



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Respuesta al daño en el ADN durante la adipogénesis a partir de células mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Juan Tomás Torres Gregorio

TUTOR PRINCIPAL
Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

COMITÉ TUTOR
Dr. Juan José Montesinos Montesinos
Instituto Mexicano del Seguro Social

Dra. Marcela Lizano Soberón
Instituto de investigaciones Biomédicas

Ciudad Universitaria, Ciudad de México. Junio, 2022



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.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio C239 del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la Dirección de la Dra. Mahara Angelica Valverde Ramírez con el financiamiento de los proyectos del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) A1-S-21417** y del **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la DGAPA-UNAM IN209320**.

Dedicatoria

A mi madre, por creer desde el principio en el propósito de esta meta, hoy nuestros esfuerzos han rendido frutos. Este logro, así como los que vengan son también suyos.

Agradecimientos

Un agradecimiento muy especial a la Dra. Mahara, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, en donde conocí a personas maravillosas. Gracias por motivarme dar lo mejor de mí, por sus consejos y su paciencia.

Gracias al Dr. Emilio Rojas por siempre tener la disponibilidad de brindar su apoyo y orientación para la mejora de este trabajo.

A la Dra Alex muchas gracias por sus enseñanzas y su guía durante la etapa experimental de este proyecto, su experiencia y sus charlas hicieron de este trabajo algo muy ameno.

A mis compañeros de laboratorio y amigos, Ricardo, Aaron, Emanuel y Paulina, gracias por todo, por sus consejos y por todas las buenas e inolvidables experiencias que compartimos en esta etapa, sin ustedes esta experiencia no hubiera sido igual, gracias.

A mi amiga y colega Ana Elenka, gracias por estar conmigo en cada momento, por que tu amistad ha sido también un impulso y una motivación para seguir avanzando.

Contenido

Abreviaturas	6
Índice de figuras gráficos y tablas	7
Resumen	8
Introducción	9
Daño al ADN	9
Respuesta al daño en el ADN (DDR)	10
Proteínas cinasas que regulan la DDR	12
Los rompimientos en la cadena del ADN como señales para el inicio de la DDR	13
La DDR regula la estructura de la cromatina para promover la reparación	14
Fosforilación de la variante de histonas H2AX para la reparación de DSBs	15
La DDR y el arresto del ciclo celular	15
El mantenimiento del genoma durante la diferenciación celular	16
Capacidad reparativa de las células troncales	17
Capacidad reparativa en células terminalmente diferenciadas	18
La capacidad reparativa durante la adipogénesis	20
Planteamiento del problema	22
Hipótesis	22
Objetivo general	22
Objetivos particulares	23
Esquema experimental	24
Materiales y métodos	25
Cultivo celular	25
Ensayo de diferenciación celular	25
Tinción con rojo oleoso, evidenciar acumulación de lípidos	25
Viabilidad celular	26
Daño en el ADN, DSBs	26
Ensayo cometa neutro	26
Activación de la Respuesta al Daño en el ADN (DDR)	27
Fosforilación de ATM y H2AX	27
Capacidad de reparación de DSBs	28
Resultados	29

Diferenciación adipogénica a partir de MSCs	29
Viabilidad celular	31
DSBs en la adipogénesis	31
Activación de la DDR durante la adipogénesis	33
Capacidad de reparación de los DSBs a través de la adipogénesis	35
Reto con etopósido de la capacidad reparativa y activación de la DDR antes y después de la diferenciación	35
Viabilidad en la cinética de reparación inducida con etopósido	35
Cinética de reparación de DSBs inducidos por etopósido	36
Activación de la respuesta al daño en el ADN en MSCs y adipocitos	38
Correlación entre la generación de DSBs y la activación de la respuesta al daño en el ADN en MSCs y adipocitos	40
Discusión	43
ATM durante la adipogénesis	45
Capacidad de reparación y activación de la DDR durante la adipogénesis frente a un reto genotóxico	46
Activación de la DDR en MSCs y adipocitos	47
Conclusiones	51
Referencias	52

Abreviaturas

ADN	Acido desoxirribonucleico
DDR	Respuesta al daño al ADN
HR	Recombinación homóloga
NHEJ	Unión de extremos no homólogos
BER	Reparación por escisión de bases
NER	Reparación por escisión de nucleótidos
MMR	Reparación de apareamientos erróneos
ATM	<i>Ataxia Telangiactesia-Mutated</i>
ATR	<i>ATM and RAD3-related</i>
DNA-PKcs	<i>DNA-dependent Protein Kinase 2</i>
CHK1-2	<i>Checkpoint Kinase 1-2</i>
PIKK	<i>Phosphatidil Inositol Kinase-like Kinase</i>
DSB	Rompimiento de cadena doble
SSB	Rompimiento de cadena sencilla
ATP	Trifosfato de adenosina
MRN	Complejo Mre11-Rad50-NBS1
MDC1	<i>Mediator of DNA damage checkpoint protein 1</i>
SC	Células troncales
ASC	Células trocales adultas
HSC	Células troncales hematopoyéticas
ASPP1	<i>Apoptosis-Stimulating of p53 Protein 1</i>
BSC	Células troncales del folículo capilar
BRCA1	<i>Breast Cancer 1</i>
E2F1	<i>E2f transcription factor 1</i>
NSC	Células troncales neuronales
53BP1	<i>Tumor suppressor p53-binding protein</i>
8-OxoG	8-Oxoguanina
MSCs	Células mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo
FDA/BrEt	Diacetato de fluorosceína-Bromuro de etidio
hFAT-P	Proteína transportadora de ácidos grasos humana

Índice de figuras gráficos y tablas

Figura 1. Tipos de daño sobre el ADN y especificidad de los mecanismos de reparación.	9
Figura 2. Representación de las vías de respuesta al daño al ADN (DDR).	10
Figura 3. Organización de los dominios PIKK.	11
Gráfica 1. Cambios morfológicos y acumulación de lípidos durante la adipogénesis de las MSCs.	27
Gráfica 2. Viabilidad durante la adipogénesis.	28
Gráfica 3. DSBs basales a través de la adipogénesis.	29
Gráfica 4. Activación de la DDR a través de la adipogénesis.	30
Gráfica 5. Fosforilación de ATM y H2AX a través de la adipogénesis	32
Gráfica 6. Viabilidad celular en la cinética de reparación inducida por etopósido.	33
Gráfica 7. Cinética de reparación de DSBs en MSCs y adipocitos inducida por etopósido.	35
Gráfica 8. Activación de la DDR durante la cinética de reparación de DSBs inducida por etopósido.	36
Gráfica 9. Correlación entre la activación de la DDR y los DSBs	37

Resumen

Se estima que ocurren alrededor de 100,000 lesiones de ADN por día en el genoma de los mamíferos. Para contrarrestar estos daños, las células tienen sistemas de reparación que detectan, señalan y reparan el ADN. Estos procesos ocurren en un contexto de actividades celulares como la transcripción, replicación, organización de la cromatina y progreso del ciclo celular. El mecanismo responsable de coordinar la reparación con estos procesos celulares es la respuesta al daño del ADN (DDR).

ATM y ATR son las principales proteínas cinasas responsables de regular las señales de la DDR en respuesta a rompimientos de doble cadena (DSBs) y rompimientos de cadena sencilla (SSBs) en el ADN respectivamente. Una respuesta temprana de la activación de estas cinasas es la fosforilación de la variante de histona H2AX, que funciona como una plataforma para el reclutamiento de modificaciones adicionales de cromatina, proteínas de reparación y consecución de la señalización DDR. Previamente, nuestro grupo de trabajo encontró que la adipogénesis cursa con disminución de la capacidad de reparar lesiones en el ADN y acumulación de daño oxidativo (8-oxoG) y SSBs a través del proceso de diferenciación. Esta acumulación de daño podría dar lugar a la generación de daños secundarios como los DSBS, los cuales podrían significar la adquisición de inestabilidad génica.

Por lo tanto, el propósito del presente trabajo fue determinar el efecto que tiene la diferenciación sobre la acumulación de daño en el ADN, del tipo específico de DSBs y con ello la activación de la DDR, utilizando un modelo de diferenciación adipogénica humana. Se encontró, que la adipogénesis lleva a una acumulación discreta de DSBs y que esta va de la mano con un aumento gradual en la activación de la DDR. Por otro lado, se determinó la capacidad de reparar DSBs inducidos con etopósido como reto genotóxico, comparando la respuesta entre las células mesenquimales humanas (MSCs) y los adipocitos derivados de éstas. Los resultados obtenidos indican que las MSCs son capaces de reparar los DSBs inducidos con etopósido más eficientemente que los adipocitos. En cuanto a la activación de la DDR ante el reto genotóxico (etopósido), se observó una activación significativa de la DDR tanto en MSCs como en adipocito, sin embargo, en las células mesenquimales la activación de la DDR disminuye 48h post tratamiento, mientras que en los adipocitos no fue posible determinar disminución en la activación de la DDR post tratamiento.

Introducción

Daño al ADN

La integridad del genoma es un requisito para la apropiada función celular y una transmisión exitosa del genoma a la progenie. Sin embargo, se estima que alrededor de 100,000 lesiones al ADN ocurren por día en el genoma de mamíferos como consecuencia de errores en la replicación, productos del metabolismo celular (especies reactivas de oxígeno) o agentes químicos ambientales (Hoeijmakers, 2009; Giglia-Mari, et al 2011). El daño en el ADN se define como un cambio en la estructura que puede ser una adición química o disrupción a una base o una ruptura en una o en ambas cadenas del ADN (Brenstein *et al* 2013).

Un daño persistente en el ADN puede inducir mutaciones, como sustituciones de bases y pequeñas inserciones/deleciones, así como rearrreglos cromosómicos. Tal inestabilidad del genoma es un paso esencial para el desarrollo de cáncer y contribuye al envejecimiento y a enfermedades relacionadas con la edad. De igual forma, el daño en el ADN puede promover la muerte celular que lleva a otras patologías que cursan con atrofia del tejido (Iyama y Wilson, 2013).

Por lo tanto, las células poseen múltiples vías de reparación para preservar la integridad del genoma cuando surge el daño. Los mecanismos de reparación del ADN más importantes presentes en células eucariontes se ilustran en la figura 1. Es posible identificar mecanismo de reparación específicos para un tipo de lesión particular y se muestran algunos ejemplos específicos (**Fig. 1**).



Fig. 1. Tipos de daño sobre el ADN y especificidad de los mecanismos de reparación. Ejemplos de inductores de diferentes tipos de daño sobre el ADN y los correspondientes mecanismos de reparación que remueven tales lesiones (Hoeijmakers, 2001).

Respuesta al daño en el ADN (DDR)

La mayoría de los mecanismos de reparación pueden operar de forma independiente para reparar las lesiones simples. Sin embargo, cuando las lesiones en el ADN son persistentes o son demasiadas para ser procesadas por las enzimas de reparación disponibles, se activa una red de vías moleculares evolutivamente conservada conocida como respuesta al daño en el ADN (DDR) (**Fig. 2**) (Simonatto, 2007).

La DDR es la encargada de coordinar a la reparación con otros procesos celulares puestos en marcha como la transcripción génica, la replicación del ADN, la organización de la cromatina y la progresión del ciclo celular, con el objeto de minimizar el impacto de las lesiones en el ADN sobre la integridad del genoma. De hecho, la reparación del ADN, el arresto del ciclo celular, la apoptosis, la

remodelación de la cromatina, la regulación transcripcional, progresión de la replicación, control metabólico y muchas otras vías celulares están bajo la influencia de las señales de daño en el ADN. Por lo tanto, se considera a la DDR como una intrincada red de señales moleculares cuya respuesta va a depender del tipo, magnitud y severidad de la lesión (Khanna y Shiloh 2010).

