



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Respuesta de la reparación del ADN en células troncales adultas, antes y después de su diferenciación a adipocitos”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Jonathan Lozano Salgado

TUTOR PRINCIPAL

Mahara A. Valverde Ramírez
Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Alejandro García Carrancá
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dr. Hector Mayani Viveros
Centro Médico Nacional Siglo XXI

Ciudad de México. Mayo, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jonathan Lozano Salgado
Alumno de la Maestría en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 15 de febrero del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Respuesta de la reparación de ADN en células troncales adultas, antes y después de su diferenciación a adipocitos**", dirigida por la Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dr. Jesús Chimal Monroy
VOCAL	Dr. Marco Antonio Velasco Velázquez
VOCAL	Dra. Marcela Lizano Soberón
VOCAL	Dr. Fredy Roberto Cifuentes Navarro
SECRETARIO	Dra. Ana María Salazar Martínez

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 17 de febrero de 2016
COORDINADORA DEL SUBCOMITÉ ACADÉMICO



DRA. BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO

C.c.p. Tutor
C.c.p. Archivo

BGP*lgg

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo económico para la asistencia a congresos.

A CONACyT por la beca de maestría 589752

Índice

Abreviaturas.....	2
Índice de tablas y figuras.....	3
Resumen.....	4
Marco Teórico.....	6
1. Daño en el ADN.....	6
1.1. Daño por oxidación	7
1.2. Mecanismos de reparación del ADN y sus vías.....	8
1.2.1. Reparación por escisión de bases (BER)	10
1.2.2. Reparación por escisión de nucleótidos (NER).....	17
2. Células Troncales: Fisiología, reparación y diferenciación.....	21
2.1. Fisiología.....	21
2.2. Reparación del ADN.....	24
2.2.1. Reparación del ADN tras la diferenciación.....	25
2.3. Diferenciación a adipocitos.....	28
Planteamiento de trabajo.....	30
Hipótesis.....	31
Objetivo General.....	31
Objetivos Particulares.....	32
Metodología.....	33
Materiales y métodos.....	34
A. Cultivo celular y tratamiento.....	34
B. Electroforesis Unicelular - Ensayo Cometa.....	37
C. Análisis.....	41
Resultados.....	42
Análisis de resultados y discusión.....	63
Conclusiones.....	68
Referencias.....	71

Abreviaturas

Luz ultravioleta	UV
Radiación ionizante	IR
Rupturas de cadena sencilla	SSBs
Especies reactivas de oxígeno	ROS
Respuesta al daño en el ADN	DDR
Células troncales	SC
Células troncales humanas adultas derivadas de tejido adiposo	hAD-MSC
Reparación por escisión de bases	BER
Sítios abásicos o sítiosapurínicos/apirimidínicos	AP
8-OxoGuanina	8-OxoG
Reparación por escisión de nucleótidos	NER
Reparación de errores de apareamiento	MMR
Entrecruzamientos intracatenarios	ICLs
Rompimientos de doble cadena	DSBs
Reparación por unión de terminaciones no homólogas	NHEJ
Reparación por recombinación homóloga	HRR
Uracilo-ADN-glicosilasa	uDG
AP endonucleasa-1	APE1
5'- desoxirribosa fosfato	dRP
8-oxoG ADN-glicosilasa	OGG1
Endonucleasa III	NTH1
Polimerasa β	Pol β
Fosfatasa de la polinucleótido cinasa	PNKP
X-ray cross complementing protein -1	XRCC1
Polimerasa δ/ϵ	Pol δ/ϵ
Flap endonucleasa-1	FEN-1
Factor de procesamiento antígeno nuclear de proliferación celular	PCNA
ADN-ligasa I	Lig I
Xeroderma pigmentosum	XP
Reparación global del genoma	GG-NER
Reparación acoplada a la transcripción	TC-NER
Proteína de replicación A	RPA
Formamidopirimidina glicosilasa	FPG
Células troncales embrionarias	ESC
Isobutil-metilxantina	IBMX
Lipoproteína lipasa	LPL
Proteína cinasa A	PKA

Índice de tablas y figuras

Figura 1. Daño al ADN, mecanismos de reparación y consecuencias.....	9
Figura 2. Estructura química de las lesiones a bases y sitios abásicos más comunes.....	12
Figura 3. Actividad de las Glicosilasas mono- y bi-funcionales.....	14
Figura 4. Mecanismo clásico de BER. “Short & Long Patch”.....	17
Figura 5. Mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (NER) y sus sub-vías: GG-NER y TC-NER.....	21
Figura 6. Propiedades de una célula troncal.....	23
Figura 7. Esquema global de reparación tras la diferenciación.....	27
Figura 8. Clasificación de categorías de daño al ADN.....	39
Figura 9. Incremento en la expresión de hFATP-1.....	44
Figura 10. Cambios morfológicos celulares durante el esquema de diferenciación.....	47
Figura 11. Tinción de rojo oleoso en hAD-MSC y células diferenciadas.....	48
Figura 12. Tinción de rojo oleoso en adipocitos día 14 obtenidos a partir de hAD-MSC.....	49
Figura 13. Ciclo celular en hAD-MSC y células diferenciadas.....	50
Figura 14. Evaluación de generación y remoción de daño en hAD-MSC.....	52
Figura 15. Evaluación de la respuesta reparativa de BER para remover 8-OxoG en hAD-MSC	55
Figura 16. Los adipocitos tienen un daño basal al ADN mayor con respecto a las hAD-MSC.....	57
Figura 17. Comparación de daño basal en el ADN, hAD-MSC Vs. Adipocitos.....	57
Figura 18. Los adipocitos presentan una mayor cantidad de 8-OxoG de manera basal.....	58
Figura 19. Comparación de 8-OxoG presentes de manera basal, hAD-MSC Vs. Adipocitos.....	59
Figura 20. Comparación entre hAD-MSC y adipocitos en la generación y remoción de lesiones.....	61
Figura 21. Los adipocitos tienen menor capacidad de remover las 8-OxoG generadas por el tratamiento en comparación con las hAD-MSC.....	62
Tabla R1. Inmunofenotipificación de hAD-MSC.....	43
Tabla R2. Monitoreo de expresión de marcadores en Adipocitos día 14.....	45
Tabla R3. Viabilidad celular de hAD-MSC (curva dosis-respuesta).....	53
Tabla R4. Viabilidad de hAD-MSC y Adipocitos a las condiciones de trabajo.....	63

Resumen

La información genética de todo ser vivo está constantemente bajo la agresión de moléculas reactivas. Se ha estimado que aproximadamente 10^5 lesiones al ADN por célula son producidas diariamente en el genoma de mamíferos, de las cuales, alrededor de 10^4 se deben oxidación de bases y rupturas de cadena sencilla (SSBs por sus siglas en inglés), causadas en su mayoría por especies reactivas de oxígeno (ROS).

Para mantener la integridad y función adecuada del genoma, la célula requiere de mecanismos de reparación competentes para la respuesta al daño en el ADN (DDR), la cual consiste en escanear, detectar y reparar estos eventos.

Los mecanismos de reparación del ADN, involucran proteínas específicas dependiendo de la lesión, la fase del ciclo celular y el tipo celular. En particular, las células troncales (SC) tienen la habilidad de auto-renovación y el potencial de diferenciarse en diversos tipos celulares, además de permanecer preferencialmente en la fase G0 del ciclo celular, lo cual minimiza la probabilidad de errores en la replicación y reduce la tasa metabólica que conlleva a una producción reducida de ROS.

Resulta interesante cómo el estudio de las células troncales humanas ha establecido un panorama nuevo en el entendimiento la función de los mecanismos de reparación del ADN dada su capacidad de auto-renovación y diferenciación. Cabe destacar que se han observado contrastes y diferencias importantes entre las células troncales y las células diferenciadas con respecto a la actividad y eficiencia de los mecanismos de reparación del ADN.

En este trabajo se describe, cuantifica y compara la respuesta reparativa de células troncales adultas humanas con respecto a las diferenciadas en el contexto de lesiones de tipo oxidante en el ADN generadas por la exposición a un producto metabólico mitocondrial habitual (H_2O_2), a través de la electroforesis unicelular (ensayo cometa). Para lo anterior, se empleó un modelo *in vitro* de SC humanas adultas derivadas de tejido adiposo (hAD- MSC), que posteriormente fueron diferenciadas a adipocitos, para evaluar las diferencias en la remoción de daño al ADN. Los resultados indican que además de generar niveles de daño oxidativo en el ADN menores aún después de un reto oxidante ($100 \mu M H_2O_2 / 2 h$), las SC son capaces de remover en su totalidad estas lesiones en el genoma, mientras que los adipocitos acumulan el daño oxidante en el ADN, proceso que no afecta la viabilidad de la población celular. De manera importante, estos hallazgos concuerdan con lo obtenido de la evaluación de las lesiones de tipo 8-OxoG, que son reparadas por el mecanismo de reparación por escisión de bases (BER). Los resultados indican que las SC humanas adultas son más eficientes en remover el daño en el ADN de tipo oxidante en comparación con las células diferenciadas, *in vitro*.

Marco Teórico

Daño en el ADN

El ADN es la biomolécula donde está contenida la información genética de cada célula de un organismo y, dada su naturaleza, es capaz de reaccionar con una gran cantidad de agentes lo cual puede dañarla teniendo implicaciones importantes en el desarrollo de diversas patologías [Iyama T. *et al.*, 2013]. Estos agentes se han clasificado en dos grandes grupos: endógenos y exógenos. El primero, y más frecuente, está conformado por aquellas especies producidas dentro de la célula por procesos metabólicos, como son las ROS y la especies reactivas de nitrógeno (RNS), que desencadenan reacciones de oxidación [Nickoloff & Hoekstra, 1998; Hedge *et al.*, 2012; Thomson, 2012]. La producción de estos agentes también incrementa por algunos agentes exógenos (por ejemplo la IR). El grupo de agentes exógenos está subdividido en físicos (IR, UVC, etc.) y químicos (medicamentos anticancerígenos, metales pesados, etc.) [Dizdaroglu, 2012, Martin et al. 2010] cuya acción dependerá de la naturaleza del agente. Se sabe que $\sim 10^4$ de los $\sim 10^5$ eventos que se presentan por día en las células de mamíferos corresponden específicamente a reacciones de oxidación y SSBs [Hedge et al., 2012], lo cual aunado al factor de exposición de cada individuo [Rodríguez-Sastre et al. 2014] y a su relación etiológica con diversas enfermedades [Hedge et al., 2012; Ramos-Espinosa et al. 2012], hace que este tipo de daño en el ADN tenga una gran importancia biológica y médica.

Daño por oxidación en el ADN.

El daño por oxidación al ADN principalmente involucra modificación de bases nucleicas [Berquist & Wilson, 2012], que suelen degenerar en sitios abásicos (AP) y SSBs, y en menor proporción existe la formación de lesiones oxidativas atípicas, es decir, que forman alteraciones tridimensionales en la molécula de ADN, también conocidas como abultamientos en el ADN. Las ROS y las RNS, son moléculas altamente reactivas, de las cuales las más estudiadas son el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el radical hidroxilo ($\bullet OH$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el óxido nítrico (NO^{\bullet}), el anión peroxinitrito ($ONOO^-$) y el hidrógeno en su forma iónica (H^{\bullet}) [Rahman et al., 2012]. De los cuales, el radical hidroxilo tiene una gran importancia ya que reacciona con una gran cantidad de biomoléculas como el ADN causando daño a las bases heterocíclicas y a la fracción de azúcar de los nucleótidos mediante diversos mecanismos [Krystona et al., 2011, Agnez-lima et al., 2012; Dizdaroglu, 2012] y que además es producto del H_2O_2 en reacciones conocidas como “tipo Fenton”.

Debido a sus sitios susceptibles a ataques nucleofílicos, la guanina es la base más vulnerable a la oxidación y el producto mayoritario es la 8-OxoGuanina (**8-oxoG**), la cual es originada por la reacción con $\bullet OH$ y representa la principal lesión en el ADN en humanos y que al no ser reparada genera un cambio de base durante la transcripción y la replicación del ADN (G unida con T o bien G unida con U) [Berquist & Wilson, 2012].

De no ser reparadas estas modificaciones en la secuencia genómica se pueden iniciar procesos patológicos importantes que contribuyen en el desarrollo y progreso de enfermedades degenerativas, particularmente cáncer y desórdenes neurológicos tanto

hereditarios como adquiridos incluyendo Alzheimer, Parkinson y Huntington así como en el envejecimiento [Hedge et al., 2012]. Es por eso que, para contender con este daño, las células emplean diversos mecanismos encargados de salvaguardar la integridad del genoma mediante vías específicas para cada tipo de lesión y que actúan en coordinación con la maquinaria del ciclo celular [Huertas, 2010].

Mecanismos de reparación del ADN y sus vías.

La reparación del ADN es el proceso celular dirigido a la corrección del daño antes de resultar en una mutación, aberración cromosómica, conducir a muerte celular o bien la tumorigénesis. Si bien la supervivencia de una especie al paso del tiempo puede ser optimizada por la variabilidad genética, las células de un individuo deben mantener la estabilidad genética en todo momento para que estos eventos no conduzcan a la muerte del mismo [Srivastava et al., 2009].

En años recientes varios reportes han sugerido que el daño al ADN puede inducir cambios en eventos de plegamiento de la cadena transcrita, lo cual puede dar lugar a variantes de mRNAs que codifican para diferentes isoformas de proteínas con el potencial de afectar la respuesta y el destino celular [Lenzken et al., 2013].

Hay múltiples tipos de daño al ADN (abultamiento por aductos, rompimiento de hebras, mal apareamiento de bases, entrecruzamientos, sitios apurínicos o apirimídicos (AP), modificaciones de bases, etc.), cada uno es atendido por una respuesta celular específica denominada mecanismos de reparación del ADN (Figura 1). En el genoma humano se han encontrado más de 130 genes relacionados con estos procesos [Decordier et al., 2010].

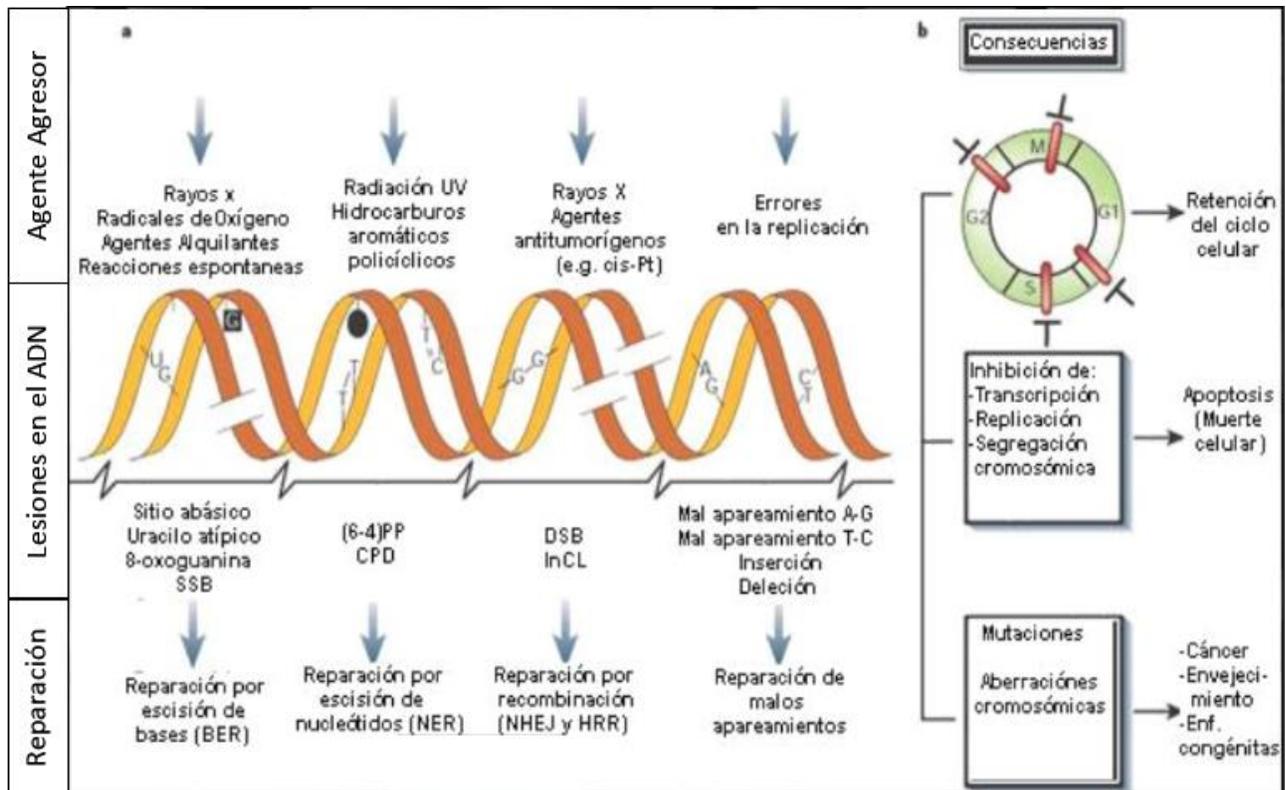


Figura 1. Daño al ADN, mecanismos de reparación y consecuencias. **a.** Agentes dañinos al ADN comunes (arriba); ejemplos de lesiones inducidas por estos agentes (en medio); mecanismo de reparación del ADN encargado de remover la lesión (abajo). **b.** Efectos del daño al ADN sobre el progreso habitual del ciclo celular, conduciendo a la retención en las fases G1, S, G2 y M (arriba), y en el metabolismo del ADN (en medio). Consecuencias a largo plazo de daño al ADN (abajo), que incluyen cambios permanentes a la secuencia del ADN (mutaciones puntuales que pueden afectar un solo gen o aberraciones cromosómicas que pueden incluir múltiples genes) y sus efectos biológicos. Adaptada de [Hoeijmakers, 2001]. Cis-Pt: cisplatino y MMC: mitomicina C (ambos agentes generadores de entrecruzamientos); (6-4)PP: 6-4 fotoproductos y CPD: dimeros de ciclobutano pirimidina. (ambos generados por radiación UV).

Los principales mecanismos de reparación en humanos son: reparación por escisión de bases (BER), reparación por escisión de nucleótidos (NER) y reparación de errores de apareamiento (MMR); además de dos mecanismos encargados de las lesiones que involucran las dos hebras del ADN generadas principalmente por agentes exógenos como la radiación (UV, x, γ) que son los entrecruzamientos intracatenarios (ICLs) y los rompimientos de doble cadena (DSBs), la reparación por unión de terminaciones no homólogas (NHEJ) y reparación por recombinación homóloga (HRR) [Huertas, 2010] estos

últimos se coordinan guardando una relación íntima con la fase del ciclo celular al momento de la detección de la lesión.

La generación de rompimientos de cadena sencilla, SSBs, y alteraciones estructurales de las hebras del ADN, son causadas por diversos tipos de agentes de los cuales la mayoría son de naturaleza oxidante, así mismo, los mecanismos de reparación de ADN involucrados en su restauración son muy eficientes con la finalidad de conservar la fidelidad de la información genética.

Los mecanismos involucrados en la reparación de rompimientos de cadena simple y lesiones intracatenarias son: la reparación por escisión de bases (BER), reparación por escisión de nucleótidos (NER) y reparación de apareamientos erróneos (MMR), de los cuales el mecanismo encargado de reparar las bases nucleicas oxidadas (como las 8-OxoG) en el ADN es el primero. Dado que es de nuestro particular interés evaluar la remoción de lesiones oxidativas, como las ocasionadas por el peróxido de hidrógeno; H₂O₂. En el presente trabajo se abordan principalmente los mecanismos de escisión (BER y NER).

Reparación por Escisión de Bases (BER)

La BER corrige lesiones a bases nucleotídicas que no distorsionan la estructura helicoidal de la molécula de ADN, sitios AP (espacio físico en el ADN carente de una base nucleotídica) y SSBs. Dichas lesiones generalmente provienen de desaminación, oxidación o alquilación. Por tanto, la mayoría del daño proviene del metabolismo celular o bien, por exposición a agentes exógenos químicos (metales pesados, fármacos, drogas, etc.) y físicos (radiación). La identificación de la uracilo-ADN-glicosilasa (uDG) de *Escherichia coli*

en 1974 por Thomas Lindahl marcó el descubrimiento de BER. La enzima descrita en 1974 en el trabajo de Lindahl y colaboradores [Lindahl, 1974] se refiere a una enzima capaz de cortar el enlace entre el uracilo y la desoxirribosa. En su momento, fue sugerido que el sitio AP se procesaba por una AP-endonucleasa, una exonucleasa, una ADN-polimerasa y una ligasa, describiendo entonces los pasos fundamentales de la BER. Las enzimas que cortan el enlace entre la desoxirribosa y una base en el ADN, ya sea modificada o mal apareada, se conocen como ADN-glicosilasas. Existe una gran diversidad de lesiones de tipo oxidante (Figura 2), dentro de las cuales la producida más abundantemente es la 8-OxoG debido a la susceptibilidad de la guanina a reacciones de oxidación. Estos productos son reconocidos por una o algunas ADN-glicosilasas las cuales inician el proceso de BER [Krokan & Bjørnas, 2013].

