New England journal of medicine* 348, 2656-2668.
- Douwes-Dekker PB, Hogendoorn PC, Kuipers-Dijkshoorn N, Prins FA, van Duinen SG, Taschner PE et al. 2003. *J Pathol* 201: 480–486.
- Elias, H., and Verma, A. 2012. Activation of hypoxia signaling is marker of poor prognosis in myelodysplasia. *Leuk Lymphoma*;53(12):2337-8. doi: 10.3109/10428194.2012.713482.
- Favier, J., and Gimenez-Roqueplo, AP. 2010. Pheochromocytomas: the (pseudo)-hypoxia hypothesis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 24: 957–968. *Genet* 16: 3136–3148.

7. Bibliografía

- Favier, J., Briere, JJ., Burnichon, N., Riviere, J., Vescovo, L., et al. 2009. The Warburg effect is genetically determined in inherited pheochromocytomas. *PLoS One* 4: e7094.
- Figuerola, M.E., Abdel-Wahab, O., Lu, C., Ward, P.S., Patel, J., Shih, A., Li, Y., Bhagwat, N., Vasanthakumar, A., Fernandez, H.F., et al. 2010. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer cell* 18, 553-567.
- Fontenay, M., Cathelin, S., Amiot, M., Gyan, E., and Solary, E. 2006. Mitochondria in hematopoiesis and hematological diseases. *Oncogene* 25: 4757–4767.
- Frezza, C., Zheng, L., Folger, O., Rajagopalan, K., Mackenzie, E., Jerby, L., Micaroni, M., Chaneton, B., Adam, J., Hedley, A., Kalna, G., Tomlinson, I., Pollard, P., Watson, D., Deberardinis, R., and Gottlieb, E. 2011. Haem oxygenase is synthetically lethal with the tumour suppressor fumarate hydratase. *Nature*. 477, 225 -228.
- Ganz, T., and Nemeth, E. 2012. Iron Metabolism: Interactions with Normal and Disordered Erythropoiesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*; 2 (5): a011668.
- Ganz, T., and Nemeth, E. 2012. Iron metabolism: interactions with normal and disordered erythropoiesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.*; 2 (5):a011668. doi: 10.1101/cshperspect.a011668.
- Garcia-Manero, G. 2011. Myelodysplastic syndromes update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*; 86 (6):490–498.
- Gattermann, N., Aul, C. and Schneider, W. 1993. Is acquired idiopathic sideroblastic anemia (AISA) a disorder of mitochondrial DNA?. *Leukemia* 7, 2069-2076.
- Gattermann, N., Retzlaff, S., Wang, YL., Hofhaus, G., Heinisch, J., Aul, C., and Schneider, W. 1997. Heteroplasmic point mutations of mitochondrial DNA affecting subunit I of cytochrome c oxidase in two patients with acquired idiopathic sideroblastic anemia. *Blood*, 90(12):4961–4972.
- Gill, A.J. 2012. Succinate dehydrogenase (SDH) and mitochondrial driven neoplasia. *Pathology* 44, 285-292.
- Gimenez-Roqueplo, AP., Favier, J., Rustin, P., Mourad, JJ., Plouin, PF., Corvol, P., Rotig, A., and Jeunemaitre, X.. 2001. The R22X mutation of the SDHD gene in hereditary paraganglioma abolishes the enzymatic activity of complex II in the mitochondrial respiratory chain and activates the hypoxia pathway. *Am. J.*