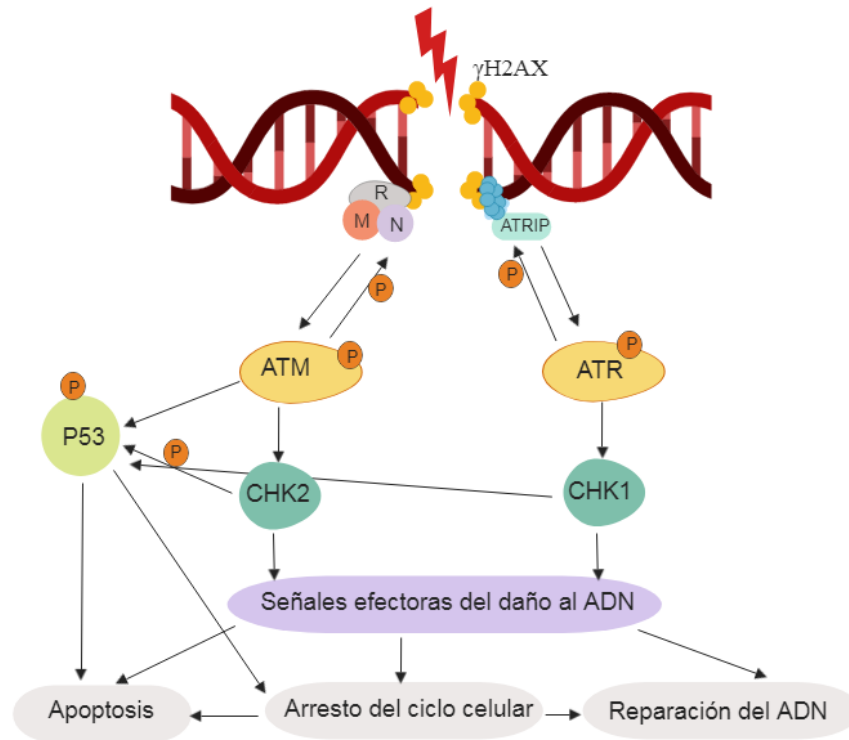


Fig. 2. Representación de las vías de respuesta al daño al ADN (DDR). Los daños al ADN y el estrés replicativo inducen rompimientos de cadena sencilla y doble, las cuales activan a ATM y a ATR respectivamente. ATM y ATR son transductores de señales clave de las vías río abajo en la DDR. Una vez fosforiladas, estas cinasas llevan a la activación de los reguladores del ciclo celular, CHK1 y CHK2, los cuales encienden las señales de los puntos de control en la progresión del ciclo celular para generar una ventana de tiempo en la que actúen los mecanismos de reparación. ATM y ATR también fosforilan a H2AX y amplifican las señales de daño al ADN. De manera adicional, la DDR induce la activación del supresor de tumores p53, un sensor crítico del daño al ADN, el cual determina el destino celular dependiendo de los niveles de daño o de la eficiencia de la reparación (Tsuiko *et al*, 2018). ATM: *Ataxia Telangiactesia-Mutated*; ATR: *ATM and RAD3-related*; CHK1-2: *Checkpoint Kinase 1-2*.

Proteínas cinasas que regulan la DDR

El concepto de “vías de supervivencia al daño en el ADN” (lo que hoy se podría considerar como la DDR), surgió a finales de los años 80’s y comienzos de los 90’s. Experimentalmente el concepto surgió con el descubrimiento de los puntos de control del ciclo celular en levadura. Sin embargo, el campo de estudio de las señales del daño en el ADN se consolidó cuando las cinasas de Ser/Thr, ATM (Ataxia Telangiectesia-Mutated), ATR (ATM and RAD3-related), DNA-PKcs (DNA-dependent Protein Kinase 2) y CHK2 (Checkpoint Kinase 2) fueron descubiertas (Arunkumar *et al*, 2003; Arunkumar *et al* 2005; Arad *et al*, 2008).

ATM, ATR y DNA-PKcs son proteínas cinasas que forman parte de la familia PIKK (Phosphatidil Inositol Kinase-like Kinase) (**Fig. 3**). Los miembros de esta familia “PIKK de respuesta al daño en el ADN” fosforilan proteínas en motivos Ser/Thr-Gln (S/T-Q) y participan en la respuesta temprana del daño en el ADN. De hecho, las tres cinasas son activadas por lesiones en el ADN vía la acción de subunidades reguladoras específicas.

Las cinasas ATM y ATR son consideradas las principales enzimas que orquestan las señales de daño en el ADN, mientras la DNA-PKcs es principalmente una enzima de reparación del ADN involucrada en la vía NHEJ que repara DSBs (Khanna y Shilo, 2010).

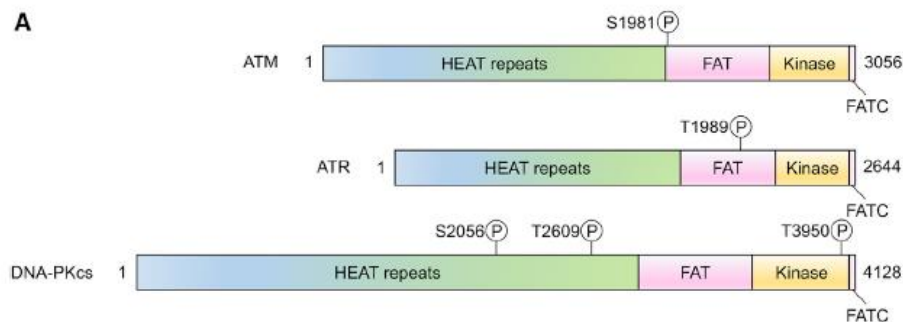


Fig. 3. Organización de los dominios PIKK. Las cajas coloreadas representan dominios proteicos; los números representan los residuos de aminoácidos. Los principales sitios de fosforilación están señalados con una letra P encerrada en un círculo (Sibanda *et al*, 2017; Blacford y Jackson, 2017). PIKK: *Phosphatidil Inositol Kinase-like Kinase*

Los rompimientos en la cadena del ADN como señales para el inicio de la DDR

Para que la reparación y la señalización del daño ocurran, una lesión en el ADN debe primero ser detectada. De hecho, cada proceso de reparación es activado por sensores de daño en el ADN que reconocen grupos particulares de lesiones. Por ejemplo, el heterodímero Ku es un sensor de terminaciones de doble cadena del ADN, mientras glicosilasas altamente especializadas reconocen lesiones específicas en las bases púricas o pirimídicas en la vía de reparación de escisión de bases (BER) (Xu, et al 2001).

Debido a que en la DDR una amplia variedad de lesiones lleva a la activación únicamente de dos principales vías de señalización controladas por ATM y ATR, la pregunta de qué tipo de lesiones son monitoreadas para iniciar la señalización del daño en el ADN es algo que aún se discute.

Se sabe que la DDR no es iniciada por los sensores de daño empleados en la reparación del ADN, debido a que estos responden a tipos de daño altamente específicos. Lo cual se entiende al considerar, el que cientos de miles de lesiones oxidativas en las bases del ADN ocurren al día por célula. Si la DDR fuera activada por la presencia de este tipo de lesiones, sería un impedimento para la progresión del ciclo celular (debido a una detención permanente en los puntos de control del ciclo celular) o la viabilidad celular (vía la activación del programa apoptótico).

La DDR debe tener la flexibilidad de activarse solo cuando un proceso de reparación dado no funciona y la lesión se vuelve persistente. Debido a esta razón, la DDR y la reparación no son representados dentro de un esquema lineal, debido a que son procesos paralelos que interactúan entre sí (Khanna y Shilo, 2010).

La activación inicial de las señales de la DDR se basa en sensores específicos que monitorean dos alteraciones de ADN clave: las DSBs por la vía ATM y SSBs por la vía de ATR. De hecho, los SSBs son intermediarios de cualquier tipo de proceso de

reparación que involucre la escisión de una o varias bases (lo que ocurre en la mayoría de los mecanismos de reparación). En paralelo, los DSBs también surgen por acción de factores endógenos tales como la reacción abortiva de la topoisomerasa II, el procesamiento de nucleótidos en horquillas de replicación detenidas, telómeros disfuncionales, el paso de la horquilla de replicación sobre gaps de SSBs o la cercanía espacial de estos (Cobb et al 2003).

El reconocimiento de SSBs o DSBs para la iniciación de la DDR representa una solución para el reto de construir una red de señalización que monitoree el ADN e identifique numerosos tipos de lesiones. Sin embargo, esto implica que muchas de las lesiones deben transformarse hacia una segunda lesión previo a la activación de las PIKKs. Esta propiedad provee eficiencia a la DDR, para que se active solamente cuando la reparación falla, sea lenta o las lesiones sean numerosas (Khanna y Shilo, 2010).

La DDR regula la estructura de la cromatina para promover la reparación

Las lesiones en el ADN ocurren en varios contextos cromosómicos incluyendo el estado compacto o laxo de la cromatina, lo cual influye la activación de la DDR y la eficiencia de la reparación del ADN. Por ejemplo, en la cromatina altamente condensada, la reparación de las estructuras dañadas es más difícil presumiblemente debido a que a las proteínas de reparación físicamente les es difícil acceder a las estructuras dañadas (Sirbu y Cortez 2013).

Independientemente de las cinasas de la DDR, mecanismos dependientes de ATP inducen una rápida relajación de la cromatina alrededor de los sitios con daño, lo que es requerido para el reclutamiento de proteínas que monitorean los daños. Sin embargo, varios cambios en la cromatina dependientes de la DDR también promueven un ambiente local apropiado para la reparación. Estos cambios incluyen la creación de una plataforma de cromatina para el reclutamiento de factores de

reparación y señalización al ADN y la inhibición de cualquier transcripción para prevenir una potencial interferencia con la reparación del ADN (Kruhlak *et al* 2006).

Fosforilación de la variante de histonas H2AX para la reparación de DSBs

Entre los diferentes tipos de daños que existen en el ADN, los DSBs son considerados el tipo de lesión más dañina. Un solo DSB puede inducir la muerte celular, al igual que los DSBs son intermediarios de muchos re-arreglos del genoma. El paso más temprano de la señalización de DSBs en células eucariontes, es llevado a cabo por la acción combinada de la cinasa ATM y el complejo MRN (Mre11-Rad50-NBS1). ATM es una de las proteínas tempranas que se acumulan en sitios de DSBs y es activada por agentes inductores de DSBs. ATM es el producto del gen mutado en ataxia-telangectasia, un desorden genético caracterizado por una neurodegeneración progresiva, disfunción del sistema inmune, hipersensibilidad a la radiación ionizante y una marcada predisposición al cáncer (Shiloh *et al*, 1995).

En células sin daño, ATM está en una forma inactiva dimérica o multimérica. Posterior a un tratamiento con radiación ionizante, la activación de ATM se correlaciona con la autofosforilación, la transición a una forma monomérica que se localiza en la cromatina que rodea a los DSBs. Una consecuencia temprana de la activación de ATM en DSBs es la fosforilación de la variante de la histona H2AX en una serina evolutivamente conservada (S139), generando γ H2AX (la versión fosforilada). Complejos de MRN, MDC1 y γ H2AX reclutan más ATM para facilitar la propagación de γ H2AX a lo largo de dominios de cromatina. γ H2AX-MDC1 es una plataforma para el reclutamiento de modificadores adicionales de la cromatina, la señalización de la DDR y proteínas de reparación (Shiloh 2006).

La DDR y el arresto del ciclo celular

Adicional a la promoción de la reparación del ADN a través de la regulación directa de las proteínas de reparación y cambios en la cromatina cercana a los sitios de

ADN dañado, la DDR también facilita la reparación a través de otros cambios globales en el ambiente celular. Tal es el caso de la activación de los puntos de control en el ciclo celular para crear una ventana extendida de tiempo que permita la remoción completa de una lesión previo a la replicación celular (Khanna y Shilo, 2010). El monitoreo del daño está ligado a una intrincada cascada de transducción de señales que inducen el arresto celular. Dependiendo de la naturaleza del daño al ADN y de la fase del ciclo celular en la cual la lesión se presenta, el ciclo celular puede ser arrestado en la transición G1/S, dentro de la fase S o la transición G2/M. Alternativamente, cuando el nivel de daño es muy elevado, la apoptosis es desencadenada para proteger al organismo de daños potencialmente peligrosos. Esta detención del ciclo celular dependiente de ATM y ATR es mediada por otras proteínas cinasas blanco de las PIKKs, como Chk2 y Chk1 respectivamente (Houtgraaf *et al* 2006).

Aunque todos los tipos celulares dentro de un organismo están equipados con las mismas vías de señalización y los mismos mecanismos de reparación, la habilidad relativa o incluso la necesidad de reparar las lesiones en el ADN podría variar dependiendo del tipo celular específico y el estado de desarrollo, además de poder cambiar a lo largo de la vida. Como consecuencia, distintos tipos celulares en diferentes etapas del desarrollo podrían adoptar diferentes respuestas cuando hacen frente a los daños en el genoma.

El mantenimiento del genoma durante la diferenciación celular

Existe una importante diferencia en las respuestas inducidas por la DDR basados en el destino celular de las células expuestas a agentes que dañan el ADN. En este sentido, las células que proliferan para generar células hijas con las mismas características de la célula madre (autorrenovación), como en el caso de las células troncales adultas, son sustancialmente diferentes de las células que proliferan hacia la formación de células en estado post mitótico diferenciado.

La información disponible sobre la plasticidad de los mecanismos de reparación del ADN, señalización del daño y muerte celular activos en diferentes estadios del

programa de diferenciación es aún algo que se investiga por sus implicaciones clínicas y su relación con enfermedades crónico-degenerativas (Simonatto *et al* 2007).

Capacidad reparativa de las células troncales

Las células troncales adultas (ASCs) son células multipotentes, con capacidad de autorrenovación que puede producir un limitado número de tipos celulares. Las ASCs están localizadas en nichos específicos del cuerpo, proveen soporte a una variedad de tejidos funcionales y responden a daños físicos (Ullah *et al* 2015). A diferencia de las células troncales embrionarias, las ASCs en la mayoría de los tejidos son principalmente quiescentes, pero retienen la capacidad de proliferar y generar progenitores y células maduras. En ASCs las alteraciones genéticas han sido implicadas en el impedimento de la capacidad de autorrenovación, proliferación y diferenciación, así como el incremento del potencial tumorigénico y envejecimiento. Por lo anterior, las ASCs emplean a los mecanismos de reparación del ADN de forma activa, en combinación con la quiescencia y la baja tasa metabólica que reducen el riesgo de adquisición de daño al ADN de manera considerable (Hyka-Nouspikel *et al*, 2011).