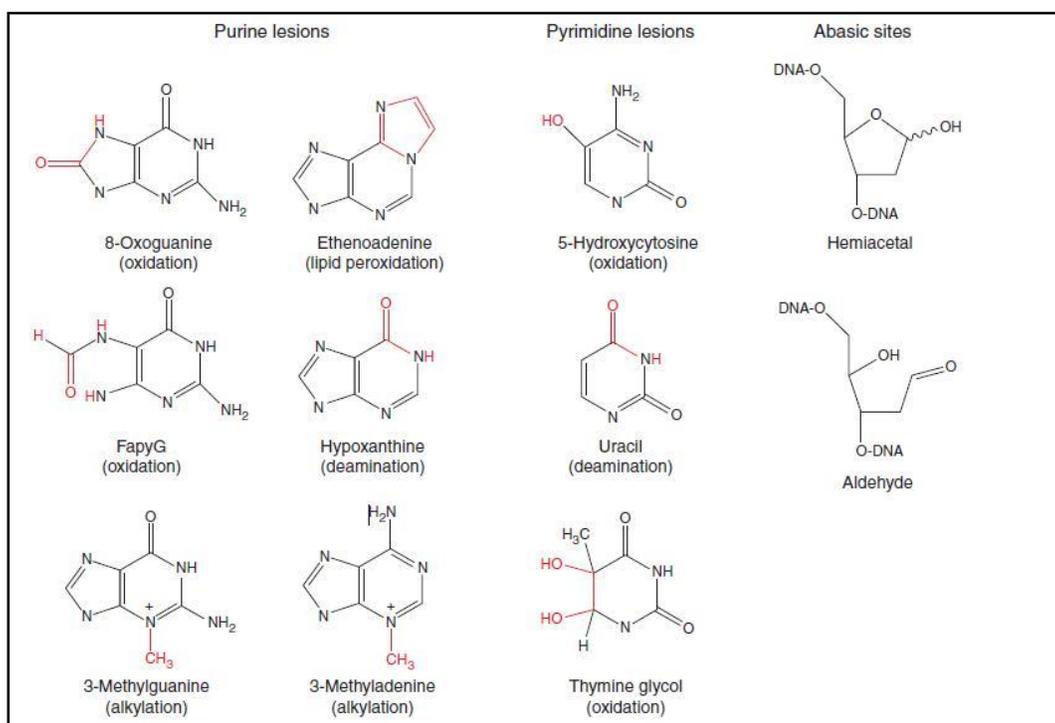


Figura 2. Estructura química de las lesiones a bases y sitios abásicos más comunes. La 8-OxoG es el producto mayoritario de una reacción de oxidación causada tanto por agentes endógenos como exógenos. Adaptada de [Krokan & Bjørnas, 2013].

El proceso de BER puede ser simplificado en 5 pasos fundamentales: (1) Reconocimiento y escisión de la base del ADN dañada, (2) incisión del sitio AP resultante, (3) “limpieza” o procesamiento de las terminaciones del ADN, (4) inserción del nucleótido apropiado al sitio de reparación (“gap”), y por último (5) la ligación de la incisión en el esqueleto de fosfatos. Cada paso es ejecutado por enzimas específicas, altamente coordinadas tanto por interacciones proteína-proteína como por la formación de complejos. En el reconocimiento (paso 1) y escisión de la base dañada (paso 2) participan las glicosilasas, éstas son clasificadas en mono- y bi-funcionales con base en su mecanismo de reacción (**Figura 3, Tabla 1**), en el caso de una glicosilasa monofuncional como la uracil-ADN-glicosilasa se extrae solamente la base generando un sitio AP. Para la incisión del sitio AP, participa la AP endonucleasa-1 (APE1), este paso consiste en la generación de un corte en el lado 5' del sitio abásico provocando un SSB y por ende generando una terminación 3'-hidroxilo y una 5'- desoxirribosa fosfato (dRP). En contraste, las ADN-glicosilasas bifuncionales tienen asociada una actividad débil de liasa, como es el caso de la 8-oxoG ADN-glicosilasa (OGG1), que realiza este segundo paso generando un SSB y formando terminaciones diferentes. Por ejemplo, OGG1 y el homólogo de la endonucleasa III (NTH1) tienen una actividad β -liasa creando un “gap” con distancia de un nucleótido con terminaciones 3'-aldehído- α,β -insaturado y 5'-hidroxilo, mientras que otras glicosilasas generarán terminaciones diferentes que requieren ser procesadas [Almeida & Sobol, 2007, Nemeca et al., 2010; Wilson et al., 2011; Parsons, 2013; Moorea et al. 2013].

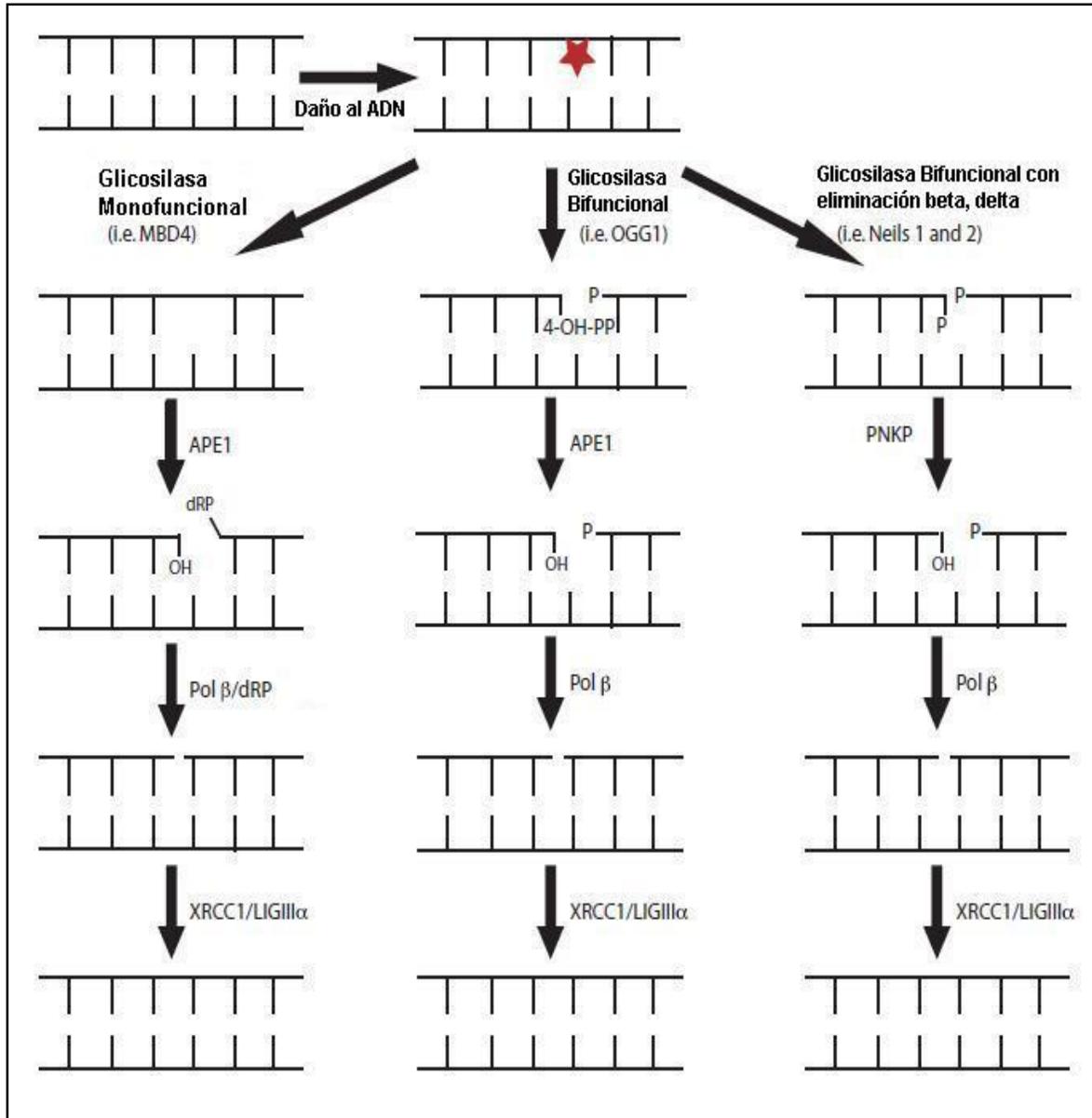


Figura 3. Actividad de las Glicosilasas mono- y bi-funcionales. Posterior a la actividad de la glicosilasa el mecanismo procederá dependiendo del tipo de terminaciones generadas durante la escisión. Hay cinco pasos principales en el mecanismo de BER: (1) Escisión de la base dañada; (2) Incisión del sitio AP; (3) Modificación de las terminaciones del ADN en el sitio de corte; (4) Llenado del “gap”; (5) Cierre de la incisión por las ligasas. En el caso de glicosilasas monofuncionales (i.e. MBD4), la base dañada es removida dando como resultado un sitio AP. APE1 realiza los cortes en los enlaces fosfodiéster del sitio AP dejando un extremo 3’OH y 5’dRP. Polβ remueve el dRP mediante su actividad de liasa y coloca en nucleótido apropiado. En el caso de las glicosilasas bifuncionales (i.e. OGG1) la base dañada es removida y la glicosilasa hace la incisión en el sitio abásico dejando un extremo 3’ 4-OH pentenal fosfato (4-OH-PP) y 5’ fosfato. APE1 modifica el extremo a 3’OH y Polβ rellena el “gap”. En la vía independiente de APE1, las glicosilasas bifuncionales (i.e. NEIL 1 y 2) remueven la base dañada y escinden el sitio abásico vía eliminación β, δ, generando extremos 3’ y 5’ fosfato. PNKP modifica el extremo a 3’OH y Polβ rellena el “gap”. En el último paso, el ADN es ligado por el complejo XRCC1/LigIIIα. Adaptada de [Srivastava et al. 2009].

El tercer paso de la BER involucra la “limpieza” o procesamiento de estas terminaciones para que sean las apropiadas para la incorporación del nucleótido y la ligación, proceso que es realizado por enzimas específicas a la naturaleza de las terminaciones. Aquellas que contienen fracciones 5'-dRP generadas por glicosilasas monofuncionales, o vía BER clásica, son tratadas por la ADN-polimerasa β (Pol β) y las terminaciones 3'aldehído- α,β -insaturado o 3'-fosfato creadas por glicosilasas bifuncionales son procesadas por APE1 y la fosfatasa de la polinucleótido cinasa (PNKP) respectivamente [Almeida & Sobol, 2007, Nemeca et al., 2010; Wilson et al., 2011; Parsons, 2013; Moorea et al. 2013].

El cuarto paso en la BER es realizado por la Pol β la cual adiciona el nucleótido correspondiente al sitio AP y finalmente, la XRCC1 (X-ray cross complementing protein -1) y la ligasa III α sellan la hendidura en el esqueleto de fosfatos de la molécula del ADN. De esta forma se completa la vía “short-patch” del mecanismo de BER (**Figura 4**), mediante el cual la mayoría de las lesiones a bases del ADN son reparadas [Almeida & Sobol, 2007, Nemeca et al., 2010; Wilson et al., 2011; Parsons, 2013; Moorea et al. 2013].

En caso de que las terminaciones 5' del SSB en el paso 3 sean resistentes al procesamiento, después de la inserción del nucleótido apropiado, se efectúa un cambio de polimerasa, de la Pol β a la polimerasa δ/ϵ (Pol δ/ϵ), la cual inserta ~2-10 nucleótidos adicionales al “gap” de reparación. Esto genera una terminación 5' con estructura de tapa (“5'-flap”) la cual es reconocida y escindida por la flap endonucleasa-1 (FEN-1) en asociación con el factor de procesamiento antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). Por último la ADN-ligasa I (Lig I) sella la apertura remanente en el esqueleto de fosfatos

con lo cual se completa la vía “long-patch” de BER (**Figura 4**) [Almeida & Sobol, 2007, Nemeca et al., 2010; Wilson et al., 2011; Parsons, 2013; Moorea et al. 2013].

El balance entre las vías “long-patch” y “short-patch” de la BER radica en la concentración de las enzimas y proteínas de andamiaje y la presencia de lesiones bloqueadoras de la terminación 5’ en el sitio de reparación (**Figura 4**) [Dalhus et al. 2009].

Interesantemente se ha observado que PARP-1 es uno de los primeros factores en unirse al intermediario SSB, una vez unido PARP-1 se activa y pasa por auto-poli(ADP)ribosilación. Esta activación parece facilitar la BER dado que el tratamiento de células con un inhibidor de PARP-1 bloquea la BER y se observa un incremento en lesiones tipo intermediarios SSB, especialmente cuando hay una deficiencia de la enzima/cofactor clave de la BER, XRCC1 o ADN polimerasa β (Pol β) [Michelle et al., 2010].

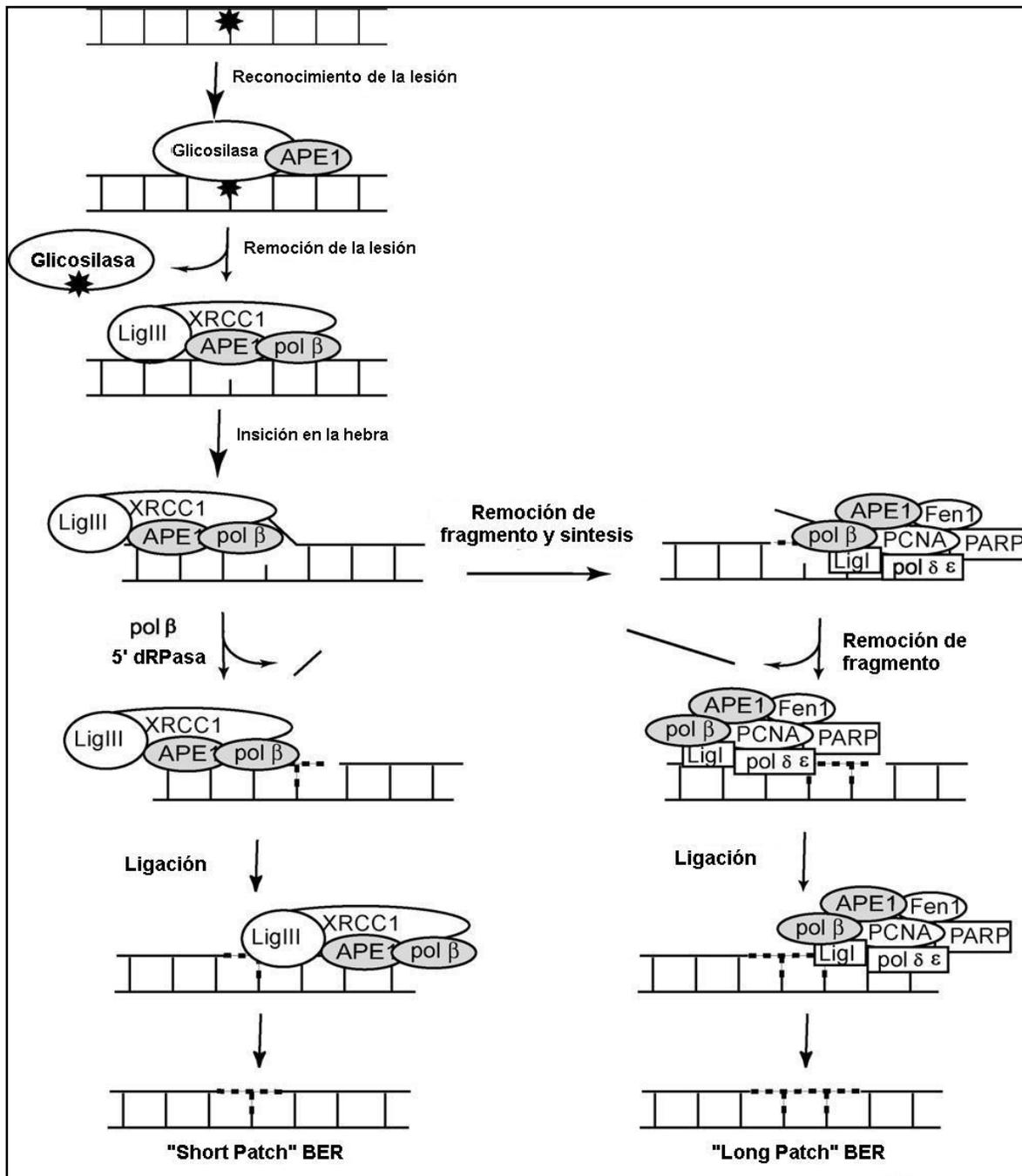


Figura 4. Mecanismo clásico de BER. La vía "Short Patch" (izquierda) donde la actividad de la glicosilasa es la iniciadora, seguida por la escisión de la cadena por APE1. Formación del "gap" (5'dRP liasa) y finalmente la incorporación de nucleótidos mediada por Polβ. El corte remanente es sellado por el complejo XRCC1/LigIIIα. La vía "Long Patch" (derecha) es la responsable de reparar lesiones donde los extremos son refractarios al corte de Pol β. En esta vía la incorporación de nucleótidos es realizada por Polδ y Polε. La terminación refractaria es removida como parte de un segmento mayor escindido por FEN-1 y la ligación es realizada por Lig I. Adaptada de [Almeida & Sobol, 2007].

Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER)

Este mecanismo de reparación es uno de los más importantes, capaz de corregir una amplia gama de lesiones a bases que inducen la modificación de la estructura helicoidal propia del ADN. Los sustratos para la NER incluyen foto-lesiones inducidas por UV como son los CPDs, 6-4PP, así como otros abultamientos generados por diversos compuestos químicos oxidantes. En humanos, los defectos hereditarios en el sistema NER están asociados con varios desordenes autosómicos recesivos, incluyendo xeroderma pigmentosum (XP), el cual es caracterizado por fotosensibilidad y predisposición a cáncer de piel por exposición a luz solar. Dentro de los 8 grupos genéticos complementarios de XP, las mutaciones de siete (XP-A, XP-B, XP-C, XP-D, XP-E, XP-F, XP-G) confieren defectos en la funcionalidad de la NER, debido a esto, los genes responsables han sido clonados y los roles de sus productos proteicos en el mecanismo molecular de NER han sido estudiadas extensamente [Staresinic et al., 2009; Waters et al., 2009; Sugasawa, 2010; Li et al., 2013; Lehmann, 2011; Melis et al., 2011].

La NER consiste en dos diferentes vías para el reconocimiento del daño al ADN. La primera, denominada reparación global del genoma (GG-NER), repara lesiones a lo largo de todo el genoma en cualquier momento. La segunda, llamada reparación acoplada a la transcripción (TC-NER), remueve lesiones específicamente de la cadena de ADN transcrita en la secuencia de los genes activos, ésta inicia cuando la ADN polimerasa (δ/ϵ) es bloqueada por los sitios dañados [Staresinic et al., 2009; Waters et al., 2009; Sugasawa, 2010; Li et al., 2013; Lehmann, 2011; Melis et al., 2011].

Se sabe que TC-NER contribuye a la pronta restauración de la actividad transcripcional bloqueada por el daño al ADN, previniendo entonces que se desencadene el proceso de

apoptosis en las células afectadas. Por otra parte, la remoción de las lesiones generadas en la secuencia de ADN no transcrita y en las regiones genómicas transcripcionalmente inactivas depende totalmente de GG-NER. Esta última es particularmente importante ya que disminuye la incidencia del bloqueo de los complejos de replicación debido al daño a la secuencia a transcribir, y en consecuencia reduce la probabilidad de adquirir mutaciones y aberraciones cromosómicas [Staresincic et al., 2009; Waters et al., 2009; Sugasawa, 2010; Li et al., 2013; Lehmann, 2011; Melis et al., 2011].

A pesar de las diferencias en las vías de NER para reconocer el daño, las reacciones sucesivas para la reparación de las lesiones correspondientes a este mecanismo son semejantes. Mientras que en GG-NER el reconocimiento del daño es mediado por un complejo que incluye a XPC en TC-NER el reconocimiento es iniciado por el bloqueo de la ARN-polimerasa II y CSB. Una vez realizado el reconocimiento por los factores descritos ambas vías de NER proceden igual [Staresincic et al., 2009; Waters et al., 2009; Sugasawa, 2010; Li et al., 2013; Lehmann, 2011; Melis et al., 2011].

Estos complejos son los encargados de reclutar a TFIIH, que así como sucede en los sitios promotores de iniciación de transcripción, promueve la apertura local del dúplex de ADN en los sitios del daño. Las actividades de ATPasa de XPB y XPD facilitan la apertura del dúplex de ADN, permitiendo al complejo de pre-incisión (XPG y XPA, así como la proteína de replicación A; RPA) introducirse al sitio de la lesión, lo cual es esencial para la iniciación del proceso de incisión/escisión de la secuencia dañada [Staresincic et al., 2009; Waters et al., 2009; Sugasawa, 2010; Li et al., 2013; Lehmann, 2011; Melis et al., 2011].