7. Bibliografía

- Hum. Genet. 69:1186–1197.
- Gottlieb, E., and Tomlinson, I.P. 2005. Mitochondrial tumor suppressors: a genetic and biochemical update. *Nature reviews Cancer* 5, 857-866.
- Green, DR., and Kroemer, G. 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*; 305: 626–629.
- Greenberg, PL. 1998. Apoptosis and its role in the myelodysplastic syndromes: implications for disease natural history and treatment. *Leuk. Res*: 22, 1123-1136.
- Guzy, R.D., Sharma, B., Bell, E., Chandel, N.S., and Schumacker, P.T. 2008. Loss of the SdhB, but Not the SdhA, subunit of complex II triggers reactive oxygen species-dependent hypoxia-inducible factor activation and tumorigenesis. *Molecular and cellular biology* 28, 718-731.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*; 100,57–70.
- Harada, H., Harada, Y., Tanaka, H., Kimura, A. and Inaba, T. 2003. Implications of somatic mutations in the AML1 gene in radiation-associated and therapy-related myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia. *Blood*; 101, 673-680.
- Hayashi, S. and McMahon, AP. 2002. Efficient Recombination in Diverse Tissues by a Tamoxifen-Inducible Form of Cre: A Tool for Temporally Regulated Gene Activation/Inactivation in the Mouse. *Developmental Biology* 244,305–318.
- Hayashi, S., and McMahon, AP. 2002. Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Dev Biol.*; 244 (2):305-18.
- Hederstedt, L. 2003. Structural biology. Complex II is complex too. *Science (New York, NY)* 299, 671-672.
- Hensen, E.F., Jordanova, E.S., van Minderhout, I.J., Hogendoorn, P.C., Taschner, P.E., van der Mey, A.G., Devilee, P., and Cornelisse, C.J. 2004. Somatic loss of maternal chromosome 11 causes parent-of-origin-dependent inheritance in SDHD-linked paraganglioma and pheochromocytoma families. *Oncogene* 23, 4076-4083.
- Herman, J. G. & Baylin, S. B. 2003. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N. Engl. J. Med.* 349, 2042-2054.
- Hewitson, K.S., Lienard, B.M., McDonough, M.A., Clifton, I.J., Butler, D., Soares, A.S.,

7. Bibliografía

- Oldham, N.J., McNeill, L.A., and Schofield, C.J. 2007. Structural and mechanistic studies on the inhibition of the hypoxia-inducible transcription factor hydroxylases by tricarboxylic acid cycle intermediates. *The Journal of biological chemistry* 282, 3293-3301.
- Hopfer, O., Nolte, F., Mossner, M., Komor, M., Kmetsch, A., Benslasfer, O., Reissmann, M., Nowak, D., Hoelzer, D., Thiel, E., and Hofmann, WK. 2012. Epigenetic dysregulation of GATA1 is involved in myelodysplastic syndromes dyserythropoiesis. *Eur. J. Haematol.* 88, 144-153.
- Huckabee, WE (1961). Hyperlactatemia. *Am J Med*; 30:833-8.
- Isaacs, J.S., Jung, Y.J., Mole, D.R., Lee, S., Torres-Cabala, C., Chung, Y.L., Merino, M., Trepel, J., Zbar, B., Toro, J., et al. 2005. HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: novel role of fumarate in regulation of HIF stability. *Cancer cell* 8, 143-153.
- Ishii, T., Miyazawa, M., Onodera, A., Yasuda, K., Kawabe, N., Kirinashizawa, M., Yoshimura, S., Maruyama, N., Hartman, P.S., and Ishii, N. 2011. Mitochondrial reactive oxygen species generation by the SDHC V69E mutation causes low birth weight and neonatal growth retardation. *Mitochondrion* 11, 155-165.
- Ishii, T., Yasuda, K., Akatsuka, A., Hino, O., Hartman, P.S., and Ishii, N. 2005. A mutation in the SDHC gene of complex II increases oxidative stress, resulting in apoptosis and tumorigenesis. *Cancer research* 65, 203-209.
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S., and Kaelin, W.G., Jr. 2001. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science (New York, NY)* 292, 464-468.
- Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., von Kriegsheim, A., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., et al. 2001. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292, 468-472.
- Kang SM., Choi JW., Hong SH., and Lee, HJ. 2013. Up-Regulation of microRNA Strands by Their Target Transcripts. *Int J Mol Sci.* 14(7):13231-40.
- Kats, L., Reschke M., Taulli, R., Pozdnyakova, O., Burgess, K., Bhargava, P., Straley, K., Karnik, R., Meissner, A., Small, D., et al. 2014. Proto-Oncogenic Role of Mutant IDH2 in Leukemia Initiation and Maintenance. *Cell Stem Cell* 14, 329-

7. Bibliografía

341.