Cuando la proliferación es requerida, las células responden al daño en el ADN activando a la DDR y deteniendo la progresión del ciclo celular, permitiendo así la reparación del ADN a través de una ventana de tiempo generada, previo a la división celular. Por otro lado, cuando los daños están muy extendidos a través del genoma y no pueden ser reparados, la célula puede entrar a un estado de senescencia, inducir la apoptosis o en el caso de células troncales, inducir a la diferenciación. Estos mecanismos protegen y aseguran la integridad genómica de las células hijas (Lieber 2003).

El destino de la célula después de recibir un daño al ADN estará determinado por la severidad de la lesión, la tasa de reparación en ese momento y especialmente por la duración y el grado de activación de la señalización de p53, esto es, entre más rápido se repare el daño, más débil será la activación de p53, previniendo entonces la apoptosis (Sherman *et al* 2011).

La capacidad de la DDR en las células indiferenciadas es especie específico y dependiente del estadio de desarrollo y del tipo celular al cual se diferencien. Por ejemplo, en tejidos con tasa de proliferación elevada como la sangre, las células troncales hematopoyéticas (HSCs) humanas exhiben una atenuación en la capacidad para responder a DSBs, permitiendo la persistencia de los foci de γ H2AX y fomentando la apoptosis a través de p53 y ASPP1 (*Apoptosis-Stimulating of p53 Protein 1*) después de un tratamiento con rayos gama. Esta respuesta de la DDR en HSCs humanas explica por qué el sistema hematopoyético es uno de los tejidos con mayor sensibilidad a la radiación. Por otra parte, realizando los mismos experimentos en HSCs de murinos se observó una reparación más eficiente de los daños causados por radiación a través de la vía NHEJ, lo que las hace más resistentes a la apoptosis causada por daños en el ADN (Milyavsky *et al*, 2010). Sin embargo, debido a que estas células usan NHEJ (un mecanismo de reparación propenso a errores) para reparar DSBs, estas pueden sufrir inestabilidad genética, sobre todo en exposiciones crónicas a radiación o cualquier otro agente generador de daño al ADN. Por el contrario, las HSCs humanas proliferantes usan la vía de reparación por recombinación homóloga (HR) de alta fidelidad y por lo tanto mantienen la integridad del genoma (Mohrin *et al* 2010).

La epidermis ofrece otro ejemplo de la especificidad de la DDR a un tipo celular. Usando epidermis de ratón como modelo, Sotiropoulou y colaboradores en 2010 demostraron que después de un tratamiento con radiación ionizante en células troncales del folículo capilar (BSCs), estas fueron resistentes a la apoptosis, independiente de quiescencia y no observaron diferenciación prematura o senescencia celular. Adicional a lo anterior, también se demostró que esta resistencia de la BSCs es una consecuencia de la alta expresión de la proteína Bcl-2 y la rápida atenuación de p53, la cual estuvo correlacionada con una reparación más rápida del ADN a través de la vía NHEJ.

Capacidad reparativa en células terminalmente diferenciadas

Mientras en las ASCs la presencia de daños en el ADN en cualquier sitio del genoma debe ser evitada, una célula en estado terminalmente diferenciado el control de la

integridad de todo el genoma podría ser prescindible, mientras que la integridad de los genes transcritos se mantenga para asegurar el adecuado funcionamiento del tejido (Fortini *et al* 2013).

Varios estudios sugieren que las células cambian sus estrategias de reparación a través de un proceso de diferenciación terminal. Durante la diferenciación terminal una extensa reprogramación del genoma asegura que solo un selecto subgrupo de genes sea transcrito (Forcales y Puri, 2005). En particular los genes involucrados en la progresión del ciclo celular están silenciados cuando una célula terminalmente diferenciada entra en un estado post mitótico. Consistentemente, una expresión negativa de genes de reparación del ADN dependiente del ciclo celular y del genoma entero se ha reportado durante la diferenciación. Sin embargo, el mantenimiento y estabilidad del genoma en las células terminalmente diferenciadas o post mitóticas también es requerido para el mantenimiento de la homeostasis en los tejidos (Simonatto *et al* 2007). De hecho, se plantea que condiciones como la neurodegeneración y cardiomiopatía pueden surgir como consecuencia del daño en células diferenciadas.

Debido a que estas células están fuera del ciclo celular, estas tienen diferentes alternativas para lidiar con lesiones en el ADN, por lo que no es sorprendente que la mayoría de los mecanismos de reparación sean regulados negativamente durante la diferenciación. Muy poco se sabe de los mecanismos moleculares por los cuales el proceso de la diferenciación implica una disminución de la capacidad reparativa y de los eventos moleculares implicados en la señalización de los daños al ADN (Fortini *et al* 2013).

En el caso de la DDR, numerosas proteínas implicadas en esta red son reguladas negativamente durante la diferenciación terminal. Un estudio realizado por Latella y colaboradores en 2004, investigó las diferencias en la DDR en un modelo de diferenciación de músculo esquelético entre células indiferenciadas (mioblastos) y células diferenciadas (miotubos). Durante la diferenciación observaron una inactivación funcional de genes implicados en la señalización de los puntos de control del ciclo celular, como Chk1 (*Checkpoint kinase 1*), ATR (*Ataxia-*

Telangectacia Related), BRCA1 (*Breast Cancer 1*), c-Jun y E2F1 (*E2f transcription factor 1*). Así mismo reportaron que el tratamiento con radiación ionizante inhibe la fosforilación de p53 en miotubos (diferenciados terminalmente), llevando a la adquisición de un fenotipo resistente a la apoptosis. Lo anterior demuestra la extensa reprogramación que ocurre durante la diferenciación terminal y sugiere que las células indiferenciadas y diferenciadas poseen una salida diferente de la DDR frente a los daños genotóxicos que enfrentan.

Otro estudio realizado por Schneider y colaboradores en 2012 evaluó la señalización de la DDR y la radio-resistencia de astrocitos y neuronas terminalmente diferenciados, ambos tipos celulares derivados de células troncales neuronales (NSCs). Se encontró que las NSCs mostraron una activación canónica de la DDR durante la irradiación con rayos X, medido a través de los foci de ATM fosforilada y la fosforilación de sus sustratos 53BP1 y H2AX. En el caso de astrocitos, se observó una marcada atenuación de la activación de ATM y sus sustratos río abajo. En estas células aún se observó la presencia de γ H2AX, siendo esta fosforilada por DNA-PK. En el caso de las neuronas terminalmente diferenciadas, estas aun mostraron la activación de ATM en presencia de daño genotóxicos, la cual estuvo asociada a una reentrada al ciclo celular y una consecuente inducción de la apoptosis.

La capacidad reparativa durante la adipogénesis

Los limitados estudios que se han realizado en neuronas postmitóticas han demostrado que los señalizadores de la DDR se mantienen activos. Pocos tejidos, además de las neuronas, permiten estudiar la actividad de la reparación en células de vida larga (Biton *et al*, 2006). Específicamente, se ha visto que los adipocitos, al igual que las neuronas, son células con una vida larga en condiciones fisiológicas. Estas células podrían renovarse en meses o en años, o no renovarse (Medina-Gómez y Vidal-Puig 2009). Una de las razones por las que la renovación es tan lenta o inexistente, se ha adjudicado a que los adipocitos son especialmente resistentes a la apoptosis. A pesar de que los mecanismos de dicha resistencia no están claros, se podría explicar en parte, por los elevados niveles de Akt/proteína

cinasa B en los adipocitos maduros. Además, los factores anti apoptóticos Bcl-2 y la proteína inhibidora de apoptosis aumentan durante los procesos de adipogénesis, aportando una resistencia a la muerte celular (Tinahones *et al* 2013).

En cuanto a su capacidad reparativa, un estudio realizado por nuestro grupo (Valverde *et al* 2018) reportó que durante la diferenciación adipogénica se da el acúmulo de SSBs y 8-OxoG, así como la disminución de la capacidad reparativa de daños oxidativos generados por peróxido de hidrógeno.

Esta acumulación de genotoxicidad y disminución de la capacidad reparativa de lesiones oxidativas y de SSBs en las células terminalmente diferenciadas puede ser la puerta de entrada para la generación y acumulación de otro tipo de daños secundarios en el ADN como los DSBs, los cuales a su vez podrían estar teniendo un efecto en la activación de la DDR para mantener la integridad genética.

En el presente trabajo es de particular interés conocer los cambios que ocurren en la activación de la DDR durante la diferenciación adipogénica a partir de células mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo (MSCs), con el objeto de contribuir al entendimiento de la regulación de la reparación del ADN durante este proceso de diferenciación particular. Este trabajo, también puede proporcionar información que ayude a entender procesos patológicos asociados a la adquisición de inestabilidad genética que contribuye a desencadenar enfermedades crónico-degenerativas asociadas con la obesidad.

Planteamiento del problema

La activación de la DDR se ha estudiado y se ha descrito principalmente dentro del contexto de células proliferantes, en la cual la maquinaria del ciclo celular está integrada con las señales del daño en el ADN. Sin embargo, en el caso de células post mitóticas diferenciadas la información de la actividad de la DDR es menos conocida (Fortini *et al* 2012). Se han reportado que la salida del ciclo celular durante la diferenciación lleva a una atenuación de los principales mecanismos de reparación del ADN. Particularmente en la adipogénesis la capacidad de reparación de lesiones en el ADN de tipo SSBs y 8-OxoG se ve atenuada conforme progresa el proceso de diferenciación (Valverde *et al*, 2018). Esta baja en la capacidad reparativa del ADN lleva también a la acumulación de daños tipo SSBs, que a su vez pueden llevar a la generación de DSBs. La presencia de lesiones en el ADN como los DSBs, es un estímulo suficiente para inducir la activación de la DDR, sin embargo, esta activación en células terminalmente diferenciadas como los adipocitos es algo que aún no está claro.

Es por ello, que este trabajo a través del uso de un modelo humano de diferenciación adipogénica establece como objetivo, estudiar el efecto que tiene la generación basal, o fisiológica de DSBs y su relación con la activación de la DDR, mediante la identificación de las proteínas ATM y de H2AX fosforiladas.

Hipótesis

Debido a que en la adipogénesis hay una acumulación de SSBs en el ADN y una disminución en la capacidad reparativa de estos, se espera que también haya una acumulación de DSBs relacionada a la activación de la DDR.

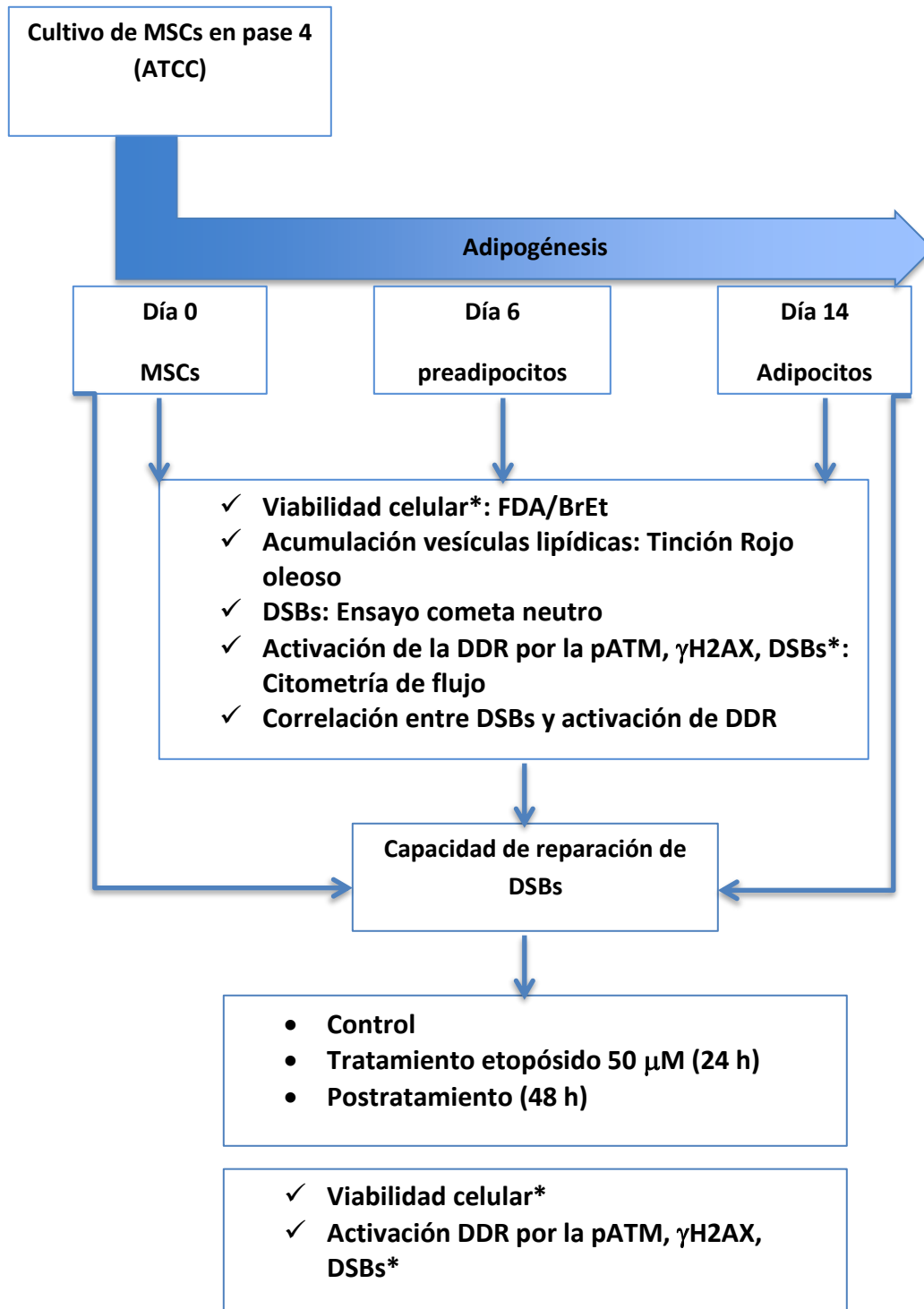
Objetivo general

Evaluar la acumulación de rompimientos de doble cadena en el ADN y la activación de la respuesta al daño en el ADN durante la adipogénesis partir de células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (MSCs).

