



Trabajo de Fin de Grado

**“Impacto del daño en el DNA en la muerte neuronal
isquémica”**

“Impact of DNA damage on ischemic neuronal death”

Enrique Álvarez Coruña

**Grado en Biotecnología
Curso académico 2020-2021**

Tras nueve meses, el paso por el laboratorio llega a su fin. Parece que fuera ayer el día que comencé los experimentos, cuando tenía vergüenza de hablar con la gente del grupo. Tras todo este tiempo, he de decir que he cogido mucho cariño a esta pequeña familia que me ha enseñado muchísimas cosas sobre la ciencia y la vida en general.

En primer lugar, muchísimas gracias a **Ángeles** y **María**, con las que no puedo estar más contento de haber aprendido de ellas. Me habéis prestado toda vuestra atención y dado todas las herramientas necesarias para que en un futuro pueda continuar con este duro pero precioso mundo que es la ciencia.

También tengo que daros las gracias a mi trío calavera: **Leticia** (el quesito de Burgos), **Regina** (mi “prometida”) y **Sonia** (la búfala de Jerez). Sin vosotros nada de esto hubiera sido igual chicas. **Sonia**, las mañanas hablando de nuestros dramas y las tardes en el gimnasio viendo cómo te pones más fuerte que el vinagre me han hecho disfrutar muchísimo, y tengo claro que dentro de unos meses no vas a caber por las puertas del laboratorio. **Regi**, tenemos que ir pensando ya en la boda en Valencia, que si no se nos va a hacer tarde. Amiga, muchísimas gracias por ayudarme siempre que lo necesitaba, personas como tú hay muy pocas y me siento un afortunado de haberte conocido. Por último, muchísimas gracias **Leti** por tu apoyo incondicional. He pasado nueve meses chinchándote mientras tú siempre te preocupabas por mí. Tus intentos fallidos de meterte conmigo, las charlas sobre todo tipo de temas, tus consejos...no hay palabras suficientes para agradecerte todo esto. Volveremos a vernos para tomar una cerveza en el Thiago’s y seguir disfrutando de tus conversaciones de “niña mayor”.

Por último, del que no puedo olvidarme es de mi compañero de poyata, **Jesús**. Gracias por prestarme parte de tu tiempo en ayudarme y sacarme una sonrisa con tus charletas, tus frases y tus poemas con acento andaluz. Eres un grande, dudo que encuentre un compañero que esté a tu nivel.

En definitiva, muchísimas gracias al **laboratorio 2.8**, me habéis hecho pasar muy buenos momentos este año. Ya formáis parte de un cachito de mi corazón y os llevaré siempre presentes allí donde esté.

RESUMEN

En la isquemia cerebral, la interacción entre los radicales libres de oxígeno (ROS), la acumulación de roturas de doble hebra en el DNA (DSBs) y su implicación en la apoptosis neuronal se desconoce. El objetivo fue estudiar el impacto de las DSBs en la muerte neuronal isquémica y el papel del estrés oxidativo en su formación. Utilizamos cultivos neuronales murinos *wild type* y con expresión constitutiva de la catalasa en la mitocondria (mCAT) para controlar los niveles endógenos de ROS, que fueron sometidos a isquemia (incubación en ausencia de oxígeno y glucosa) y 4 horas de reoxigenación. Analizando la expresión proteica y la apoptosis neuronal mediante *western blot*, inmunofluorescencia y citometría de flujo, comprobamos que la isquemia provoca, de manera dependiente del tiempo, la formación de DSBs (incremento de γ H2AX) y la generación de ROS por la mitocondria. Ello culmina en la apoptosis, detectada por los marcadores p53, caspasa-3 activa y AnnexinaV+/7AAD-. Las neuronas mCAT presentan una menor acumulación de DSBs y apoptosis respecto a las *wild type*. Nuestros resultados muestran la importancia del estrés oxidativo en la formación de DSBs involucrada en la apoptosis neuronal causada por isquemia y la terapia antioxidante como posible estrategia neuroprotectora frente el ictus.

ABSTRACT

In cerebral ischemia, the interaction between oxygen free radicals (ROS), the accumulation of double-stranded breaks in DNA (DSBs), and their involvement in neuronal apoptosis is unknown. The objective was to study the impact of DSBs on ischemic neuronal death and the role of oxidative stress in their formation. We used wild type murine neuronal cultures with constitutive expression of catalase in the mitochondria (mCAT) to control endogenous ROS levels, which were subjected to ischemia (incubation in oxygen-glucose deprivation) and reoxygenation for 4 hours. Analysing protein expression and neuronal apoptosis using western blot, immunofluorescence, and flow cytometry, we found that ischemia causes, in a time-dependent manner, the formation of DSBs (increase in γ H2AX) and the generation of ROS by the mitochondria. This culminates in apoptosis, detected by the markers p53, active caspase-3 and AnnexinV +/7AAD-. The mCAT neurons presented a lower accumulation of DSBs and apoptosis compared to wild types. Our results demonstrate the relevance of oxidative stress in the formation of DSBs involved in neuronal apoptosis caused by ischemia and poses antioxidant therapy as a possible neuroprotective strategy against stroke.

ÍNDICE

ABREVIATURAS

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Ictus: concepto e impacto socio sanitario.....	1
1.2. Fisiopatología y muerte celular por isquemia cerebral.....	1
1.3. Especies reactivas de oxígeno en el contexto de la isquemia cerebral.....	2
1.4. Daño en el DNA tras la isquemia cerebral.....	4
1.5. Sistemas de defensa antioxidantes en la célula.....	5
1.6. Muerte neuronal apoptótica.....	6
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	8
2.1. Hipótesis.....	8
2.2. Objetivos:.....	8
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
3.1. Animales de experimentación.....	9
3.2. Cultivo celular.....	10
3.3. Isquemia <i>in vitro</i>	11
3.4. Análisis de la expresión proteica mediante Western Blot.....	11
3.5. Inmunocitoquímica.....	13
3.6. MitoSOX™ mediante citometría de flujo.....	14
3.7. Ensayo TUNEL.....	15
3.8. Determinación de la apoptosis mediante citometría de flujo (kit Anexina V/ APC- 7AAD).....	16
3.9. Análisis de resultados.....	16
4. RESULTADOS.....	17
4.1. La isquemia causa roturas de doble hebra en el DNA que provocan la estabilización de p53 y el incremento de la muerte neuronal apoptótica.....	17
4.2. La OGD provoca una situación de estrés oxidativo celular que se correlaciona con un incremento del proceso apoptótico.....	20
4.3. La expresión constitutiva de catalasa mitocondrial durante el daño isquémico se asocia con un menor número de roturas de doble hebra en el DNA, la reducción de la estabilización de p53 y la disminución de la apoptosis neuronal.....	21
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	26
6. CONCLUSIONES.....	28
7. Bibliografía.....	29

ABREVIATURAS

7AAD: 7-amino-actinomicina D

APC: Aloficocianina

BCA: Ácido bicinónico

BSA: Albúmina sérica bovina

CAT: Catalasa

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

HANK's: Hank's Balanced Salt Solution

MAP2: *Microtubule-Associated Protein 2*

mCAT /*mCAT* Catalasa mitocondrial (proteína/gen)

Nx: Normoxia

O₂⁻: Anión superóxido

OGD: Oxygen-glucose deprivation

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

γH2AX: fosfo-histona H2AX

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SDS: Dodecilsulfato sódico

wt: *wild type* o genotipo silvestre

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Ictus: concepto e impacto sociosanitario

El ictus es un tipo de accidente cerebrovascular caracterizado por la reducción brusca del flujo sanguíneo cerebral que conduce a una disminución del aporte de nutrientes y oxígeno a esta zona del organismo. La privación de oxígeno y metabolitos básicos impide el correcto funcionamiento de la actividad cerebral lo que puede ocasionar la muerte del paciente (Caldeira et al., 2014).

Los ictus se clasifican en dos tipos diferentes según su etiología: isquémicos y hemorrágicos. El ictus isquémico es ocasionado por la obstrucción de vasos sanguíneos que riegan el tejido cerebral a causa de la presencia de coágulos o trombos que ocasionan su taponamiento. El ictus hemorrágico se caracteriza por la rotura de vasos cerebrales que provocan la extravasación de la sangre al tejido cerebral (Nedergaard & Dirnagl, 2005). El primer tipo es más frecuente y engloba el 80-85% del número total de accidentes cerebrovasculares. Sin embargo, los ictus hemorrágicos, a pesar de ser menos frecuentes presentan una mayor gravedad y un mayor índice de mortalidad asociada.

Según datos de la Sociedad Española de Neurología, los ictus constituyen la segunda mayor causa de mortalidad (la primera en mujeres), así como la principal causa de discapacidad funcional adquirida y segunda en demencia en adultos. Cada año se registran 110.000-120.000 casos de ictus, de los cuales más de la mitad genera algún tipo de discapacidad o el fallecimiento del paciente. Debido a la elevada relevancia sociosanitaria de esta patología es fundamental su estudio e investigación para mejorar la situación actual y futura de los pacientes.

1.2. Fisiopatología y muerte celular por isquemia cerebral

La privación de oxígeno y nutrientes al tejido cerebral inicia una serie de cascadas de señalización en las células que puede culminar en la muerte de un gran número de estas. Cuando el suministro sanguíneo se reduce a menos del 20% se originan graves consecuencias en las funciones celulares (Sugawara et al., 2004). Inicialmente, la ausencia de oxígeno produce el agotamiento de los niveles de ATP en pocos minutos, lo que conduce al funcionamiento erróneo de las bombas Na^+/K^+ , disminución del potencial de membrana neuronal y una intensa liberación de glutamato, el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso (Rossi et al., 2000). Posteriormente, el glutamato comienza a acumularse en el espacio extracelular provocando la entrada masiva de Ca^{2+} a las células a través de la activación de los receptores de glutamato NMDA (N-metil-D-aspartato) presentes en la superficie neuronal. El calcio actúa como mensajero secundario y activa un gran número de proteínas

entre las que se encuentran enzimas como la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) asociada a la generación de radicales libres provocando su incremento, calpaínas, fosfolipasas así como diversas quinasas y proteasas que originan una serie de desequilibrios energéticos que culminan en la muerte celular excitotóxica (Almeida et al., 2001). Finalmente, la muerte de las células nerviosas tendrá lugar principalmente por necrosis o apoptosis en función de la intensidad y la duración del estímulo aunque también se han observado otros mecanismos de muerte como autofagia, ferroptosis o fagoptosis (Fricker et al., 2018).

La región más afectada se denomina core o núcleo de la isquemia, que engloba todas aquellas células que dependen estrictamente del vaso sanguíneo afectado y, en ella, todos los tipos celulares mueren prácticamente de forma inmediata mediante necrosis (Puig et al., 2018). Alrededor del núcleo, se encuentra la zona de “penumbra” en la cual existe un riego sanguíneo residual que permite que las células se mantengan metabólicamente activas pero con un funcionamiento anómalo de su acción eléctrica. Estas neuronas, al igual que las del núcleo, sufren alteraciones bioquímicas dañinas, sin embargo, la disponibilidad de ATP permite que la disfunción celular avance de una forma más lenta y que las células mueran de forma regulada principalmente por apoptosis, sin liberar al espacio extracelular contenido interno que origine consecuencias inflamatorias perjudiciales como en el caso de la necrosis (Fricker et al., 2018). A pesar de esto hecho, es posible que las células apoptóticas no se eliminan de forma rápida y acaben muriendo por necrosis desencadenando la inflamación tisular. Es importante destacar la posibilidad de recuperación de la zona de penumbra si se restaura el flujo sanguíneo (Ramos-Cabrer et al., 2011).

A pesar de que esto ocurra, la muerte celular puede producirse incluso días después del accidente. Este hecho ocurre a causa de diversos factores entre los que se encuentra la elevada producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) cuando se restaura el flujo sanguíneo, es decir, en el proceso de reperfusión. El daño a diversos componentes celulares entre los que se encuentra el DNA puede provocar la muerte apoptótica neuronal. A continuación, se detalla el papel de estas moléculas oxidantes en el contexto de la isquemia cerebral, su actuación sobre el DNA y la activación de la cascada apoptótica correspondiente.

1.3. Especies reactivas de oxígeno en el contexto de la isquemia cerebral

El estrés oxidativo en la patología de la isquemia cerebral juega un papel determinante en el equilibrio vida-muerte de las células nerviosas en la zona de penumbra. Una vez la oclusión del vaso sanguíneo ha desaparecido se restaura el suministro de oxígeno y glucosa necesarios para la generación de ATP.

Sin embargo, se ha observado un elevado incremento de la generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (RNS) causantes de graves daños a la célula y que pueden iniciar cascadas de señalización que resulten en la muerte celular por apoptosis o necrosis (Rodríguez et al., 2021).

En condiciones fisiológicas, las mitocondrias emplean oxígeno para generar ATP mediante la fosforilación oxidativa acoplada a la cadena respiratoria. En esta situación, se generan niveles bajos de anión superóxido que serán convertidos a peróxido de hidrógeno por una reacción catalizada por la superóxido dismutasa, de tal forma que estos radicales saldrán del orgánulo y ejercerán sus funciones como mensajeros intracelulares. Los ROS ejercen su papel en correcto funcionamiento de la célula, de modo que niveles controlados de los mismos resultan fundamentales para mantener los procesos fisiológicos. A nivel neuronal, se ha observado que estas moléculas son esenciales para la proliferación y diferenciación neuronal así como el proceso sináptico (Oswald et al., 2018).

En el contexto isquémico, el agotamiento de oxígeno causa la interrupción de la fosforilación oxidativa y favorece la vía glucolítica como forma de producción de ATP. Esto provoca una acumulación de ácido láctico que genera una situación de acidosis celular (Lewerenz et al., 2010). Tal suceso promueve cambios prooxidantes en la neurona como la liberación de hierro oxidante de origen proteico, la inactivación de los sistemas de defensa antioxidante celulares así como el aumento de la sensibilidad al glutamato (Lewerenz et al., 2010). La acidificación celular, así como la despolarización mitocondrial, provocan el aumento de la producción de ROS. La entrada de calcio provoca la activación de diversas enzimas relacionadas con la generación de ROS y RNS tales como la xantina oxidasa, la ciclooxigenasa, las NADPH oxidasas y la óxido nítrico sintasa (nNOS) (Moro et al., 2004).