La proteína RPA consiste en 3 subunidades que con gran afinidad se unen a la secuencia de ADN sin daño. Esta proteína cubre apenas 30 nucleótidos (que corresponde en tamaño a la secuencia escindida en NER) y se cree que desempeña un papel como protector de cadenas sencillas de ADN para evitar que sean atacadas por nucleasas [Staresincic et al., 2009; Waters et al., 2009; Sugasawa, 2010; Li et al., 2013; Lehmann, 2011; Melis et al., 2011].

Cuando el complejo de pre-incisión está instalado adecuadamente, se efectúan los SSB por XPG y ERCC1-XPF cuyas acciones combinadas resultan en la escisión de un fragmento de ADN de cadena sencilla de 24-32 nucleótidos, el cual incluye el sitio dañado. Mientras que XPG realiza el corte 3', el dímero ERCC1-XPF lo realiza en 5'. Staresincic *et al.* en el 2009 proponen un mecanismo de “corte-parche-corte-parche” que implica que la incisión 5' preceda a la 3' [Staresincic et al., 2009; Waters et al., 2009; Sugasawa, 2010; Li et al., 2013; Lehmann, 2011; Melis et al., 2011].

Para la síntesis de la cadena procesada se requiere de PCNA debido a su afinidad por las ADN polimerasas por lo que es reclutada al sitio por XPG y RPA. Las polimerasas Pol δ , Pol κ y Pol ϵ son las encargadas de la síntesis de la secuencia escindida. Finalmente el complejo XRCC1/LigIII α es el encargado el proceso de ligación. A la fecha se conoce que son 30 las proteínas que conforman el mecanismo de NER para contrarrestar los daños en el ADN descritos previamente (**Figura 5**) [Staresincic et al., 2009; Waters et al., 2009; Sugasawa, 2010; Li et al., 2013; Lehmann, 2011; Melis et al., 2011].

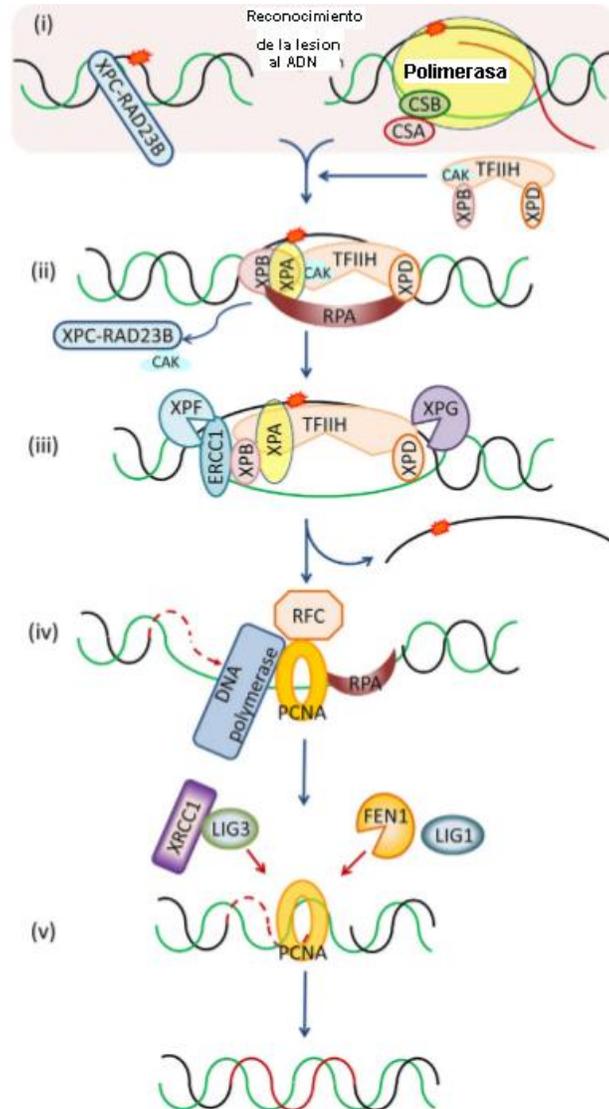


Figura 5. Mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (NER) y sus sub-vías: GG-NER y TC-NER. (i) XPC-RAD23B reconocen el daño al ADN como paso inicial en GG-NER. TC-NER es iniciado por el bloqueo de la maquinaria de transcripción debido a la modificación estructural de la secuencia del gen transcripcionalmente activo. Posterior al reconocimiento de la lesión, GG-NER y TC-NER involucran componentes proteicos afines. (ii) el complejo TFIID es reclutado posterior al reconocimiento. Mediante la actividad de helicasa de las subunidades XPB y XPD, TFIID promueve la apertura del dúplex de ADN alrededor de la lesión, facilitando el reclutamiento de XPA y RPA. (iii) el complejo XPF-ERCC1 es reclutado al sitio de la lesión mediante interacción directa con XPA, mientras que XPG es anclado de manera específica mediante la interacción con TFIIH. Dos endonucleasas, XPF-ERCC1 y XPG, son responsables de realizar la incisión 5' y 3', respectivamente, en el área afectada. (iv) posterior a la doble incisión y a la remoción del fragmento oligonucleotídico que contiene el daño, la ADN polimerasa comienza a rellenar el "gap" en cooperación con RFC y PCNA. (v) finalmente, el corte es sellado tanto por XRCC1/LigIII α como por FEN1/LigI. CAK: Cinasa activadora de la ciclina dependiente de cinasa; RFC Factor de replicación C. Adaptada de [Iyama et al., 2013].

Todas las células del organismo están expuestas al daño en el ADN en mayor o menor medida dependiendo de sus requerimientos energéticos o bien de la función que desempeñan, por ejemplo, el metabolismo altamente oxidativo de las neuronas o el músculo esquelético [Ramos-Espinosa et al., 2012], la capacidad de acumular lípidos de los adipocitos, la alta tasa de recambio de las células de la piel y de las microvellosidades intestinales [Harfouche & Martin, 2010] o bien, el metabolismo poco oxidativo de las células troncales (SC) debido a su baja cantidad de mitocondrias entre otros procesos que resultan en protección adicional al daño al ADN [Reily et al., 2013]. Con base en esto, la respuesta ante la presencia de daño en el ADN debe ser específica para ajustarse a las demandas de cada tipo celular bajo sus contextos específicos de exposición.

Células Troncales: Fisiología, reparación del ADN y diferenciación.

Fisiología

Mucho del conocimiento respecto a las células troncales proviene de los numerosos estudios en el sistema hematopoyético y pesar de lo exhaustivo de estos, existen aún muchas incógnitas en este campo de estudio. Una definición genérica para las células troncales es “poblaciones de células capaces de dividirse simétrica y asimétricamente para auto-renovarse o diferenciarse en múltiples tipos de progenie diferenciada” [Cai et al. 2004].

Una gran cantidad de SC han sido identificadas y han sido clasificados en 2 grupos principales: las células troncales embrionarias (ESC) y las células troncales adultas. Las primeras provienen de las capas internas del blastocisto y tienen la capacidad de

diferenciarse en todos los tipos celulares que conforman el cuerpo humano. Las segundas son aquellas que se encuentran en el organismo de manera posnatal y que conservan las propiedades de troncalidad (auto-renovación y potencial de diferenciación) a lo largo de la vida. Adicionalmente, las SC adultas han sido identificadas en distintos nichos en el organismo además de la médula ósea) [Carlson et al. 2009]. Estas células mantienen la homeostasis tisular a largo plazo, el proceso fisiológico responsable de la estabilidad interna de renovación de órganos, incluyendo el número constante apropiado de células, así como la regeneración en respuesta al daño (pérdida de la celularidad por diversos factores) [Reily et al., 2013].

Se han descrito diferentes grados de troncalidad, esto se refiere al potencial de diferenciación que tiene determinada población de SC. A pesar de que la mayoría de las células troncales adultas se encuentran en estado quiescente del ciclo celular, cuando se dividen se obtienen tres posibles resultados. El primero consiste en que ambas células hijas mantengan su capacidad de SC (simétrica). En el segundo, una célula hija mantiene las propiedades de SC pero la otra adquiere propiedades más restringidas y se considera intermediaria (asimétrica). El último resultado consiste en que ambas células sean intermediarias (figura 7) [Carlson et al. 2009].

Si lo anterior se analiza conforme a potencial de diferenciación, la SC primaria, también llamada "*long-term SC*", tiene un mayor potencial de diferenciarse a una mayor cantidad de tipos celulares mientras que la secundaria, llamada "*short-term SC*" tienen una mayor restricción en potencialidad. Siguiendo esta lógica, debajo de esta cadena se encuentran las células de amplificación transitoria, estas están restringidas a un solo linaje celular y son las encargadas de generar la población celular encargada de regenerar el tejido dañado

o que requiera nuevas células. Es importante señalar que un tejido u órgano puede tener más de un tipo de SC [Carlson et al. 2009].

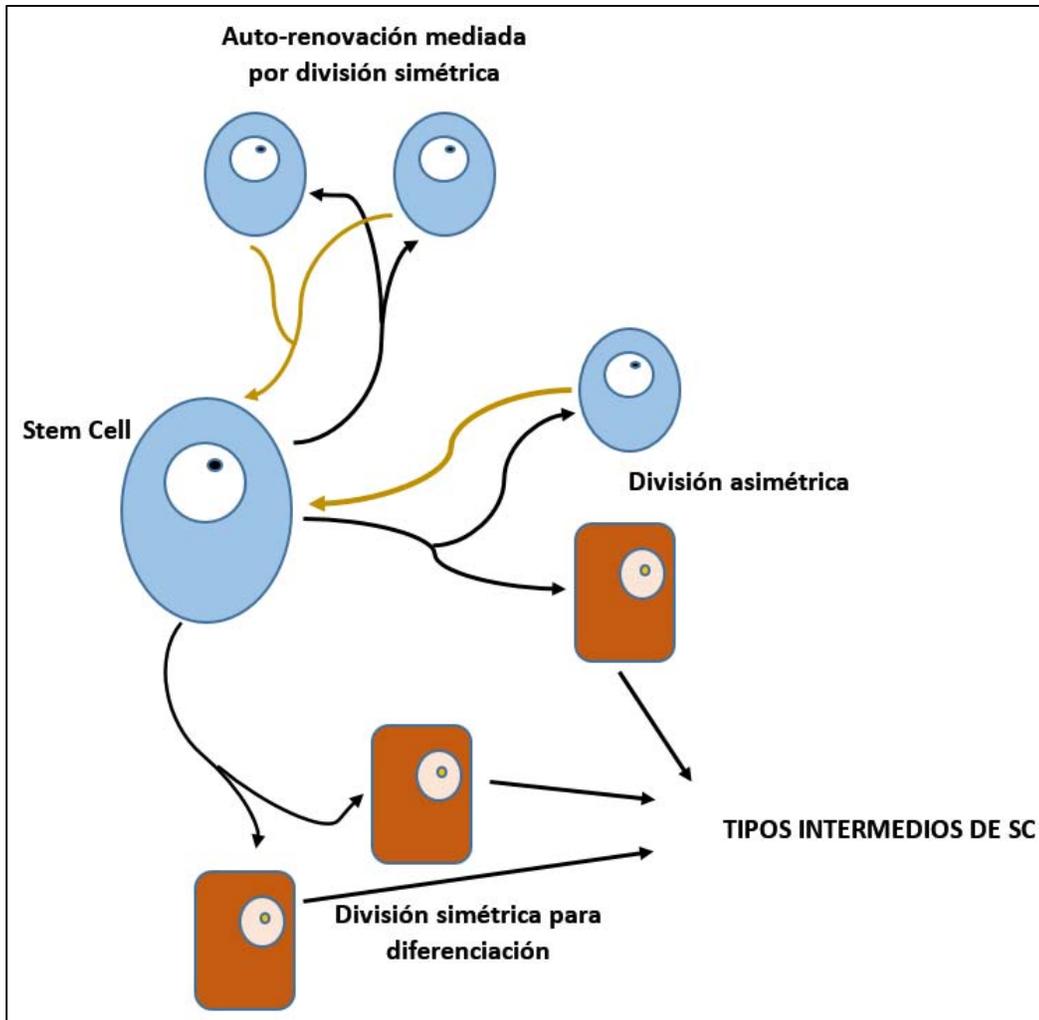


Figura 7. Propiedades de una célula troncal. División simétrica y asimétrica que efectúan las SC. Adaptada de [Carlson et al. 2009].

Un tipo de célula troncal adulta está representada por las células mesenquimales multipotentes, éstas pueden ser aisladas de diversas fuentes; médula ósea, músculo y tejido adiposo. Estas células con gran plasticidad de diferenciación, que pueden adquirir perfiles de expresión y fenotipos funcionales de otros tejidos, incluso de endodermo o

ectodermo [Flores-Figueroa et al. 2006], tienen una gran relevancia en el campo de la medicina regenerativa, y se ha observado que sus índices de reparación de daño en el ADN están relacionados con la localización de las mismas en el organismo [Fortini et al., 2013].

Las alteraciones genéticas en células trocales adultas han sido implicadas en el impedimento de la capacidad de proliferación así como en el incremento del potencial tumorigénico y el envejecimiento [Kenyon & Gerson, 2007]. Se ha descrito que las células trocales además de los mecanismos de reparación emplean a la quiescencia, que es el estado celular fuera de ciclo (G0), lo cual les confiere una tasa metabólica baja y en conjunto disminuyen el riesgo de adquirir daño al ADN. Adicional a esto y en contraste con células diferenciadas las cuales tienen una mayor tasa metabólica y realizan respiración mitocondrial, las células troncales generan energía principalmente por medio de procesos anaerobios (glucólisis anaerobia) que les confiere una ventaja cito-protectora ya que la producción de ROS y RNS es considerablemente baja [Reily et al., 2013].

Reparación del ADN.

Las células troncales al igual que cualquier otro tipo celular, son susceptibles de sufrir daño en el ADN, cuando esto ocurre la célula activa la reparación requerida en función de la lesión generada [Decordier et al., 2010]. Si la reparación del daño no es exitosa, diversos procesos celulares se activan, tales como la senescencia, la apoptosis o bien, la diferenciación [Reily et al., 2013].

El destino de las células, después de recibir un daño al ADN, está determinado por la severidad del mismo, la tasa de reparación y adicionalmente por la activación o no de p53.

La persistencia de daño aunada a procesos de replicación, puede significar en apoptosis mediada por p53. Además de esta función, p53 funciona como supresor de genes (como es el caso de *nanog*) relacionados con la pluripotencia. Dicha represión es una de las correlaciones más importantes entre daño al ADN y pérdida de la pluripotencia derivando en diferenciación celular que es una manera de evitar la acumulación de mutaciones futuras en una poza auto-renovable de células. La sensibilidad al daño y la inducción de apoptosis por p53 es muy variable entre células troncales [Reily et al., 2013].

Si el daño escapa a la reparación o bien es reparado deficientemente, se fijará la lesión a manera de mutación en la reserva de células troncales, generando inestabilidad génica. El genoma mutado podría entonces ser propagado horizontalmente (por auto-renovación) o verticalmente (a la progenie mediante diferenciación). Estas mutaciones en SC tienen la posibilidad de ser amplificadas posteriormente por el proceso de expansión clonal y acumular más con el tiempo, lo que eventualmente puede degenerar en tumorigénesis [Maynard et al., 2008; Iyama et al., 2013; Reily et al., 2013].

Reparación del ADN tras la diferenciación celular.

Muy poco se sabe sobre los mecanismos moleculares por los cuales el proceso de diferenciación implica una disminución de la capacidad de reparación del ADN; algunos estudios sugieren que está relacionado al ahorro energético celular y a la optimización de funciones en células especializadas [Harfouche & Martin, 2010; Frosina, 2010]. Por un lado se ha reportado que la actividad de la NER disminuye durante la diferenciación que sufren células troncales humanas, sugiriendo que se debe a alteraciones sufridas durante este proceso en el complejo TFIIH como blanco de ubiquitinación. Análogamente, alteraciones

en los mecanismos de reparación BER, HRR, NHEJ y MMR han sido observadas bajo diversos esquemas experimentales [Nospikel & Hanawalt, 2000 & 2002; Casorelli et al., 2007; Hildrestrand et al., 2007 & 2009; Rolseth et al., 2008; Narciso et al., 2007; Prall et al., 2007; Sotiropoulou et al., 2010] y sugieren la disminución de la reparación ante el daño al ADN.

Maynard y colaboradores en el 2008 demostraron que las células troncales embrionarias (ESC) presentan una reparación del ADN más eficiente, en comparación con fibroblastos en respuesta a diversos agentes: H₂O₂, UVC, IR y psoralen, evaluados para la NER. Ensayos por microarreglos revelaron una mayor expresión de diversos genes relacionados con la reparación del ADN en células troncales embrionarias, entre ellos los característicos de la BER y la reparación de DSB comparado con células diferenciadas. En el mismo estudio, cuando se retaron las células troncales embrionarias frente a su contraparte diferenciada a H₂O₂, los niveles de la proteína OGG1 (la glicosilasa específica para remover las 8-OxoG) y APE1 se vieron incrementados. En concordancia, el nivel de las 8-oxoG detectadas fue menor en las células troncales embrionarias que en fibroblastos debido a una reparación de las lesiones oxidativas más eficiente (BER) [Reily et al., 2013; Maynard et al., 2008].

A pesar de los grandes avances en el campo de las células troncales poco se sabe sobre la manera en la que responden ante el daño en el ADN especialmente en células troncales adultas. De manera general, se habla de una reparación del daño al ADN más eficiente en las células troncales, comparada con células diferenciadas (**Figura 7**) en modelos murinos o bien células troncales embrionarias de humano.

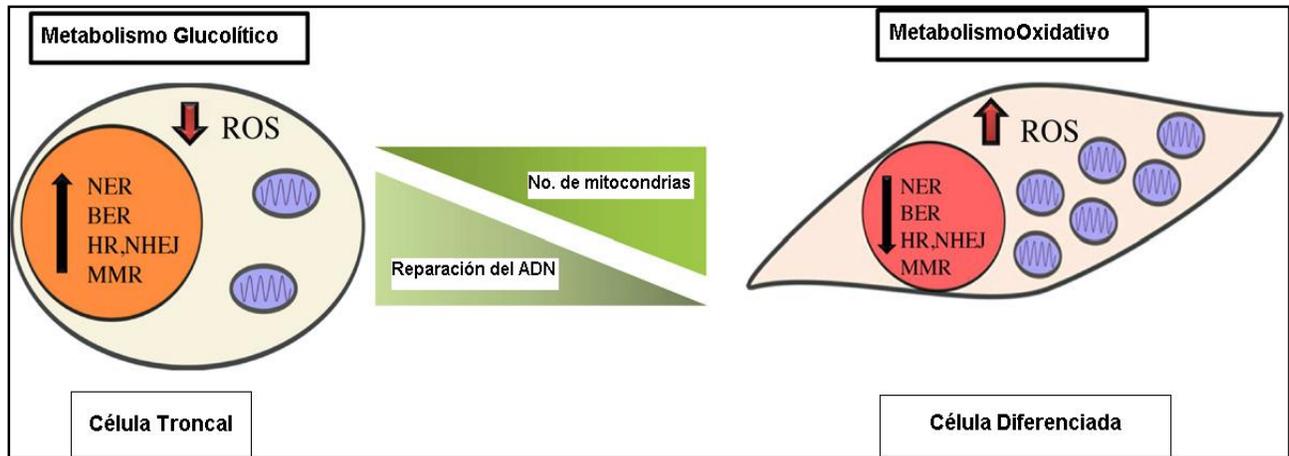


Figura 7. Esquema global de reparación tras la diferenciación. Respiración mitocondrial incrementada y reparación del daño al ADN reducida después de la diferenciación de células troncales. Las células troncales presentan mayor capacidad de reparación de daño al ADN y un bajo número de mitocondrias y dependen de procesos glucolíticos anaerobios. La oxidación mitocondrial es suprimida, resultando en producción de ATP mitocondrial y generación de ROS reducida. Durante la diferenciación ocurre el remodelado celular generando el estímulo para el incremento de cantidad de mitocondrias, oxidación y producción de ROS. Además de una disminución en la actividad de los principales mecanismos de reparación como una medida de controlar el gasto energético. Adaptada de [Reily et al., 2013].

A pesar de que el modelo propuesto por Reily et al. en el 2013 sugiere que el proceso de diferenciación *per se* modifica los patrones de reparación del ADN y que esta relación parece ser inversamente proporcional, algunos reportes [Ramos-Espinosa et al., 2012, Fortini et al. 2013, Harfouche & Martin, 2010] han demostrado que la diferenciación no siempre describe este patrón y que hay contextos en los cuales las células precursoras empleadas manifiestan niveles superiores de apoptosis en comparación con las diferenciadas [P. Fortini et al. 2013, Harfouche & Martin, 2010] o bien, que depende del tipo de agente genotóxico empleado y de los tipos celulares a comparar. Un claro ejemplo es documentado por Ramos-Espinosa y col. en el 2012, quienes empleando un modelo de diferenciación de neuroblastoma humano (MSN) demuestran que las neuronas tienen una mayor reparación que sus progenitoras para contener el daño por UVC, a pesar de

presentar una mayor sensibilidad a este agente, pero una deficiencia importante para remover el daño generado por H₂O₂.