Objetivos particulares

- Inducir la diferenciación de células MSCs hacia el linaje adipogénico.
- Evidenciar la diferenciación adipogénica a través de la acumulación de lípidos.
- Determinar los niveles de DSBs basales durante la adipogénesis.
- Medir la activación basal de la DDR mediante la fosforilación de ATM y H2AX durante la adipogénesis.
- Evaluar la capacidad de reparación de DSBs inducidos por etopósido y la activación de la DDR al inicio y al final de la adipogénesis.
- Correlacionar los DSBs con la activación de DDR en la adipogénesis.

Esquema experimental



Materiales y métodos

Cultivo celular

Se emplearon células mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo normales (ATCC® Cat. No. PCS500011™). Para los ensayos se usaron células en pases tempranos (4-7). Los cultivos fueron mantenidos en medio MesenPRO RS™ Medium GIBCO® (Cat. No. 12746-012) preparado de acuerdo con las especificaciones del proveedor, se incubaron a 37 °C y 5% CO₂ en cámara húmeda (Water Jacketed US Autoflow Automatic CO₂ Incubator, NUAIRE), los cambios de medio se establecieron cada 48 horas (Lozano-Salgado 2016) y se trabajaron a una confluencia de 40,000 células/cm². Para las cosechas, los cultivos fueron tratados con Tripsina-EDTA 0.05% (Gibco, Cat No. 25300-054) incubados por 3 minutos, posteriormente las células se centrifugaron en un tubo cónico a 1200 rpm por 5 min para su recuperación.

Ensayo de diferenciación celular

Se partió de cultivos de MSCs con una confluencia de 40,000 células/cm² en pase temprano. Se realizó un doble lavado con PBS y se añadió medio de diferenciación “StemPro® Adipogénesis Differentiation Kit, Gibco (Cat. No. A10070-01). Los cambios de medio se establecieron cada 72 horas, se incubó a 37 °C, 5% CO₂ en obscuridad. Para las cosechas, los cultivos fueron tratados con Tripsina-EDTA 0.25% (Gibco, Cat. No. 25200-056) durante 3 minutos y posteriormente la suspensión se pasó a un tubo cónico y se centrifugó a 1200 rpm por 5 minutos para la recuperación de las células.

Tinción con rojo oleoso, evidenciar acumulación de lípidos

Las tinciones se efectuaron en cultivos correspondientes a los días 0, 6 y 14 del proceso de diferenciación adipogénica. Por cada día de evaluación se sembraron cajas de cultivo con MSCs; que al llegar a una confluencia de ~85% se inició la diferenciación (día 0). Para la tinción, se inició con la fijación de las células con paraformaldehído al 10%, posteriormente se realizaron 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 hicieron dos lavados adicionales, se añadieron 0.5 mL de PBS para la visualización en microscopio invertido (Olympus IX50-S8F2). Se adquirieron imágenes de diferentes campos para cada día evaluado. Posteriormente para su cuantificación, se removió el PBS y se extrajo el colorante incubando con isopropanol (750 μ L) por 10 minutos, con agitación y protegido de la luz. Finalmente se tomaron alícuotas del sobrenadante y se colocaron en placas de ELISA para determinar la absorbancia a 500 nm con un espectrofotómetro (Multiskan™ Go, Thermo Scientific™51119200), empleando como blanco isopropanol.

Viabilidad celular

Fue evaluada por el método de FDA-BrEt (Diacetato de fluoresceína-Bromuro de etidio). Se colocaron 10 μ L de la mezcla FDA-BrEt (20 μ L de BrEt (0.02 μ g/ml) + 3 μ L de FDA (0.015 μ g/ml) con 10 μ L de la suspensión celular en PBS en un portaobjetos. Se colocó un cubreobjetos de 18 x 18 mm y con un microscopio de fluorescencia usando un filtro doble (UM61002, Olympus) se captó la fluorescencia emitida en rojo por el BrEt y en verde por el FDA después de ser metabolizado por las esterasas. Discriminando por fluorescencia, rojo = células muertas y verde = células vivas; de varios campos de análisis y representando los resultados porcentualmente.

Daño en el ADN, DSBs

Ensayo cometa neutro

Las células provenientes de los cultivos celulares de interés se cosecharon en PBS y se mezclaron con agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% para ser distribuidas sobre un portaobjetos previamente cubierto con una capa de agarosa regular al 0.5%, colocando un cubreobjetos y dejando solidificar a 4 °C. Posteriormente se le agregó una tercera capa de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% y nuevamente se dejó solidificar a 4 °C. Posteriormente, estas preparaciones fueron colocadas dentro de un vaso Köppling con solución de lisis (2.5 M de NaCl, 100 mM de EDTA,

10 mM de Tris, pH 10; suplementada en fresco con 10% de DMSO y 1% de Tritón X-100) y almacenado a 4 °C por al menos una hora.

Se preparó la solución de electroforesis para cometa neutro (ácido bórico, 200 mM de EDTA y tris-base) para el desenrollamiento y la electroforesis. Se montó la cámara de electroforesis horizontal sobre una cama de hielo previamente nivelada y se colocaron dentro las laminillas orientadas en una misma dirección, bajo condiciones de luz amarilla. Se incubaron por 2 horas para el desenrollamiento del ADN. Posteriormente se inició la electroforesis a un voltaje constante de 25 V y 300 mA por 25 minutos. Una vez terminada la electroforesis, las laminillas fueron transferidas a otra superficie donde se les realizó un doble lavado con solución de neutralización (0.4 M Tris, pH 7.5); posteriormente fueron deshidratadas con etanol absoluto (Rojas et al 1999) y se dejaron secar.

Para la tinción de las laminillas, se les agregó 20 µl de bromuro de etidio (20 mg/ml). Las preparaciones fueron visualizadas a un aumento de 20X usando un microscopio Olympus BX-60 de epifluorescencia (515-560 nm del filtro de excitación, 590 nm de filtro de barrera), acoplado a un digitalizador de imágenes utilizando el software Komet Imaging Ltd V5.0. El daño en el ADN, DSBs fue determinado del análisis de 100 nucleoides por preparación habiendo realizado duplicados de cada una.

El análisis estadístico se hizo con ayuda del software GraphPad Prism 7.04. Los datos de los tres experimentos fueron sometidas a las pruebas de normalidad de Pearson y de Shapiro-Wilk. Debido a que los datos no se comportaron de manera Gaussiana, los datos se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (One-Way ANOVA on Ranks).

Activación de la Respuesta al Daño en el ADN (DDR)

Fosforilación de ATM y H2AX

La activación de la DDR se determinó mediante citometría de flujo empleando el kit *DNA, Muse-Color DNA Damage*. Para cada condición experimental se usaron aproximadamente 100,000 células. Una vez cosechadas, estas fueron lavadas dos veces con PBS, fijadas y permeabilizadas de acuerdo con las especificaciones del

proveedor. Posteriormente las células fueron teñidas con anticuerpo conjugado específico para γ H2AX (Ser139) y 50 μ L de un anticuerpo conjugado específico para ATM fosforilado (Ser 1981) por 30 minutos. Finalmente, las células fueron analizadas usando el citómetro Muse® Cell Analyzer (Muse™ EMD Millipore Co., Hayward, CA, USA). Los resultados adquiridos se expresan como porcentajes de subpoblaciones positivas a los diferentes marcajes. Para evaluar si existen diferencias significativas, los datos serán analizados mediante una prueba paramétrica de ANOVA.

Capacidad de reparación de DSBs

La capacidad de reparación de DSBs, se abordó mediante un estudio cinético. De tal forma que los cultivos celulares tanto de MSCs y adipocitos fueron sujetos al tratamiento con etopósido 50 μ M durante 24 horas para inducir DSBs y la activación de la DDR, tomando en cuenta la literatura (Menéndez et al 2011). Así mismo, la recuperación al daño inducido se determinó 48 h post tratamiento después de ser lavado el tratamiento e incubado los cultivos celulares en condiciones óptimas de medio de cultivo, temperatura y % de CO₂. De tal manera que a partir de cultivos control (basales), al término de tratamiento con etopósido y 48 h post tratamiento de MSCs y adipocitos se determinó el porcentaje de inducción de DSBs mediante el ensayo cometa neutro y la activación de la DDR mediante citometría de flujo siguiendo los protocolos previamente descritos.

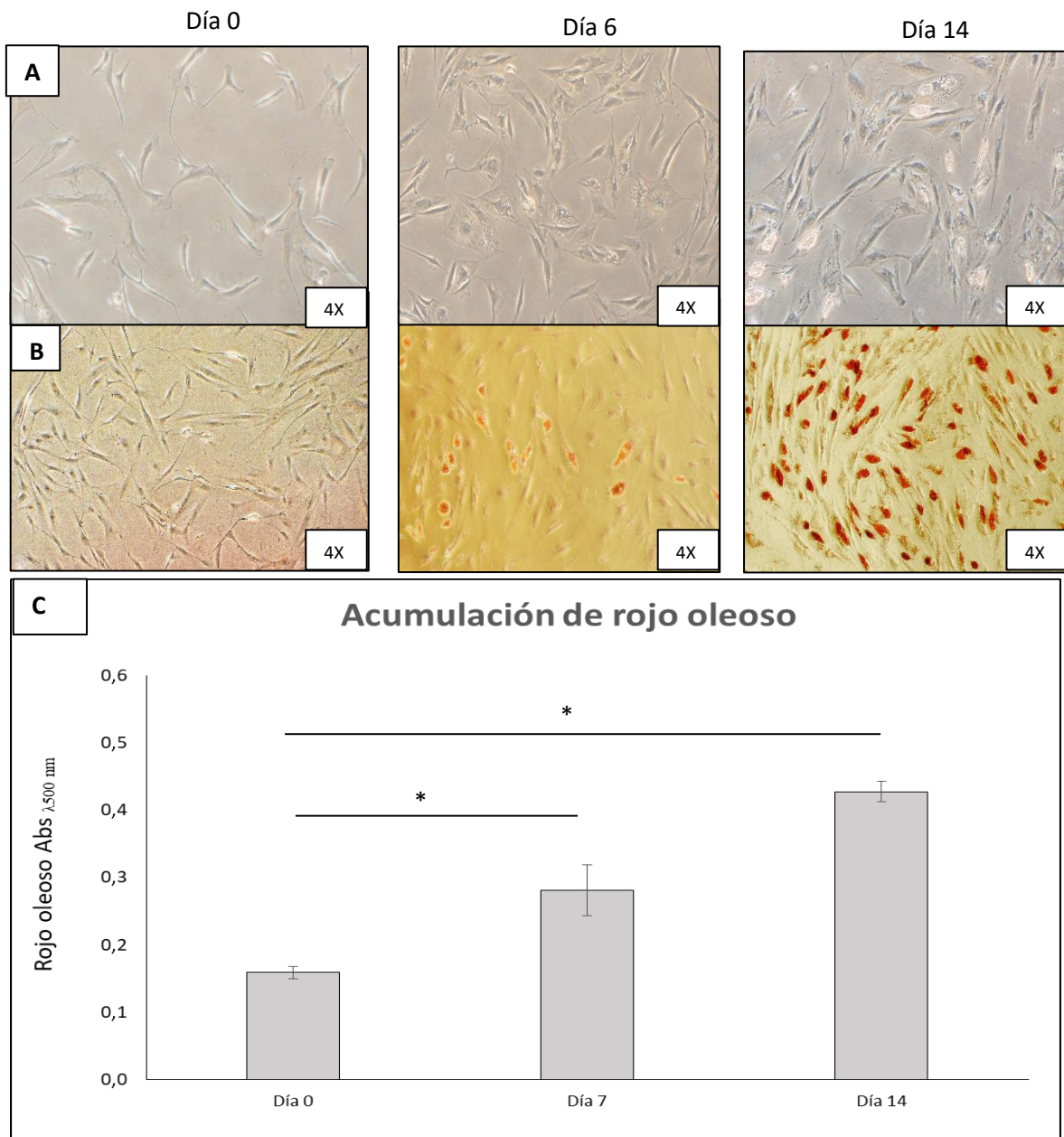
Resultados

Diferenciación adipogénica a partir de MSCs

La adipogénesis se realizó a partir de la línea celular de células mesenquimales derivadas de tejido adiposo (MSCs) (ATCC PCS-500-011), cuya identidad se ha confirmado por nuestro grupo (Lozano-Salgado, 2016, Valverde et al., 2018). Estas células fueron inducidas a la diferenciación en fase 4 con medio de diferenciación “StemPRO Adipogenesis Differentiation Kit, Gibco”. El proceso de diferenciación se siguió por 14 días, realizando cambios de medio cada 72 h, tal como se detalla en la metodología.