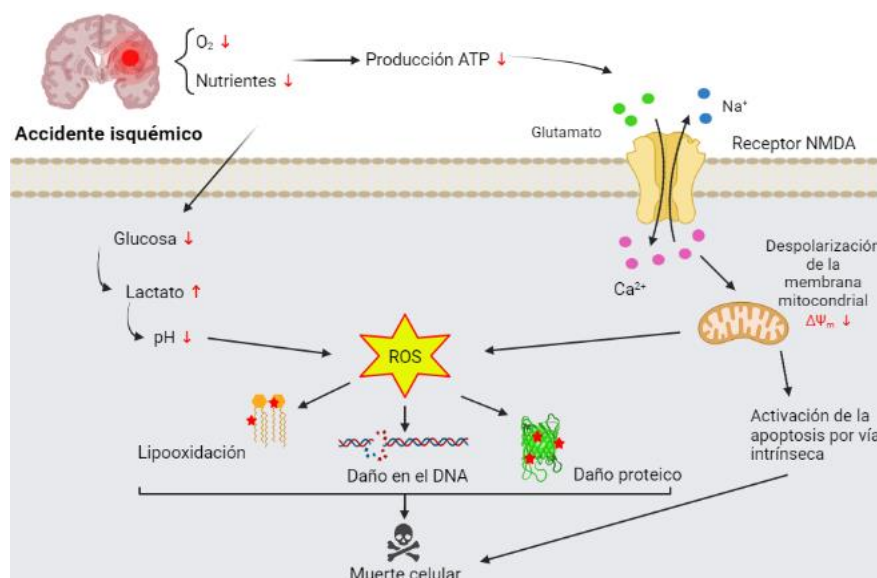


Figura 1. Fisiopatología de la isquemia cerebral. La escasez de oxígeno y nutrientes provoca el agotamiento de ATP, ocasionando una liberación masiva de glutamato al espacio extracelular. Esta situación produce la entrada masiva de Ca^{2+} al interior de las neuronas activando diversas rutas de señalización entre las que se encuentra la apoptosis por vía intrínseca. La acidosis celular generada por la producción de lactato así como el funcionamiento anómalo mitocondrial incrementan la producción de ROS que acaba ocasionando la muerte celular.

Una vez se recupera el flujo sanguíneo, se restaura la fosforilación oxidativa y la cadena respiratoria mitocondrial. Sin embargo, se produce un fuerte incremento de la producción de anión superóxido. Se desconoce en gran medida este proceso, aunque todo parece indicar que el complejo I de la cadena respiratoria funciona de forma anómala reduciendo NAD^+ a NADH, generando así elevadas cantidades de O_2^- (Manzanero et al., 2013). La apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial permite que los ROS viajen al citoplasma y ocasionen la oxidación y daño de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. La mitocondria se consolida como principal generador de ROS, sin embargo, también se genera un gran número de estas moléculas en el citoplasma mediante la acción de enzimas como la NADPH-oxidasa (NOX) (Rodríguez et al., 2021).

La elevada generación de ROS en el ictus supera los sistemas de defensa antioxidante provocando una situación de estrés oxidativo en la célula. Se han observado niveles reducidos de antioxidantes en las primeras horas posteriores a la isquemia cerebral (Manzanero et al., 2013) a pesar de su papel fundamental para evitar y reducir estos daños. Con el objetivo de equilibrar la balanza, un gran número de estudios desarrollan tratamientos farmacológicos con antioxidantes, ya sea mediante administración exógena o favoreciendo la producción endógena de los mismos.

1.4. Daño en el DNA tras la isquemia cerebral

El DNA es altamente vulnerable al estrés oxidativo originado tras la isquemia cerebral. El daño causado por ROS y RNS es una de las consecuencias más graves de este tipo de accidente cerebrovascular. Cuando el daño no es reparado, se desencadenan múltiples vías de señalización que culminan en la apoptosis celular y, por tanto, en alteraciones en la recuperación funcional del paciente tras el accidente cerebrovascular (Bolaños et al., 2009). Un gran número de estudios sugieren que la isquemia cerebral provoca un incremento del número de sitiosapurínicos/apirimidínicos, roturas monocatenarias (SSBs) y bicatenarias (DSBs) del DNA neuronal así como modificaciones en las bases nitrogenadas, siendo todas ellas desencadenantes de la muerte celular (Li et al., 2018).

Tras estas lesiones, se inicia una respuesta que comienza con el reconocimiento del daño en el DNA por quinasas de la familia de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) las cuales desencadenarán vías que conduzcan a la reparación del DNA y/o la muerte celular (Li et al., 2018). Entre las principales PI3Ks que responden a este daño se incluye ATM (*Ataxia Telangectasia Mutated*), ATR (*ATM and Rad3 Related*) y DNA-PKcs (*DNA Protein Kinase catalytic subunit*). Mientras que ATM se activa en respuesta a DSBs, ATR se activa principalmente en presencia de SSBs, siendo ambas proteínas relevantes en el inicio de la cascada apoptótica así como en la reparación del DNA. En el caso de las DNA-PKcs, son fundamentales para la formación del complejo de reparación de DSBs en el DNA

mediante el modelo de recombinación de extremos no homólogos (NHEJ) (Li et al., 2018). Tras la formación de DSBs, el heterodímero Ku70/80 se uniría a estos extremos libres permitiendo la unión de DNA-PKcs y la formación del complejo activo (Li et al., 2018).

A diferencia de los SSBs, los mecanismos que regulan y coordinan la reparación de los DSBs no están tan estudiados y aún se conoce muy poco sobre los mismos a pesar de la elevada gravedad de estas roturas para la célula que provocan reordenamientos cromosómicos anómalos o su muerte.

En el contexto de la isquemia cerebral, la reparación del DNA presenta un gran impacto en el proceso de neurogénesis, plasticidad neuronal, remielinización y recuperación funcional (Canugovi et al., 2013). Actualmente son pocos los informes clínicos relacionados con tratamientos potenciadores de las vías de reparación del DNA neuronal y menos aún los relacionados con la reparación de DSBs. El desarrollo de este tipo de terapias resultaría de gran interés debido a la importancia del mantenimiento de la integridad celular.

1.5. Sistemas de defensa antioxidantes en la célula

Las ROS son generados por NADPH oxidasas, peroxisomas, el retículo endoplásmico o la mitocondria, siendo esta última la principal fuente productora. El radical superóxido se produce de forma habitual en la cadena respiratoria, sin embargo, los niveles son controlados por la acción de superóxido dismutasas (SODs) (Reczek & Chandel, 2015). Estas enzimas, presentes tanto en la matriz mitocondrial como en el citosol, convierten el radical superóxido en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). A pesar de que H_2O_2 es más estable que otras especies, esta molécula puede dar lugar a radicales hidroxilo ($OH\cdot$) que alteren la homeostasis celular (Reczek & Chandel, 2015). La célula presenta un conjunto de enzimas antioxidantes como son las peroxirredoxinas (PRX), glutatión peroxidasa (GPXs) y la catalasa (CAT) que permiten la detoxificación de este compuesto dando lugar a H_2O .

Las PRXs presentan en su cadena aminoacídica una cisteína capaz de sufrir la oxidación por parte de H_2O_2 . Posteriormente, estas enzimas son reducidas por la acción del sistema tiorredoxina/tiorredoxina reductasa, el cual requiere de NADPH para la donación de electrones. En el caso de las GPXs, estas neutralizan H_2O_2 gracias al tripéptido glutatión, el cual reduce diversos tipos de moléculas inestables mediante la donación de un protón desde su grupo tiol libre (Gallardo et al., 2014). El glutatión oxidado es reducido de nuevo por la acción de la glutatión reductasa, empleando NADPH para ceder electrones a este péptido (Dringen et al., 2005). A diferencia de las PRXs y GPXs que están presentes en varios compartimentos celulares, la catalasa se encuentra confinada principalmente en el interior de los peroxisomas. Esta enzima juega un papel esencial en las defensas antioxidantes de la célula y

presenta una estructura homotetramérica en la que cada subunidad contiene un grupo hemo con un anillo tetrapirrólico enlazado a un átomo de hierro. Estos componentes conforman el sitio activo de la proteína y permiten la catálisis de la dismutación del peróxido de hidrógeno en H_2O y O_2 (Dringen et al., 2005).

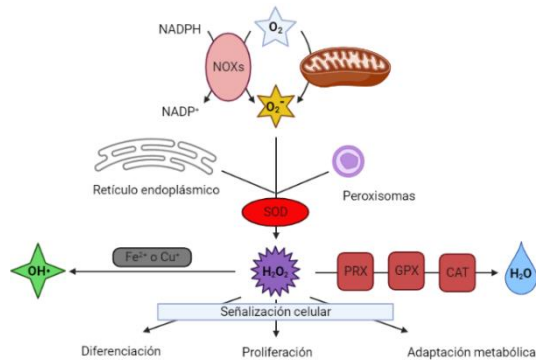


Figura 2. Sistemas antioxidantes celulares. El ion superóxido producido principalmente en la mitocondria, el retículo endoplásmico y los peroxisomas es convertido en H_2O_2 por acción de las superóxido dismutasas. Posteriormente esta molécula desempeñará su papel como mensajero secundario dentro de la célula o bien será convertido en agua por la acción de diversas enzimas (PRX, GPX, CAT). A su vez, esta molécula también es capaz de convertirse en radicales hidroxilo altamente reactivos.

1.6. Muerte neuronal apoptótica

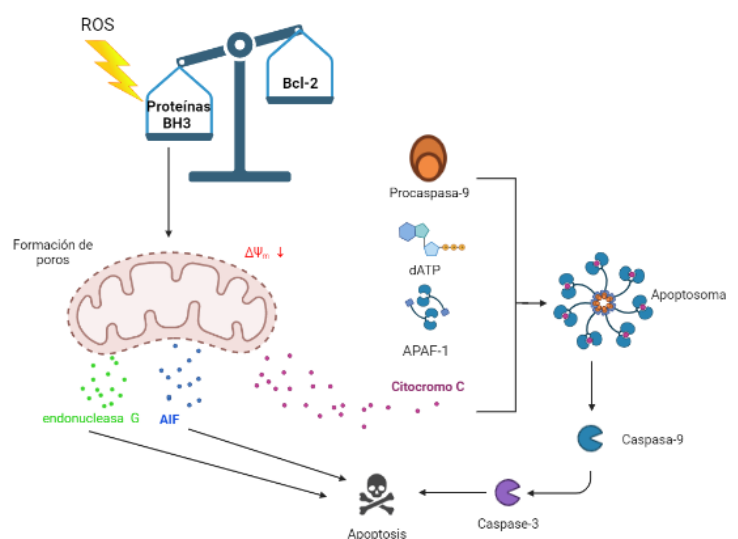
Como se mencionó anteriormente, en la zona de penumbra isquémica se produce una situación en la que convergen respuestas celulares a favor de la reparación y supervivencia de la célula a la vez que se activan mecanismos asociados a la muerte de esta. La controversia se mantiene durante un tiempo considerable pudiendo ocasionar la muerte poblaciones neuronales horas o incluso días después del suceso (Chen et al., 2011). El estrés oxidativo, entre otros muchos estímulos asociados a la patología isquémica, activa la vía intrínseca de la apoptosis provocando la traslocación del citocromo c desde la mitocondria al citosol (Elmore, 2007).

En condiciones fisiológicas, el citocromo c se sitúa en el interior de espacio intermembrana mitocondrial, sin embargo, la permeabilidad de la membrana externa de la mitocondria está controlada por proteínas de la familia Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*). Dentro de este grupo proteico, se encuentran miembros denominados antiapoptóticos que inhiben la salida del citocromo c al citosol, como es el caso de Bcl-XL o Bcl-2, o bien, proteínas proapoptóticas como Bid (*BH3-interacting-domain death agonist*), Bax (*Bcl-2-associated X protein*) o Bim (*BH3-interacting-domain death agonist*) entre otros, que estimulan la salida de citocromo c del orgánulo celular (Elmore, 2007). Tras el ictus, se produce la interacción y agregación de estas proteínas proapoptóticas que se insertan en la membrana mitocondrial externa provocando la formación de poros en la misma, la pérdida de potencial eléctrico y la salida de citocromo c iniciando la cascada de señalización apoptótica. Además de esta molécula, se liberan otras muchas proteínas mitocondriales entre las que se incluye la endonucleasa G o el factor inductor de apoptosis (AIF) los cuales pueden iniciar a su vez vías apoptóticas independientes de caspasas (Sugawara et al., 2004).

Una vez el citocromo c se encuentra en el citosol interactuará con dATP, APAF-1 (*Apoptosis protease-activating factor-1*) y la procaspasa-9 para forma un complejo denominado apoptosoma el cual dará lugar a la caspasa-9 activa que a su vez actuará sobre la procaspasa-3 generando caspasa-3 activa (Elmore, 2007). Esta proteasa provoca la escisión de múltiples sustratos como PARPs (*Poly ADP-ribose Polymerases*), daño en el DNA mediante la activación de CAD (*caspase-activated DNase*) o la condensación de la cromatina actuando sobre ACIN1 (*Apoptotic Chromatin Condensation Inducer 1*) entre otras muchas acciones que acabarán culminando en la muerte de la célula por apoptosis (Sugawara et al., 2004).