Diferenciación a adipocitos

Durante el desarrollo fetal, el segundo semestre de gestación es el periodo clave para la adipogénesis. Es en esta etapa cuando ocurre la agregación de células mesenquimales y la formación de vasos sanguíneos en zonas donde después del nacimiento se acumularán los lípidos, conocidas como “clusters adipocíticos”. Posterior al nacimiento estas zonas están sujetas a cambios dependientes de la dieta [W. Kiess et al. 2008]. Los estímulos que controlan la adipogénesis son controlados por la leptina, esta proteína es producida por una gran diversidad de tejidos incluyendo musculo esquelético, estómago, hígado, glándula pituitaria, tejido adiposo, placenta, los ovarios, etc. Su función es de señalizador de la saciedad y por ende, regulador principal de la ingesta, uso y almacenaje de grasas. Otro regulador importante en la diferenciación de adipocitos es la adiponectina, la cual es una proteína activadora de cAMP y PPAR γ , y que además favorece la actividad de la insulina lo cual no solo incrementa la captación de glucosa sino también la oxidación de ácidos grasos.

El proceso de diferenciación a adipocitos ha sido estudiado principalmente en modelos in vitro partiendo de líneas pre-adipocíticas, principalmente de origen murino. El arresto del crecimiento en la población a diferenciar es un evento indispensable en este proceso [W. Kiess et al. 2008]. El paso clave para la diferenciación a adipocito partiendo de una célula troncal derivada de tejido adiposo es la inducción de los “reguladores maestros” PPAR γ 2

(peroxisome proliferator-activated receptor γ) y C/EBP α (CCAAT/enhancer binding protein α), factores de transcripción indispensables para la adipogénesis.

Lo anterior es logrado mediante el uso combinado de hormonas (corticoides), insulina, isobutil-metilxantina (IBMX) e indometacina. La insulina juega un papel muy importante en la señalización para la incorporación de ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana citoplasmática mediante la activación de proteínas transporte como la proteína transportadora de ácidos grasos-1 (FATP-1), indispensables para la formación de las vesículas lipídicas que caracterizan a los adipocitos. Por otra parte, la IBMX es un agente que eleva la concentración de cAMP, lo cual inhibe la actividad de la fosfodiesterasa y TNF- α causando un incremento en la expresión de PPAR γ 2 y lipoproteína lipasa (LPL), adicionalmente inhibe la osteogénesis mediante el bloqueo de la expresión génica de Runx-2 y OPN por medio de la activación de la proteína cinasa A (PKA). Finalmente, la indometacina es un agonista de unión directa a PPAR γ 2, lo cual conduce a la expresión de marcadores adipogénicos. Se han reportado otros factores como hormonas tiroideas (T3), Asc-2-P y FGF-2 los cuales han mostrado una sinergia con los otros componentes incrementando su actividad y optimizando el proceso de diferenciación [Zuk, et al., 2001 & 2004, Vater et al., 2011].

En el presente trabajo es de particular interés diferenciar células troncales adultas humanas derivadas de tejido adiposo (**hAD-MSC**) a adipocitos empleando el procedimiento reportado por Zuk et al. en su publicación del 2004 y Vater et al. en el 2011. Empleando este protocolo de diferenciación es posible seguir el proceso a través de la tinción de los cuerpos grasos mediante la tinción con el colorante liposoluble, rojo oleoso, así mismo la observación de cambios morfológicos (forma globular, cuerpos lipídicos intracelulares, etc.)

Planteamiento del trabajo

Si bien el conocimiento de los mecanismos de reparación del ADN, en relación a la lesión específica que sufre el ADN y como se resuelve ha crecido en las últimas décadas, aún hay incógnitas por explorar. Entre ellas está conocer y describir la variación de los patrones de reparación del ADN dependientes del contexto celular (tipo, origen, pluripotencialidad, etc.) y el microambiente en el que se encuentran.

Es por ello que en el presente trabajo se plantea determinar la respuesta de la reparación del ADN en células troncales adultas, antes y después de su diferenciación a adipocitos. Para ello, es de particular interés determinar esta capacidad reparativa ante el daño oxidativo inducido por el peróxido de hidrógeno, ya que es un estímulo oxidante que puede producirse fisiológicamente en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*.

Las células troncales humanas que se emplean son derivadas de tejido adiposo y tienen un inmunofenotipo característico que debe ser monitoreado para la certidumbre de los resultados, puesto que con los pases estas características pueden perderse. Así mismo, el mantener el inmunofenotipo característico asegura la potencialidad de diferenciación a adipocito en una célula con el mismo bagaje genético.

Con este trabajo será posible determinar las diferencias entre la reparación de lesiones oxidativas como las 8-oxoG entre células troncales y las diferenciadas a adipocito.

Hipótesis.

Las células diferenciadas a adipocitos, tendrán una menor respuesta reparativa al daño en el ADN generado por H₂O₂ (un agente oxidante) con respecto a sus progenitores troncales (hAD-MSC).

Objetivo general.

- Determinar la respuesta de la reparación del ADN ante el daño inducido por H₂O₂ en células troncales adultas, antes y después de su diferenciación a adipocitos.

Objetivos particulares.

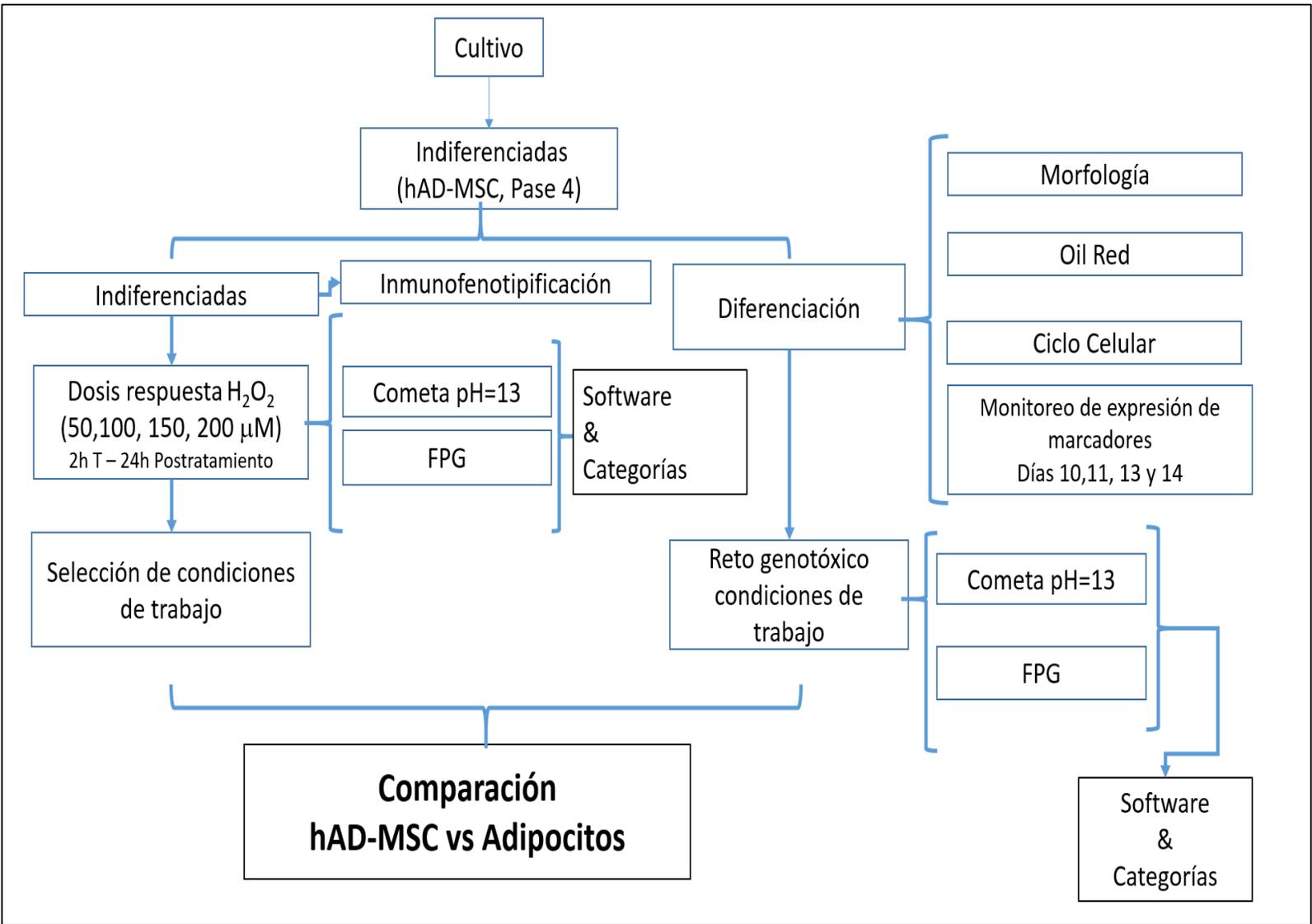
A. Diferenciación a adipocitos del modelo de estudio (hAD-MSC):

1. Verificar el inmunofenotipo de las células troncales adultas (hAD-MSC) de acuerdo a lo reportado y mostrar los cambios tras su diferenciación.
2. Establecer las condiciones óptimas para la diferenciación de las hAD-MSC a adipocitos
 - I. Observación de la morfología.
 - II. Tinción de vesículas lipídicas intracelulares durante la diferenciación usando rojo oleoso.
 - III. Identificación de un arresto en el ciclo celular en G1/G0 indicativo de la diferenciación adipogénica.
 - IV. Observación de posibles cambios en la expresión de marcadores de adipocitos mediante citometría de flujo.

B. Evaluación de la generación y remoción del daño en el ADN:

3. Realizar una curva dosis-efecto con H₂O₂ (50, 100, 150 y 200 μM) para selección de condiciones de trabajo en hAD-MSC a través de la cuantificación de rompimientos de cadena sencilla.
4. Identificar el daño basal en el ADN y lesiones específicas del tipo 8-oxoG, en células hAD-MSC y después de su diferenciación a adipocitos.
5. Identificar el daño inducido en el ADN por H₂O₂ y lesiones específicas del tipo 8-oxoG, en células hAD-MSC y después de su diferenciación a adipocitos.
6. Comparar la capacidad reparativa de lesiones oxidativas en el ADN entre hAD-MSC y adipocitos.

1. Metodología



Materiales y métodos

A. Cultivo celular y tratamiento.

- 1.1. **Cultivo.** Se emplearon células troncales mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo (hAD-MSC) normales (ATCC® Cat. No. PCS500011™), para todos los ensayos se dispuso de un pase temprano (pase 4). Dichos cultivos se hicieron empleando medio “MesenPRO RS™ Medium GIBCO” (Cat. No. 12746-012) preparado de acuerdo con las especificaciones del proveedor, se incubaron a 37°C, 5% CO₂, en cámara húmeda (Water-Jacketed US Autoflow Automatic CO₂ Incubator, NUAIRE), los cambios de medio se establecieron cada 48 horas y se trabajaron a una confluencia ~85%. Para las cosechas los cultivos fueron tratados con Tripsina-EDTA 0.05% (Gibco, Cat. No. 25300-054) durante 3 minutos, tiempo suficiente para obtener una suspensión total del cultivo la cual se trasladó a un tubo conteniendo 8 mL de PBS 1x y se centrifugó a 300 x g durante 5 minutos.

- 1.2. **Ensayo de diferenciación celular.** Se partió de cultivos de hAD-MSC con una confluencia ~85%, pase 4. A partir de ese momento se realizó un lavado con PBS para remover componentes del medio previo y se añadió medio de diferenciación “StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit, Gibco” (Cat. No. A10070-01). Los cambios de medio se establecieron cada 72 horas, se incubó a 37°C, 5% CO₂, en oscuridad y en cámara. Para las cosechas los cultivos fueron tratados con Tripsina-EDTA 0.25% (Gibco, Cat. No. 25200-056)

durante 3 minutos y con ayuda de un gendarme se obtuvo una suspensión del cultivo, la cual se trasladó a un tubo conteniendo 8 mL de PBS 1x y se centrifugó a 300 x g durante 5 minutos.

1.3. **Viabilidad celular.** Fue evaluada por el método de FDA-BrET (Diacetato de fluoresceína – Bromuro de etidio). Se colocaron 5 μ L de la mezcla (20 μ L de BrEt + 3 μ L de FDA, preparada al momento de la evaluación) en un portaobjetos (Pearl Microscope Slides), se colocó un cubreobjetos de 18 x 18 mm (Pearl cover glass, 0.13-0.17 mm espesor) y se realizó un conteo mínimo de 100 células, discriminando por fluorescencia (rojo = células muertas y verde = células vivas). Se empleó un microscopio acoplado a aditamentos de fluorescencia (Olympus BX60) a 20x.

1.4. **Tratamiento oxidante.**

1. *hAD-MSC*: Se trabajó con una confluencia ~85%, una caja de cultivo por condición (2 horas de tratamiento y 24 horas postratamiento) y por tratamiento (control, 50, 100, 100, 150, 200 μ M de H₂O₂). Para establecer la concentración óptima de H₂O₂ se efectuó un cambio de medio 24 horas previas a la exposición, transcurrido este tiempo, se realizó la curva dosis-respuesta, a las concentraciones mencionadas, junto con un cambio de medio que permitió tener mejor precisión en el manejo de las concentraciones.

La condición de 24 horas postratamiento involucra un cambio de medio después de las 2 horas de exposición, precedido de un lavado con PBS, y la incubación en condiciones control (37°C, 5% CO₂, en oscuridad y en cámara húmeda).

2. *Adipocitos*: Se trabajó con cultivos a una confluencia ~85%, 14 días de diferenciación, cajas independientes por condición (control, 2h T y 24h P) y por tratamiento (control y 100 µM H₂O₂). Se realizó un cambio de medio 24h previas al tratamiento. La concentración indicada de H₂O₂ se añadió junto con un cambio de medio adicional y precedido de un lavado con PBS.

Ambos tipos celulares se cosecharon con tripsina-EDTA al estar en la confluencia indicada; hAD-MSC (0.05%) y adipocitos (0.25%) durante 3 minutos a condiciones de incubación, la suspensión celular obtenida se diluyó en 8 mL de PBS, se centrifugaron las muestras a 300 x G durante 5 minutos, al término se resuspendió en 3 mL de PBS y se realizó el conteo, evaluación de la viabilidad y la preparación de las laminillas para la electroforesis unicelular (ensayo cometa).

B. Electroforesis Unicelular - Ensayo Cometa

1.5. **Identificación del daño generado por exposición a H₂O₂.** Esta metodología tiene la capacidad de realizarse en condiciones de alcalinidad, pH>13, y es capaz de identificar rompimientos de cadena sencilla en el ADN, sitios AP, sitios incompletos de reparación, así como entrecruzamientos en el ADN [Valverde & Rojas, 2009]. La técnica fue empleada en un primer experimento en condiciones alcalinas para evaluar la presencia de rompimientos de cadena sencilla en el ADN en ambos contextos celulares y condiciones experimentales (control, tratamiento y 24 horas postratamiento).

Para identificar 8-OxoG (para la evaluación de BER), se empleó a la FPG (formamidopirimidina glicosilasa; fapyG glicosilasa) que es la enzima glicolítica que las resuelve como SSB [Ramos-Espinosa et al, 2012]. Ambos protocolos se siguieron de acuerdo a lo publicado por **Azqueta & Collins** en el **2013**. Se trabajó con dos laminillas por condición y por tratamiento. El tiempo de desenrollamiento fue de 20 minutos para el protocolo alcalino mientras que para el protocolo con la enzima se omite este paso, y es sustituido por la incubación con FPG durante 30 minutos a 37°C. La electroforesis en ambos ensayos fue a 0.8V/cm durante 20 minutos. Al término de la electroforesis se efectuó la neutralización y finalmente la fijación con etanol 96%. Para el análisis se tiñeron con bromuro de etidio, evaluando 50 nucleóides por laminilla empleando el software KOMET 5.0 (kinetic

imaging) acoplado a un microscopio de epifluorescencia (Olympus BX60) con filtro de excitación 515-560 nm, filtro barrera de 590 nm a 20x.

- 1.6. **Análisis por categorías de daño.** Se establecen 5 categorías (0-4), las cuales dependen de la intensidad de daño visualizado como la cola del cometa (**Figura 8, A**), donde la categoría 0 incluye a los cometas o bien nucleóides sin daño y la categoría 4 representa a los nucleóides con el ADN totalmente fragmentado, visualizadas como “nubes” [Ramos-Espinosa et al, 2012]. El anterior es representado gráficamente tomando en cuenta todos los valores adquiridos (100 valores por condición y por experimento).

Adicionalmente, se puede asignar un valor numérico a cada condición dependiendo de la incidencia de eventos por categoría, este valor es conocido como “índice de daño” (**Figura 8, B**) y se calcula de manera individual por ensayo y por condición (100 valores por índice calculado). En éste, el valor total de nucleóides en cada categoría se multiplica por el valor asignado de 0-4. La suma de los cálculos hechos representa el índice de daño al ADN, dicho valor se encuentra en el intervalo de 0 a 400.

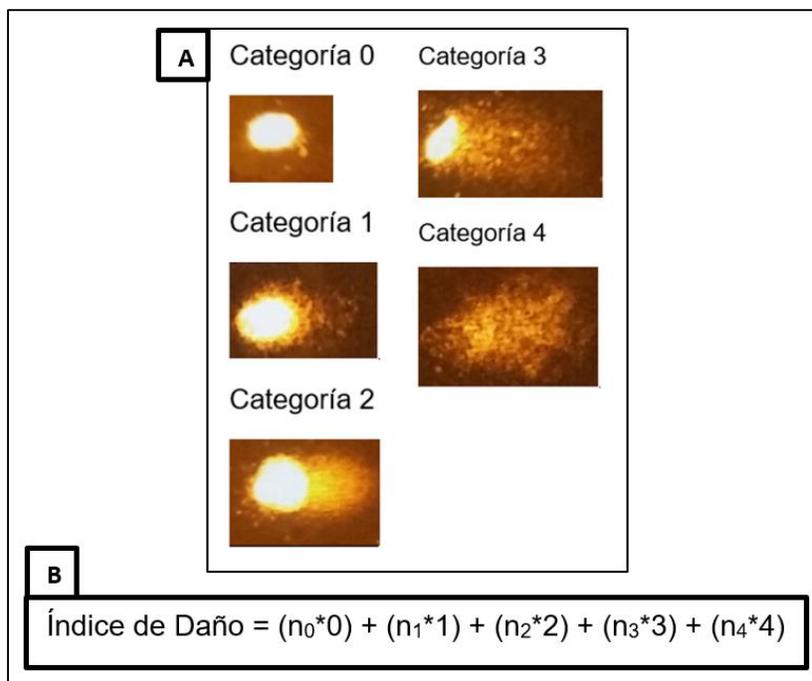


Figura 8. Clasificación de categorías de daño al ADN. A) La asignación visual por categoría es dependiente de la intensidad de fluorescencia en la cola y la distancia total de migración, la categoría 4 representa a las células con mayor daño y que se visualizan como “nubes”. **B)** Algoritmo para el cálculo de índice de daño (ID) en el ADN por condición experimental. Dónde: n_n ; número de nucleóides en la categoría “n”.

- 1.7. **Ciclo celular.** Se evaluó mediante el uso de un agente intercalante del ADN (yoduro de propidio; IP) y RNAsa A para disminuir inespecificidad (Muse Cell Cycle Kit, MCH100106). Después de la cosecha, las células se fijaron con etanol al 70 % (aprox. 1mL), posterior a un lavado con PBS, durante mínimo 48 horas. A continuación, se centrifugaron las células 300 x G durante 5 minutos y se realizó un lavado con PBS (1 mL). Se agregó el reactivo y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, la adquisición se efectuó empleando un citómetro FACScan (BD biosystems) de la unidad de citofluorometría del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Se determinó posteriormente la fase del ciclo celular de las poblaciones celulares de acuerdo con su contenido desoxirribonucleico

relacionado directamente con la intensidad de fluorescencia generada por el IP incorporado.

1.8. **Citometría de flujo.** Se emplearon anticuerpos Anti CD146/MCAM-CFS Mouse IgG1; Clone 128018, Anti CD105/Endoglin-PerCP Mouse IgG1; Clone 166707, Anti CD90/Thy1-APC Mouse IgG2A; Clone Thy-1A1, Anti CD45-PE Mouse IgG1; Clone 2D1 (Human Mesenchymal Stem Cell Multi-Color Flow Cytometry Kit, R&D; FMC002) y Anti hFATP-1-PE Mouse IgG2b; Clone 308420 (R&D; IC3304P) para la verificación del inmunofenotipo de las hAD-MSc y su variación tras la diferenciación a adipocitos. Para el control de isotipo se emplearon Mouse IgG1-PE, Mouse IgG2A-APC, Mouse IgG1-CFS y Mouse IgG1-PerCP. Las concentraciones empleadas corresponden con lo especificado por el proveedor en todos los casos. El marcaje con hFATP-1 requirió de permeabilización por ser una proteína citoplasmática asociada a la cara interna de la membrana celular. Para dicho proceso se empleó una disolución de saponina (0.1% w/v saponina, 0.05% NaN₃, en PBS) posterior al marcaje extracelular durante 10 minutos, seguido de la incubación correspondiente con el anticuerpo anti-hFATP-1 durante 30 min. Las adquisiciones se efectuaron en un citómetro Attune Azul/Rojo (BD Biosystems) de la unidad de citofluorometría del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. El análisis de los datos se efectuó en el programa Attune Cytometric Software utilizando el mismo *gate* para todos los casos incluyendo a todas las células evaluadas y excluyendo el debris.