La exitosa diferenciación adipogénica se evidencia por cambios morfológicos adquiridos durante los 14 días del proceso. Se apreció en las células aumento en su tamaño, forma y la presencia de vesículas lipídicas (Gráfica 1A). Para confirmar la presencia de lípidos en dichas vesículas, se realizó una tinción con rojo oleoso y se encontró que a partir del día 6 del proceso de diferenciación comenzaba la acumulación de lípidos en la célula (Gráfica 1B).

Para confirmar un aumento progresivo de esta acumulación lipídica, se realizó la cuantificación espectrofotométrica a 500 nm de absorbancia del rojo oleoso. Se observa el aumento progresivo de los valores de absorbancia para rojo oleoso, siendo esto, estadísticamente significativo en el día 6 con respecto al control ($p < 0.05$) lo cual documenta que en nuestro protocolo de diferenciación existe un almacenamiento progresivo de lípidos durante el transcurso de la adipogénesis en 14 días (Gráfica 1C).

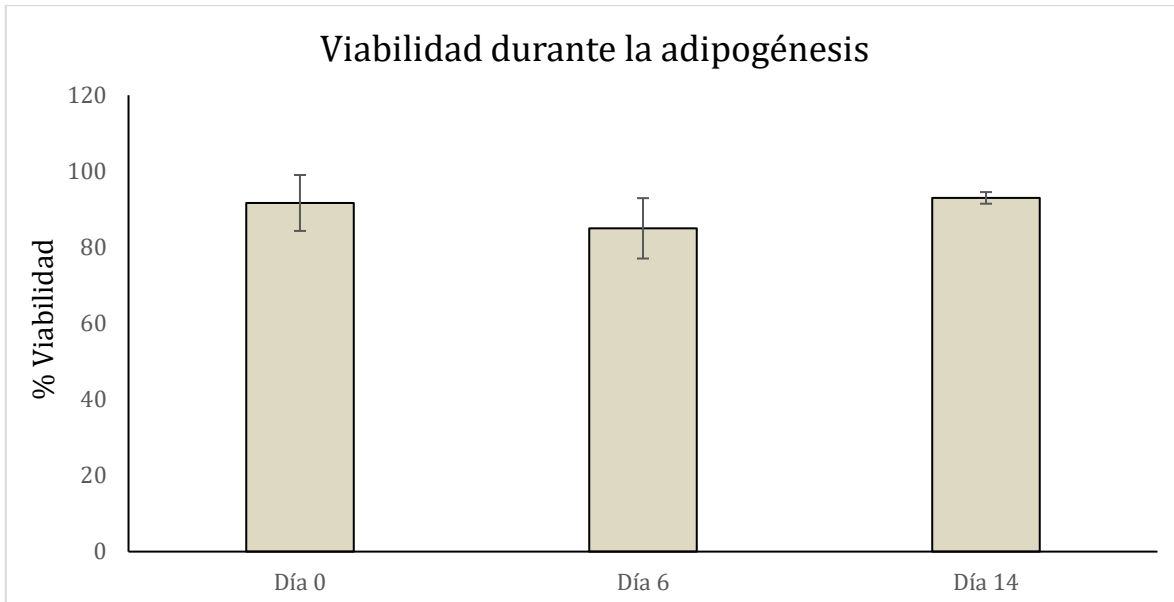


Grafica 1. Cambios morfológicos y acumulación de lípidos durante la adipogénesis de las MSCs.

(A) Proceso de diferenciación adipogénica en los días 0, 7 y 14 en donde se observa un aumento en el tamaño de las células y formas más redondeadas conforme avanza el proceso. (B) Tinción con rojo oleoso para evidenciar la presencia de vesículas lipídicas. (C) Retención del colorante por las células bajo condiciones de adipogénesis, extraído y cuantificado a 500 nm. La grafica muestra el error estándar de la absorbancia y un aumento significativo de la absorbancia en los días 7 y 14 (Análisis de ANOVA, $p < 0.05$).

Viabilidad celular

Se evaluó la viabilidad celular a través de la adipogénesis mediante el método de FDA-BrEt, para determinar la actividad metabólica de esterasas. Se determinó que el protocolo de diferenciación adipogénica transcurre con valores de viabilidad celular superiores al 90% (Gráfica 2).

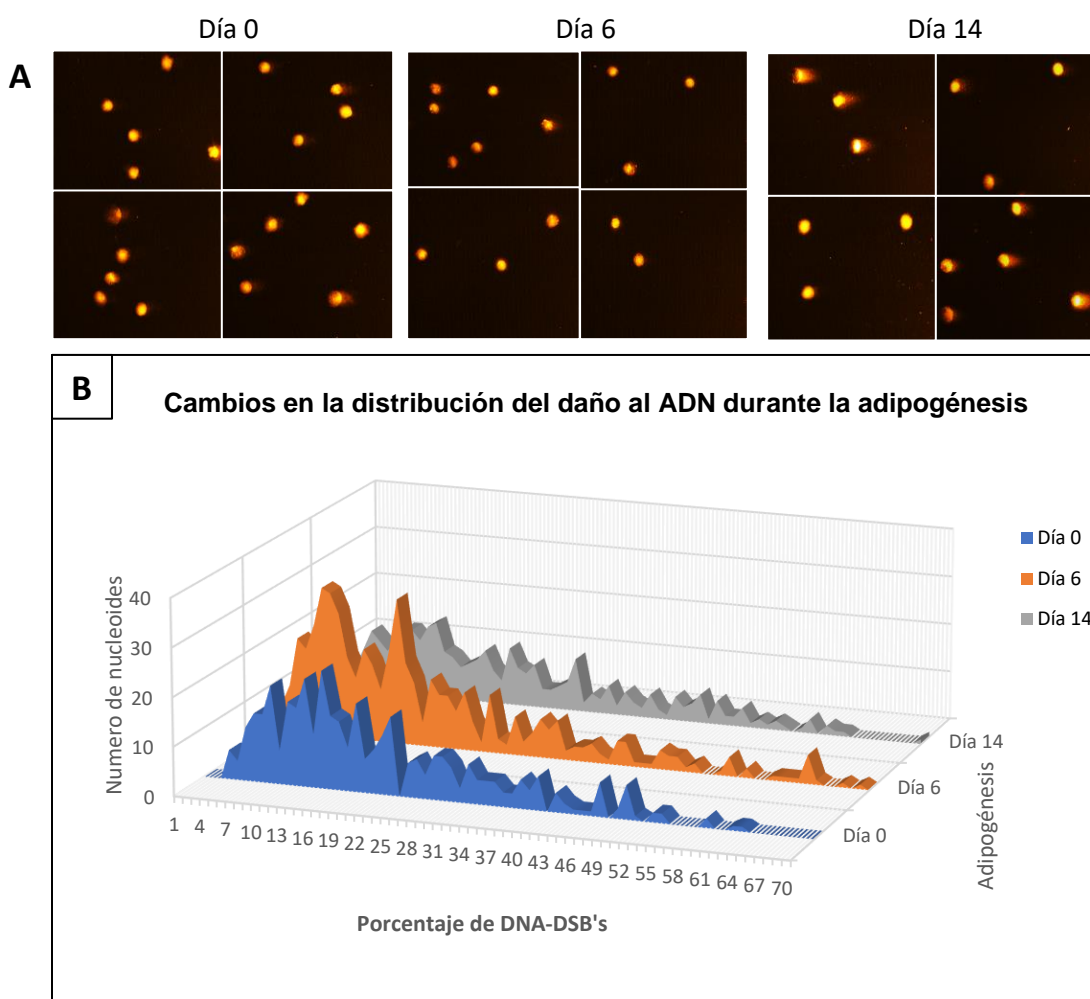


Gráfica 2. Evaluación de la viabilidad durante la adipogénesis. Mantenimiento de la viabilidad durante la diferenciación a partir de MSCs.

DSBs en la adipogénesis

Para evidenciar la acumulación de DSBs durante la adipogénesis, se realizó el ensayo cometa neutro, para cultivos correspondientes a los días 0, 6 y 14 (Gráfica 3). El análisis de la fragmentación del ADN de cadena doble se realizó mediante el software Komet V5.0 (Kinetic Imaging Ltd). Esto nos permite adquirir diversos parámetros que determinan la magnitud del daño en el ADN, particularmente seleccionamos para fines de este trabajo el porcentaje de ADN en la cola (%DNA-DSBs), el cual en las imágenes (Gráfica 3A) representa las colas de los cometas. En las imágenes de los nucleoides representativos del comportamiento a través de los 14 días de diferenciación, es posible apreciar un incremento de la longitud de las colas de los cometas, de forma cualitativa. Adicionalmente, la evaluación cuantitativa del daño en el ADN tiene la ventaja de poder representar la distribución

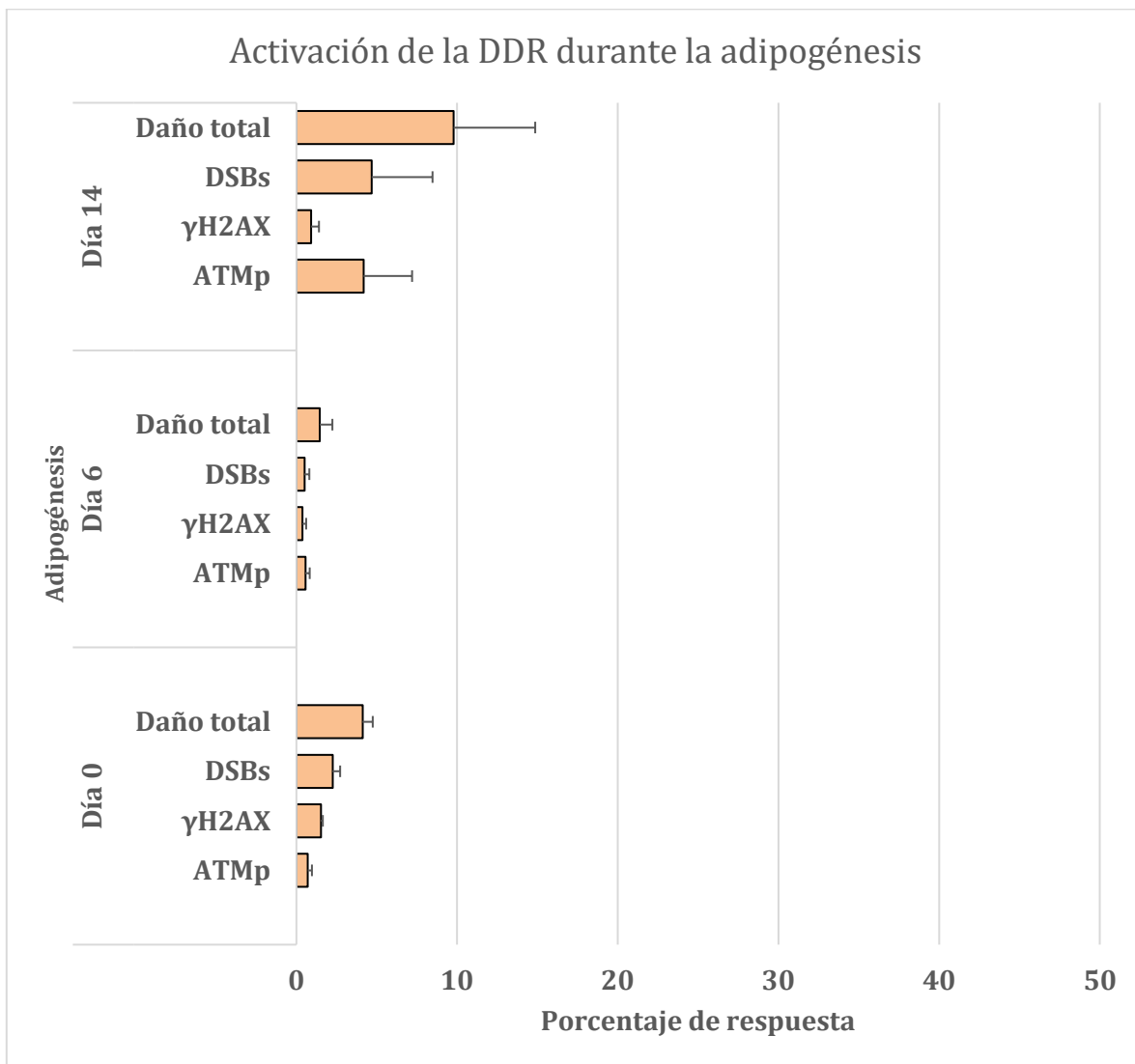
de DSBs de células individuales a través de la adipogénesis (Gráfica 3B). Bajo este análisis se observa que conforme avanzan los días de diferenciación, hay una tendencia en la distribución del daño de los nucleoides en la que se incrementan los valores del %DNA-DSBs con respecto a las MSCs de las cuales inició el proceso sin embargo es importante mencionar que no se encontraron diferencias significativas (análisis de ANOVA, $p > 0.05$),.