En el contexto de la apoptosis neuronal cabe destacar el papel de la proteína p53. La quinasa ATM fosforila esta proteína en respuesta a daños en el DNA para inhibir su degradación proteosomal logrando así su estabilización y contribuyendo al desarrollo de la muerte celular (Endo et al., 2006). Se ha demostrado que este sensor de estrés genotóxico provoca la activación transcripcional de diversos genes proapoptóticos de la familia Bcl-2 como BAX (BCL2 Associated X), PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis) y NOXA (phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1) (Wang et al., 2009). Además de esta activación transcripcional, la estabilización de p53 provoca su traslocación a la mitocondria donde formará complejos con las proteínas antiapoptóticas Bcl-XL y Bcl-2 inhibiéndolas (Endo et al., 2006). La inhibición de esta proteína en cultivos de neuronas *in vitro* ha resultado tener un efecto protector frente las lesiones en el DNA neuronal y reducir la severidad del daño cerebral en ratones (Culmsee et al., 2001). También se ha observado que la administración de inhibidores específicos de la unión de p53 al DNA reduce significativamente los niveles de apoptosis (Leker et al., 2004) o la reducción de la gravedad de la lesión cerebral en ratones deficientes en p53 (Yonekura et al., 2006). Todos estos datos concluyen en el papel fundamental de esta proteína en muerte neuronal isquémica.

Figura 3. Vía intrínseca de la apoptosis. Cuando se produce un estímulo apoptótico como puede ser la producción masiva de ROS en la isquemia cerebral se produce un desequilibrio entre las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas de la familia Bcl-2 a favor de las primeras. Esta situación provoca la formación de poros en la membrana mitocondrial, la pérdida de su potencial eléctrico y la salida de citocromo c. En el citosol, esta proteína se ensamblará a otros componentes celulares (procaspasa-9, dATP y APAF-1) para formar el apoptosoma, el cual activará una serie de caspasas que darán lugar a la muerte celular. Además del citocromo c, se liberan al citoplasma otros componentes mitocondriales como AIF o la endonucleasa G, los cuales ocasionan la muerte apoptótica de la célula independiente de caspasas.



2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Las neuronas requieren una estructura íntegra en el DNA para asegurar su supervivencia. Tras la isquemia, el incremento de la generación de ROS da lugar a una situación de estrés oxidativo que origina daño en el DNA (Bolaños et al., 2009) y que puede ocasionar la muerte neuronal. Las roturas de doble cadena de DNA (DSBs) constituyen uno de los tipos de lesión más graves para la célula. Sin embargo, su papel en la patología del ictus isquémico apenas se ha estudiado, en comparación con otro tipo de roturas (Sánchez-Morán et al., 2020). A pesar de la relevancia de ambos fenómenos, la interacción entre el estrés oxidativo y la formación de roturas de doble cadena de DNA sigue siendo en gran parte desconocida, así como su implicación en la muerte neuronal isquémica.

Basándonos en el contenido anteriormente expuesto, nos planteamos la hipótesis de que el estrés oxidativo podría jugar un papel fundamental en la formación de DSBs en el DNA y, por tanto, en la apoptosis neuronal ocasionada por este tipo de lesiones. La reducción de los niveles de ROS disminuiría el número de estas roturas incrementando las posibilidades de supervivencia celular y demostrando a su vez la importancia de las defensas antioxidantes celulares.

2.2. Objetivos:

En relación con la hipótesis de partida, los objetivos propuestos para el desarrollo del presente trabajo son:

1. Analizar la implicación de las roturas de doble cadena de DNA en la muerte neuronal isquémica.
2. Estudiar el impacto de una terapia antioxidante endógena en la integridad del DNA y su relevancia en la neuroprotección frente al daño isquémico.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Animales de experimentación

Los animales se criaron, manipularon y sacrificaron de acuerdo con la Directiva de la Unión Europea 86/609/EEC y la recomendación 2007/526/EC, la legislación española RD53/2013, y siguiendo la Guía para el cuidado y manejo de Animales de laboratorio. Los procedimientos se realizaron bajo la supervisión de la Dra. María Delgado, que posee las categorías C y D de los cursos de capacitación de manejo de animales de experimentación.

3.1.1. Ratón transgénico mCAT

Para el estudio se empleó un modelo de ratón modificado genéticamente que expresaba de manera constitutiva la catalasa mitocondrial (mCAT) (Vicente-Gutierrez et al., 2019). Estos animales heterocigotos mCAT se cruzaron con ratones C57B1/6J considerados *wild type* para llevar a cabo experimentos tanto con animales mCAT/+ (mCAT) como +/+ (*wt*).

3.1.2. Extracción de DNA y genotipado

En el momento de la realización de los cultivos de neuronas corticales se extraía DNA de los cerebelos o bien de las colas de los embriones de 14,5 días de gestación. Cada extracto tisular era sometido a 200 µl de tampón de lisis (buffer TEN: Tris 50 mM pH 7,5, EDTA 5 mM pH 8, NaCl 100 mM, más espemedina 0,5 mM, DTT 1 mM, proteinasa K 800 U/ µl). El tejido junto con la mezcla de reacción se dejaba en agitación toda a noche a 55 °C para una completa digestión, al día siguiente las muestras se hervían a 100 °C durante 5 minutos y se centrifugaban otros 5 minutos a 13000 rpm a 4 °C.

En cuanto al genotipado de los animales, se llevaba a cabo una PCR empleando tres oligonucleótidos diferentes: 124540-BOL1 5'-CTCCCAAAGTCGCTCTGAGTTGTTATAT-3' (forward), 124541-BOL1 5'-CGATTTGTACGTA ACTAATCTGTCTGG-3' (reverse) y 0034-Kin-ROSA, 5'-GCAGTGAGAAGAGTACCACCATGAGTCC-3'. Este último oligonucleótido es necesario debido a que los dos primeros cebadores originan un fragmento de 5949 pb difícil de detectar por el elevado número de nucleótidos que presenta. Con el empleo del tercero se origina una banda de 245 pb más fácilmente apreciable y que nos permite reconocer a los individuos mCAT. En el caso del alelo silvestre se observa una única banda de 778 pb. Los componentes empleados para la reacción en cadena consistían en una mezcla de dNTPs 0.5 mM (Roche), Taq polimerasa 0,042 U/ µl (Biotools) y tampón 1X con cloruro de magnesio. La mezclas se introducían en el termociclador y se seleccionaba un programa basado en 5 minutos a 95 °C, 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C con 30 segundos a una temperatura más baja, 65 °C, más 3 minutos a 72 °C, y 8 minutos finales a 72 °C.

3.1.3. Electroforesis en gel de agarosa

Una vez obtenidos los productos de la PCR estos se cargaban en geles de agarosa al 2% (p/v) a los cuales se les había incluido MidoriGreen (1:20000) en su elaboración. A las muestras se les añadía un tampón de carga 6x (Tris 10 mM pH 7,6, azul de bromofenol 0,03% (v/v), xileno cianol 0,03%, glicerol 60%, Na₂EDTA 2H₂O 60 mM) como colorante y la electroforesis tenía en lugar en tampón TAE (Tris 40 mM, ácido acético glacial 20 mM, Na₂EDTA 2H₂O 1 Mm). Los resultados se obtuvieron empleando ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad).

3.2. Cultivo celular

Se emplearon neuronas corticales de ratón procedentes de embriones con 14,5 días de gestación. La realización del cultivo requiere el sacrificio de la ratona gestante. Tras la eutanasia de la gestante mediante dislocación cervical se realizaba la histerectomía para la obtención de los embriones. Ya dentro de la cabina de flujo laminar, se extraían los hemisferios cerebrales corticales de los embriones mediante un corte en la región occipital y se depositaban en una placa Petri recubierta con solución de extracción [EBSS (*Eagle's Basal Salt Solution*: NaCl 116 mM, KCl 5,4 mM, NaH₂PO₄ 1,01 mM, MgSO₄ 1,5 mM, NaHCO₃ 26 mM, D-glucosa 4 mM, 10 mg/ml de rojo fenol) 2,94 mg/ml de BSA y 20 µg/ml de DNAsa tipo I, pH 7,15]. Una vez extraídos los cerebros se realizaban dos cortes en forma de cruz en ellos y se colocaban en un tubo falcon de 50 ml en el caso de que fueran cultivos conjuntos, o bien, en tubos eppendorf de 1,5 ml si llevábamos a cabo cultivos individuales. Tras sedimentar el tejido, se retiraba el exceso de líquido y se resuspendía en solución de disgregación [EBSS, 3,15 µg/ml de BSA, 50 µg/ml de DNAsa tipo I, 10 mg/ml de tripsina, pH 7,15]. Se dejaba actuar la tripsina 10 minutos colocando los recipientes en un baño termostático a 37° C. Una vez transcurrido el tiempo se paraba la reacción inactivando la enzima peptidasa mediante la adición de suero fetal bovino hasta una concentración final del 10% (v/v). Tras la tripsinización tenía lugar la primera centrifugación de 5 minutos a 500g y se eliminaba el sobrenadante obtenido. Tras esto, empleando una pipeta siliconada, se llevaba a cabo un primer ciclo de 12 resuspensiones y se dejaba reposar 4 minutos. Una vez los restos tisulares sedimentasen y las células quedaran en el sobrenadante recogíamos este último y lo añadíamos a un nuevo falcon de 50 ml en el cual tenía lugar otras 9 resuspensiones y que finalizaban con la centrifugación de las células 5 minutos a 500g.

El sobrenadante se resuspendía en 1 ml de medio Neurobasal (NB A Medium. Gibco) suplementado con piruvato 0,25 mM, D-glucosa 5,5 mM, L-glutamina 2 mM, Plasmocin 2,5 µg/ml, B27 1x y una mezcla de antibióticos (penicilina G 100 U/l, estreptomycin 100 µg/l y anfotericina B 0,25 µg/l). Tras esto, añadíamos de nuevo 20 ml del medio Neurobasal suplementado y se llevaba a cabo el

recuento del número de neuroblastos en un contador de células automatizado (Corning® Cell Counter). Al finalizar, se realizaban los cálculos correspondientes para lograr una siembra de 200.000 células/cm² y se incluía la suspensión celular a placas de poliestireno (NUNC™, Thermo Fisher Scientific) las cuales habíamos recubierto con una solución de poli D-lisina (Sigma) al 10% en agua destilada y dejado secar en el interior de la cabina de flujo. Tras la siembra las placas se guardaron en incubadores con atmósfera húmeda, a 37 °C y 5% de CO₂. Cada tres días se cambiaba el medio a las neuronas añadiéndoles de nuevo el medio Neurobasal suplementado hasta el noveno día de cultivo en el cual eran sometidas al experimento de isquemia (Vecino et al., 2018). A los diferentes días de cultivo, se realizaron fotos en campo claro con un microscopio invertido Leica DMi1 (Mannheim, Germany).

3.3. Isquemia *in vitro*

Este proceso consistía en privar a las células de glucosa y oxígeno (oxygen-glucose deprivation, OGD) durante períodos de tiempo controlados y, posteriormente, añadirles un medio de reoxigenación de tal forma que se lograra simular el fenómeno de isquemia-reperfusión (Vecino et al., 2018). Este experimento tenía lugar en un incubador RUSKINN “IN VIVO-400” (Concept 400 anaerobic chamber, Ruskinn Technology, Leeds, United Kingdom). A las placas se les retiraba el medio de cultivo y se llevaba a cabo un lavado de las mismas con PBS. Tras esto, se introducían en el incubador y se les añadía Neurobasal™ A suplementado con piruvato 2,5 mM, L-glutamina 2mM y una mezcla de antibióticos (penicilina G 100 U/l; anfotericina B 0,25 µg/l; estreptomycin 100 µg/l) pero sin adición de glucosa ni B27. Las células se dejaban incubando en el interior en condiciones controladas (37°C, N₂ 95%, CO₂ 5%, O₂ <1%) y, una vez transcurrido el tiempo marcado, las placas eran extraídas del incubador, se les retiraba el medio y se les agregaba el denominado “medio de reoxigenación” el cual era similar al anterior a excepción de que se suplementaba a mayores con D-glucosa 5,5 mM. De forma paralela, las placas de la condición normoxia se mantuvieron en el incubador a 37°C y 5% CO₂ sin realizar ningún cambio de medio.

3.4. Análisis de la expresión proteica mediante Western Blot

3.4.1. Recogida de extractos proteicos

Las neuronas procedentes de los cultivos celulares se lavaron con PBS frío y posteriormente se lisaron con tampón de extracción (1% NP40 en PBS suplementado con una serie de inhibidores de proteasas (Soybean, aprotinina, leupeptina), TCLK, etanólicos (fluoruro de fenil metil sulfonilo, pestatina A) y fosfatasa (fluoruro sódico, vanadato). Se recolectaron rápidamente todas las placas con el extracto

celular en tubos eppendorf de 1,5 ml. Posteriormente, las muestras eran centrifugadas a 13000 rpm durante 10' a 4° C y el sobrenadante era almacenado a -80°C en tubos eppendorf nuevos.

Cuantificación de la concentración proteica

La concentración de proteínas se determinó mediante el empleo de un método colorimétrico basado en el ácido bicinonónico (BCA) (Pierce™ BCA Protein Assay Reagent; Thermo Fisher Scientific). El cambio de color es debido a la reducción del Cu^{+2} a Cu^+ , esta cantidad de cobre reducido es proporcional a la concentración de proteínas presente en la muestra de estudio. El Cu^+ generado por esta interacción reacciona con el BCA, produciendo un cambio colorimétrico hacia tonalidades púrpuras que absorben longitudes de onda entorno a los 562 nm. Todas las muestras se realizaron por triplicado y se empleó un espectrofotómetro lector de placas para medir las absorbancias (MIB#5250030, Thermo Scientific™ Varioskan™ Flash Multimode Reader, Thermo Fisher Scientific), a su vez, se utilizó BSA como estándar para la determinación de la recta patrón (Sánchez-Morán et al., 2020).