- Kim, DW., Uetsuki, T., Kaziro, Y., Yamaguchi, N., and Sugano, S. 1990. Use of the human elongation factor 1oc promoter as a versatile and efficient expression system. *Gene*, 91; 217-223.
- Kim, W., and Liao, L.M. 2012. IDH mutations in human glioma. *Neurosurgery clinics of North America* 23, 471-480.
- King, A., Selak, M., and Gottlieb, E. 2006. Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer. *Oncogene* 25, 4675–4682.
- Kiuru, M., and Launonen, V. 2004. Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer (HLRCC). *Current molecular medicine* 4, 869-875.
- Kogan, SC., Ward, JM., Anver, MR., Berman, JJ., Brayton, C., Cardiff, RD., et al. 2002. Hematopathology subcommittee of the Mouse Models of Human Cancers Consortium. Bethesda proposals for classification of nonlymphoid hematopoietic neoplasms in mice. *Blood*; 100 (1):238-45.
- Koivunen, P., Hirsila, M., Remes, A.M., Hassinen, I.E., Kivirikko, K.I., and Myllyharju, J. 2007. Inhibition of hypoxia-inducible factor (HIF) hydroxylases by citric acid cycle intermediates: possible links between cell metabolism and stabilization of HIF. *The Journal of biological chemistry* 282, 4524-4532.
- Korpershoek, E., Favier, J., Gaal, J., Burnichon, N., van Gessel, B., Oudijk, L., Badoual, C., Gadessaud, N., Venisse, A., Bayley, J.P., et al. 2012. SDHA immunohistochemistry detects germline SDHA gene mutations in apparently sporadic paragangliomas and pheochromocytomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 96, E1472-1476.
- Lehtonen, H.J. 2011. Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer: update on clinical and molecular characteristics. *Familial cancer* 10, 397-411.
- Letouzé, E., Martinelli, C., Lorient, C., Burnichon, N., Abermil, N., Ottolenghi, C., Janin, M., Menara, M., Nguyen, A., Benit, et al. 2013. SDH Mutations Establish a Hypermethylator Phenotype in Paraganglioma. *Cancer Cell* 23, 739–752.
- Linnartz, B., Anglmayer, R., and Zanssen, S. 2004. Comprehensive scanning of somatic mitochondrial DNA alterations in acute leukemia developing from myelodysplastic syndromes. *Cancer Res*, 64(6):1966–1971.
- Lopez-Jimenez, E., Gomez-Lopez, G., Leandro-Garcia, L.J., Munoz, I., Schiavi, F., et al.

7. Bibliografía

2010. Research resource: Transcriptional profiling reveals different pseudohypoxic signatures in SDHB and VHL-related pheochromocytomas. *Mol Endocrinol* ; 24: 2382–2391.
- Malinoc, A., Sullivan, M., Wiech, T., Kurt Werner, S., Jilg, C., Straeter, J., Deger, S., Hoffmann, M.M., Bosse, A., Rasp, G., et al. 2012. Biallelic inactivation of the SDHC gene in renal carcinoma associated with paraganglioma syndrome type 3. *Endocrine-related cancer* 19, 283-290.
- Mathew, R., Degenhardt, K., Haramaty, L., Karp, CM., and White, E. 2008. Immortalized mouse epithelial cell models to study the role of apoptosis in cancer. *Methods Enzymol.*, 446:77-106.
- Matthes, TW., Meyer, G., Samii, K., Beris, P. 2000. Increased apoptosis in acquired sideroblastic anaemia. *Br J Haematol*, 111:843–852.
- Maxwell, P.H. 2005. Hypoxia-inducible factor as a physiological regulator. *Experimental physiology* 90, 791-797.
- Merlo, A., de Quiros, SB., Secades, P., Zambrano, I., Balbin, M., et al. 2012. Identification of a signaling axis HIF-1 α /microRNA-210/ISCU independent of SDH mutation that defines a subgroup of head and neck paragangliomas. *J Clin Endocrinol Metab* 97: E2194–2200.
- Millan-Ucles, A., Diaz-Castro, B., Garcia-Flores, P., Baez, A., Perez-Simon, J.A., Lopez-Barneo, J., and Piruat, J.I. 2014. A conditional mouse mutant in the tumor suppressor SdhD gene unveils a link between p21(WAF1/Cip1) induction and mitochondrial dysfunction. *PloS one* 9, e85528.
- Moll, UM., Marchenko, N., Zhang, XK. 2006. p53 and Nur77/TR3 - transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction. *Oncogene* 25:4725–4743.
- Moraleda, JM., Blanquer, M., Bleda, P., Iniesta, P., Ruiz, FM., Bonilla, S., Cabanes C., Tabares, L., and Martinez, S. 2006. Adult stem cell therapy. Dream or reality? *Transplant Immunology*; 17:74-77.
- Nakamaki, T., Bartram, C., Seriu, T., Kahan, J., Fukuchi, K., Tsuruoka, N., Janssen, JW., Miller, CW., and Koeffler, HP. 1997. Molecular analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor genes, p15, p16, p18 and p19 in the myelodysplastic syndromes. *Leuk. Res.* 21, 235-240.
- Niemann, S., and Muller, U. 2000. Mutations in SDHC cause autosomal dominant