1.9. ***Tinción de vesículas lipídicas por la tinción de rojo oleoso.*** Para este procedimiento se sembró un pozo por placa y por día de evaluación (placa de 12 pozos) con hAD-MSC, cultivos que al tener confluencia ~85% se inició la diferenciación (T=0). Las tinciones correspondientes se efectuaron a los días 10, 11, 12, 13, 14 y 15. Para la tinción, se realizó primeramente la fijación de las células con paraformaldehído al 10%, posterior a dos lavados con PBS, se añadió el colorante y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Al término de la misma se realizaron dos lavados con PBS y se añadieron 0.5 mL de rojo oleoso (Oil Red O, Trevigen 5010-024-05) preparado de acuerdo al proveedor y se incubó durante 30 minutos con agitación suave protegido de la luz. Transcurrido el tiempo se efectuaron dos lavados adicionales, se añadieron 0.5 mL de PBS para la visualización en microscopio invertido (Olympus IX50-S8F2). Se tomaron imágenes para cada día evaluado. Posteriormente para su cuantificación, se removió el PBS y se extrajo el colorante con isopropanol (750 μ L) e incubando por 10 minutos, con agitación y protegido de la luz. Finalmente se colocó el sobrenadante en una celda de cuarzo (Quartz Spectrophotometer Cell Semi Micro, 9-Q-10 mm, Bio-Rad Labs) y se midió la absorbancia de la muestra en un espectrofotómetro (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, Model: 80-2106-20) a 500 nm empleando isopropanol como blanco.

C. Análisis.

1.10. **Análisis estadístico.** El análisis estadístico se realizó con la ayuda del software SigmaStat 3.5 y SigmaPlot 10.0. Debido a que la distribución de los datos no se comportó de manera Gaussiana se emplearon pruebas no paramétricas para dichos análisis: Kruskal-Wallis (One-Way ANOVA on Ranks), Prueba de Dunn, Prueba de Turkey y T-Test.

Resultados

1. Las hAD-MSC tienen un inmunofenotipo CD90+, CD105+, CD146-, CD45, hFATP-1.

Se realizó un marcaje intra y extracelular con anticuerpos acoplados a fluorocromos dirigidos a algunas moléculas empleadas para la inmunofenotipificación de la línea celular hAD-MSC (mesenquimales adultas) CD105 y CD90, así como la incorporación de marcadores negativos (CD146 y CD45) y el marcador correspondiente para monitorear el progreso de la diferenciación adipogénica (hFATP-1).

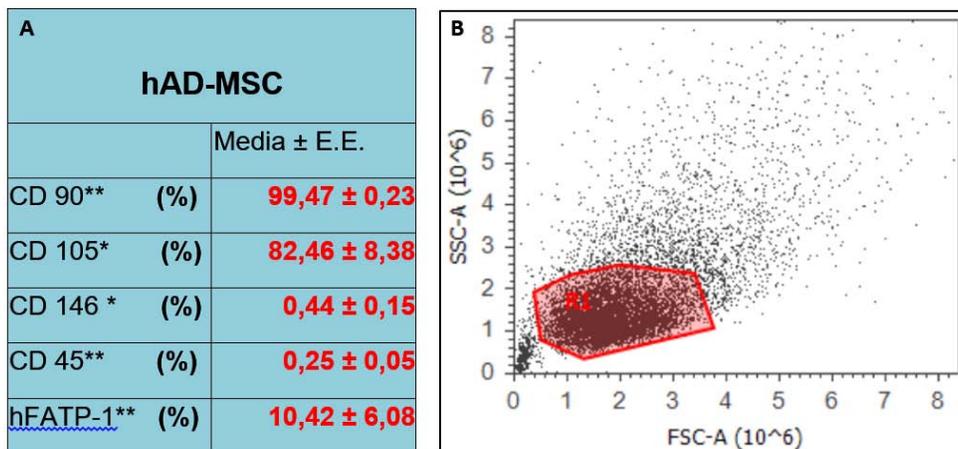


Tabla R1. Inmunofenotipificación de hAD-MSC. **A)** Marcadores y sus porcentajes correspondientes para cada marcador empleado (CD146, hFATP-1, CD90, CD105, y CD45) comparado con el control isotípico. Los datos se representan como la media y variabilidad representada como error estándar, n= *4, **3. **B)** Dot plot correspondiente a la selección de ventana de trabajo para el análisis (mismo para todos los marcadores).

Posterior a la adquisición se corroboró que la población de hAD-MSC expresa homogéneamente los marcadores positivos, así como la ausencia total de expresión de los negativos (**Tabla R1**). También se observó la expresión baja del marcador de diferenciación (hFATP-1) lo cual está relacionado con la procedencia de las células razón por la cual para

la caracterización de adipocitos se emplean pruebas complementarias además de la expresión de dicho marcador.

1.1. Cambio del inmunofenotipo tras la diferenciación a adipocitos, CD90+, CD105+, hFATP-1^{hi}, CD146-.

Se realizó un marcaje intra y extracelular con anticuerpos acoplados a fluorocromos para el proceso de diferenciación (días 10, 11, 13 y 14), se emplearon los marcadores CD90, CD105, hFATP-1, CD146 obteniendo un incremento progresivo de hFATP-1 del día 10 hacia el día 14 y que es considerablemente superior al patrón de expresión de las hAD-
MSC como se observa en la **figura 8**.

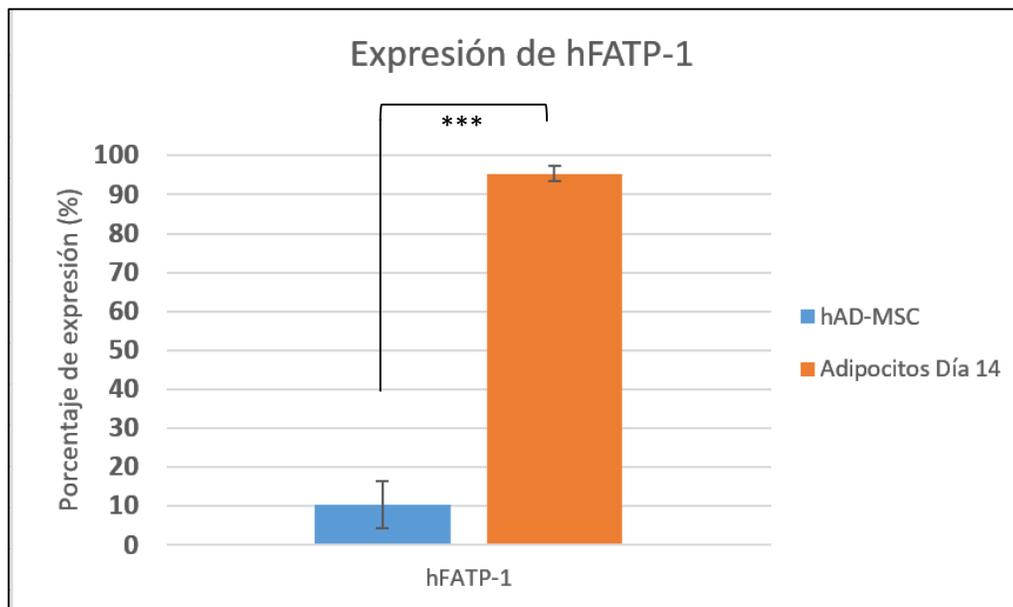


Figura 9. Incremento en la expresión de hFATP-1 al día 14 del esquema de diferenciación evaluando la proporción de la población que expresa el transportador de ácidos grasos hFATP-1. ***Diferencias estadísticamente significativas; T-Test, $n_{hADMSC} = 3$, $n_{Adipocitos} = 5$, $p < 0.025$. Las barras de error corresponden al E.E. cuyo valor numérico se muestra en la tabla R2.

Adicionalmente, se observó una conservación en los niveles de expresión de los marcadores CD90 y CD105 (**Tabla R2**).

A)	hAD-MSC	Adipocitos
	Media ± E.E.	Media ± E.E.
CD 90 (%)	99,47 ± 0,23	99,35 ± 0.23
CD 105 (%)	82,46 ± 8,38	79,12 ± 9.69
CD 146 (%) ****	0,44 ± 0,15	2,88 ± 0.87
<u>hFATP-1</u> (%) ****	10,42 ± 6,08	94,34 ± 2.28

B)

C)

Tabla R2. Monitoreo de expresión de marcadores en Adipocitos día 14. A) Marcadores y sus porcentajes correspondientes para cada marcador empleado (CD146, hFATP-1, CD90 y CD105) comparado con el control isotípico. Los datos se representan como la media y variabilidad representada como error estándar. ****Diferencias estadísticamente significativas; t-Test, n=5, p<0.025. **B** y **C)** Dot plot correspondientes a la selección de ventana de trabajo para el análisis de hAD-MSC y adipocitos, respectivamente.

Estos resultados indican una óptima diferenciación hacia adipocitos partiendo de hAD-MSC y que además ayudaron a seleccionar el **día 14** como la condición de trabajo para los adipocitos dada la homogeneidad en los patrones de inmunofenotipo determinados.

2. Las hAD-MSC responden eficientemente a la diferenciación a adipocitos.

Una vez que se logró una confluencia de ~85% en el cultivo de hAD-MSC se indujo la diferenciación mediante el uso de medio adipogénico (StemPRO Adipogenesis), se realizaron cambios periódicos (cada 72 h) y la tinción de gránulos lipídicos por el método de tinción con rojo oleoso, la observación de morfología por microscopía y el marcaje para

la inmunofenotipificación. En donde se pudieron observar cambios relevantes en la morfología (Figura 9), estos cambios se presentaron progresivamente desde el día 5-6 pero fueron muy evidentes a partir del día 11 y se acentuaron más conforme avanzó el tiempo. En la figura únicamente se muestran a bajo aumento las células troncales en un inicio, es decir día 0, se contrastan con la morfología alcanzada el día 14 de diferenciación con varias magnificaciones para evidenciar las vesículas lipídicas y los cambios en el patrón de crecimiento del cultivo.

Por otra parte, al realizarse la tinción con rojo oleoso se observó un incremento importante en los valores de absorbancia a 500 nm de la retención del colorante liposoluble en los cultivos diferenciados (día 10 al 15) con respecto a las hAD-MSC (Figura 10), indicando de manera cuantitativa el almacenamiento progresivo de ácidos grasos en el interior de las células. La morfología que se observa al día 14 de diferenciación se presenta en la figura 11, en donde es evidente la formación de múltiples cuerpos grasos o bien vesículas lipídicas intracelulares que corresponden a un adipocito. Este ensayo se realizó con $n=1$ por día ya que lo que se buscó fue un patrón para ayudar en la selección del día de diferenciación óptimo.

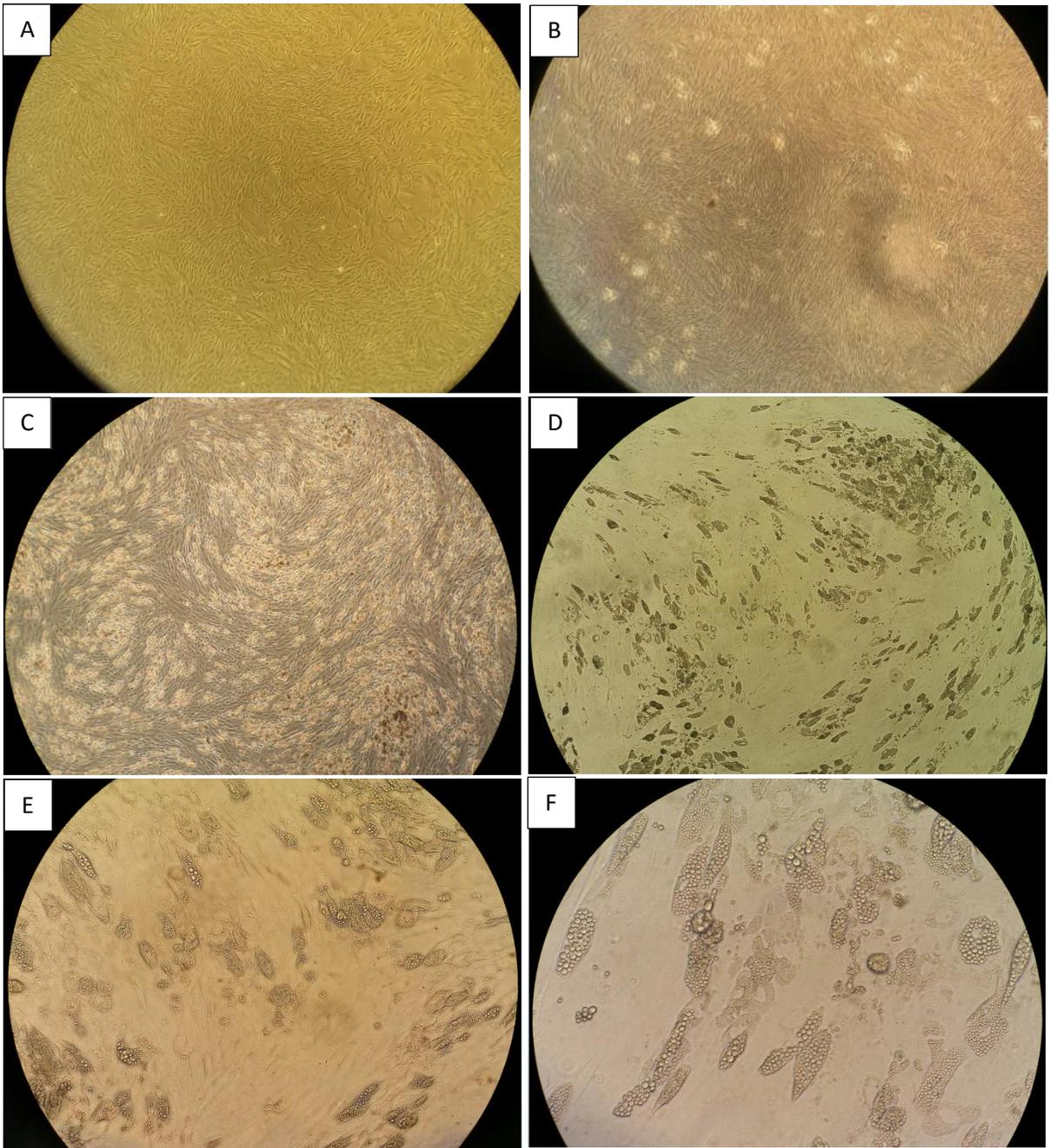


Figura 10. Cambios morfológicos celulares durante el esquema de diferenciación. Se observa un cambio progresivo en el cultivo destacando la presencia de cuerpos grasos (vesículas lipídicas) en el interior de las células. Células mesenquimales adultas derivadas de tejido adiposo hAD-MSC (A Y B) 4x. Diferenciación celular día 14: 4x, 10x, 20x y 40x (C, D, E y F respectivamente).

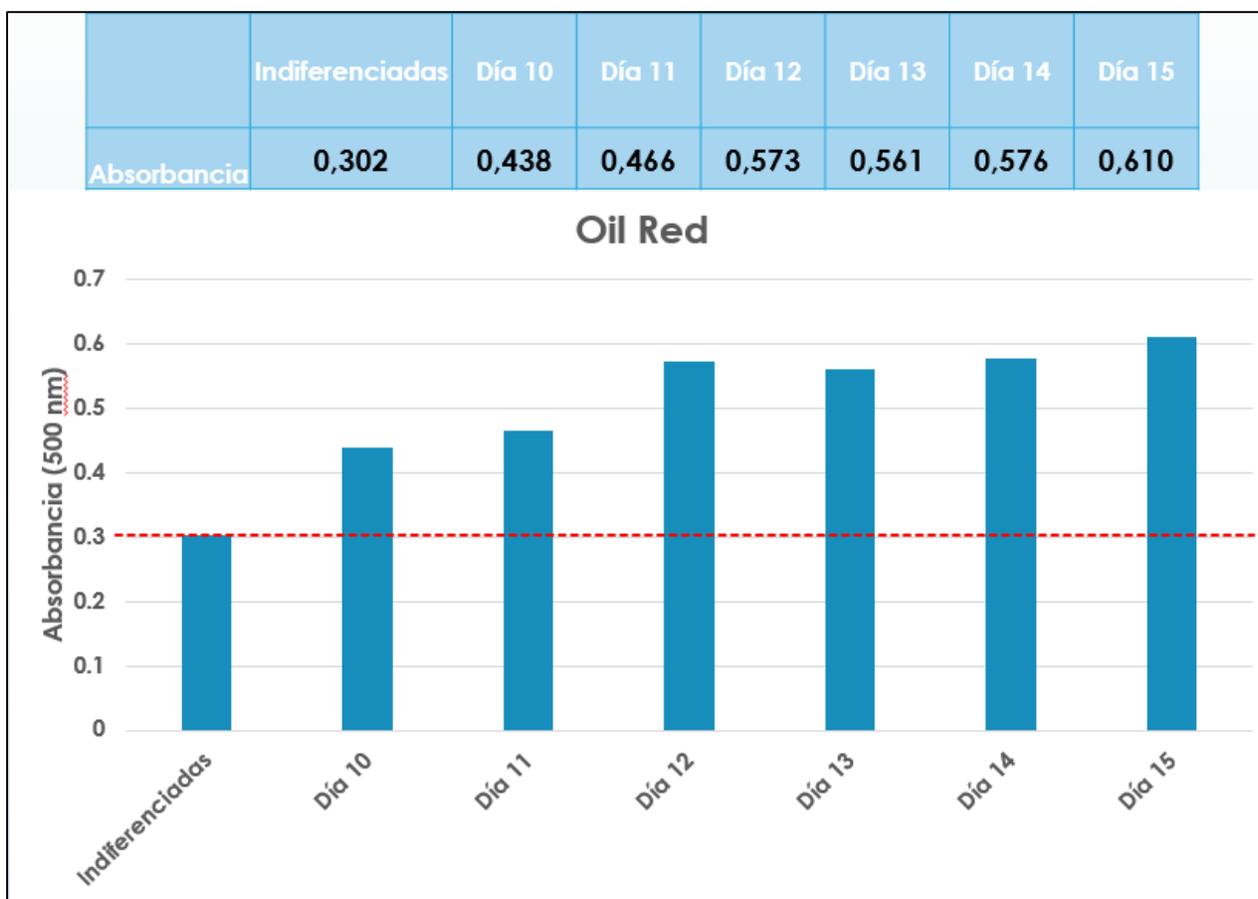


Figura 11. Tinción de rojo oleoso en hAD-MSC y células diferenciadas. El cultivo diferenciado se evaluó en el intervalo de 10 -15 días, se observa un incremento en la retención del colorante liposoluble conforme progresan los días. La línea punteada representa el valor de las hAD-MSC como referencia.