Gráfica 3. DSBs basales a través de la adipogénesis. (A) Cometas teñidos con bromuro de etidio y visualizados con microscopio de epifluorescencia a una magnificación de 10x. Se observa un aumento en la longitud e intensidad de las colas del cometa conforme avanza la adipogénesis. (B) Distribución del porcentaje de DNA-DSBs a través de la diferenciación. La distribución del daño en el ADN de doble cadena cuantificado mediante Komet V5.0, muestra nucleoides con un mayor porcentaje de daño conforme avanza la adipogénesis y disminuye el número de nucleoides con bajo porcentaje de daño.

Activación de la DDR durante la adipogénesis

De forma paralela a la determinación del incremento en los DSBs durante la diferenciación, se determinó la activación de la DDR a través de la adipogénesis, monitorizando los días 0, 6 y 14. Específicamente, la activación de la DDR se muestra a través de la fosforilación de dos elementos sensores de la vía de señalización, ATM y H2AX lo cual se evaluó por citometría de flujo. También se evaluó el porcentaje de células con doble marcaje que representa la presencia de DSBs (ATMp+ γ H2AX= DSBs) y el porcentaje de daño total que es la sumatoria de la respuesta observada (Gráfica 4). Los resultados obtenidos se comportan de manera semejante a lo observado como rompimientos de doble cadena de ADN determinado mediante el ensayo cometa neutro (Gráfica 3), en donde se observa la tendencia a un aumento gradual de los DSBs conforme avanza el proceso de la diferenciación adipogénica. Sin embargo, así como en el caso de los resultados de la gráfica 3, estos no mostraron una diferencia significativa (ANOVA $p > 0.05$).



Grafica 4. Activación de la DDR a través de la adipogénesis, porcentaje de respuesta fraccionada de activadores a través de la adipogénesis. Se presenta el porcentaje a nivel basal de fosforilación de ATM, H2AX y los DSBs a través de la diferenciación evaluado mediante citometría. El análisis estadístico de ANOVA reveló que no existen diferencias significativas entre cada uno de los elementos de la DDR ni entre los diferentes días de la diferenciación ($P > 0.05$)

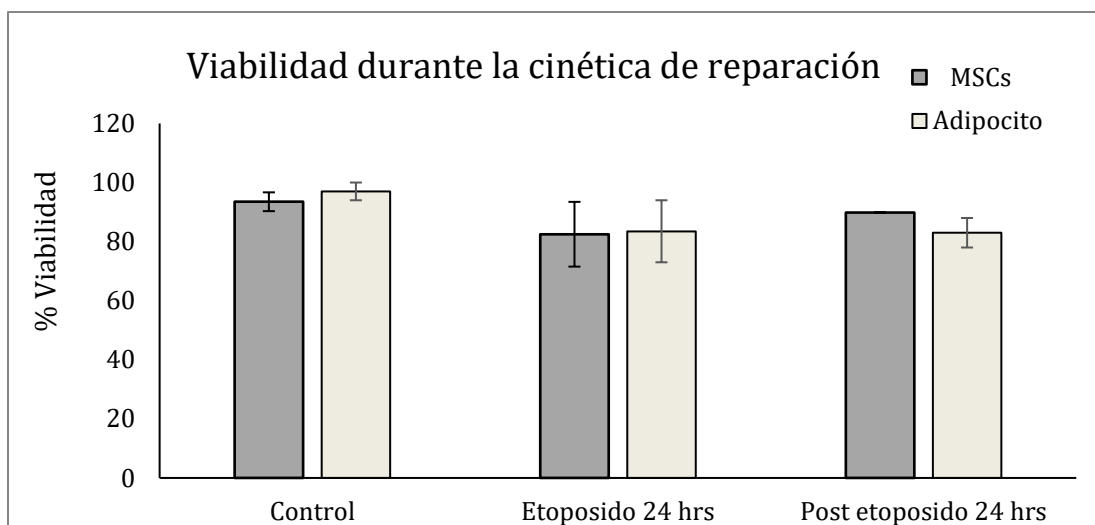
Capacidad de reparación de los DSBs a través de la adipogénesis

Reto con etopósido de la capacidad reparativa y activación de la DDR antes y después de la diferenciación

Dado que los DSBs y la activación de la DDR a través de la adipogénesis es un fenómeno que se presenta de manera discreta; planteamos el escenario de conocer su respuesta ante el reto genotóxico inducido con etopósido. Dicho escenario requiere de la inducción de DSBs en condiciones donde la viabilidad celular no sea afectada en un porcentaje alto. Para ello, tomando en cuenta la literatura (Menéndez et al 2011) adoptamos la concentración de 50 μ M durante 24 horas para inducir DSBs al igual que la activación de la DDR. Habiendo inducido las respuestas esperadas se hizo el seguimiento de un periodo de post tratamiento retirando el etopósido y cambiando a medio fresco para determinar si se recuperaban los parámetros iniciales.

Viabilidad en la cinética de reparación inducida con etopósido

Se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo de FDA-BrEt en condiciones control o basales para MSCs y adipocitos, al término del tratamiento con etopósido y 48 h post tratamiento (Gráfica 5). Los resultados al respecto muestran porcentajes altos (85 - 95 %) de viabilidad celular (actividad metabólica) en las tres condiciones experimentales.

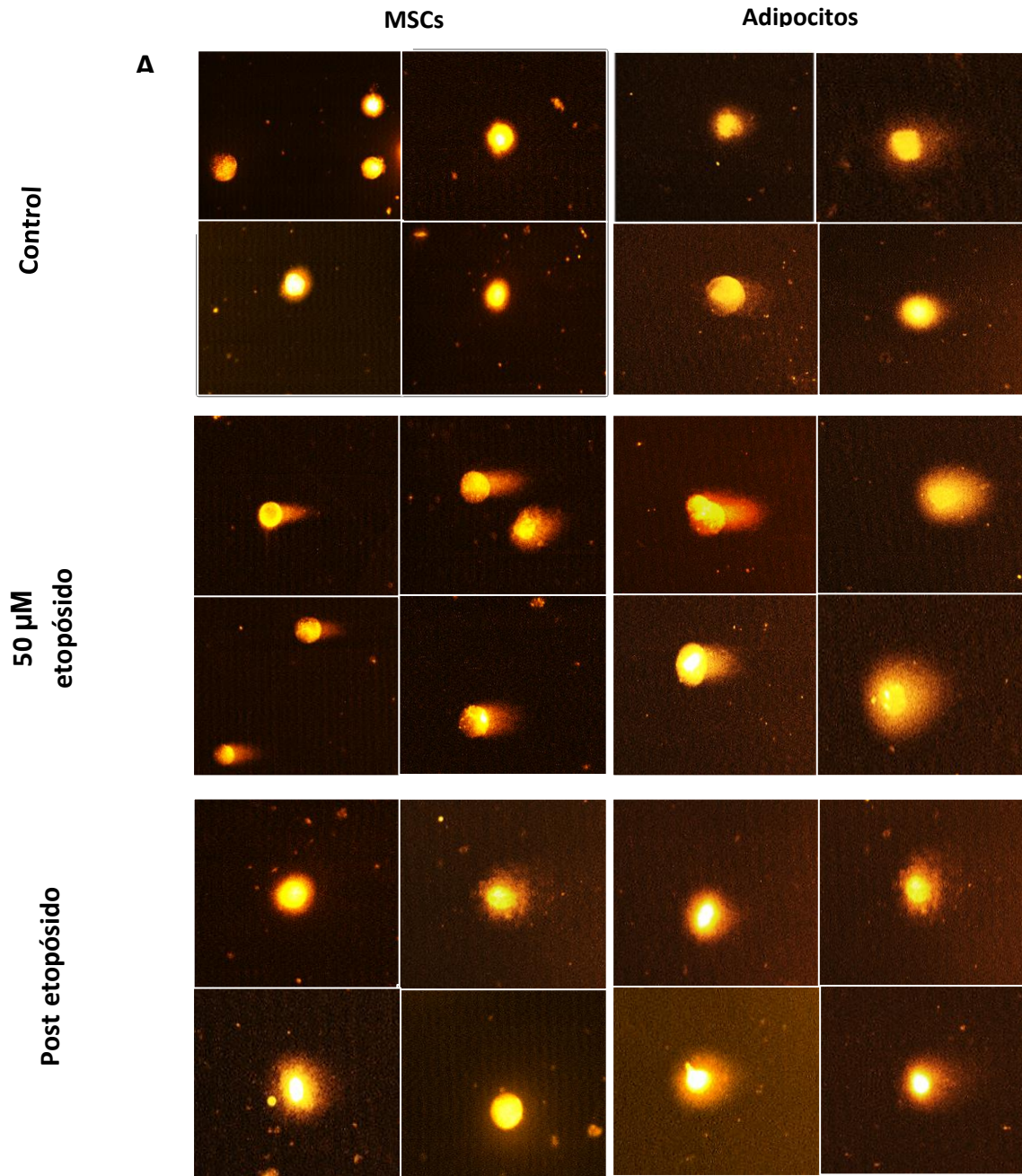


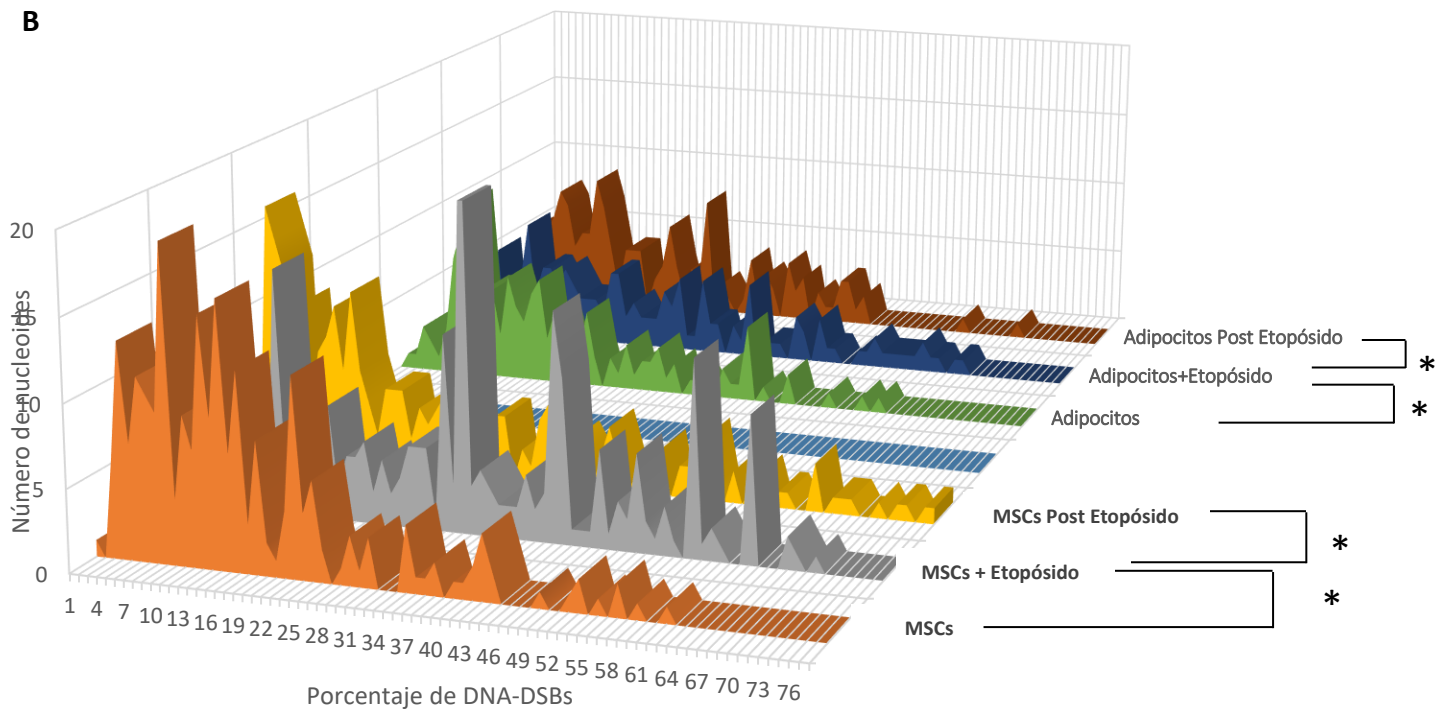
Grafica 5. Viabilidad celular en la cinética de reparación inducida por etopósido. Se muestra la viabilidad inicial, el cambio generado por el tratamiento con etopósido 50 μM por 24 horas y la obtenida tras el post tratamiento de 24 horas en condiciones óptimas de cultivo.