3.4.2. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE

Las muestras sometidas a electroforesis se prepararon añadiendo el volumen de extracto proteico necesario (30 – 50 μg) junto con tampón de carga 4x (β -mercaptoetanol 4% (v/v), SDS 8% (p/v), azul de bromofenol 0.02% (p/v), glicerol 4% (v/v) y Tris-base 250 mM) y agua destilada para igualar los volúmenes a cargar. Se hirvieron 5 minutos a 100 °C y, posteriormente, se centrifugaron a 13000g 4°C durante 10 minutos. Empleando un dispositivo de electroforesis vertical (Mini Protean 3, BioRad) las muestras proteicas se cargaron en geles de poliacrilamida al 12-15% con un 10% de dodecil sulfato sódico (SDS) para la correcta desnaturalización de las proteínas. Además de las muestras, se cargaba un marcador de pesos moleculares (*Page Ruler™ Prestained Protein Ladder*, ThermoScientific) y la cubeta electroforética se llenaba de un tampón de electroforesis (Tris 25 mM, glicina 200 mM y SDS al 0,1% (p/v); pH 8,3). El proceso tenía lugar a 80 v en la porción superior “stacking” del gel y a 180-200 en la región inferior o “running” (Sánchez-Morán et al., 2020).

3.4.3. Electrotransferencia e inmunodetección de proteínas

Las proteínas separadas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa de 0,45 μm (Amersham™ Protam™; Sigma Aldrich) utilizando el dispositivo *Mini Transblot* (Biorad) y un buffer de transferencia no comercial (Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20% (v/v); pH 8,3) Se empleó un amperaje constante de 390 mA durante 90 minutos en hielo. Al finalizar se realizaban lavados por triplicado (3 x 5 min) con tampón Tris salino con Tween-20 (TTBS). Tras estos lavados se llevó a cabo el bloqueo de las membranas con solución con leche al 5% (p/v) en TTBS 1 h rotando en el

Navigator™ a temperatura ambiente y posteriormente los lavados (3 x 5 min) con TTBS. Tras esto, se incubaba cada sección de la membrana con la solución que contenía el anticuerpo primario específico frente la proteína de interés (*Tabla 1*) y se dejaba en el Navigator™ durante toda la noche y a 4°C. Esta solución presentaba el anticuerpo monoclonal primario en la proporción indicada y leche al 2% (p/v) en TTBS excepto la solución de anticuerpos frente γ H2AX en la cual se sustituía la leche por albúmina al 2% en TTBS. Se empleó la proteína GAPDH (36 kDa) como control de carga por su variación mínima en las diferentes condiciones de estudio ([Sánchez-Morán et al., 2020](#)).

El siguiente día se retiraban estas soluciones y se llevaban a cabo de nuevo lavados por triplicado (3 x 5 min) con TTBS. Tras esto, se llevaba a cabo la incubación de las secciones de las membranas con la solución de anticuerpos secundarios (*Tabla 1*) correspondientes. Esta solución de TTBS suplementada con leche al 2% y el anticuerpo en cuestión se dejaba incubando durante 1 h en el Navigator™. Tras esto, se llevaban a cabo nuevos lavados con TTBS (5 X 5 min en todas las proteínas de estudio a excepción de la proteína control GAPDH que requería menos lavados, 3 x 5 min) y un último lavado con tampón Tris salino (TBS) (1 X 5 min). Una vez lavadas las membranas, se procedía a tu revelado.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Referencia	Casa comercial
Anticuerpos primarios				
GAPDH	Ratón	1/10	AM 4300	Thermo Scientific
p53	Ratón	1/2000	2524	Cell Signaling
phospho-H2AX	Ratón	1/500	05-636	Millipore
Caspasa-3 activa	Conejo	1/1000	9661	Cell Signaling
Anticuerpos secundarios				
Anti-ratón	Cabra	1/10000	170-6516	BioRad
Anti-conejo	Cabra	1/10000	Sc-2030	Santa Cruz

Tabla 1. Anticuerpos empleados en Western Blot

Los reactivos de quimioluminiscencia empleados variaban en función de la proteína de estudio. Las soluciones de revelado empleadas siguiendo las instrucciones del fabricante fueron *Western Blotting Luminol Reagent* (Santa Cruz Biotechnology), *Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate* (Thermo Fisher Scientific), *Super Signal West Dura* (Thermo Fisher Scientific) y *Super Signal West Fento* (Thermo Fisher Scientific). La señal obtenida en las membranas se exponía a películas autorradiográficas Super HR-U X-Ray Film (Fujifilm Medical).

3.5. Inmunocitoquímica

Constituye una de las técnicas principales para conocer la localización y expresión de las diferentes proteínas de estudio a nivel celular empleando para este fin anticuerpos dirigidos frente el antígeno proteico de interés. Para este ensayo se sembraron placas de 4 pocillos de 2 cm² en los cuales se habían depositado previamente cubreobjetos de cristal esterilizados a fuego con una solución de poli-L-ornitina 15 μ g/ml (Sigma) y

Anticuerpo	Especie	Dilución	Referencia	Casa comercial
Anticuerpos primarios				
MAP 2	Conejo	1/500	ab32454	Abcam
p53	Ratón	1/2000	2524	Cell Signaling
γ -H2AX	Ratón	1/200	05-636	Millipore
Caspasa-3 activa	Conejo	1/300	9661	Cell Signaling
Anticuerpos secundarios				
Cy2	Conejo	1/500	111.225.003	Jackson
Cy2	Ratón	1/500	115.215.003	Jackson
Cy3	Conejo	1/500	111.175.003	Jackson
Cy3	Ratón	1/500	111.165.003	Jackson

Tabla 2. Anticuerpos empleados en inmunocitoquímica

fibronectina 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma). Una vez sometidas al experimento de isquemia y las 4 horas de reoxigenación se eliminó el medio y se lavó 2x2' con PBS frío. Tras esto se fijaron las células con paraformaldehído (PFA) al 4% (v/v) en PBS toda la noche. Al día siguiente se retiró el PFA, se realizaron 3x5' lavados con PBS frío y se llevó a cabo una incubación de 20' RT con glicina 0.1M en PBS frío. Tras esto se permeabilizó las células con Triton al 0,25% (v/v) en PBS a RT durante 5'. Después de retirar esta mezcla se aplicó una solución de bloqueo con 0,1% de Triton (v/v) y 10% de suero de cabra (v/v) en PBS a temperatura ambiente durante 1 hora. El paso a continuación fue la incubación toda la noche a 4°C con una solución de PBS que contenía SG al 5% (v/v) y la dilución adecuada de anticuerpo primario frente la proteína de interés (*Tabla 2*). Al día siguiente se retiró la solución de anticuerpos y se llevaron a cabo 3x5' lavados con PBS para posteriormente proceder con la incubación con el anticuerpo secundario. La mezcla contenía PBS, SG al 5% (v/v) y una solución de anticuerpo secundario conjugado con cianinas (Cy2 o Cy3) en una dilución 1:500. Esta incubación debía de realizarse en oscuridad, durante 1 h a temperatura ambiente.

Tras la incubación con la solución de anticuerpos secundarios, se hicieron 2x2' lavados con PBS para posteriormente llevar a cabo una tinción nuclear con DAPI. Este marcador se une a las regiones ricas en adenina y timina del DNA dando lugar a una señal fluorescente azulada una vez observamos las células a microscopio. Se incubaron las neuronas con una solución de DAPI 30 μM (Sigma) a temperatura ambiente durante 10'. Tras esto se realizaron lavados 3x5' con PBS y uno último con agua destilada ([Sánchez-Morán et al., 2020](#)). Los cubreobjetos lavados se montaron sobre un cubreobjetos y se utilizó el kit SlowFade Antifade (Invitrogen) para evitar la pérdida de fluorescencia hasta su análisis mediante microscopía de fluorescencia en microscopio invertido NIKON Eclipse Ti-E usando el objetivo 40x.

3.6. MitoSOXTM mediante citometría de flujo

Esta técnica se basa en la oxidación específica del reactivo fluorogénico MitoSOXTM (*MitoSOXTM Red mitochondrial superoxide indicator for live cell imaging*, Thermo Fisher) por el ion superóxido mitocondrial. El compuesto entra en las células y posteriormente se dirige a las mitocondrias donde se oxida y se une al ácido nucleico originando una señal fluorescente de color rojizo.

En cabina de flujo laminar los pocillos con las células adheridas eran lavados con PBS atemperado y tras esto se les añadía 500 μl /pocillo de la solución que contenía MitoSOXTM 2 μM en tampón Hank's para una incubación de 30 minutos a 37°C ([Vicente-Gutierrez et al., 2021](#)). Se reservaba un pocillo como control positivo de la oxidación máxima, al cual se le añadía 5 μl de Antimicina A 5 μM .

Tras la incubación, se llevaba a cabo un lavado con PBS y se recogían las células con tripsina, la cual se dejaba actuar durante 1 minuto y se depositaban en los tubos rotulados a los cuales se les añadía suero fetal bovino hasta una concentración final del 10% para parar tripsinización. Se centrifugaban los tubos 5 minutos a 500g y posteriormente el precipitado era resuspendido en PBS. Finalmente, las muestras eran analizadas en el citómetro de flujo FACScalibur (BD Biosciences).

3.7. Ensayo TUNEL

La técnica TUNEL se basa en la incorporación de dUTPs modificados por la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) en los extremos 3'-OH presentes en el DNA roto o fragmentado propio del proceso apoptótico. En el caso del kit empleado (*Click-iT® Plus TUNEL Assay*, Thermo Fisher), el nucleótido modificado incluye un grupo alquino el cual reacciona covalentemente con el colorante Alexa Fluor™ picolil azida en una reacción catalizada por cobre (Yin et al., 2020).

Para el desarrollo de esta técnica partíamos de células adheridas a cubreobjetos de cristal que habían sido fijadas con paraformaldehído al 4%. Lo primero que se llevaba a cabo fue la permeabilización de las células con una solución de PBS al 0.25% de Triton™ X-100 durante 20'. Tras esto, se retiraba esta solución y se realizaban dos lavados con agua desionizada. Como control positivo, empleábamos células a las cuales inducíamos de forma intencionada roturas en las hebras del DNA. Para esto incubábamos un pocillo de células fijadas y permeabilizadas con 1 unidad de DNasa I durante 30 minutos a RT. Tras la incubación eliminábamos la solución con la enzima nucleasa y lavábamos dos veces con agua desionizada.

Para la reacción llevada a cabo por la transferasa terminal TdT se recubrían todos los cristales con 100 µl de TdT Reaction Buffer, dejándolo actuar durante 10 minutos a RT. Mientras, se llevaba a cabo la preparación de la mezcla de reacción (47 µl TdT reaction buffer, 1 µl EdUTP, 2 µl enzima TdT) que era añadida tras eliminar el TdT Reaction Buffer. Se incluían 50 µl/cristal y se dejaba incubar durante 60 minutos a RT en oscuridad. Tras esto, se removía la mezcla de reacción, se lavaban los cristales con agua destilada y después, con una solución de BSA al 3% y 0.1% de Triton™ X-100 en PBS por 5 minutos más un último lavado con PBS 1X. Reacción Click-iT™ Plus. Una vez incorporados los nucleótidos modificados en el DNA se preparaba la mezcla de reacción Click-iT™ Plus (45 µl Click-iT Plus TUNEL Supermix, 5 µl 10X Click iT Plus TUNEL Reaction buffer additive) para lograr la emisión de fluorescencia. Se añadía rápidamente 50 µl a cada cristal y se dejaba actuar 30' RT en oscuridad. Una vez transcurrido el tiempo, se eliminaba el cocktail de reacción y se lavaban los cubreobjetos con una solución de PBS con BSA al 3% (v/v) durante 5 minutos. El desarrollo como tal de la técnica finaliza en este punto, sin embargo, a mayores se complementaba con una

inmunodetección por anticuerpos tal y como se explicó en la inmunocitoquímica para su posterior análisis por microscopía de fluorescencia en un equipo NIKON Eclipse Ti-E, objetivo 40x.

3.8. Determinación de la apoptosis mediante citometría de flujo (kit Anexina V/ APC- 7AAD)

Durante la muerte celular programada se produce la traslocación de los residuos de fosfatidilserina desde la cara interna de la membrana plasmática a la superficie celular. Este suceso puede detectarse empleando la proteína anexina V. Ésta presenta una fuerte afinidad por los residuos de fosfatidilserina, de tal forma que si se conjuga con un fluorocromo (aloficocianina, APC) nos permite identificar aquellas células que se encuentran en el proceso apoptótico mediante citometría de flujo. Además de esta sustancia, se emplea el compuesto 7-actinomicina D (7AAD) el cual es capaz de penetrar en las células muertas debido a la pérdida de la integridad de su membrana plasmática. Este método permite identificar las células Anexina V positivas/ 7 AAD negativas como apoptóticas.

La técnica comenzaba con la aspiración del medio y el lavado con PBS de las células a las 4 horas de la realización de la isquemia. Después, se les añadía EDTA tetrasódico 1mM (500 µl/pocillo) y tras un minuto de incubación las células eran recogidas cuidadosamente formando una especie de telilla en el pocillo. Las células se incluían en los tubos de citometría previamente marcados y se centrifugaban 5 minutos a 500 X g. Al finalizar el proceso se eliminaba el sobrenadante y el pellet era resuspendido en 100 µl de Binding Buffer (Hepes 10mM, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2,5mM; pH=7,4). Posteriormente se incluía en los pocillos una solución de BB que contenía 3 µl/10⁶ células de Anexina V (APC Annexin V, Immunostep) y 1 µl/10⁶ de 7AAD (BD Pharmingen) (Vecino et al., 2018). A mayores, siempre se llevaban cuatro controles: células sin marcar, células marcadas sólo con anexina V, células marcadas solo con 7AAD, y células marcadas con anexina V y 7AAD. Tras una incubación a temperatura ambiente y oscuridad durante 15 minutos se añadía 400 µl de BB a todas las muestras. La apoptosis se evaluaba en un citómetro de flujo FACScalibur (BD Biosciences).

3.9. Análisis de resultados

El procesamiento y cuantificación de las imágenes se llevó a cabo con el software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>). Los valores obtenidos en las diferentes técnicas se analizaron estadísticamente empleando el software GraphPad Prism 9 Statistics© y se expresaron como el valor medio ± el error estándar de la media (S.E.M.). La significatividad se midió mediante análisis de la varianza (ANOVA) de una o dos vías seguido del test de Bonferroni (para comparaciones múltiples) considerando estadísticamente significativo un valor p<0.05.