7. Bibliografía

- paraganglioma, type 3. *Nature genetics* 26, 268-270.
- Nimer, SD. 2008. Myelodysplastic syndromes. *Blood* 111, 4841-4851.
- Oudijk, L., Gaal, J., Korpershoek, E., van Nederveen, F.H., Kelly, L., Schiavon, G., Verweij, J., Mathijssen, R.H., den Bakker, M.A., Oldenburg, R.A., et al. 2013. SDHA mutations in adult and pediatric wild-type gastrointestinal stromal tumors. *Mod Pathol* 26, 456-463.
- Papathomas, TG., de Krijger, RR., and Tischler, AS. 2013. Paragangliomas: update on differential diagnostic considerations, composite tumors, and recent genetic developments. *Seminars in diagnostic pathology* 30, 207-223.
- Parker, JE., Mufti, GJ., Rasool, F., Mijovic, A., Devereux, S., and Pagliuca, A. 2000. The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS. *Blood*, 96(12):3932-8.
- Parmar, K., Mauch, P., Vergilio, JA., Sackstein, R., and Down, JD. 2007. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA*; 104:5431-6.
- Petit, PX., Zamzami, N., Vayssière, JL., Mignotte, B., Kroemer, G., and Castedo, M. 1997. Implication of mitochondria in apoptosis. *Mol Cell Biochem*, 174(1-2).
- Picaud, S., Kavanagh, K.L., Yue, W.W., Lee, W.H., Muller-Knapp, S., Gileadi, O., Sacchettini, J., and Oppermann, U. 2011. Structural basis of fumarate hydratase deficiency. *Journal of inherited metabolic disease* 34, 671-676.
- Piruat, JI., Pintado, CO., Ortega-Saenz, P., Roche, M., and Lopez-Barneo, J. 2004. The mitochondrial SDHD gene is required for early embryogenesis, and its partial deficiency results in persistent carotid body glomus cell activation with full responsiveness to hypoxia. *Mol Cell Biol* 24, 10933-10940.
- Platero-Luengo, A., González-Granero, S., Durán, R., Díaz-Castro, B., Piruat, JI., García-Verdugo, JM., Pardal, R., and López-Barneo, J. (2014). An O₂-sensitive glomus cell-stem cell synapse induces carotid body growth in chronic hypoxia. *Cell* 156, 291-303.
- Pollard, PJ., Briere, JJ., Alam, NA., Barwell, J., Barclay, E., Wortham, NC., Hunt, T., Mitchell, M., Olpin, S., Moat, SJ., et al. 2005. Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1 α in tumours which result from germline FH and SDH mutations. *Human molecular genetics* 14, 2231-2239.