Cinética de reparación de DSBs inducidos por etopósido

Una vez verificado el mantenimiento de la viabilidad celular frente al tratamiento con etopósido (50 μM), se realizó un ensayo de la cinética de reparación de DSBs en células MSCs y adipocitos. La evaluación de los DSBs se realizó mediante el ensayo cometa neutro. El tratamiento con etopósido incrementó los DSBs en ambos tipos celulares, evidenciado por el aumento en la longitud e intensidad de fluorescencia de las colas de los cometas. Así mismo, la eficiencia de la reparación del ADN tras 48 h de post tratamiento se observa como la disminución de la longitud e intensidad de fluorescencia de las colas de los cometas (Gráfica 6A). Analizando la valoración cuantitativa del daño (%DNA-DSBs) se hace evidente el aumento de los DSBs ante el reto genotóxico con el etopósido 50 μM , mostrando por un lado mayor sensibilidad de las células MSCs con respecto a los adipocitos. A la vez que se observa una capacidad de reparación de DSBs ligeramente más eficiente en las MSCs con respecto a los adipocitos (Gráfica 6B). La mayor sensibilidad de la MSCs quizás es debido al estrés replicativo que genera el etopósido, ya que estas células tienen una tasa de replicación mayor que los adipocitos.

Capacidad de reparación de DSBs inducidos con etopósido en MSCs y adipocitos



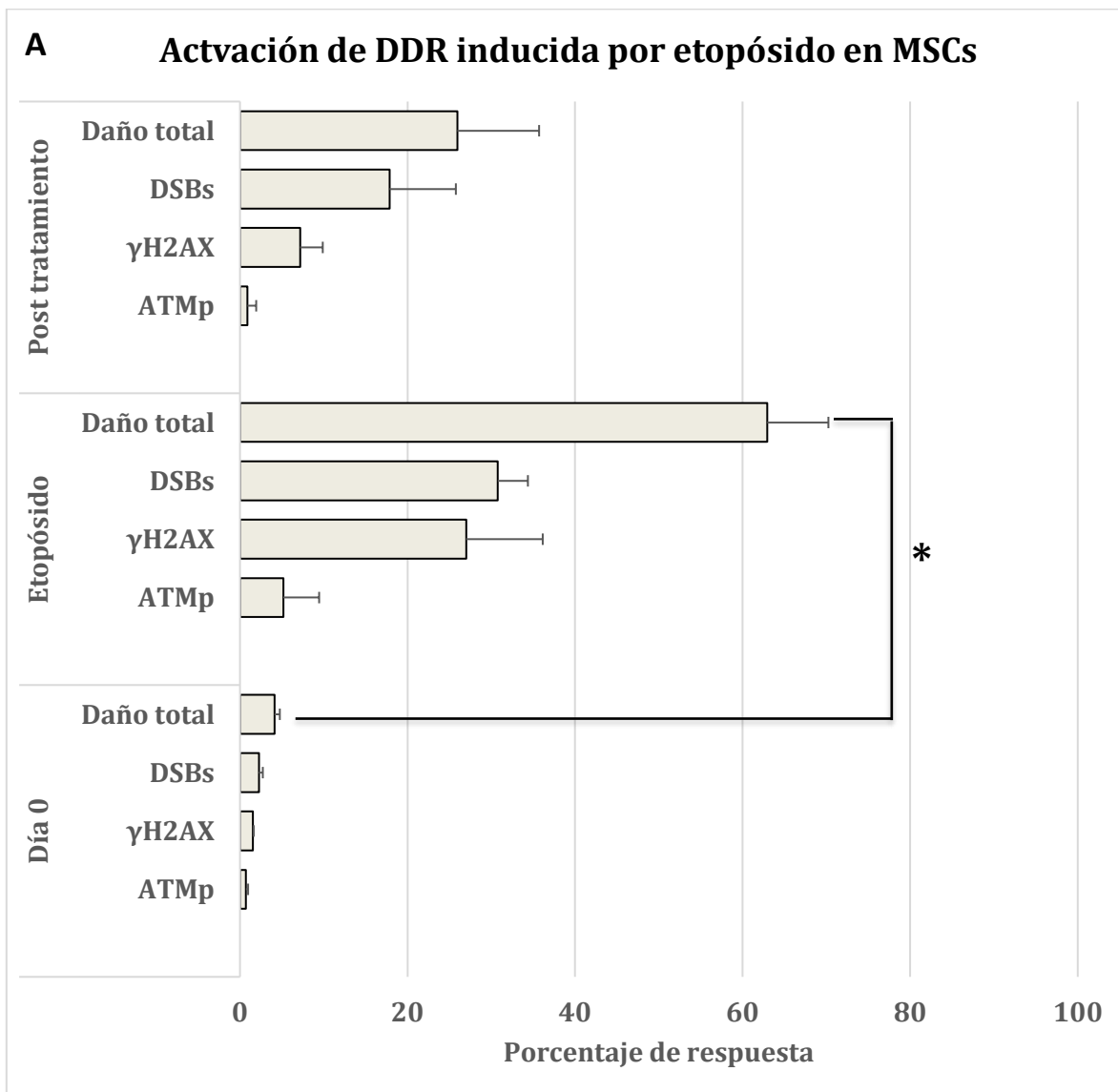


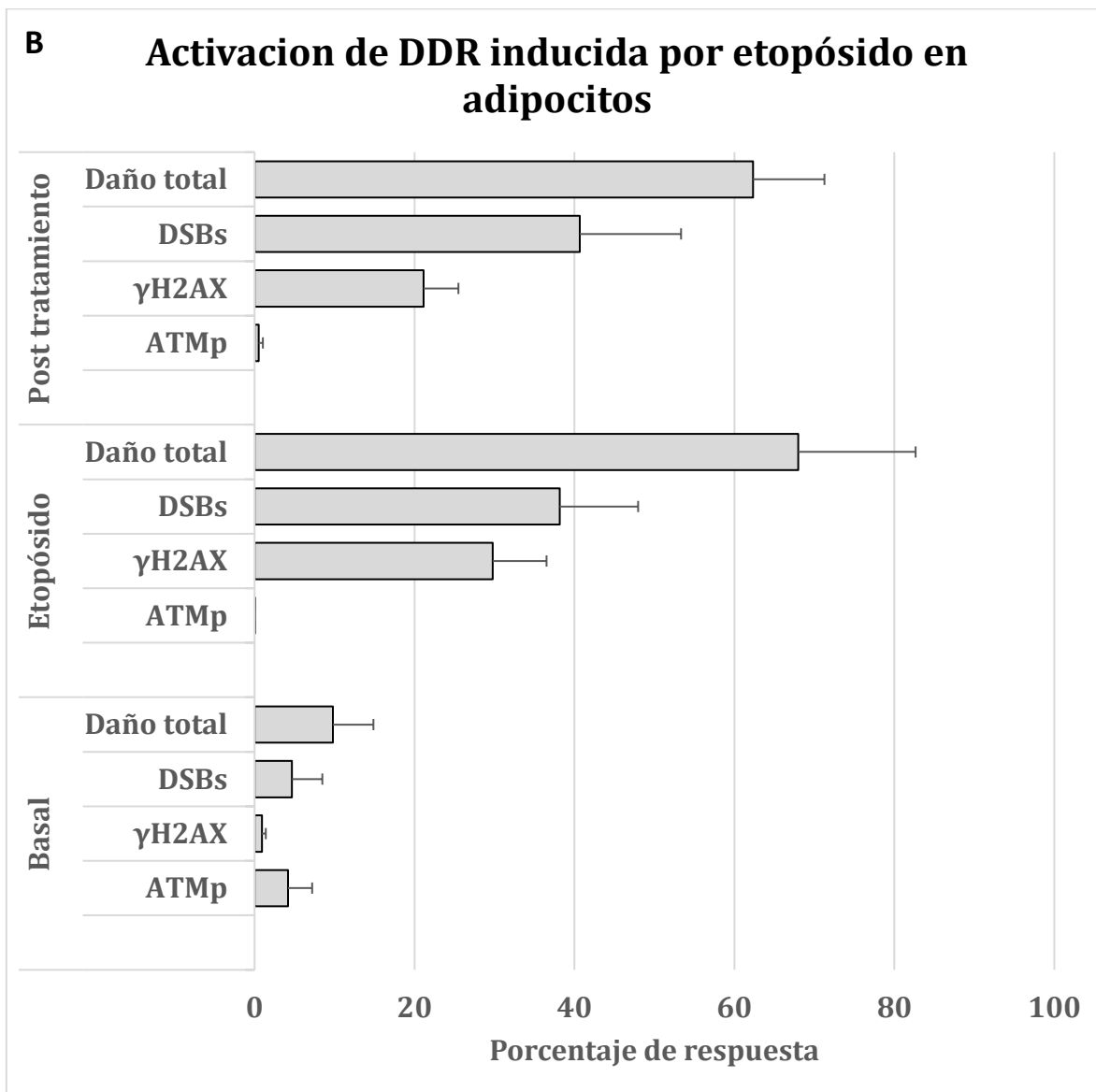
Grafica 6. Cinética de reparación de DSBs inducidos por etopósido en MSCs y adipocitos. (A) Imágenes de cometas en diferentes condiciones experimentales, mostrando incrementos en las colas que representan DSBs que disminuyen en los posts tratamientos. (B) Niveles basales de DSBs en MSCs y adipocitos, DSBs inducidos por etopósido y la disminución 48 h post tratamiento. Se observa que ambos tipos celulares tienen la capacidad de remover los DSBs. La grafica muestra un aumento significativo estadísticamente de DSBs entre el control y el tratamiento con etopósido. Diferencias significativas entre el tratamiento con etopósido y el post tratamiento tanto en MSCs como en adipocitos (Análisis de ANOVA, $p < 0.05$). No se encontraron diferencias significativas al momento de comparar ambos tipos celulares ($p > 0.05$), lo que señala que ambas se comportaron igual frente al reto con el etopósido.

Activación de la respuesta al daño en el ADN en MSCs y adipocitos

Paralelo a la evaluación de DSBs durante la cinética de reparación de MSCs y adipocitos, se evaluó la activación de la DDR para determinar las diferencias en la capacidad de respuesta de estas células cuando se les reta con un inductor de DSBs como el etopósido. La evaluación de la DDR se hizo mediante citometría de

flujo usando el marcaje de la fosforilación de ATM, H2AX, el doble marcaje que denota DSBs y el daño total que representa la sumatoria de respuestas positivas (Gráfica 7). Se observa una activación de la DDR de magnitud semejante para las células MSCs y los adipocitos. Sin embargo, esta activación de la DDR solo es significativa en MSCs. A pesar de no existir significancia, se observa que existe un patrón que coincide con el comportamiento observado en los DSBs determinados por el ensayo cometa.





Grafica 7. Activación de la DDR en la cinética de reparación inducida por etopósido. Ambos tipos celulares conservan la capacidad de activar a la DDR en respuesta al tratamiento con etopósido, siendo mayor y estadísticamente significativa ($p < 0.05$) la activación en MSCs (A) en comparación con los adipocitos en los cuales no se encontró significancia ($p < 0.05$) (B). Esta activación disminuye de manera más evidente en MSCs 48 horas post tratamiento.

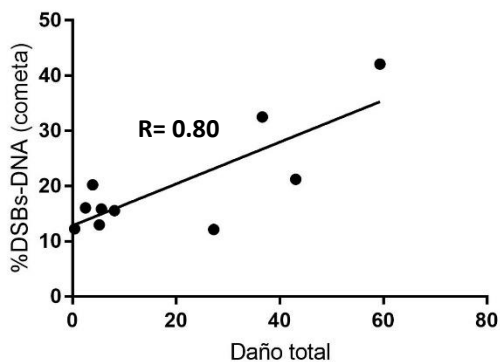
Correlación entre la generación de DSBs y la activación de la respuesta al daño en el ADN en MSCs y adipocitos

Finalmente, para evaluar la relación entre los DSBs determinados mediante el ensayo cometa y la actividad de cada uno de los elementos de la DDR tanto para

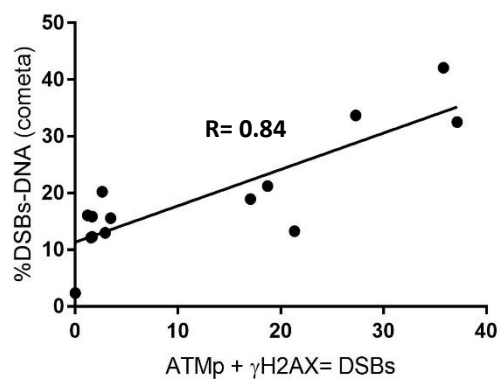
MSCs como para adipocitos, se realizó un análisis de correlación. Se observa que hay diferencia en la pendiente de ambos tipos celulares; si bien es positiva para ambas, esta correlación es significativa solo para células MSCs ($p < 0.05$), mientras que para los adipocitos no existe significancia en ningún caso.