4. RESULTADOS

4.1. La isquemia provoca roturas de doble hebra en el DNA y la estabilización de p53, lo que culmina en la apoptosis neuronal.

Numerosos estudios han demostrado la elevada susceptibilidad del DNA al daño ocasionado por la privación de oxígeno y glucosa. Sin embargo, la mayoría de estas investigaciones se centra en las roturas monocatenarias en el DNA obviando las lesiones que se producen en ambas hebras del material genético. Además, se sabe que estas últimas tienen consecuencias fatales en la célula si no son reparadas de forma adecuada pueden originar alteraciones cromosomales, la muerte programada de la célula o bien iniciar una proliferación celular descontrolada (Sánchez-Morán et al., 2020).

Por todos estos antecedentes, nos planteamos analizar el impacto de las roturas de doble cadena de DNA en la muerte neuronal isquémica. Para cumplir este objetivo, se emplearon neuronas corticales procedentes de embriones de ratón que fueron sometidas a diferentes tiempos de isquemia *in vitro* (0, 10, 30 y 45 minutos), seguido por 4 horas de reoxigenación, tal y como se ha descrito en el apartado de **Materiales y métodos**. De esta forma se pretendía observar si el aumento del tiempo isquemia se correspondía con un mayor número de DNA DSBs además de observar un incremento de la muerte neuronal mediada por apoptosis.

Para el estudio de DNA DSBs se utilizó la histona fosforilada H2AX (γ H2AX) como marcador. La fosforilación de esta proteína se produce pocos minutos después de la aparición de roturas de doble hebra en el DNA y ejerce una función de reclutamiento de la maquinaria de reparación de daño del DNA. Debido a su uso habitual en numerosos estudios ha sido clasificada como un marcador altamente sensible, temprano, cuantitativo y selectivo de DNA DSBs (Kuo & Yang, 2008).

Trabajos previos en nuestro laboratorio han demostrado la relación existente entre la estabilidad de la proteína p53 y el daño isquémico con la consecuente activación de la vía apoptótica (Gomez-Sanchez et al., 2011). Con relación al análisis del proceso apoptótico, utilizamos dos biomarcadores diferentes: p53 y caspasa-3 activa. Tal y como se mencionó en la **Introducción**, p53 se emplea como sensor genotóxico en numerosos estudios ya que en el proceso isquémico se estabiliza e inicia una cascada de señalización que deriva en la activación mitocondrial de la muerte celular programada, por lo que su empleo para el estudio de la muerte neuronal resulta relevante. Por otro lado, la proteína caspasa-3 activa es un efector final del proceso apoptótico. Hay que tener en cuenta que tanto la vía extrínseca como intrínseca de la apoptosis convergen en la activación de esta caspasa que, una vez activada, origina cambios bioquímicos y morfológicos irreversibles que acaban con la vida de la

célula (Sugawara et al., 2004). Su papel esencial en la apoptosis tardía consolida a caspasa-3 activa como el sensor biológico por excelencia para el estudio de este proceso.

En el presente estudio, se llevaron a cabo transferencias tipo *western blot* así como ensayos de inmunofluorescencia para conocer los niveles de los tres marcadores en las cuatro condiciones experimentales. Mediante el empleo de estas técnicas se pretendía analizar las posibles diferencias entre los distintos tiempos de OGD.

El análisis *western blot* (Figura 4) reveló la existencia de un incremento dependiente del tiempo de los niveles de γ H2AX, p53 y caspasa-3 activa con respecto la duración de la isquemia. El análisis estadístico de la cantidad relativa de proteína confirmó estos resultados, obteniendo diferencias significativas en todas las condiciones.

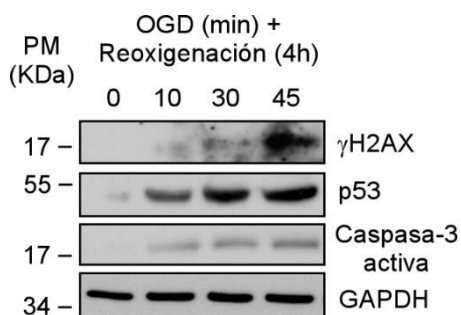


Figura 4. El aumento del tiempo de OGD se correlaciona con un mayor número de DNA DSBs y el incremento de la apoptosis neuronal. Visualización de la abundancia de las proteínas γ H2AX, p53, caspasa-3 activa y GAPDH en extractos proteicos neuronales.

Con el fin de confirmar estos resultados, se realizaron 2 estudios de inmunofluorescencia: detección de proteínas por inmunocitoquímica y TUNEL. Como primera aproximación, se realizaron dos inmunocitoquímicas en las cuales se detectaron γ H2AX y p53, respectivamente, junto con el marcador neuronal MAP2 (*Microtubule-associated protein 2*). Las imágenes de inmunofluorescencia demostraron la acumulación de DNA DSBs y de p53 en las neuronas tras la isquemia (Figura 5)

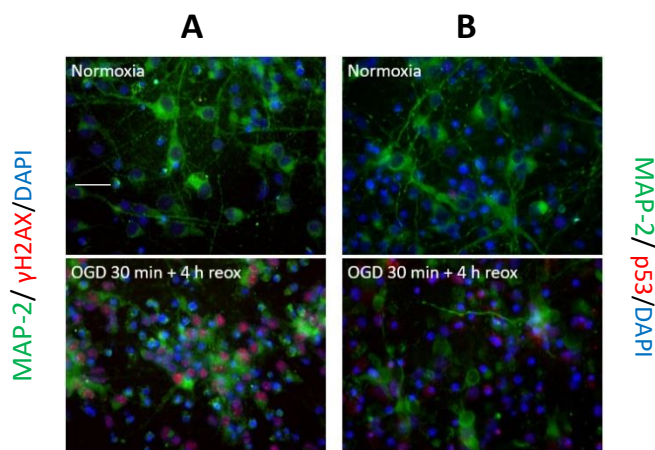
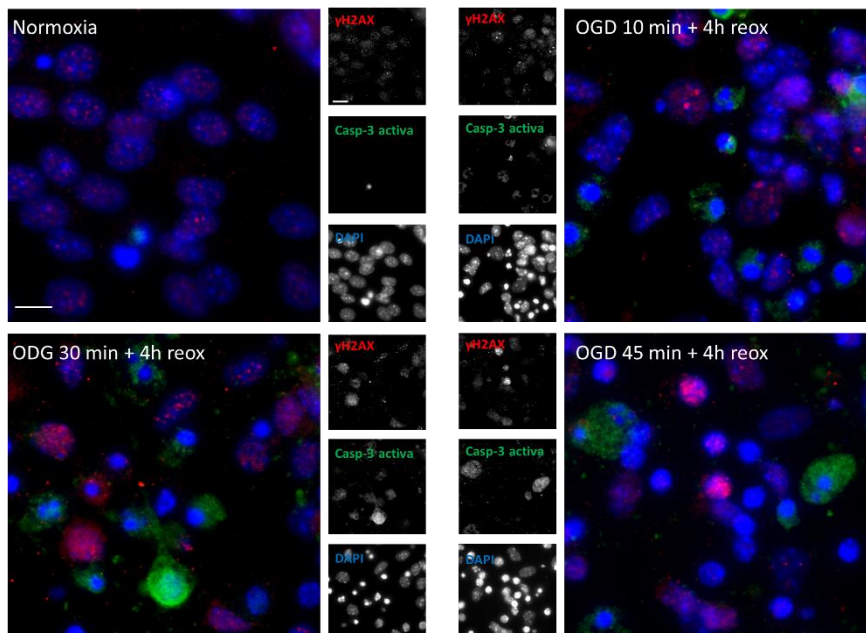


Figura 5. El análisis por inmunocitoquímica confirma la acumulación de roturas de doble cadena en el DNA y de p53 en neuronas tras la isquemia.. Imágenes representativas de microscopía confocal de neuronas corticales sometidas a 2 tiempos de OGD diferentes (0 y 30 minutos) más 4 horas de reoxigenación. **A.** Marcaje para γ H2AX (rojo), MAP-2 (verde) y el núcleo celular con DAPI (azul). **B.** Marcaje para p53 (rojo), MAP-2 (verde) y el núcleo celular con DAPI (azul). Barra de escala. Barra de escala 50 μ m.

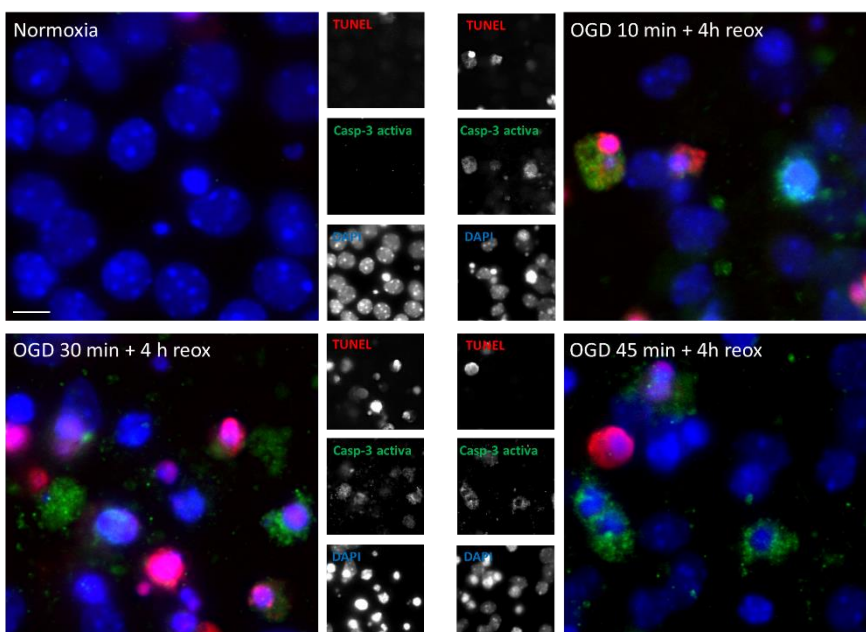
Posteriormente, se realizaron 2 nuevas inmunocitoquímicas con los marcajes γ H2AX/caspasa-3 activa y p53/caspasa-3 activa. Además, se realizó la técnica TUNEL como una técnica complementaria que confirma el incremento del daño en el DNA asociado al proceso apoptótico (Sánchez-Morán et al., 2020) junto con el marcaje con anticuerpos de caspasa-3 activa.

Los resultados conseguidos en la inmunocitoquímica γ H2AX/caspasa-3 activa confirmaron el incremento del daño en el DNA observado por análisis por transferencia tipo western blot, verificando de nuevo un aumento de ambos (Figura 6). Los valores obtenidos en la técnica TUNEL constataban los resultados reflejados en el ensayo anterior, observándose valores superiores de células TUNEL+ y/o caspasa-3 activa+ en las neuronas sometidas a tiempos de ischemia más altos (30 y 45 minutos + 4 horas de reoxigenación) (Figura 7).



γ H2AX /Caspasa-3 activa/DAPI

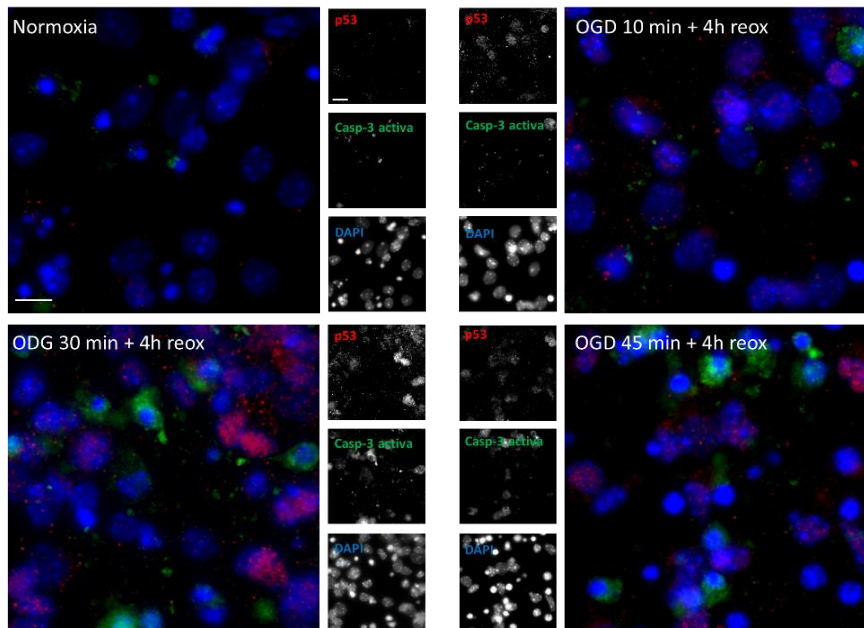
Figura 6. El incremento de roturas de doble hebra en el DNA en función del tiempo de ischemia *in vitro* se asocia con niveles más elevados de apoptosis neuronal. Imágenes representativas de microscopía confocal de neuronas corticales sometidas a 4 tiempos de OGD diferentes (0, 10, 30 y 45 minutos) más 4 horas de reoxigenación marcadas para γ H2AX(rojo), caspasa-3 activa(verde) y el núcleo celular con DAPI (azul). Barra de escala 10 μ m.



TUNEL/Caspasa-3 activa/DAPI

Figura 7. Los resultados obtenidos por técnica TUNEL verifican la acumulación de daño en el DNA. Imágenes representativas de microscopía confocal de neuronas corticales sometidas a 4 tiempos de OGD diferentes (0, 10, 30 y 45 minutos) más 4 horas de reoxigenación marcadas para TUNEL (rojo), caspasa-3 activa(verde) y el núcleo celular con DAPI (azul). Barra de escala 10 μ m.