7. Bibliografía

- Pollard, PJ., Spencer-Dene, B., Shukla, D., Howarth, K., Nye, E., El-Bahrawy, M., Deheragoda, M., Joannou, M., McDonald, S., Martin, A., et al. 2007. Targeted inactivation of fh1 causes proliferative renal cyst development and activation of the hypoxia pathway. *Cancer cell*; 11, 311-319.
- Quesnel, B., Guillerm, G., Vereecque, R., Wattel, E., Preudhomme, C., Bauters, F., Vanrumbeke, M., and Fenaux, P. 1998. Methylation of the p15(INK4b) gene in myelodysplastic syndromes is frequent and acquired during disease progression. *Blood* 91, 2985-2990.
- Rakheja, D., Konoplev, S., Medeiros, LJ., and Chen, W. 2012. IDH mutations in acute myeloid leukemia. *Human pathology* 43, 1541-1551.
- Raza, A., Gezer, S., Mundle, S., Gao, XZ., Alvi, S., Borok, R., Rifkin, S., Iftikhar, A., Shetty, V., Parcharidou, A., et al. 1995a. Apoptosis in bone marrow biopsy samples involving stromal and hematopoietic cells in 50 patients with myelodysplastic syndromes. *Blood* 86, 268-276 .
- Raza, A., Gezer, S., Mundle, S., Gao, XZ., Alvi, S., Borok, R., Rifkin, S., Iftikhr, A., Shetty, V., Parcharidou, A., et al. 1995. Apoptosis in bone marrow biopsy samples involving stromal and hematopoietic cells in 50 patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*;86(1):268-76.
- Raza, A., Mundle, S., Iftikhar, A., Gregory, S., Marcus, B., Khan, Z., Alvi, S., Shetty, V., Dameron, S., Wright, V., et al. 1995b. Simultaneous assessment of cell kinetics and programmed cell death in bone marrow biopsies of myelodysplastics reveals extensive apoptosis as the probable basis for ineffective hematopoiesis. *Am J Hematol*; 48(3):143-54.
- Reddy, PL., Shetty, VT., Dutt, D., York, A., Dar, S., Mundle, SD., et al. 2002. Increased incidence of mitochondrial cytochrome c-oxidase gene mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 116(3): 564–575.
- Rehn, M., Olsson, A., Reckzeh, K., Diffner, E., Carmeliet, P., Landberg, G., et al. 2011. Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor regulates murine hematopoietic stem cell function in the low oxygenic niche. *Blood*;118:1534–43.
- Ricketts, CJ., Shuch, B., Vocke, CD., Metwalli, AR., Bratslavsky, G., Middelton, L., Yang, Y., Wei, MH., Pautler, SE., Peterson, J., et al. 2012. Succinate dehydrogenase kidney cancer: an aggressive example of the Warburg effect in cancer. *The Journal of urology*; 188, 2063-2071.

7. Bibliografía

- Rochman, Y., Spolski, R., and Leonard, WJ. 2009. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nat Rev Immunol*; (7): 480-90.
- Romanov, VS., Pospelov, VA., and Pospelova, TV. 2012. Cyclin-dependent kinaseinhibitor p21(Waf1): contemporary view on its role in senescence andoncogenesis. *Biochemistry* 77: 575–584.
- Rose, NR., McDonough, MA., King, ON., Kawamura, A., and Schofield, CJ. 2011. Inhibition of 2-oxoglutarate dependent oxygenases. *Chemical Society reviews* 40, 4364-4397.
- Rotig, A., Bourgeron, T., Chretien, D., Rustin, P., and Munnich, A. 1995. Spectrum of mitochondrial DNA rearrangements in the Pearsonmarrow-pancreas syndrome. *Hum Mol Genet*, 4:1327–1330.
- Rotig, A., Colonna, M., Bonnefont, JP., et al. 1989. Mitochondrial DNA deletion in Pearson’s marrow/pancreas syndrome. *Lancet*, 1:902–903.
- Rustin, P., A. Munnich, and A. Rotig. 2002. Succinate dehydrogenase and human diseases: new insights into a well-known enzyme. *Eur. J. Hum. Genet.*10: 289–291.
- Rustin, P., and A. Rotig. 2002. Inborn errors of complex II. Unusual human mitochondrial diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1553:117–122.
- Sasaki, M., Knobbe, CB., Itsumi, M., Elia, A.J., Harris, I.S., Chio, II, Cairns, RA., McCracken, S., Wakeham, A., Haight, J., et al. 2012a. D-2-hydroxyglutarate produced by mutant IDH1 perturbs collagen maturation and basement membrane function. *Genes & development* 26, 2038-2049.
- Sasaki, M., Knobbe, CB., Munger, JC., Lind, E.F., Brenner, D., Brustle, A., Harris, IS., Holmes, R., Wakeham, A., Haight, J., et al. 2012b. IDH1(R132H) mutation increases murine haematopoietic progenitors and alters epigenetics. *Nature* 488, 656-659.
- Savic, A., Cemerikic-Martinovic, V., Dovat, S., Rajic, N., Urosevic, I., Sekulic, B., Kvrjic, V., Popovic, S. 2012. Angiogenesis and survival in patients with myelodysplastic syndrome. *Pathol Oncol Res*; 18(3): 681-90. doi: 10.1007/s12253-012-9495-y.
- Schapira, AH. 2012. Mitochondrial diseases. *Lancet*, 12(379): 1825–1834 .
- Schildgen, V., Wulfert, M., and Gattermann, N. 2011. Impaired mitochondrial gene transcription in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with