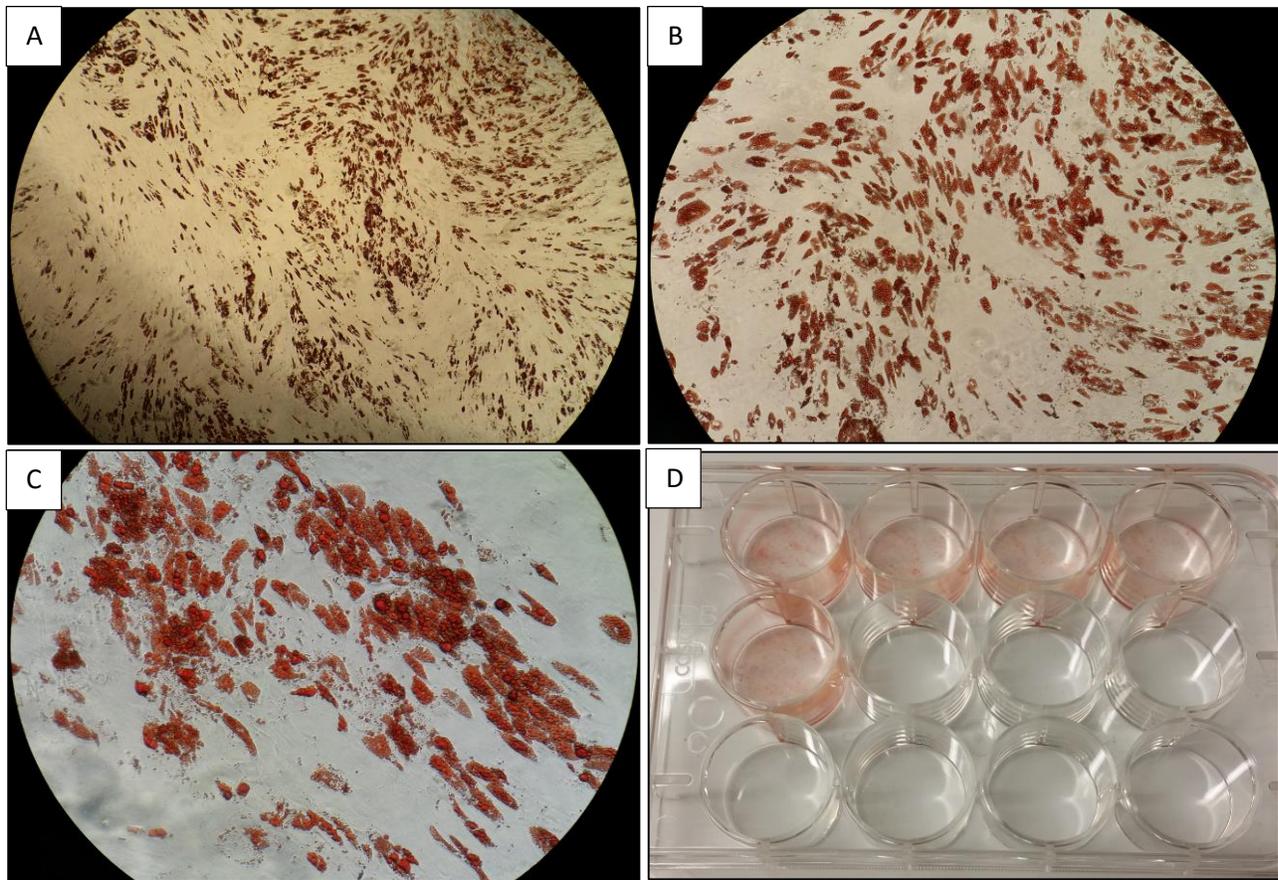
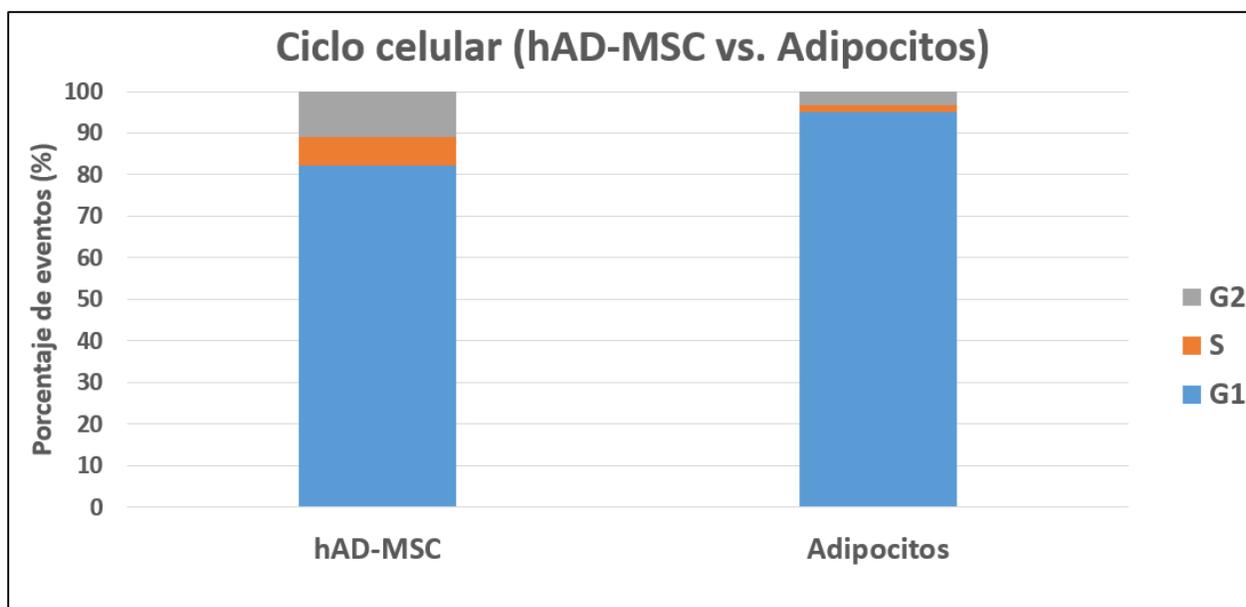


Figura 12. Tinción con rojo oleoso en adipocitos día 14 obtenidos a partir de hAD-MSC. Se muestra el mismo campo a diferentes aumentos (A; 10x, B; 20x y C; 40x). La intensidad de la tinción se apreció a simple vista (D).

Posteriormente, se efectuó una evaluación por citometría de flujo del ciclo celular de ambos cultivos celulares (día 14 para las células diferenciadas), en donde se observó un arresto en la fase G1 del ciclo celular (**Figura 12**), que de acuerdo a lo reportado por **Nouspikel & Hanawalt** en el **2002**, es una característica de las células totalmente diferenciadas el presentar un estado postmitótico. Esta prueba se relacionó al número de células inicial (estado troncal) y al día 14 del proceso de diferenciación con lo cual no se observó cambio en el número de células en el cultivo. Ambas pruebas indican la atenuación del proceso de replicación del ADN.



Fase del ciclo	G1	S	G2/M	n
hAD-MSC	82,27 ± 3,37	6,75 ± 1,15	10,98 ± 2,78	6
Adipocitos	95,06 ± 0,34***	1,69 ± 0,22***	3,25 ± 0,21***	3

Figura 13. Ciclo celular en hAD-MSC y células diferenciadas (día 14). Se observa un porcentaje elevado de células en la fase G1 del ciclo celular en la población diferenciada, en el día 14, sugerente de un estado postmitótico correspondiente a adipocito. t-Test, $n_{\text{hAD-MSC}}=6$, $n_{\text{adipocitos}}=3$, $p<0.025$.

Adicionalmente, cabe destacar que, durante el proceso de cosecha de los cultivos diferenciados, se detectó una mayor capacidad de adhesión de las células a las cajas de cultivo sugiriendo indirectamente un cambio en la expresión de moléculas de adhesión, relacionado con la formación de tejido adiposo, lo cual corresponde con lo reportado por **Kubo W. et al. 1999**.

3. Las hAD-MSC remueven eficientemente las lesiones en el ADN generadas por H_2O_2 a concentraciones de hasta 100 μM .

3.1. Generación y remoción de daño global (SSB, sitios AP y sitios de reparación tardía).

Después de la exposición a peróxido de hidrógeno a concentraciones crecientes (50, 100, 150 y 200 μM) durante 2 horas, se determinaron los rompimientos de cadena sencilla mediante la electroforesis unicelular, mostrando su migración en el campo eléctrico proporcional al daño generado. Los resultados del ensayo cometa mostraron un incremento dosis-dependiente estadísticamente significativo (con respecto al control y las dosis) en todas las concentraciones empleadas. El daño se analizó mediante tres métodos diferentes; histogramas de frecuencia de Olive Tail Moment (OTM), parámetro que representa la movilidad de los fragmentos de ADN de cadena sencilla en tres dimensiones determinado por el software Komet 5.0 (**Figura 14 A**), mediante categorías de daño asignadas por el valor de OTM (**Figura 14 B**) y gráficos de caja para OTM de las diferentes condiciones experimentales (**Figura 14 A'**). Es muy importante destacar que si bien la representación gráfica de las categorías es independiente de las mediciones, el algoritmo se calcula con base en 100, por lo tanto, el valor de I.D. mostrado es el promedio de los obtenidos por ensayo

En experimentos paralelos, se evaluó la remoción de daño al ADN con postratamiento de 24 h en condiciones de cultivo óptimas (medio MesenPRO, 37°C, 5% CO_2 , cámara húmeda, en oscuridad) tras el lavado del tratamiento. Este experimento permite evaluar la reparación del ADN mediante la remoción eficiente del daño. Los resultados indican además de la dosis efectos dependientes, una reparación del ADN eficiente y estadísticamente

significativa con respecto al control para los tratamientos de H₂O₂ de 50 y 100 μM; no así para las concentraciones superiores en donde se observó una reparación parcial del daño generado (Figura 14).

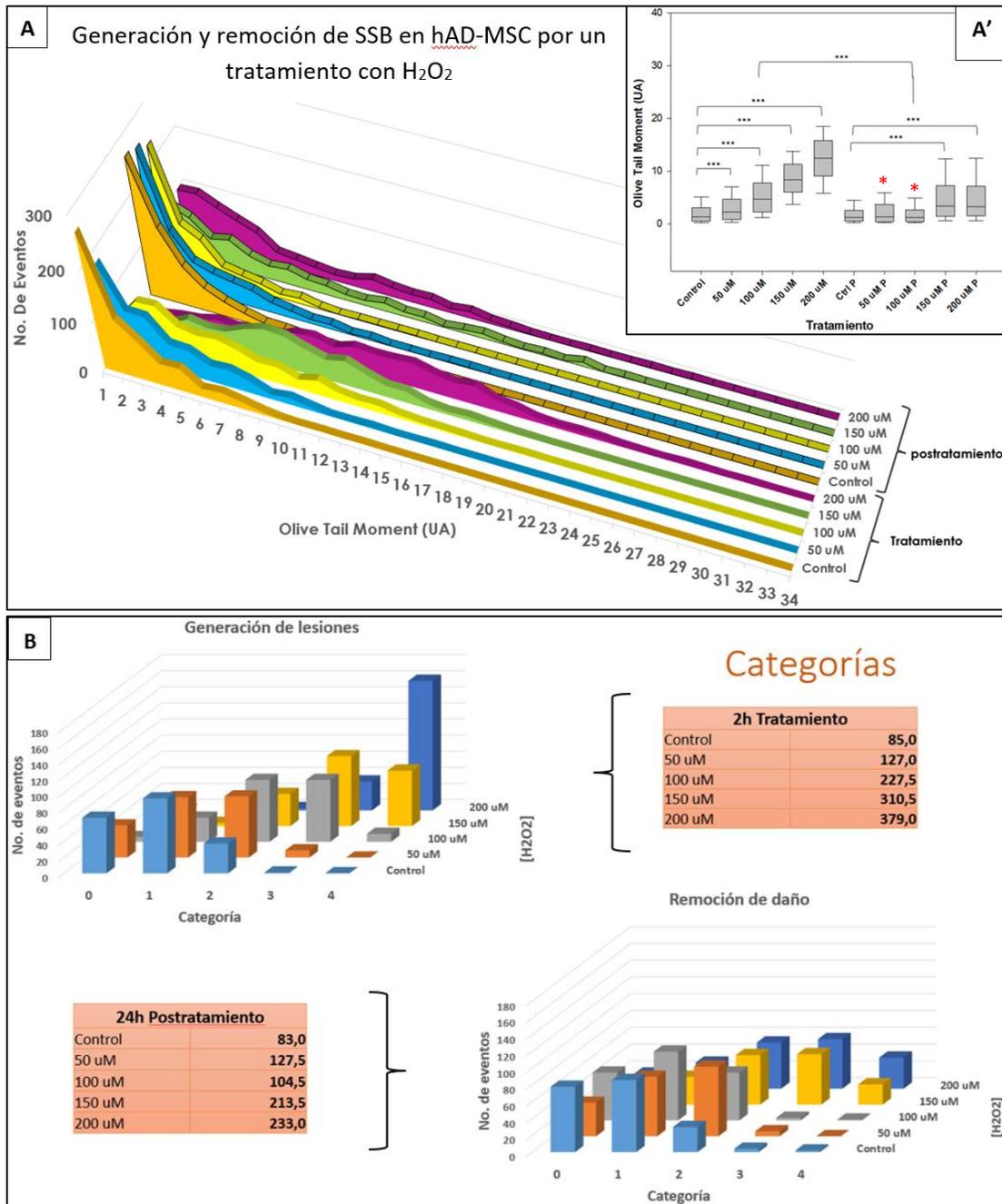


Figura 14. Evaluación de generación y remoción de daño en hAD-MSC. A) Se observa un desplazamiento poblacional hacia valores de más daño (representados como frecuencia de eventos por intervalo en OTM). La exposición al tratamiento causa un aumento en la generación de lesiones al ADN en todas las condiciones

(estadísticamente significativo respecto al control y entre tratamientos: **A'**). Las lesiones generadas durante el tratamiento son removidas eficientemente a las 24 horas posteriores a la exposición (**P**) solamente en las condiciones de 50 y 100 μM . **B)** Representación de categorías de daño e ID, mostrando de una manera concentración-dependiente el incremento en la generación de las lesiones y su remoción eficiente solo en las concentraciones de 50 y 100 μM , visualizado la ineficiente reparación como permanencia de lesiones en las concentraciones superiores de 150 y 200 μM . El I.D. representado es el promedio de los obtenidos por ensayo. *** Diferencias estadísticamente significativas. Kruskal-Wallis $p \leq 0.001$, Prueba de Dunn $p \leq 0.05$, $n=6$. Nota: La "**P**" simboliza el postratamiento mientras que la ausencia de letra en las condiciones simboliza el tratamiento. *Indica las condiciones de remoción de daño óptimas.

Adicionalmente, se determinó la viabilidad de los cultivos para cada tratamiento mediante la tinción dual de fluorocromos que determina el funcionamiento metabólico lisosomal; en donde se observaron efectos citotóxicos en las concentraciones de 150 y 200 μM de H_2O_2 (Tabla R3). También se observó que la viabilidad se recuperó tras el periodo de recuperación para todas las concentraciones. Con base en estos resultados se descartó el trabajar con las concentraciones citotóxicas que pudieran enmascarar la eficiencia del proceso de reparación del ADN.

	2 h Tratamiento					24h Postratamiento				
	Control	50 μM	100 μM	150 μM	200 μM	Control	50 μM	100 μM	150 μM	200 μM
hAD-MSC	100,00	96,12 \pm 2,4	88,24 \pm 3,38	70,88 \pm 3,7	64,91 \pm 7,9	100,00	91,12 \pm 4,1	86,67 \pm 1,5	81,90 \pm 1,5	72,60 \pm 3,5

Tabla R3. Viabilidad celular de hAD-MSC (curva dosis-respuesta). De las concentraciones empleadas, solamente las dos más altas (150 μM y 200 μM) cursaron con citotoxicidad descartándolas para evitar variables contundentes en la interpretación de resultados. Método BrEt-FDA, los resultados se muestran normalizados respecto al control. Promedios y error estándar, $n= 6$.

3.2. Evaluación de BER en hAD-MSC (generación y remoción de 8-OxoG).

Las lesiones oxidativas en el ADN, específicamente las 8-oxoG y FapyG generadas por el tratamiento con H_2O_2 son reparadas a través del mecanismo de reparación por escisión de bases (BER). Por ello se identificó la lesión mediante la glicosilasa **FPG** y se determinó su

persistencia o remoción para indicar la funcionalidad de la reparación por escisión de bases. Bajo este protocolo se observó la generación y remoción de lesiones 8-oxoG, para los tratamientos de 50 y 100 μM de H_2O_2 y una remoción parcial de las mismas a concentraciones $>100 \mu\text{M}$ lo cual se observa por los tres métodos de representación (Frecuencias, Categorías y Grafico de cajas) (**Figuras 15**).

Lo anterior se interpreta como una eficiencia de la BER para remover los dos tipos de oxidación de la guanina evaluados los cuales representan las lesiones por oxidación más frecuentes en el ADN. Si bien el mecanismo de reparación remueve una proporción considerable de las lesiones generadas por el tratamiento a concentraciones de 150 y 200 μM su eficiencia no es la necesaria para alcanzar los niveles basales de 8-OxoG en el ADN genómico en estas células.

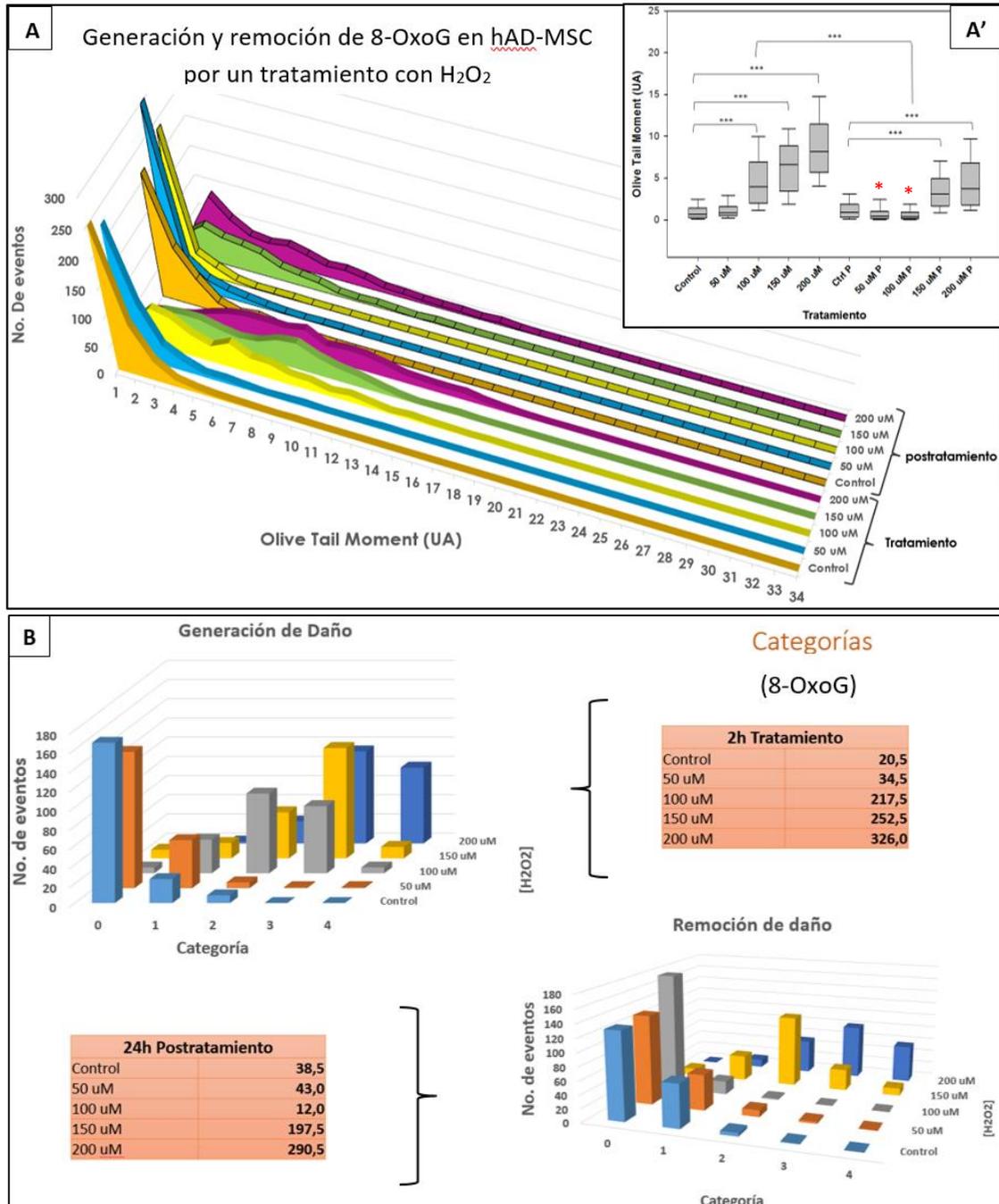


Figura 15. Evaluación de la respuesta reparativa de la BER para remover 8-OxoG en hAD-MSC. A) El tratamiento con H₂O₂ genera de manera tratamiento-dependiente la formación de la lesión específica de BER y que en estas células solo se remueven para las condiciones de 50 y 100 μ M. A') Estas diferencias son estadísticamente significativas con respecto al control en el tratamiento y solamente las concentraciones mencionadas recuperan los valores basales en el postratamiento. B) Representación de categorías de daño, mostrando de una manera concentración-dependiente, las lesiones y su remoción eficiente solo en las concentraciones de 50 y 100 μ M, visualizado la ineficiente reparación como permanencia de lesiones en las concentraciones superiores de 150 y 200 μ M. El I.D. representado es el promedio de los obtenidos por ensayo. *** Diferencias estadísticamente significativas. Kruskal-Wallis $p \leq 0.001$, Prueba de Turkey $p \leq 0.05$, $n=4$. *Indica las condiciones de remoción de daño óptimas.

4. Las células diferenciadas a adipocitos tienen un daño basal en el ADN superior al de las hAD-MSC.

Se evaluó el daño basal de los adipocitos mediante la electroforesis unicelular alcalina (pH>13) y mediante la digestión con FPG, para determinar 8-oxoG. También se determinó el daño inducido por el H₂O₂ 100 µM durante 2 horas (T=0) y 24 horas después cultivado en condiciones óptimas para determinar la respuesta reparativa. El daño en el ADN, después de los 14 días de diferenciación a adipocitos, fue mayor que en las hAD-MSC con respecto a las hAD-MSC lo cual fue estadísticamente significativo, como se muestra en la **figura 17**.