En cuanto a la inmunocitoquímica realizada sobre p53/caspasa-3 activa, la estabilización de p53 y la activación de la caspasa-3 se intensificaba en valores de isquemia *in vitro* más altos (Figura 8).



p53/Caspasa-3 activa/DAPI

Figura 8. El aumento de DSBs en el DNA se correlaciona con la activación de los mecanismos de muerte apoptóticos. Imágenes representativas de microscopía confocal de neuronas corticales sometidas a 4 tiempos de OGD diferentes (0, 10, 30 y 45 minutos) más 4 horas de reoxigenación marcadas para p53 (rojo), caspasa-3 activa (verde) y el núcleo celular con DAPI (azul). Barra de escala 10 μ m.

Todos estos resultados demuestran que la isquemia induce, de manera dependiente del tiempo, la generación de las roturas de doble cadena del DNA, lo que se acompaña de la acumulación de la proteína pro-apoptótica p53. El resultado final de estas alteraciones es la muerte neuronal por apoptosis. Por tanto, la integridad del DNA desempeña una función esencial en la supervivencia neuronal tras un proceso isquémico.

4.2. La OGD provoca una situación de estrés oxidativo celular que se correlaciona con un incremento del proceso apoptótico.

La imposibilidad de generar ATP, así como el funcionamiento anómalo de la cadena respiratoria mitocondrial en el proceso isquemia-reperfusión origina la formación de un gran número de ROS que supera los sistemas de defensa celulares (Li et al., 2018). El descontrol metabólico permite la actuación de estas moléculas sobre diferentes componentes celulares así como la activación de cascadas de señalización que desembocan en la muerte de la célula (Bolaños et al., 2009). Debido a estos antecedentes, en el actual trabajo se llevó a cabo el estudio del incremento de los niveles de los ROS en las neuronas corticales sometidas a proceso isquémico así como la relación de este fenómeno con la muerte celular apoptótica. Para el análisis de la producción de ROS, se llevó a cabo la detección de ROS mitocondriales mediante la técnica MitoSOXTM mientras que para el estudio del proceso apoptótico, se realizó el ensayo Anexina V/7AAD. Tal y como se detalló en el apartado de **Materiales y métodos**, esta técnica nos permite conocer con elevada sensibilidad el número de células

apoptóticas (Anexina V+/7AAD-) dentro de una población celular. Las condiciones experimentales empleadas fueron las mismas que las mencionadas con anterioridad.

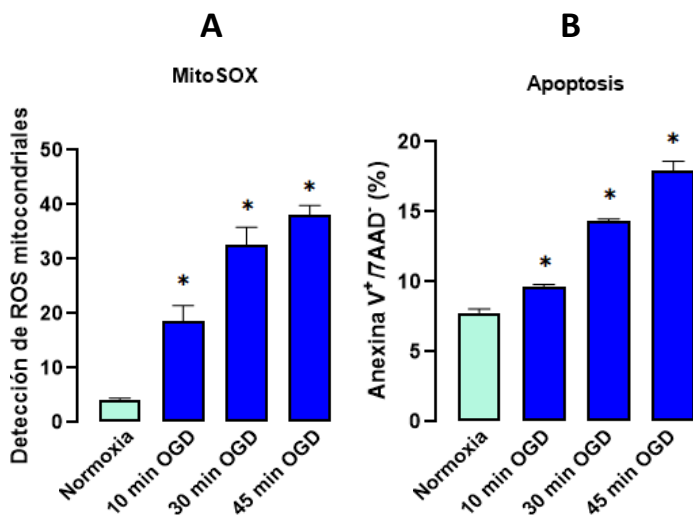


Figura 9. El aumento de los niveles de ROS en la isquemia-reperfusión se asocia con un incremento del número de neuronas apoptóticas. **A.** Determinación de la detección de ROS mitocondriales en neuronas corticales a diferentes tiempos de isquemia *in vitro* (0, 10, 30 y 45 minutos) más 4 horas de reoxigenación. **B.** Análisis del porcentaje de neuronas apoptóticas (AnexinaV⁺/7AAD⁺) mediante citometría de flujo en las mismas condiciones experimentales. Los resultados se muestran como medias \pm S.E.M de 4 cultivos independientes *p < 0.05 vs normoxia (ANOVA de una vía seguido de test de Bonferroni *post hoc*)

Los resultados obtenidos en el ensayo MitoSOXTM confirman el incremento de los niveles de ROS en la situación isquemia-reperfusión, observándose un aumento de la producción de ión superóxido mitocondrial en función del tiempo de OGD neuronal a las 4 horas de reoxigenación. Por otro lado, en el caso del ensayo Anexina V/7AAD se observa un mayor número de células Anexina V+/7AAD- en tiempos de isquemia *in vitro* de 30 y 45 minutos, aunque ya con 10 minutos las diferencias frente la condición normoxia son significativas. El resultado de este ensayo corrobora los resultados obtenidos sobre p53 y caspasa-3 activa, mencionados previamente.

4.3. La expresión constitutiva de catalasa en la mitocondria reduce el número de roturas de doble hebra en el DNA, la estabilización de p53 y la apoptosis neuronal provocadas por la isquemia.

El segundo objetivo del trabajo consistía en el estudio del impacto del estrés oxidativo en la generación de DSBs en el DNA y, por tanto, las consecuencias subsiguientes en la apoptosis neuronal causada por la isquemia. Se sabe que esta situación oxidante es altamente perjudicial en el contexto isquémico, sin embargo, se desconoce la intervención directa sobre el daño genómico neuronal, y menos aún en la formación de roturas de doble hebra. Así, para llevar a cabo el estudio se emplearon cultivos de neuronas corticales procedentes de embriones de ratón que expresan de forma constitutiva la catalasa en la mitocondria (mCAT) reduciendo así los niveles endógenos de ROS mitocondriales. Esta oxidorreductasa cataliza la reacción que transforma peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno de tal forma que los ratones que expresan esta proteína de forma constitutiva presentan niveles basales

más elevados que permiten modular a la baja la generación endógena de ROS (Vicente-Gutierrez et al., 2019). Por ello, este modelo murino nos permitía analizar la importancia de los mecanismos de defensa antioxidantes en la neuroprotección frente el estrés oxidativo en la isquemia cerebral.

A partir de los estudios previos nos quedamos únicamente con dos condiciones experimentales: normoxia y OGD de 30 minutos con 4 horas de reoxigenación. ya que se concluyó que la OGD de 30 minutos era el tiempo más adecuado para el estudio del proceso apoptótico que sufren estas neuronas en la isquemia cerebral. Las neuronas procedentes de embriones silvestres, así como las obtenidas de animales mCAT se sometieron al tiempo de ODG escogido más una reoxigenación de 4 horas en condiciones controladas, tal y como se explicó detalladamente en el apartado de **Materiales y métodos**. Posteriormente, se llevó cabo la evaluación de las diferencias morfológicas, de desarrollo y diferenciación entre los cultivos neuronales de ambos genotipos, sin encontrar diferencias significativas (Figura 10).

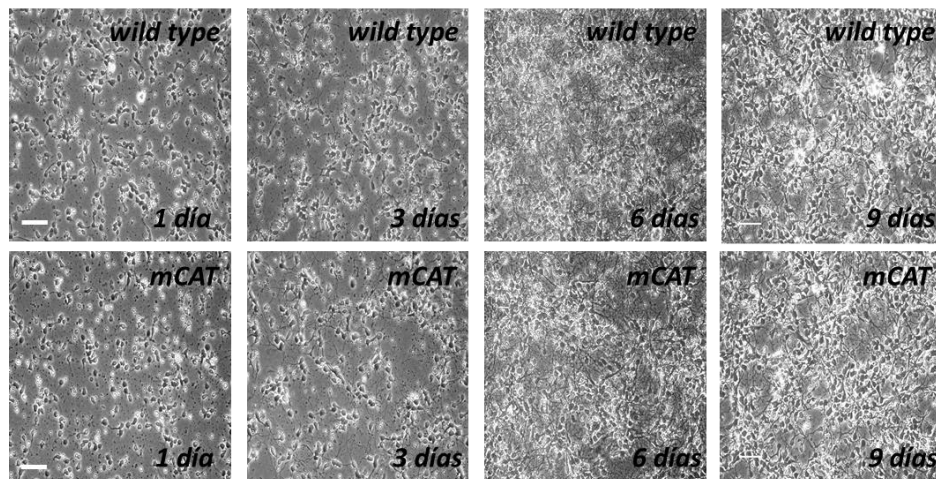


Figura 10. La morfología neuronal no se ve afectada por la catalasa mitocondrial. Imágenes a diferentes días de cultivo (1, 3, 6 y 9 días) de neuronas de ratones *wild type* (franja superior) y *mCAT* (franja inferior). Barra de escala 50 μ m.

En las transferencias tipo *western blot* se observaron claras diferencias entre ambos genotipos. En la (Figura 11) observamos que los niveles de expresión de γ H2AX, p53 y caspasa-3 activa tras la isquemia y posterior reoxigenación (OGD/R) fue menor en las neuronas mCAT que en las neuronas *wild type*.

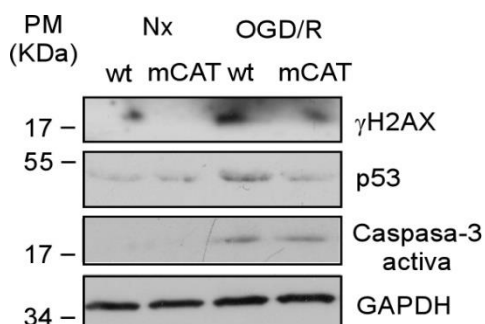


Figura 11. Los neuronas con expresión constitutiva de catalasa mitocondrial presentan niveles reducidos de DSBs en el DNA y de la activación de la apoptosis. Visualización de la abundancia de las proteínas p53 (53 kDa), GAPDH (36 kDa), γ H2AX (17 kDa) y caspasa-3 activa (12 kDa) en extractos proteicos neuronales de ratones *wild type* (wt) y mCAT.

Posteriormente, para confirmar nuestros resultados, se realizaron los marcajes γ H2AX/caspasa-3 activa, p53/caspasa-3 activa y TUNEL/caspasa-3 activa mediante técnicas de inmunofluorescencia. Estos experimentos revelaron diferencias significativas en los dos genotipos utilizados.

El incremento de las roturas de doble hebra inducido por la isquemia (OGD) se constató con el aumento del número de neuronas γ H2AX positivas en ambos tipos de animales. Mientras que, en los ratones de genotipo silvestre (*wt*), el número de células γ H2AX positivas se elevó al 76.47 % del total tras la OGD, en neuronas mCAT el aumento fue significativamente menor, incrementándose solo hasta el 52.05% (Figura 12).

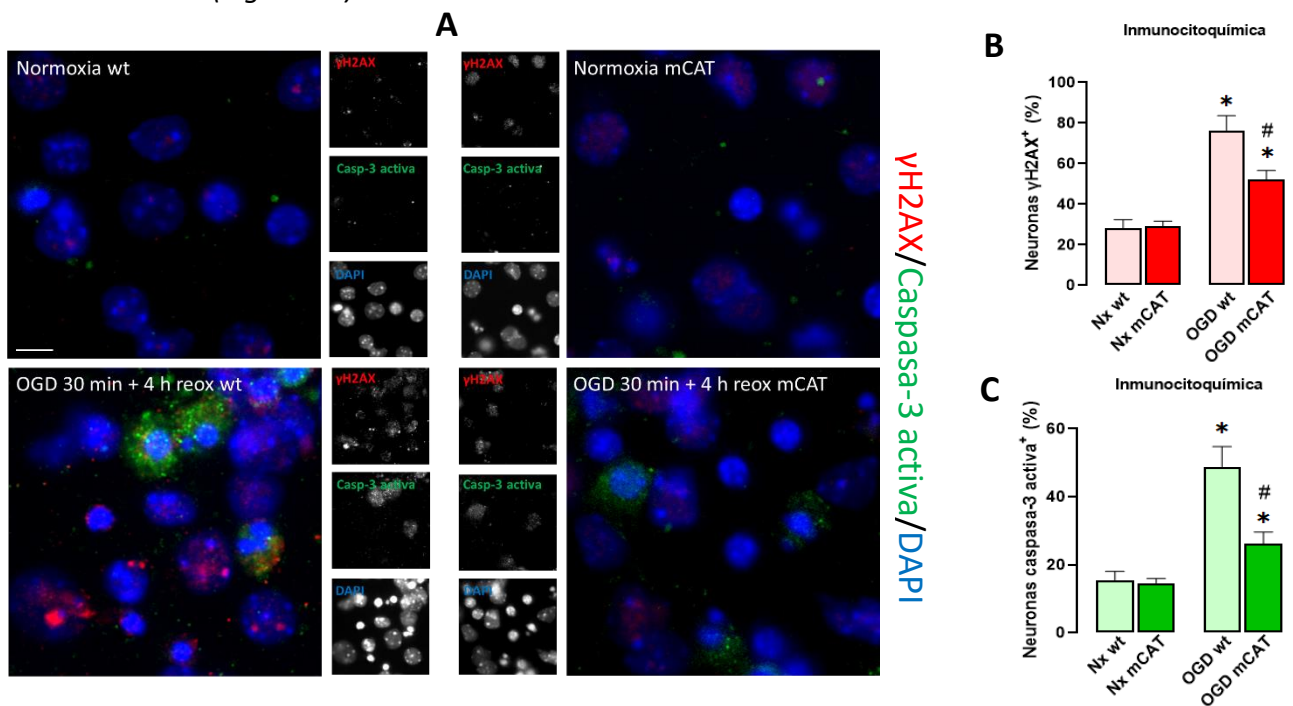


Figura 12. La expresión constitutiva de catalasa mitocondrial protege frente al daño en el DNA. **A.** Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de neuronas corticales de genotipo silvestre y mCAT en normoxia y sometidas a OGD de 30 minutos más 4 horas de reoxigenación. Marcaje para γ H2AX(rojo), caspasa-3 activa(verde) y el núcleo celular con DAPI (azul). **B y C.** Porcentaje de células γ H2AX⁺ y caspasa-3 activa⁺, respectivamente, en cada uno de los grupos de estudio. Los resultados se muestran como medias \pm S.E.M * $p < 0.05$ vs normoxia de cada genotipo y # $p < 0.05$ vs OGD *wild type* (ANOVA de dos vías y test Bonferroni *post hoc*). Barra de escala 10 μ m. n=4 -7 imágenes de cada condición.