7. Bibliografía

- myelodysplasia-related changes. *Experimental Hematology* 39:666–675.
- Selak, M.A., Armour, S.M., MacKenzie, E.D., Boulahbel, H., Watson, D.G., Mansfield, K.D., Pan, Y., Simon, M.C., Thompson, C.B., and Gottlieb, E. 2005. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer cell* 7, 77-85.
- Semenza, G.L., Roth, P.H., Fang, H.M., and Wang, G.L. 1994. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *The Journal of biological chemistry* 269, 23757-23763.
- Shaulian, E., Zauberman, A., Ginsberg, D., and Oren, M. 1992. Identification of a minimal transforming domain of p53: Negativedominance through abrogation of sequence-specific DNA binding. *Mol. Cell Biol.*12,5581–5592.
- Slane BG., Aykin-Burns N., Smith BJ., Kalen AL., Goswami PC., Domann FE. and Spitz DR. 2006. Mutation of succinate dehydrogenase subunit C results in increased O₂·, oxidative stress, and genomic instability. *Cancer Res.* 66(15):7615-20.
- Smith, BW., Rueter, EM., Becker, NA., Bida, JP., Nelson-Holte, M., et al. 2011. Mouse Models of Human Familial Paraganglioma, Pheochromocytoma - A New View of the Old Problem, Dr. Jose Fernando Martin (Ed.), ISBN: 978-953-307-822-9, InTech. DOI: 10.5772/25346. Available from:<http://www.intechopen.com/books/pheochromocytoma-a-new-view-of-the-old-problem/mouse-models-of-human-familial-paraganglioma>.
- Till, JE., and McCulloch, EA. 1964. Repair processes in irradiated mouse hematopoietic tissue. *Ann N Acad Sci.* ;114:115-25.
- Timmers, HJ., Gimenez-Roqueplo, AP., Mannelli, M., and Pacak, K. 2009. Clinical aspects of SDHx-related pheochromocytoma and paraganglioma. *Endocrine-related cancer* 16, 391-400.
- Tomlinson, IP., Alam, NA., Rowan, AJ., Barclay, E., Jaeger, EE., Kelsell, D., Leigh, I., Gorman, P., Lamlum, H., Rahman, S., et al. 2002. Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nature genetics* 30, 406-410.
- Tong, H., Hu, C., Zhuang, Z., Wang, L., and Jin, J. 2012. Hypoxia-inducible factor-1 α expression indicates poor prognosis in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma.*; 53(12): 2412-8. doi: 10.3109/10428194.2012.696637.
- Uchida, T., Kinoshita, T., Nagai, H., Nakahara, Y., Saito, H., Hotta, T., and Murate, T.