Al realizar la comparación mediante el índice de daño en categorías se observaron diferencias importantes en el comportamiento de la población celular ante condiciones de cultivo control idénticas (**Figura 18**). El valor numérico del índice de daño en el ADN (I.D.) es 1.68 veces mayor en los adipocitos en comparación con el de las hAD-MSC, adicionalmente se observó un desplazamiento en la población de los adipocitos hacia categorías de más daño, estando entre las categorías 1 y 2, mientras que las células indiferenciadas se encuentran en 1 con tendencia a 0.

hADMSC Vs. Adipocitos (Daño basal/SSB)

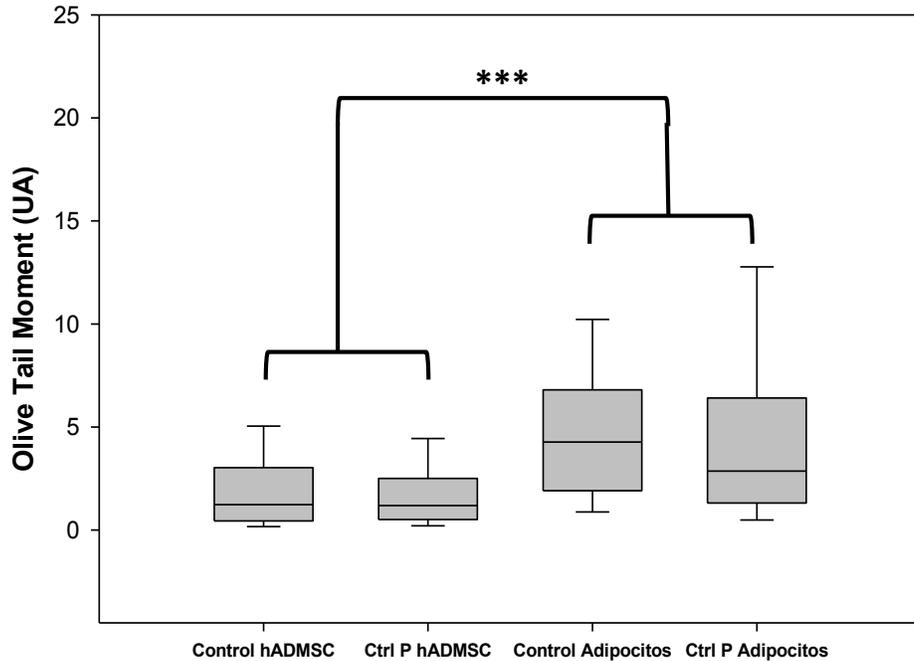
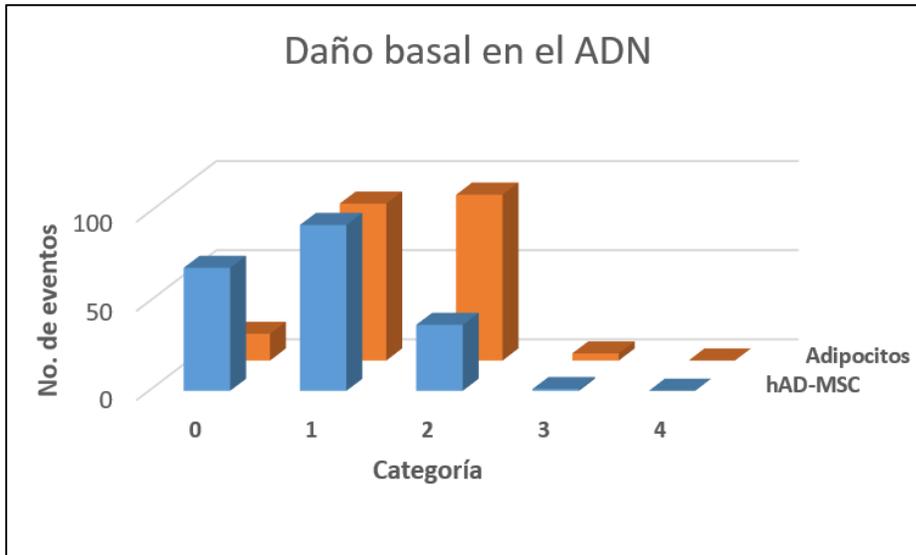


Figura 16. Los adipocitos tienen un daño basal al ADN mayor con respecto a las hAD-MSC. ***Diferencias estadísticamente significativas por Kruskal-Wallis ($p < 0.001$) y Prueba de Dunn ($p < 0.05$), $n_{\text{adipocitos}}=3$, $n_{\text{hAD-MSC}}=6$. P: Postratamiento.



	I.D.
hAD-MSC	85
Adipocitos	143

Figura 17. Comparación de daño basal en el ADN, hAD-MSC Vs. Adipocitos. La población de los adipocitos se encuentra desplazada hacia las categorías de más daño en el ADN en comparación con las indiferenciadas, adicionalmente, el valor numérico del índice de daño (I.D.) es 1.68 veces mayor en los adipocitos.

De manera análoga, se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto a la presencia de 8-OxoG entre ambos estados de diferenciación, sugiriendo que la actividad basal de BER en las células diferenciadas esta atenuada al ser comparada con lo correspondiente en las hAD-MSC (**Figura 19**).

hADMSC Vs. Adipocitos (Daño basal/8-OxoG)

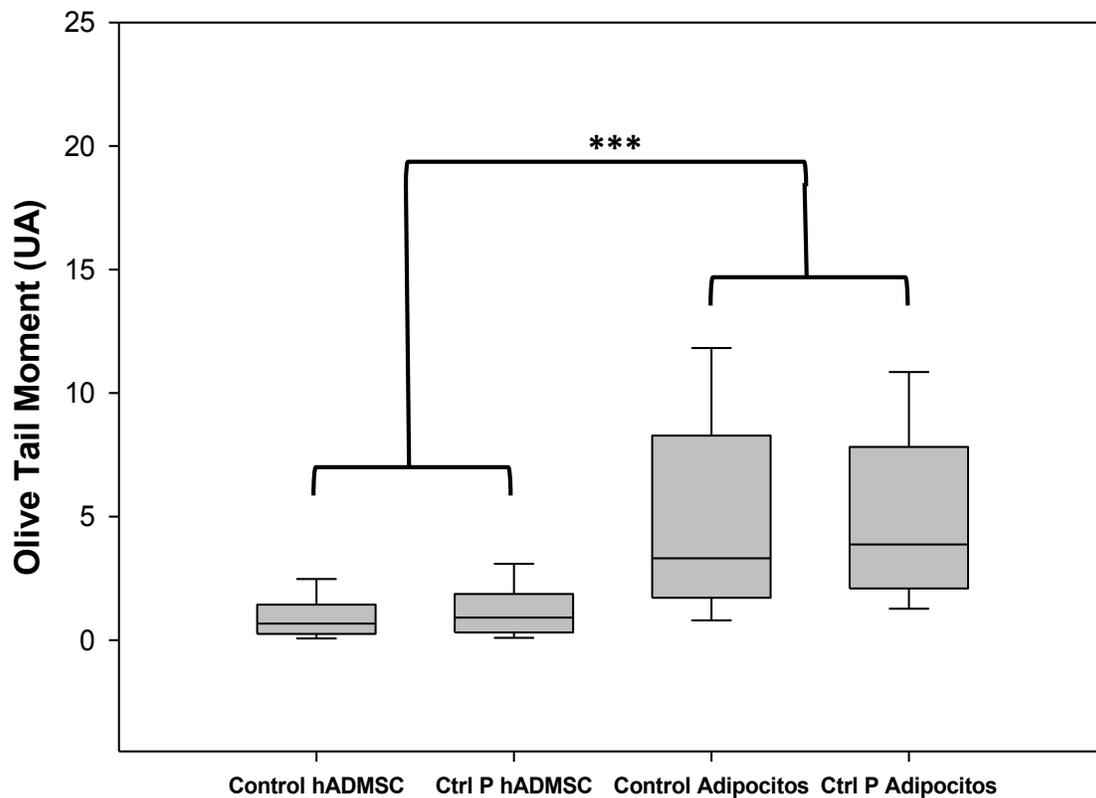
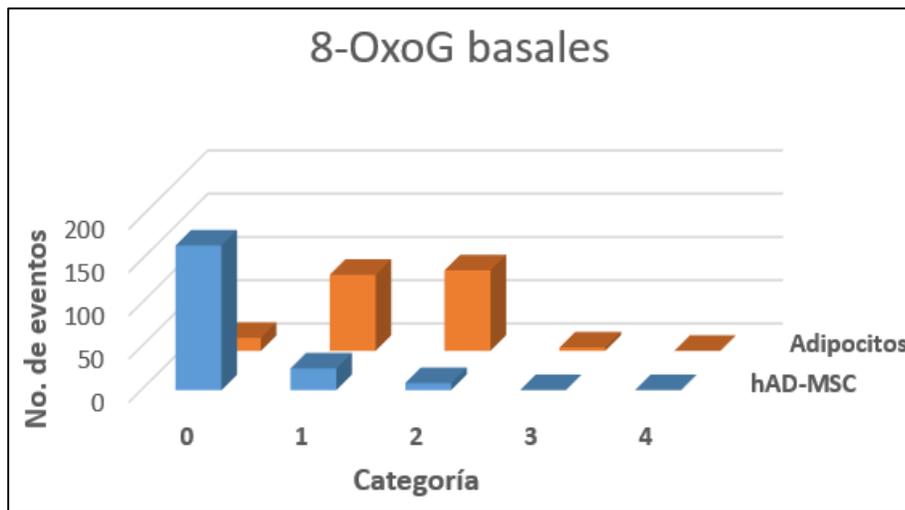


Figura 18. Los adipocitos presentan una mayor cantidad de 8-OxoG de manera basal en comparación con sus progenitores indiferenciados. La actividad de BER podría estar atenuada en estas células con respecto a las hAD-MSC. ***Diferencias estadísticamente significativas por Kruskal-Wallis ($p < 0.001$) y Prueba de Dunn ($p < 0.05$), $n_{\text{adipocitos}}=3$, $n_{\text{hAD-MSC}}=6$. P: Postratamiento.

El valor numérico por análisis de índice de daño en el ADN respecto a la presencia de 8-OxoG es 6.98 veces mayor al correspondiente en las hAD-MSC, adicional a lo anterior, la población de adipocitos se encuentra entre las categorías 1 y 2 de daño de manera muy similar a lo observado en la figura 20 mientras que la población de las células indiferenciadas se encuentra en su mayoría en la categoría 0 (**Figura 20**).



	I.D.
hAD-MSC	20.5
Adipocitos	143

Figura 19. Comparación de 8-OxoG presentes de manera basal, hAD-MSC Vs. Adipocitos. El índice de daño de los adipocitos es 6.98 veces mayor en comparación con las hAD-MSC. Se aprecia el desplazamiento de la población diferenciada a categorías de mayor daño.

5. Las células diferenciadas a adipocitos muestran una respuesta reparativa en el ADN menor respecto a las hAD-MSK.

En contraste con la prueba anterior se realizaron ensayos de exposición de los adipocitos obtenidos a una concentración de 100 μ M de H₂O₂, comparándolo tanto con su control como con las hAD-MSK, en las condiciones de tratamiento (2 horas) y 24 horas posteriores al mismo. Los resultados muestran que el daño global, evaluado como SSB, generado por el tratamiento induce lesiones en los adipocitos que no pueden ser removidas aun 24 horas posteriores al tratamiento (**Figura 21**).

Adicionalmente, al evaluar la generación y remoción de 8-OxoG se observó una mayor generación de estas lesiones en los adipocitos y una deficiencia en la respuesta de reparación del ADN tras 24 horas (**Figura 22**), confirmando la atenuación del mecanismo de BER en los adipocitos al ser comparado con las hAD-MSK.

hAD-MSC vs Adipocitos (SSB)

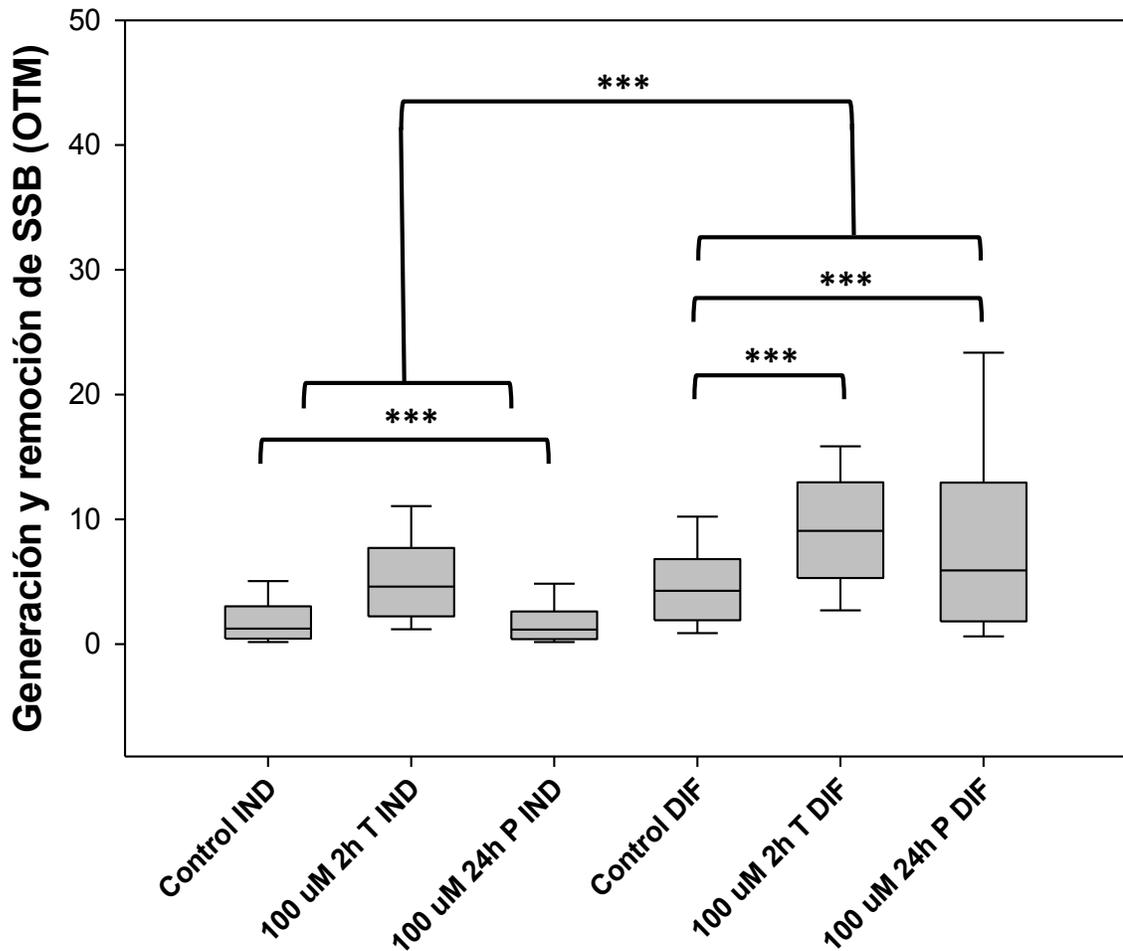


Figura 20. Comparación entre hAD-MSC y adipocitos en la generación y remoción de lesiones oxidativas en el ADN. Los adipocitos tienen una menor respuesta de reparación ante lesiones generadas por un reto genotóxico de 100 μM de H_2O_2 en comparación con sus progenitores troncales (hAD-MSC). ***Diferencias estadísticamente significativas por Kruskal-Wallis ($p < 0.001$) y Prueba de Dunn ($p < 0.05$), $n_{\text{adipocitos}}=3$, $n_{\text{hAD-MSC}}=6$. IND: Indiferenciadas (hAD-MSC). DIF: Diferenciadas (Adipocitos). 2h T: 2 horas de tratamiento. 24h P: 24 horas postratamiento.

hAD-MSC vs Adipocitos (8-OxoG)

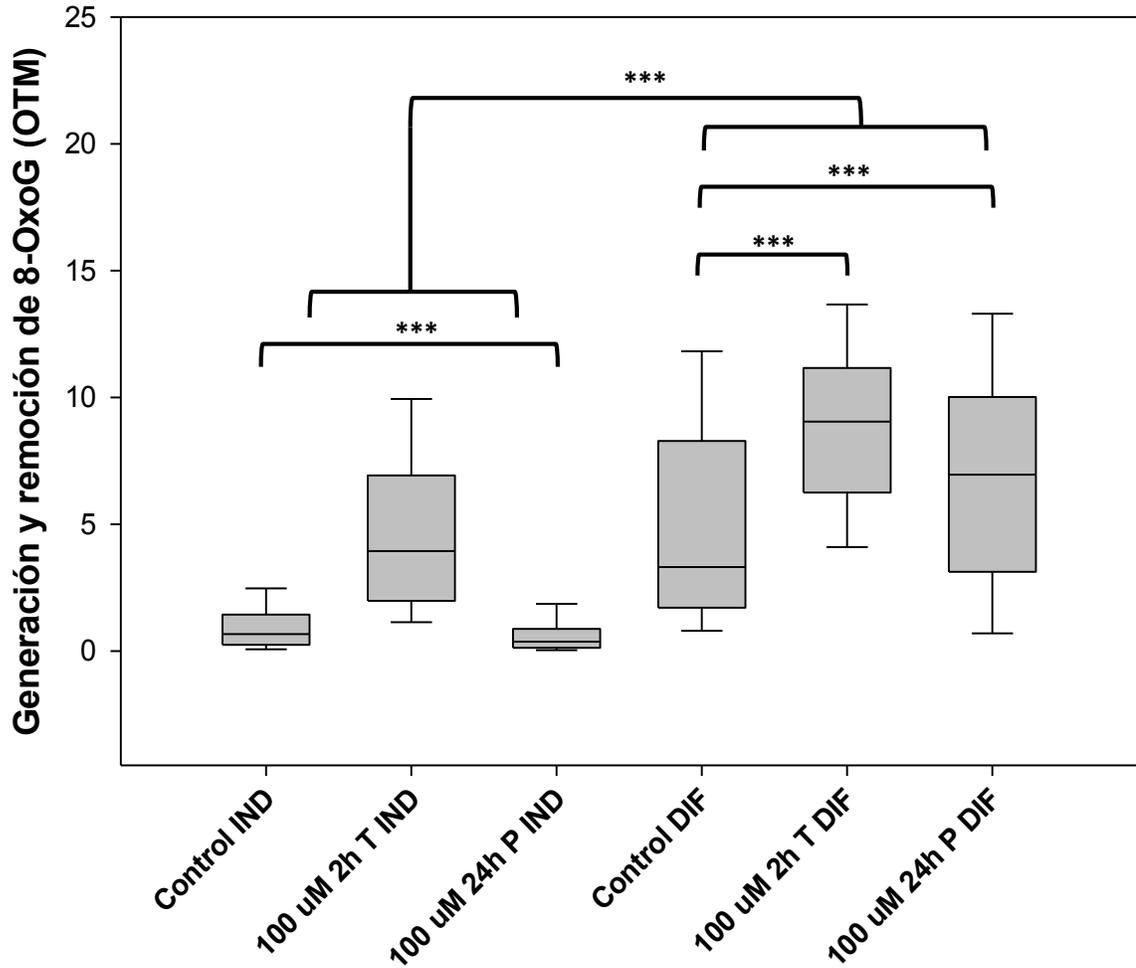


Figura 21. Los adipocitos tienen menor capacidad de remover las 8-OxoG generadas por el tratamiento en comparación con las hAD-MSC. El mecanismo de BER en hAD-MSC es más eficiente en la remoción de 8-OxoG respecto a los adipocitos. *Diferencias estadísticamente significativas por método de Kruskal-Wallis ($p < 0.001$) y Prueba de Dunn ($p < 0.05$), $n_{\text{adipocitos}}=3$, $n_{\text{hAD-MSC}}=6$. IND: Indiferenciadas (hAD-MSC). DIF: Diferenciadas (Adipocitos). 2h T: 2 horas de tratamiento. 24h P: 24 horas postratamiento.**

Se realizó el ensayo correspondiente de evaluación de la viabilidad celular por el método de BrEt-FDA, en donde se observa que el tratamiento no afecta significativamente la viabilidad celular (**Tabla R4**) y que es equivalente a la respuesta obtenida por el cultivo de hAD-MSC a la concentración de 100 μM de peróxido de hidrógeno. Esto indica que no hay

un proceso citotóxico importante que enmascare el resultado obtenido por el tratamiento en la generación y remoción del daño en el ADN, tanto en adipocitos como en las hAD- MSC a la concentración de trabajo seleccionada.

	2h Tratamiento		24h postratamiento	
	Control	100 uM	Control	100 uM
hAD- MSC	100,00/ 86.6	88,24 ± 3,38	100,00/86.25	86,67 ± 1,5
Adipocitos	100,00/ 86.2	84,60 ± 2,8	100,00/84.1	80,92 ± 3,7

Tabla R4. Viabilidad de hAD- MSC y Adipocitos a las condiciones de trabajo. No se observan diferencias representativas en ningún caso.

En conjunto, lo anterior muestra que los adipocitos tuvieron menor capacidad para contener con el daño en el ADN causado por una exposición a H₂O₂ y que además, al evaluar la remoción lesión-específica de BER (8-OxoG), estas células fueron incapaces de alcanzar los valores basales correspondientes, mientras que las hAD- MSC removieron este daño.

Análisis y discusión de resultados.