El estudio mediante técnica TUNEL de las roturas de DNA confirmaba de nuevo las diferencias observadas en transferencia western blot e inmunocitoquímica. El número de células TUNEL positivas ascendía en las neuronas sometidas al estímulo isquémico, no obstante, este incremento fue inferior en el genotipo mCAT, donde las neuronas marcadas positivamente no llegó a duplicarse frente la condición basal (Figura 13), como sí ocurrió en las neuronas *wild type*.

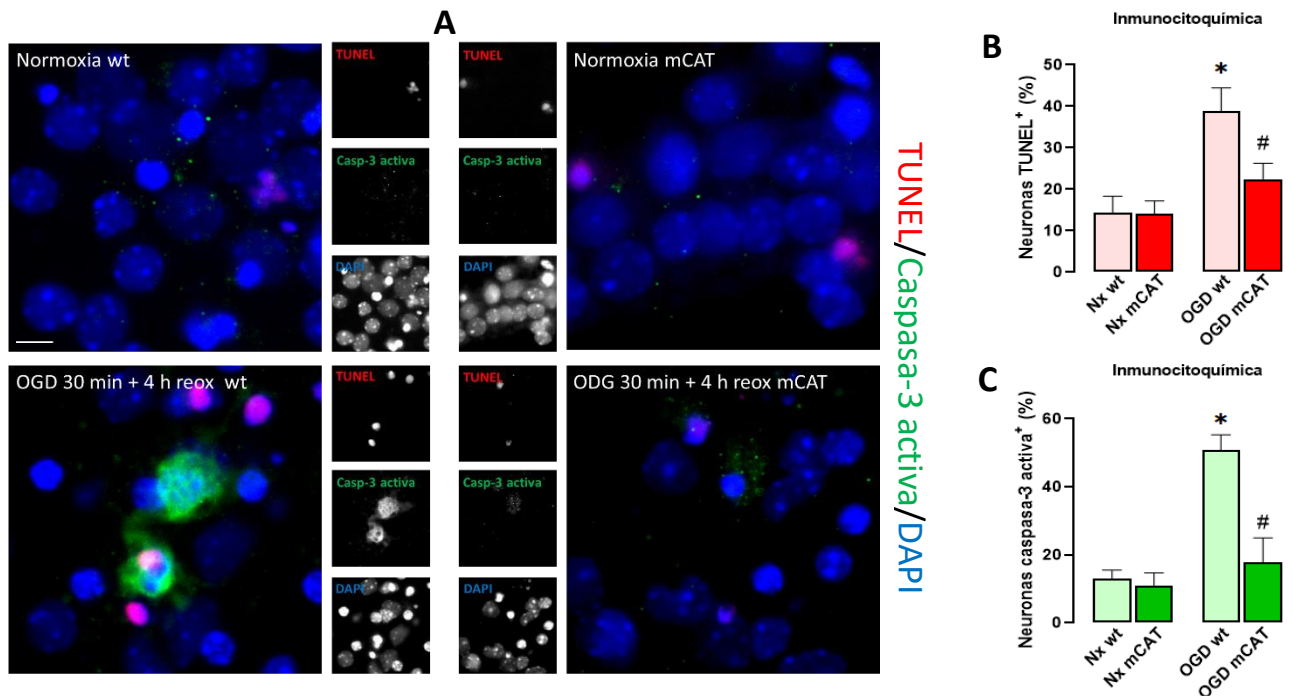


Figura 13. El ensayo TUNEL corrobora la reducción de la acumulación de roturas en el DNA. **A.** Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de neuronas corticales de genotipo silvestre y mCAT en normoxia y sometidas a OGD de 30 minutos más 4 horas de reoxigenación. Marcaje para p53 (rojo), caspasa-3 activa(verde) y el núcleo celular con DAPI (azul). **B y C.** Porcentaje de células p53+ y caspasa-3 activa+, respectivamente, en cada uno de los grupos de estudio. Los resultados se muestran como medias \pm S.E.M * $p < 0.05$ vs normoxia de cada genotipo y # $p < 0.05$ vs OGD *wild type* (ANOVA de dos vías y test Bonferroni *post hoc*). Barra de escala 10 μ m. n = 5-7 imágenes de cada condición.

Por tanto, nuestros resultados demuestran que la generación de ROS que causa la isquemia es la responsable de la formación de roturas de doble cadena en el DNA neuronal, lo que finalmente induce la apoptosis neuronal. Es más, nuestros resultados ponen de manifiesto la función neuroprotectora de los sistemas de defensa antioxidantes celulares en el control de este tipo de daño genómico.

Con respecto a la apoptosis neuronal, se ve gravemente afectada por el impacto de los ROS. Las neuronas *wild type* que resultaron ser p53 positivas tras la OGD, se incrementaron 4 veces con respecto la condición normoxia, mientras que las neuronas que expresaban mCAT el aumento se reducía un 50% respecto a las neuronas *wt* sometidas a la isquemia (2,36) (Figura 13). En lo referente a la proteína efectora caspasa-3 activa, su marcaje se llevó a cabo en la técnica TUNEL y en las dos inmunocitoquímicas (Figuras 12, 13 y 14), obteniendo un valor medio de 46.87% y 22.15% de neuronas caspasa-3 activa positivas en genotipo silvestre y mCAT, respectivamente, en la condición OGD. Estos datos resultan de nuevo significativos y demuestran el vínculo existente entre los ROS y la activación de cascadas de señalización que desembocan en la muerte de las neuronas por apoptosis.

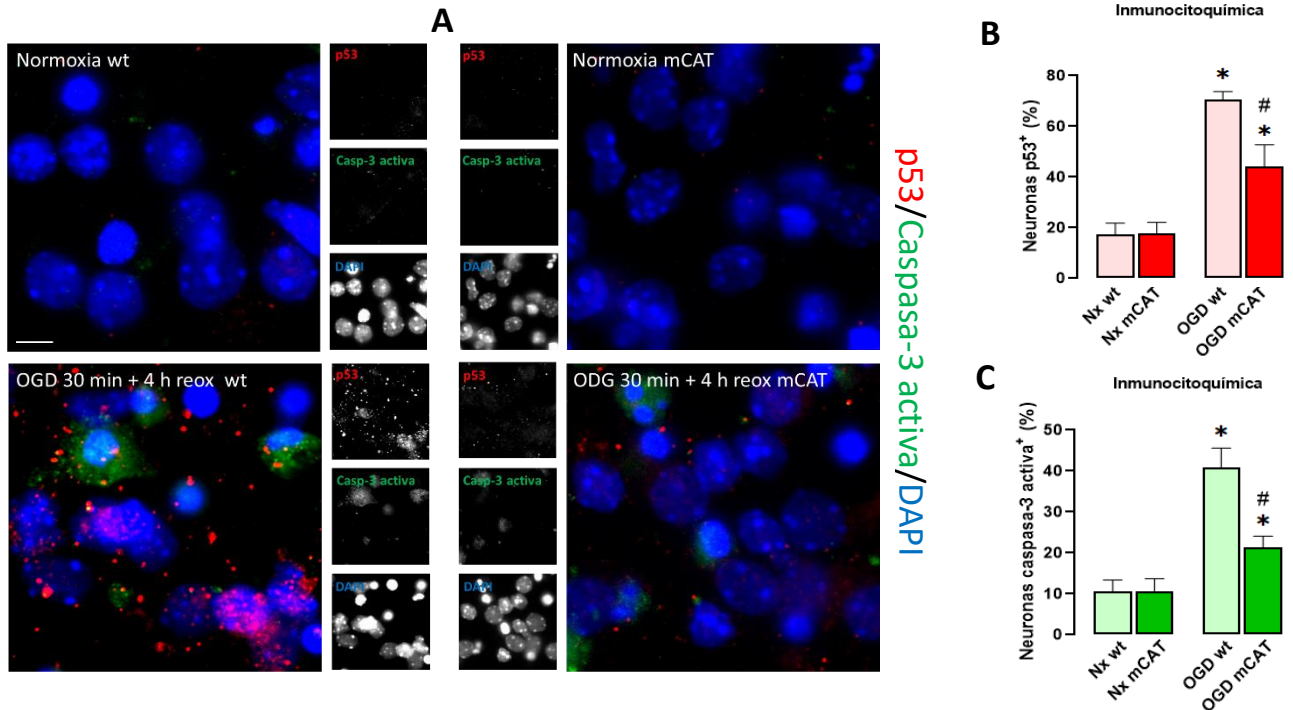


Figura 14. El control del estrés oxidativo reduce la apoptosis neuronal. A. Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de neuronas corticales de genotipo silvestre y mCAT en normoxia y sometidas a OGD de 30 minutos más 4 horas de reoxigenación. Marcaje para p53 (rojo), caspasa-3 activa(verde) y el núcleo celular con DAPI (azul). B y C. Porcentaje de células p53+ y caspasa-3 activa+, respectivamente, en cada uno de los grupos de estudio. Los resultados se muestran como medias \pm S.E.M * $p < 0.05$ vs normoxia de cada genotipo y # $p < 0.05$ vs OGD *wild type* (ANOVA de dos vías y test Bonferroni *post hoc*). Barra de escala 10 μ m. n = 5-7 imágenes de cada condición.

Finalmente, analizamos la apoptosis neuronal mediante citometría de flujo. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Alotham, 2019) demostraron la reducción de los niveles endógenos de ROS mitocondriales en neuronas mCAT sometidas a una OGD de 30 minutos y 4 horas de reoxigenación, respecto a neuronas *wild type*. El análisis de la apoptosis neuronal mediante citometría de flujo reveló una clara reducción de la apoptosis neuronal en las neuronas mCAT, con respecto a las neuronas *wild type* (Figura 15). De nuevo, nuestros resultados destacan el papel neuroprotector que juegan las defensas antioxidantes celulares en el control de los ROS y la supervivencia neuronal tras la isquemia.

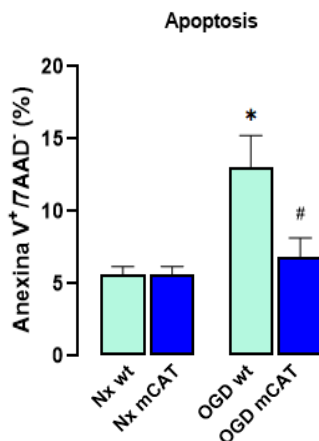


Figura 15. El número de células apoptóticas se ve reducida en el genotipo mCAT. Análisis del porcentaje de neuronas apoptóticas (AnexinaV⁺/7AAD⁻) procedentes de ratones *wild type* y mCAT en normoxia y sometidas a OGD de 30 minutos más 4 horas de reoxigenación. Los resultados se muestran como medias \pm S.E.M de 4 cultivos independientes * $p < 0.05$ vs normoxia de cada genotipo y # $p < 0.05$ vs OGD *wild type* (ANOVA de dos vías y test Bonferroni *post hoc*).

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las consecuencias negativas asociadas a las roturas monocatenarias de DNA están ampliamente estudiadas, al igual que los mecanismos de reparación de estas. Sin embargo, el impacto de las roturas de doble hebra de DNA en la muerte neuronal isquémica continúa siendo una incógnita (Sánchez-Morán et al., 2020). La bibliografía acerca de estas lesiones no es únicamente escasa en el contexto de la isquemia cerebral, sino que el número de estudios relacionados con este tipo de daño tampoco es muy alto en accidentes similares asociados a la disminución del riego sanguíneo.

Un estudio realizado en ratas a las que se les realizó la oclusión de la arteria cerebral media (modelo de isquemia cerebral *in vivo*) mostró la acumulación de un alto número de DSBs en las células cerebrales a las 24 horas de la isquemia focal (Didenko et al., 2002). Además, estudios en jerbos sobre isquemia transitoria en neuronas piramidales CA1 del hipocampo demostraron que la muerte retardada de estas células a varios días del accidente se correlacionaba con el marcaje positivo de DNA DSBs, a los 5 días del suceso, pero no a los 3 días (Kihara et al., 1994). Así mismo, estudios *in vivo* de isquemia medular han mostrado marcajes TUNEL positivos en neuronas motoras 1 día después de la privación de oxígeno y glucosa a la vez que se observaba la activación de los procesos apoptóticos (Hayashi et al., 1998). Ninguno de los artículos encontrados valoraba las posibles disparidades en la acumulación de estas lesiones y la puesta en marcha de los mecanismos de muerte celular en neuronas sometidas a tiempos de isquemia diferentes. A su vez, destaca la ausencia de ensayos que contemplen el escenario de la reoxigenación temprana tras la isquemia cerebral, a las pocas horas del suceso.

En el presente trabajo, el estudio de los niveles de daño de doble hebra llevados a cabo a las 4 horas de la privación de oxígeno y glucosa sobre cultivos de neuronas corticales de ratón mostró un incremento, dependiente del tiempo de isquemia, de los niveles de DNA DSBs con respecto la duración de la isquemia *in vitro*. A su vez, este aumento del número de lesiones en el DNA coincidía con un incremento de los niveles de apoptosis.

De esta manera, nuestros resultados confirman la existencia de una clara correlación entre DNA DSBs y apoptosis en neuronas que pondría en evidencia el elevado impacto de estas roturas en la muerte neuronal isquémica en el contexto de la reoxigenación temprana.

En lo referente al estudio del estrés oxidativo, el conocimiento acerca de la susceptibilidad cerebral frente este fenómeno es más amplio, aunque sigue sin haber estudios acerca de la implicación directa de los ROS en la formación de DSBs en el DNA. El cerebro posee un potente sistema de defensa

frente los ROS. Sin embargo, en la isquemia-reperfusión la producción excesiva de estos compuestos supera la capacidad antioxidante endógena.