7. Bibliografía

1997. Hypermethylation of the p15INK4B gene in myelodysplastic syndromes. *Blood* 90, 1403-1409.
- Vallespi, T., Imbert, M., Mecucci, C., Preudhomme, C. and Fenaux, P. 1998. Diagnosis, classification, and cytogenetics of myelodysplastic syndromes. *Haematologica*, 83, 258-275.
- van Riel B., and Rosenbauer F. 2014. Epigenetic control of hematopoiesis: the PU.1 chromatin connection. *Biol Chem*. Disponible en: [/j/bchm.ahead-of-print/hsz-2014-0195/hsz-2014-0195.xml](#). doi: 10.1515/hsz-2014-0195. [Epub ahead of print].
- Vanharanta, S., Buchta, M., McWhinney, SR., Virta, SK., Peczkowska, M., Morrison, C.D., Lehtonen, R., Januszewicz, A., Jarvinen, H., Juhola, M., et al. 2004. Early-onset renal cell carcinoma as a novel extraparaganglial component of SDHB-associated heritable paraganglioma. *American journal of human genetics* 74, 153-159.
- Vardiman, JW., Thiele, J., Arber, DA., et al. 2009. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*; 114:937-951.
- Vyas, P., Ault, K., Jackson, CW., Orkin, SH. and Shivdasani, RA. 1999. Consequences of GATA-1 deficiency in megakaryocytes and platelets. *Blood* 93, 2867-2875.
- Walker, NI., Harmon, BV., Gobe, GC. and Kerr, JF. 1998. Patterns of cell death. *Methods Achiev. Exp. Pathol.* 13, 18-54.
- Walter, MJ., Shen, D., Ding, L., Shao, J., Koboldt, DC., Chen, K., Larson, DE., McLellan, MD., Dooling, D., Abbott, R., et al. 2012. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 366, 1090-1098.
- Wang, GL., Jiang, BH., Rue, EA., and Semenza, GL. 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 5510-5514.
- Ward, PS., Patel, J., Wise, DR., Abdel-Wahab, O., Bennett, BD., Collier, HA., Cross, JR., Fantin, VR., Hedvat, CV., Perl, AE., et al. 2010. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer cell* 17, 225-234.
- White, E. 2006. Mechanisms of apoptosis regulation by viral oncogenes in infection

7. Bibliografía

- and tumorigenesis. *Cell Death Differ.* 13, 1371–1377.
- White, E., Cipriani, R., Sabbatini, P., and Denton, A. 1991. Adenovirus E1B 19-kilodalton protein overcomes the cytotoxicity of E1A proteins. *J. Virol.* 65, 2968–2978.
- Wilhelm, J., and A. Pingoud. 2003. Real-time polymerase chain reaction. *ChemBioChem* 4: 1120-1128.
- Williamson, P.J., Oscier, D.G., Bell, A.J. and Hamblin, T.J. 1991. Red cell aplasia in myelodysplastic syndrome. *J. Clin. Pathol.* 44, 431-432.
- Wong, K.F., and So, C.C. 2002. Hypoplastic myelodysplastic syndrome—a clinical, morphologic, or genetic diagnosis?. *Cancer Genet. Cytogenet.* 138, 85-88.
- Wulfert, M., Küpper, A.C., Tapprich, C., Bottomley, S.S., Bowen, D., Germing, U. et al. 2008. Analysis of mitochondrial DNA in 104 patients with myelodysplastic syndromes. *Exp Hematol*, 36(5):577–586 .
- Xekouki, P., Pacak, K., Almeida, M., Wassif, C.A., Rustin, P., Nesterova, M., de la Luz Sierra, M., Matro, J., Ball, E., Azevedo, M., et al. 2012. Succinate dehydrogenase (SDH) D subunit (SDHD) inactivation in a growth-hormone-producing pituitary tumor: a new association for SDH? *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 97, E357-366.
- Xiao, M., Yang, H., Xu, W., Ma, S., Lin, H., Zhu, H., Liu, L., Liu, Y., Yang, C., Xu, Y., et al. 2012. Inhibition of alpha-KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors. *Genes & development* 26, 1326-1338.
- Xu, J. 2005. Preparation, culture, and immortalization of mouse embryonic fibroblasts. *Current Protocols in Molecular Biology*; 28.1.1-28.1.8.
- Xu, W., Yang, H., Liu, Y., Yang, Y., Wang, P., Kim, S.H., Ito, S., Yang, C., Wang, P., Xiao, M.T., et al. 2011. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer cell* 19, 17-30.
- Yan, H., Parsons, D.W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B.A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G.J., et al. 2009. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *The New England journal of medicine* 360, 765-773.
- Yankovskaya, V., Horsefield R., Tornroth, S.; Luna-Chavez, C., Miyoshi, H., Leger, C., Byrne, B., Cecchini, G., and Iwata, S.. 2003. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science* 299:700–704.

7. Bibliografía

- Zamzami, N., Brenner, C., Marzo, I., Susin, SA., and Kroemer, G. 1998. Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene* 16: 2265–2282.
- Zhao, S., Lin, Y., Xu, W., Jiang, W., Zha, Z., Wang, P., Yu, W., Li, Z., Gong, L., Peng, Y., et al. 2009. Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha. *Science*, 324, 261-265.