Actualmente hay mucha variabilidad en los métodos de caracterización de las células troncales debido a la heterogeneidad entre poblaciones dentro de un mismo organismo. Particularmente en las hAD-MSC, esta reportado que la expresión de los marcadores evaluados por citometría de flujo varía de manera dependiente al pase del cultivo (**ATCC® PCS500011™**), por lo tanto, para asegurar los patrones de expresión y reducir variabilidad se trabajó con un pase temprano (pase 4). Asimismo, de manera experimental, los cambios morfológicos y las tinciones dependieron tanto del día evaluado como de la confluencia celular. Dado lo anterior, fue muy importante caracterizar tanto las hAD-MSC como los adipocitos obtenidos mediante complementariedad de métodos: morfología, tinciones, marcajes mediante anticuerpos y ensayos de proliferación, que en conjunto, proporcionaron una descripción clara de ambos tipos celulares y una diferencia evidente entre ellos en cada uno de los parámetros evaluados (morfología, expresión de marcadores, tinción de cuerpos grasos, etc.).

Las hAD-MSC mostraron una alta eficiencia de diferenciación que alcanzó características estables (dentro de los días evaluados; 10-15) en el día 14. El primer parámetro que evidenció lo anterior, fue el incremento significativo en la expresión del transportador de ácidos grasos (hFATP-1) que llegó a un máximo para el día 11 y que se mantuvo en los días consecutivos evaluados, este transportador se localiza en un compartimento intracelular perinuclear y es debido a la estimulación por insulina que ocurre su translocación a la membrana plasmática y su asociación con GLU4 [**Stahl et al., 2002**]. Una vez asociado a la membrana citoplasmática, este transportador facilita la captación y

acumulación de ácidos grasos de cadena larga (LCFA, por sus siglas en inglés) [**García-Martínez et al., 2005, Wu et al., 2006**].

La expresión y translocación de este transportador está relacionada con la formación de vesículas lipídicas en el espacio citoplasmático durante el proceso de diferenciación adipogénica, las cuales, se evidenciaron mediante una tinción específica de ácidos grasos empleando rojo oleoso (oil red O), el cual es un colorante con una alta solubilidad en lípidos, característica que permite marcar regiones celulares en donde se acumulen este tipo de biomoléculas [**Peña & Watts, 1971**]. Los resultados muestran una acumulación del colorante que llegó a un máximo para el día 12 y se mantuvo en los mismos valores los días posteriores. Las vesículas lipídicas fueron evidentes mediante el uso de microscopio como se muestra en la **figura 13** y que confirma el carácter lipídico de lo observado antes de la tinción en la **figura 12**.

Se observó un incremento en la capacidad de adhesión del cultivo conforme el progreso de la diferenciación, tanto con la placa de cultivo como entre las células, lo cual corresponde a lo reportado por **Kubo Y. et al.** en el 2000. Lo anterior tiene el sentido biológico de la formación de cara basal y apical del tejido para desarrollar coordinadamente su función que en este caso particular corresponde a la captación de los ácidos grasos para la formación de reservas energéticas así como una captación y secreción de hormonas y factores indispensables para la homeostasis de un tejido de esta naturaleza. Finalmente, al evaluar el la distribución de la población en las fases del ciclo celular por la incorporación de yoduro de propidio (IP) y su cuantificación por citometría de flujo, se pudo observar una disminución importante de células en la fase S y un incremento casi total en la fase G1/G0, esto coincide con lo publicado en **2002** por **Nouspikel y Hanawalt**, en donde se menciona que las células

post-mitóticas (como los adipocitos, neuronas, etc.) no replican su material genético. Es importante destacar que se trabajó con todas las células provenientes del cultivo correspondiente a la diferenciación, esto es, no se realizó “cell-sorting”. Lo anterior se debió a que el cultivo no presentó variabilidad interna en ninguna de las evaluaciones comportándose como una población homogénea.

Por otra parte, los resultados indican una buena respuesta reparativa, para las hAD-MSC de las lesiones generadas por el tratamiento con H₂O₂ 100 μM durante 2 h y el seguimiento tras 24 horas de recuperación en condiciones de cultivo óptimas.

El comportamiento de la BER al evaluar la 8-OxoG, lesión que es removida por la glicosilasa bifuncional 8-oxoguanina ADN-glicosilasa (OGG1) y que identificamos mediante la electroforesis unicelular con el uso de FPG que es el ortólogo de la OGG1 en *E. Coli* mostro resultados semejantes. Es importante destacar que a través de la electroforesis unicelular alcalina se determinan tanto SSB, los sitios de reparación retardada o interrumpida, los sitios apurínicos/apirimidínicos (AP), además de los diversos productos por oxidación que se generan en las bases nucleotídicas que alteran las fuerzas de enlaces en la cadena del ADN y que no tuvieron tiempo de ser removidas por las glicosilasas, por otra parte, la variación del ensayo con FPG es un método de cuantificación lesión específica (8-OxoG) [Rojas et al., 2009].

Al relacionar lo anterior con los resultados obtenidos en la evaluación de la viabilidad celular por el método de FDA-BrEt (**Tabla R3**), se concluye que, los resultados obtenidos de la genotoxicidad no son enmascarados por procesos celulares como la citotoxicidad. Por lo tanto, los datos indican que las condiciones óptimas de remoción de daño en el ADN

inducido por este agente oxidante, H₂O₂ en las hAD-MSK, se encuentran en el intervalo de 0 a 100 μM.

Debido a la significancia estadística obtenida de generación y remoción de daño en la curva concentración-respuesta analizada por los tres métodos empleados (frecuencias, índice de daño y OTM) aunado a los valores de la viabilidad en los cultivos, se decidió seleccionar como condición de trabajo la concentración de 100 μM. Es importante mencionar que, no se emplearon las concentraciones superiores (150 y 200 μM) debido al incremento en la citotoxicidad y el gran número de nucleóides completamente fragmentados (“nubes”) a causa del tratamiento, los cuales son factores que enmascaran tanto la respuesta reparativa como la inducción de las lesiones.

Posteriormente, al cuantificar el daño basal presente en los adipocitos obtenidos tras la diferenciación, se observó que éste es mayor en comparación con las hAD-MSK, aproximadamente del doble del valor de OTM, lo anterior podría explicarse como una atenuación de la capacidad de estas células a remover el daño generado por fuentes endógenas o bien que estas células están sujetas al efecto de la producción de ROS elevada de acuerdo al modelo de **Reily C.R. y colaboradores** propuesto en el **2013**. Al evaluar la capacidad de reparación de las 8-OxoG generadas por procesos metabólicos celulares implícitos en la diferenciación a adipocito, se observó una diferencia aún más pronunciada, en el caso del índice de daño de los adipocitos éste fue 6.98 veces mayor comparado con el correspondiente para las hAD-MSK, diferencia que no se manifiesta tan evidente a través del análisis de OTM. Complementariamente, de acuerdo a lo mostrado en las **figuras 23 y 24**, el valor de daño basal (representado en OTM) en adipocitos es equivalente al valor de daño con tratamiento (100 μM H₂O₂) de las hAD-MSK, tanto para la

evaluación de daño global y de 8-OxoG empleando la glicosilasa FPG. Lo anterior nos proporciona un punto de referencia para apreciar mejor el nivel de daño basal que presentan las células diferenciadas. Lo anterior, es indicativo de la atenuación del mecanismo de BER en los adipocitos que sigue el modelo propuesto por **Reily C.R. y colaboradores** en el 2013 (**Figura 9**) y que concuerda con estudios recientes en otros modelos de diferenciación [Narciso et al., 2007; Hilderstrand et al., 2007], de manera importante los hallazgos encontrados por Narciso L. y su grupo de trabajo sugieren una inducción en la producción de ROS como parte del proceso de diferenciación *per se* en el caso del proceso de mioblastos a miotubos, podría ser que en este modelo de diferenciación haya también inducción de ROS las cuales estarían elevando el daño basal en el ADN. Se esperaría que este tipo de daño constante retaría a la célula a incrementar la expresión de componentes de la respuesta reparativa del ADN, sin embargo, los resultados observados en las **figuras 19-22** indican lo contrario.

Finalmente, al efectuar el reto genotóxico a la condición de trabajo (100 μ M de H₂O₂), se observó que los adipocitos no son capaces de remover en su totalidad las lesiones generadas aún después de 24 horas posteriores al reto pero que esto no indujo citotoxicidad en el cultivo (**Tabla R4**) al menos en el intervalo evaluado, con lo cual no solo nos indica que el daño cuantificado es debido al tratamiento y que no hubo enmascaramiento del mismo, también nos sugiere que el daño generado se podría estar acumulando en el genoma. Aunado a esto el hallar el mismo comportamiento en cuanto a las lesiones del tipo 8-OxoG, refuerza la propuesta de la atenuación de los mecanismos de reparación en estas células, específicamente el mecanismo de BER y que se comporta como el modelo mencionado (**Figura 9**).

Conclusiones

En el presente trabajo se mostró que los adipocitos, que se obtienen a partir de un proceso de diferenciación partiendo de células troncales adultas humanas derivadas de tejido adiposo, tienen una menor capacidad de remover las lesiones en el ADN de origen oxidativo con respecto a las hAD-MSC y, que adicionalmente, tienen un daño basal en el ADN mayor al de las hAD-MSC lo cual sugiere una deficiencia para contender con el daño generado de manera endógena y que podría estar relacionado con la producción de especies reactivas de oxígeno y/o con el proceso de diferenciación. Se sugieren experimentos complementarios para la cuantificación de ROS así como el uso de otros agentes oxidantes en ambos tipos celulares, además de ensayos para la cuantificación de transcritos y proteínas relacionados con la reparación del ADN.

De manera importante, se observó que el tratamiento no causó citotoxicidad en los adipocitos y que al relacionarse con su deficiencia en la reparación del daño pone en evidencia la posible acumulación de daño en el ADN de estas células. Si bien se sabe que un proceso de diferenciación incluye movimientos en la cromatina que involucran silenciamiento de genes innecesarios y compactación de la misma, además de la evidencia reportada acerca de una disminución del mecanismo de reparación global del genoma de NER (GG-NER) en células diferenciadas [**Ramos-Espinoza et al., 2012**], esto nos lleva a pensar que posiblemente parte del daño que no se pudo remover se encuentra en estos fragmentos no transcritos del ADN, sin embargo, también se sabe que bajo ciertos estímulos los adipocitos pueden salir del estado postmitótico que los caracteriza y entrar en división celular en donde la acumulación de estas lesiones retomarí una importancia

mutagénica ya que se corre el riesgo de la replicación y transcripción de estas secuencias dañadas y que incluso podrían favorecer el desarrollo de cáncer entre otras enfermedades degenerativas.

Finalmente, la terapia con células troncales tiene una enorme ventaja sobre los injertos autólogos y los trasplantes y ésta cada vez gana más terreno dentro de la medicina regenerativa, debido a esto, es muy importante conocer los mecanismos que salvaguardan la integridad del genoma así como la sensibilidad al daño que puede tener una población dada y así tener una descripción del comportamiento de la misma ante ciertos estímulos que son parte de un procedimiento quirúrgico.

Perspectivas

- ✓ Realizar diferenciación a otro tipo celular (Condrocitos, Osteocitos, Neuronas, etc.) y realizar ensayos análogos de genotoxicidad.
- ✓ Realizar pruebas con un cultivo primario de adipocitos humanos (Daño basal y reto genotóxico) para hacer contraste de daño en el ADN y reparación.
- ✓ Cuantificar la generación de especies reactivas de oxígeno en los 3 tipos celulares (hAD-MSC, células diferenciadas a partir de hAD-MSC y cultivo primario de adipocitos).
- ✓ Cuantificar la expresión de proteínas y de los mRNA relacionados a la reparación del ADN.
- ✓ Realizar ensayos nsayos análogos con otro agente genotóxico con la finalidad de evaluar otros mecanismos de reparación en el mismo modelo.

Referencias.

- Agnez-Lima L.F. et al. DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms. *Mutation Research*. 751: 15–28 (2012).
- Almeida K.H., Sobol R.W. A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA Repair*. 6: 695–711 (2007).
- Almeida K.H., Sobol R.W. A unified view of base excision repair: Lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA Repair*. 6: 695–711 (2007).
- Berquist B.R., Wilson D.M. III. Pathways for repairing and tolerating the spectrum of oxidative DNA lesions. *Cancer Letters*. 327: 61–72 (2012).
- Casorelli I. et al. Methylation damage response in hematopoietic progenitor cells. *DNA Repair*. 6: 1170– 1178 (2007).
- Carlson B.M. et al. *Stem Cell anthology*. Elsevier. 1st Edition. 43-50 (2009).
- Collins A. et al. Launch of the ComNet (comet network) project on the comet assay in human population studies during the International Comet Assay Workshop meeting in Kusadasi, Turkey (September 13-16, 2011). *Mutagenesis*. 2012 Jul; 27(4):385-6. doi: 10.1093/mutage/ges014.
- Collins A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*. 26 (3): 249-61 (2004).
- Dalhus B., Laerdahl J.K., Backe P.H., Bjørnas M. DNA base repair – recognition and initiation of catalysis. *FEMS Microbiol Rev*. 33: 1044–1078 (2009).
- Deans R.J., Moseley A.B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*. 28 (8): 875-884 (2000).
- Decordier I., Vande Loock K., Kirsch-Volders M. Phenotyping for DNA repair capacity. *Mutat Res*. 705: 107–129 (2010).

- Dizdaroglu M. Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms, repair and disease. *Cancer Letters*. 327: 26–47 (2012).
- Dizdaroglu M. Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms, repair and disease. *Cancer Letters*. 327: 26–47 (2012).
- Fortini P, Ferretti C, Dogliotti E. The response to DNA damage during differentiation: pathways and consequences. *Mutat Res*. 2013 Mar-Apr; 743-744:160-8. doi: 10.1016/j.mrfmmm
- Frankenberg-Schwager M. Review of repair kinetic for DNA damage induced in eukaryotic cells *in vitro* by ionizing radiation. *Radiother Oncol* 14, 307-320 (1989).
- Frosina G. The bright and the dark sides of DNA repair in stem cells. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010: 845396 (2010).
- García-Martínez C. et al. Impact on fatty acid metabolism and differential localization of FATP1 and FAT/CD36 proteins delivered in cultured human muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 288: C1264–C1272 (2005)
- Harfouche G., Martin M.T. Response of normal stem cells to ionizing radiation: A balance between homeostasis and genomic stability. *Mutation Research*. 704: 167–174 (2010).
- Hedge M.L., Mantha A.K., Hazra T.K., Bhakat K.K., Mitra S., Szczesny B. Oxidative genome damage and its repair: Implications in aging and neurodegenerative diseases. *Mech. Age. Dev.* 133: 157–168 (2012).
- Hildrestrand G. et al. Expression patterns of Neil3 during embryonic brain development and neoplasia, *BMC Neurosci.* 10: 45 (2009).
- Hildrestrand G.A., Diep D.B., Kunke D., Bolstad N., Bjørnas M., Krauss S., et al., The capacity to remove 8-oxoG is enhanced in newborn neural stem/progenitor cells and decreases in juvenile mice and upon cell differentiation. *DNA Repair* 6: 723–732 (2007).
- Hoeijmakers J. H. J. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. 411; 366-374 (2001).

- Huertas P. DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17: 11–16 (2010).
- Iyama T., Wilson D.M. III. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair*. 12: 620– 636 (2013).
- Kenyon J., Gerson S.L., The role of DNA damage repair in aging of adult stem cells. *Nucleic Acids Res.* 35: 7557–7565 (2007).
- Kiess W. et al. Adipocytes and adipose tissue. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 22 (1): 135–153 (2008).
- Krokan H.E., Bjørås M. Base Excision Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5:a012583.
- Krystona T. B., Georgieva A. B., Pissis P, Georgakilasa A. G.. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research*, 711: 193–201 (2011).
- Kubo Y. et al. Organization of extracellular matrix components during differentiation of adipocytes in long-term cell culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol.--Animal* 36:38~4 (2000).
- Lehmann A.R. DNA polymerases and repair synthesis in NER in human cells. *DNA Repair*. 10: 730– 733 (2011).
- Lenzken S., Loffreda A., Barabino S. M. RNA Splicing: A New Player in the DNA Damage Response. *Int J Cell Biol.* 2013: 12 pages (2013).
- Mathews L.A., Cabarcas S.M., Hurt E.M. *DNA Repair of Cancer Stem Cells* (Springer, New York, 2013).
- Li et al. Checkpoint protein Rad9 plays an important role in nucleotide excision repair. *DNA Repair*. 12: 284– 292 (2013).
- Lindahl T. An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 71: 3649–3653 (1974).
- Maynard S. et al. Human embryonic stem cells have enhanced repair of multiple forms of DNA damage. *Stem Cells*. 26: 2266–2274 (2008).

- Melis J. P.M., Luijten M., Mullenders L. H.F., van Steeg H. Nucleotide Excision Repair and Cancer. DNA repair and Human Health. Chapter 5. 121-127 (2011).
- Michelle L. Heacock, Stefanick D. F., Horton J. K., Wilson S. H. Alkylation DNA damage in combination with PARP inhibition results in formation of S-phase-dependent double-strand breaks. DNA Repair, 9: 929–936 (2010).
- Moorea S. P.G., Toomirea K.J., Strauss P.R. DNA modifications repaired by base excision repair are epigenetic. DNA Repair. 12: 1152– 1158 (2013).
- Narciso L. et al., Terminally differentiated muscle cells are defective in base excision DNA repair and hypersensitive to oxygen injury, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104: 17010–17015 (2007).
- Nemecca A.A., Wallace S.S., Sweasya J.B. Variant base excision repair proteins: Contributors to genomic instability. Seminars in Cancer Biology. 20: 320–328 (2010).
- Nickoloff J., Hoekstra M. DNA Damage and Repair: DNA Repair in Higher Eukaryotes. Humana Press, New Jersey. 65-78 (1998).
- Nospikel T, Hanawalt PC. DNA repair in terminally differentiated cells. DNA Repair. 1:59–75 (2002).
- Nospikel T., Hanawalt P.C. Terminally differentiated human neurons repair transcribed genes but display attenuated global DNA repair and modulation of repair gene expression. Mol. Cell. Biol. 20: 1562–1570 (2000).
- O. Momcilovic, L. Knobloch, J. Fornasaglio, S. Varum, C. Easley, G. Schatten, DNA damage responses in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells, PLoS ONE 5 e13410 (2010).
- Parsons J.L., Dianov G.L. Co-ordination of base excision repair and genome stability. DNA Repair. 12: 326– 333 (2013).
- Peña H.G., Watts R.S. 125I-OIL RED 0: Chromatography, radiopurity and lipid binding. J Nucl Med. 12 (5). 245-248 (1971).

- Prall W.C. et al. Age-related transcription levels of KU70, MGST1 and BIK in CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells, *Mech. Ageing Dev.* 128: 503–510 (2007).
- Rahman T., Hosen I., Islam M. M. T., Shekhar H. U. Oxidative stress and human health. *Adv. Bios. Biotech.* 3: 997-1019 (2012).
- Ramos-Espinosa P., Rojas E., Valverde M. Differential DNA damage response to UV and hydrogen peroxide depending of differentiation stage in a neuroblastoma model. *Neurotoxicology.* 33(5):1086-95 (2012).
- Reily C.R., Koch L., Keith O., Marchetto M.C., Martins C.M. The role of DNA repair in the pluripotency and differentiation of human stem cells. *Mutation research.* 752: 25–35 (2013).
- Rolseth V. et al. Widespread distribution of DNA glycosylases removing oxidative DNA lesions in human and rodent brains. *DNA Repair* 7: 1578–1588 (2008).
- Sotiropoulou P.A. et al. Bcl-2 and accelerated DNA repair mediates resistance of hair follicle bulge stem cells to DNA-damage-induced cell death. *Nat. Cell Biol.* 12: 572–582 (2010).
- Srivastava N., Gochhait S., de Boer P., Bamezai R.N.K. Role of H2AX in DNA damage response and human cancers. *Mutation Research.* 681: 180–188 (2009).
- Stahl A, Evans JG, Pattel S, Hirsch D, Lodish HF. Insulin causes fatty acid transport protein translocation and enhanced fatty acid uptake in adipocytes. *Dev Cell.* 2(4):477-88 (2002).
- Staresinic et al. Coordination of dual incision and repair synthesis in human nucleotide excision repair. *EMBO J.* 28(8): 1111–1120 (2009).
- Sugasawa K. Regulation of damage recognition in mammalian global genomic nucleotide excision repair. *Mutation Research.* 685: 29–37 (2010).
- Thomson L.H. Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: The molecular choreography. *Mutation Research.* 751: 158–246 (2012).

- Valverde M., Rojas E. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. *Mutation Research*, Volume 681, Issue 1, 93-109 (2009).
- Vater C., Kasten P., Stiehler M. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomaterialia*. 7; 463- 467 (2011).
- Waters R., Teng Y., Yu Y., Yu S., Reed S.H. Tilting at windmills? The nucleotide excision repair of chromosomal DNA. *DNA Repair*. 8: 146–152 (2009).
- Wilson D.M.III, Kimb D., Berquista B.R., Sigurdson A.J. Variation in base excision repair capacity. *Mutation Research*. 711: 100–112 (2011).
- Wu Q. et al. FATP1 Is an Insulin-Sensitive Fatty Acid Transporter Involved in Diet-Induced Obesity. *Mol. Cell. Biol.* 26 (9): 3455–3467 (2006).
- Zuk P.A. et al. Chondrogenic potential of multipotential cells from human adipose tissue. *Plast Reconstr Surg*. 113(2): 585-94 (2004).
- Zuk P.A. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*. 7 (2): 211-228 (2001).