El refuerzo de las defensas antioxidantes frente la isquemia cerebral provoca, en la mayoría de los casos, una disminución de la gravedad. Estudios realizados en ratones que sobreexpresaban la enzima glutatión peroxidasa mostraron una reducción de la muerte celular por necrosis y apoptosis tras la isquemia cerebral (Ishibashi et al., 2002). Así mismo, estos resultados coincidían con los obtenidos a partir de ratones transgénicos con niveles superiores de superóxido dismutasa de cobre-zinc (Yang et al., 1994). En el presente estudio se emplearon ratones transgénicos que sobreexpresaban de forma constitutiva la catalasa en la mitocondria (Vicente-Gutierrez et al., 2019). El modelo animal mCAT desarrollado previamente en el laboratorio permitió la realización de diversos ensayos para conocer la implicación del estrés oxidativo en la formación de DSBs y, por tanto, las consecuencias sobre la muerte neuronal.

En el presente estudio encontramos que las neuronas procedentes de ratones mCAT, y en los cuales se detectan valores más bajos de ROS endógenos respecto a los *wild type*, presentaron unos niveles de daño de doble hebra significativamente inferiores a las células de ratones de genotipo silvestre, a las 4 horas de reoxigenación, observando a su vez una reducción de la apoptosis. Nuestros resultados demuestran el papel esencial del estrés oxidativo en la formación de estas roturas, así como la importancia de los sistemas de defensa antioxidantes en el contexto de la isquemia cerebral, reduciendo la gravedad y la muerte neuronal. Además ponen de manifiesto la importancia de la terapia antioxidante en la protección del DNA y supervivencia neuronal tras un daño isquémico.

Los estudios reflejados en la presente memoria deberán realizarse *in vivo* en el futuro para verificar los fenómenos observados en los cultivos de neuronas corticales, ya que en esta primera aproximación no se tiene en cuenta la influencia que puede tener el organismo completo en el proceso. Así, estos resultados podrán abrir una nueva línea de investigación en el laboratorio centrada en la potenciación de los sistemas de defensa antioxidantes celulares en las primeras horas posteriores a la isquemia cerebral.

6. CONCLUSIONES

En vista de los resultados obtenidos y en relación con los objetivos planteados, en la presente memoria podemos concluir que:

1. En las neuronas en cultivo primario, la isquemia induce roturas de doble hebra en el DNA, analizado por el aumento en los niveles de γ H2AX y el número de neuronas TUNEL positivas, lo que provoca la estabilidad de p53 y el aumento de la apoptosis neuronal.
2. El aumento en el número de DNA DSBs es dependiente del tiempo de isquemia. Así, isquemias más largas (y por tanto más intensas) ocasionan un mayor número de estas lesiones en el DNA que ponen en peligro la integridad del genoma neuronal y provocan la apoptosis celular.
3. La generación de ROS inducida por el proceso isquemia-reoxigenación es responsable, en gran parte, del elevado número de DSBs en el DNA neuronal.
4. La disminución endógena de la generación de ROS mitocondriales mediante la expresión de la catalasa previene la formación de DSBs en el DNA, así como la acumulación de y apoptosis neuronal inducidas por la isquemia.

Conclusión final:

Los resultados expuestos en el presente trabajo ponen de manifiesto la relevancia de las roturas de doble hebra de DNA en la muerte neuronal isquémica. Es más, demostramos la importancia del estrés oxidativo endógeno en la formación de DSBs en el DNA neuronal tras la isquemia. Así la isquemia induce la producción exacerbada de ROS, lo que conduce a una situación de estrés oxidativo en la célula que participa, en gran medida, en la formación de este tipo de daño genómico. La disminución de los niveles endógenos de ROS, mediante la expresión de catalasa en la mitocondria, muestran una reducción altamente significativa del daño en el DNA y, en consecuencia, de la apoptosis neuronal en condiciones isquémicas. Por tanto, nuestros resultados aportan información relevante que podría ser clave para el desarrollo de terapias neuroprotectoras centradas en potenciar los mecanismos de reparación de roturas de doble hebra en el DNA, o bien, los sistemas de defensa antioxidantes de la célula con el fin de minimizar la gravedad de estos sucesos tras un daño isquémico, como puede ocurrir en el ictus.

7. Bibliografía

- Almeida, A., Almeida, J., Bolaños, J. P., & Moncada, S. (2001). Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: The role of glycolytically generated ATP in astrocyte protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(26), 15294–15299.
- Alotham, N. S. (2019). *Función neuroprotectora de la terapia antioxidante dirigida a la mitocondria en la isquemia cerebral* [Universidad de Salamanca].
- Bolaños, J. P., Moro, M. A., Lizasoain, I., & Almeida, A. (2009). Mitochondria and reactive oxygen and nitrogen species in neurological disorders and stroke: Therapeutic implications. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 61, Issue 14, pp. 1299–1315). Adv Drug Deliv Rev.
- Caldeira, M. V., Salazar, I. L., Curcio, M., Canzoniero, L. M. T., & Duarte, C. B. (2014). Role of the ubiquitin-proteasome system in brain ischemia: Friend or foe? In *Progress in Neurobiology* (Vol. 112, pp. 50–69). Elsevier
- Canugovi, C., Misiak, M., Ferrarelli, L. K., Croteau, D. L., & Bohr, V. A. (2013). The role of DNA repair in brain related disease pathology. *DNA Repair*, 12(8), 578–587.
- Chen, S. Der, Yang, D. I., Lin, T. K., Shaw, F. Z., Liou, C. W., & Chuang, Y. C. (2011). Roles of oxidative stress, apoptosis, PGC-1 and mitochondrial biogenesis in cerebral ischemia. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 12, Issue 10, pp. 7199–7215). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).
- Culmsee, C., Zhu, X., Yu, Q. S., Chan, S. L., Camandola, S., Guo, Z., Greig, N. H., & Mattson, M. P. (2001). A synthetic inhibitor of p53 protects neurons against death induced by ischemic and excitotoxic insults, and amyloid β -peptide. *Journal of Neurochemistry*, 77(1), 220–228.
- Didenko, V. V., Ngo, H., Minchew, C. L., Boudreaux, D. J., Widmayer, M. A., & Baskin, D. S. (2002). Visualization of irreparable ischemic damage in brain by selective labeling of double-strand blunt-ended DNA breaks. *Molecular Medicine*, 8(12), 818–823.
- Dringen, R., Pawlowski, P. G., & Hirrlinger, J. (2005). Peroxide detoxification by brain cells. *Journal of Neuroscience Research*, 79(1–2), 157–165.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. In *Toxicologic Pathology* (Vol. 35, Issue 4, pp. 495–516). NIH Public Access.
- Endo, H., Kamada, H., Nito, C., Nishi, T., & Chan, P. H. (2006). Mitochondrial translocation of p53 mediates release of cytochrome c and hippocampal CA1 neuronal death after transient global cerebral ischemia in rats. *Journal of Neuroscience*, 26(30), 7974–7983.
- Fricker, M., Tolkovsky, A. M., Borutaite, V., Coleman, M., & Brown, G. C. (2018). Neuronal cell death. In *Physiological Reviews* (Vol. 98, Issue 2, pp. 813–880). American Physiological Society.
- Gallardo, I. F. B., Camacho, M. E. I., Robles, L. I. V., Celis, A. C., & Partida, A. H. (2014). Estrés oxidante: el sistema enzimático glutatión y la salud bucal. *Ciencias Clínicas*, 15(1), 2–8.
- Gomez-Sanchez, J. C., Delgado-Esteban, M., Rodriguez-Hernandez, I., Sobrino, T., De La Ossa, N. P., Reverte, S., Bolaños, J. P., Gonzalez-Sarmiento, R., Castillo, J., & Almeida, A. (2011). The human Tp53 Arg72Pro polymorphism explains different functional prognosis in stroke. *Journal of Experimental Medicine*, 208(3), 429–437.
- Hayashi, T., Sakurai, M., Abe, K., Sadahiro, M., Tabayashi, K., & Itoyama, Y. (1998). Apoptosis of motor neurons with induction of caspases in the spinal cord after ischemia. *Stroke*, 29(5), 1007–1013.
- Ishibashi, N., Prokopenko, O., Weisbrot-Lefkowitz, M., Reuhl, K. R., & Mirochnitchenko, O. (2002). Glutathione peroxidase inhibits cell death and glial activation following experimental stroke. *Molecular Brain Research*, 109(1–2), 34–44.
- Kihara, S. ichi, Shiraishi, T., Nakagawa, S., Toda, K., & Tabuchi, K. (1994). Visualization of DNA double strand breaks in the gerbil hippocampal CA1 following transient ischemia. *Neuroscience Letters*, 175(1–2), 133–136.
- KUO, L. J., & YANG, L.-X. (2008). γ -H2AX - A Novel Biomarker for DNA Double-strand Breaks. *In Vivo*, 22(3).

- Leker, R. R., Aharonowiz, M., Greig, N. H., & Ovadia, H. (2004). The role of p53-induced apoptosis in cerebral ischemia: Effects of the p53 inhibitor pifithrin α . *Experimental Neurology*, 187(2), 478–486.
- Lewerenz, J., Dargusch, R., & Maher, P. (2010). Lactacidosis modulates glutathione metabolism and oxidative glutamate toxicity. *Journal of Neurochemistry*, 113(2), 502–514.
- Li, P., Stetler, R. A., Leak, R. K., Shi, Y., Li, Y., Yu, W., Bennett, M. V. L., & Chen, J. (2018a). Oxidative stress and DNA damage after cerebral ischemia: Potential therapeutic targets to repair the genome and improve stroke recovery. In *Neuropharmacology* (Vol. 134, Issue Pt B, pp. 208–217). Elsevier Ltd.
- Manzanero, S., Santro, T., & Arumugam, T. V. (2013). Neuronal oxidative stress in acute ischemic stroke: Sources and contribution to cell injury. *Neurochemistry International*, 62(5), 712–718.
- Moro, M. A., Cárdenas, A., Hurtado, O., Leza, J. C., & Lizasoain, I. (2004). Role of nitric oxide after brain ischaemia. *Cell Calcium*, 36(3–4), 265–275.
- Nedergaard, M., & Dirnagl, U. (2005). Role of glial cells in cerebral ischemia. In *GLIA* (Vol. 50, Issue 4, pp. 281–286). John Wiley & Sons, Ltd.
- Oswald, M. C. W., Garnham, N., Sweeney, S. T., & Landgraf, M. (2018). Regulation of neuronal development and function by ROS. In *FEBS Letters* (Vol. 592, Issue 5, pp. 679–691). Wiley Blackwell.
- Puig, B., Brenna, S., & Magnus, T. (2018). Molecular communication of a dying neuron in stroke. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 9). MDPI AG.
- Ramos-Cabrer, P., Campos, F., Sobrino, T., & Castillo, J. (2011). Targeting the ischemic penumbra. *Stroke*, 42
- Reczek, C. R., & Chandel, N. S. (2015). ROS-dependent signal transduction. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 33, pp. 8–13). Elsevier Ltd.
- Rodríguez, C., Agulla, J., & Delgado-Esteban, M. (2021). Refocusing the Brain: New Approaches in Neuroprotection Against Ischemic Injury. *Neurochemical Research*, 46(1), 51–63.
- Rossi, D. J., Oshima, T., & Attwell, D. (2000). Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature*, 403(6767), 316–321.
- Sánchez-Morán, I., Rodríguez, C., Lapresa, R., Agulla, J., Sobrino, T., Castillo, J., Bolaños, J. P., & Almeida, A. (2020). Nuclear WRAP53 promotes neuronal survival and functional recovery after stroke. *Science Advances*, 6(41).
- Sugawara, T., Fujimura, M., Noshita, N., Kim, G. W., Saito, A., Hayashi, T., Narasimhan, P., Maier, C. M., & Chan, P. H. (2004). Neuronal Death/Survival Signaling Pathways in Cerebral Ischemia. *NeuroRx*, 1(1), 17–25.
- Vecino, R., Burguete, M. C., Jover-Mengual, T., Agulla, J., Bobo-Jiménez, V., Salom, J. B., Almeida, A., & Delgado-Esteban, M. (2018). The MDM2-p53 pathway is involved in preconditioning-induced neuronal tolerance to ischemia. *Scientific Reports*, 8(1), 1–15.
- Vicente-Gutierrez, C., Bonora, N., Bobo-Jimenez, V., Jimenez-Blasco, D., Lopez-Fabuel, I., Fernandez, E., Josephine, C., Bonvento, G., Enriquez, J. A., Almeida, A., & Bolaños, J. P. (2019). Astrocytic mitochondrial ROS modulate brain metabolism and mouse behaviour. In *Nature Metabolism* (Vol. 1, Issue 2, pp. 201–211). Nature Research.
- Vicente-Gutierrez, C., Bonora, N., Jimenez-Blasco, D., Lopez-Fabuel, I., Bates, G., Murphy, M. P., Almeida, A., & Bolaños, J. P. (2021). Abrogating mitochondrial ROS in neurons or astrocytes reveals cell-specific impact on mouse behaviour. *Redox Biology*, 41, 101917.
- Yang, G., Chan, P. H., Chen, J., Carlson, E., Chen, S. F., Weinstein, P., Epstein, C. J., & Kamii, H. (1994). Human copper-zinc superoxide dismutase transgenic mice are highly resistant to reperfusion injury after focal cerebral ischemia. *Stroke*, 25(1), 165–170.
- Yin, H., Zhang, H., Kong, Y., Wang, C., Guo, Y., Gao, Y., Yuan, L., Yang, X., & Chen, J. (2020). Apelin protects auditory cells from cisplatin-induced toxicity in vitro by inhibiting ROS and apoptosis. *Neuroscience Letters*, 728.
- Yonekura, I., Takai, K., Asai, A., Kawahara, N., & Kirino, T. (2006). p53 potentiates hippocampal neuronal death caused by global ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 26(10), 1332–1340.