A

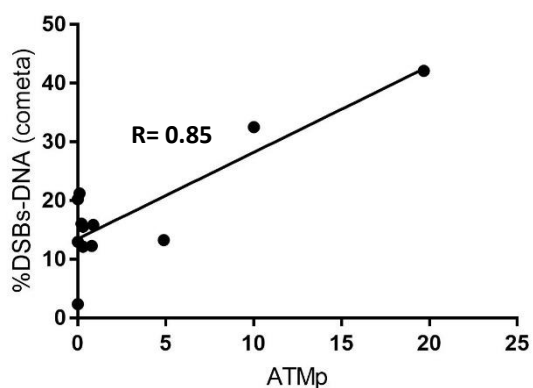
Correlación DSBs vs Daño total (MSCs)



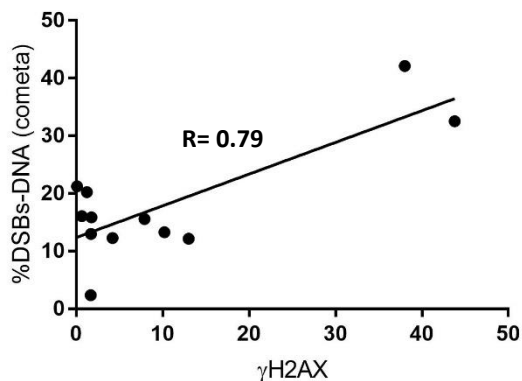
Correlación DSBs vs ATMp + γ H2AX (MSCs)



Correlación DSBs vs ATMp (MSCs)

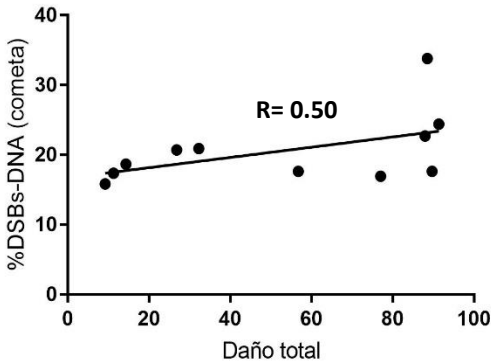


Correlación DSBs vs γ H2AX (MSCs)

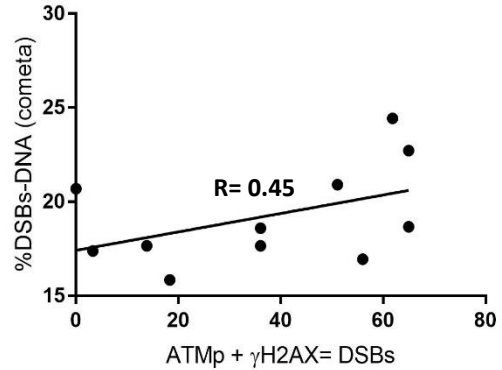


B

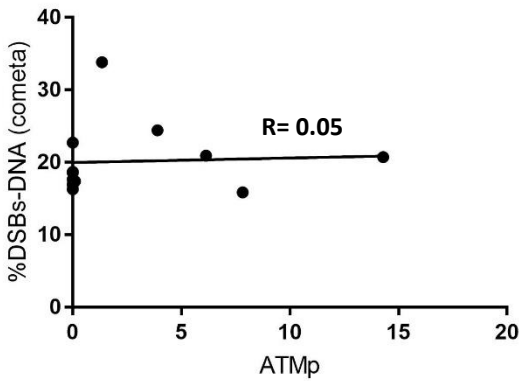
Correlación DSBs vs Daño total (adipocitos)



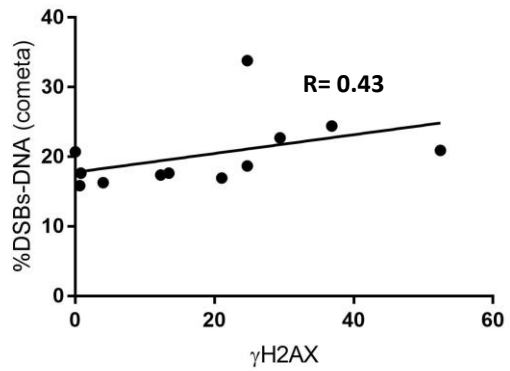
Correlación DSBs vs ATMp + γ H2AX (adipocitos)



Correlación DSBs vs ATMp (adipocitos)



Correlación DSBs vs γ H2AX (adipocitos)



Grafica 8. Correlación entre la actividad de la DDR y los DNA-DSBs. (A) Correlación entre la presencia de DSBs y los diferentes elementos de la DDR en células MSCs. (B) Correlación entre las DSBs y los elementos de la DDR en adipocitos. Ambos tipos celulares presentan una relación positiva entre la actividad de la DDR y la presencia de DSBs, sin embargo, esta correlación solo es significativa en las MSCs en todos los casos (análisis de correlación de Pearson, $p < 0.05$).

Discusión

Aunque todos los tipos celulares dentro de un organismo están equipados con los mismos sistemas de reparación y redes de señalización para respuestas adaptativas, la habilidad relativa y la necesidad de reparar lesiones al ADN varía dependiendo del tipo celular, estadio de desarrollo y puede cambiar a lo largo del tiempo de vida (Fortini *et al* 2013). Las evidencias señalan que, en eucariontes, las células tienen diferentes necesidades para lidiar con el estrés genotóxico y por lo tanto la reparación del ADN y la DDR puede diferir. Entre los factores más importantes de estas diferencias esta la dependencia que tienen los mecanismos de reparación y señalización de daño al ADN con respecto al ciclo celular (Simonatto 2007).

En ese sentido, las células que se dividen hacia células hijas con capacidad proliferativa son sustancialmente diferentes de las células que se dividen hacia la formación de células postmitóticas (Poleskaya y Rudnicki, 2002). Para estudiar dicha plasticidad de los cambios en los mecanismos de reparación y de la DDR, en el presente estudio se usó como modelo la diferenciación adipogénica a partir de células mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo (MSCs), debido a que en trabajos previos en nuestro laboratorio han señalado que dicho proceso trae como consecuencia una atenuación en los mecanismos de reparación de SSBs y daños oxidativos.

Para estudiar los cambios en la DDR durante la adipogénesis se decidió medir la generación de DSBs a lo largo de la adipogénesis. Aunque las DSBs son lesiones que se presentan en menor frecuencia que las SSBs, estos son biológicamente más significativos debido al daño que causan si no son reparados de manera eficiente; lo anterior es importante ya que la persistencia de DSBs conduce a la activación de la DDR (Shilo, 2006). Este tipo de lesiones en el ADN, generadas a nivel basal durante la adipogénesis se determinó mediante el ensayo cometa neutro, encontrando su acumulación durante el proceso de diferenciación, reflejado en el

incremento de la longitud de las colas de los cometas. A diferencia de los SSBs en la adipogénesis, los cuales se acumulan de manera gradual a lo largo de la diferenciación, los DSBs incrementaron más entre el día 6 y el 14 de la diferenciación, es decir hacia el final del proceso, cuando las células están entrando a un estado postmitótico.

El incremento de daños al final de la diferenciación se puede explicar a través de dos factores, el primero puede ser debido al origen fisiológico de los DSBs. Si bien en algunos casos los DSBs se generan por agentes físicos y químicos externos, una cantidad significativa se genera por estímulos endógenos propios del proceso de adipogénesis en este caso. Los DSBs muchas veces son considerados como daños secundarios que se originan a partir de un daño primario como los daños oxidativos y los SSBs, que por deficiencia en los mecanismos de reparación y/o replicación se transforman a DSBs. Para entender lo anterior se debe de tomar en cuenta que la mayoría de los mecanismos de reparación depende de enzimas con actividad de nucleasas, cuyo papel es la remoción de una o varias bases dañadas para permitir la actividad de polimerasas y ligasas (Khanna y Shilo, 2010). Esto trae como consecuencia la generación de espacios entre las bases de las cadenas del ADN a los que se les denominan “gaps”. Una atenuación de la capacidad reparativa de daños oxidativos, como ocurre en la adipogénesis podría llevar a un aumento en la presencia de estos gaps, que, aunado a la acumulación de SSBs durante la diferenciación, podrían llevar a la formación de un mayor número de DSBs, ya sea por la replicación de la lesión, el paso de la maquinaria de transcripción o la proximidad de una lesión con otra (Cannan y Penderson 2016).

El segundo factor importante que puede explicar el aumento de DSBs al final de la adipogénesis es el remodelado de la cromatina durante este proceso. Es ya conocido que en células troncales o en estados indiferenciados existe una mayor presencia de eucromatina que se va perdiendo conforme avanza la diferenciación (Chen *et al* 2014). Estudios realizados por Metzger e Iliakis basados en el uso de electroforesis de campo pulsado y contabilizando los foci de γ H2AX como marcador de DSBs corroboran este comportamiento que muestran los procesos de reparación

lenta de DSBs que surgen en la heterocromatina. Además, distintos requerimientos fueron observados para la reparación de DSBs en heterocromatina vs eucromatina; mientras la rapidez de los procesos de reparación de DSBs requieren de las proteínas: NHEJ, Ku70, Ku80, DNA-PKcs, XRCC4, DNA ligasa IV y XLF/Cernunnos, el proceso de reparación lento en fase G0/G1 requiere de manera adicional de ATM, ARTEMIS, H2AX, MDC1, RNF8, RNF168, el complejo MRN y 53BP1.

Otro estudio realizado por Woodbine y colaboradores en 2010 sobre los DSBs inducidos de manera endógena sobre la heterocromatina del ADN en fibroblastos embrionarios de ratón muestra que los DSBs que surgen de manera endógena por daño oxidativo en células no replicantes requiere de la función de ATM y de Artemis. Se mostro que Artemis actúo rio abajo de ATM, resultando en la acumulación de DSBs que albergaron pKAP-1, esencial para la modificación de la cromatina y el reclutamiento de los elementos de reparación. Se propuso que la heterocromatina actúa como una barrera para la reparación de DSBs que es mitigada por la fosforilación de KAP-1 dependiente de ATM. Lo anterior apoya la idea acerca de que en adipocitos, la velocidad reparativa de DSBs podría ser menor que en MSCs.

ATM durante la adipogénesis

Uno de los objetivos más importantes de este trabajo fue determinar la activación de la DDR durante la diferenciación. Si bien hay evidencia de que en la adipogénesis ciertos mecanismos de reparación se veían atenuados, la actividad de la DDR a través de este proceso no es del todo clara. En ese sentido se evaluó la presencia de ATM y de H2AX fosforilados mediante citometría, siendo que ambas marcas indican la activación de la DDR inducida por DSBs. Como se observa en la gráfica 4, ambas marcas estuvieron presentes y activas a través de todo el proceso, siendo al día 14, al final del proceso de diferenciación, en donde existe una mayor activación de la DDR. Los hallazgos son importantes, debido a que demuestra que en adipocitos terminalmente diferenciados no solo hay un aumento en la presencia de DSBs, sino que también se mantiene la activación de la DDR a través de la vía ATM.

En general se ha visto que en varios procesos de diferenciación numerosas proteínas implicadas en la DDR son reguladas negativamente. Un estudio de Schneider y colaboradores en 2012 revela que astrocitos diferenciados carecen de la activación de la DDR a través de la vía ATM. La activación de ATM y sus factores de DDR río abajo están fuertemente inhibidos a través de la represión transcripcional, mientras en células troncales neuronales, ATM parece ser la principal cinasa responsable en una DDR canónica.

Si bien en el caso de la diferenciación de células troncales neuronales hacia astrocitos ocurre un silenciamiento transcripcional de ATM, en otros modelos de diferenciación esto cambia, siendo otros elementos de la DDR los que son atenuados y cuya falta de actividad es compensada a través de otros componentes de la DDR. Regresando al trabajo realizado por Schneider *et al*, en astrocitos la enzima DNA-Pk, otra cinasa importante de la DDR es de hecho responsable de la fosforilación de H2AX. Otro ejemplo de esto es señalado en el trabajo de Latella y colaboradores en 2004 en el que observaron que los miotubos (células musculares terminalmente diferenciadas) carecen de la actividad de ATR y Chk1, sin embargo, la rama ATM-Chk2 es completamente funcional bajo el estímulo como radiación y una variedad de agentes inductores de daño. Otro trabajo realizado por Biton y colaboradores en 2007 señala que en neuronas postmitóticas la respuesta a DSBs es mediada por ATM y la supresión de la función de ATM atenúa la reentrada al ciclo celular y la consecuente apoptosis.

Capacidad de reparación y activación de la DDR durante la adipogénesis frente a un reto genotóxico

Para confirmar si existe una atenuación de la capacidad reparativa de los DSBs en la adipogénesis y si este daño era proporcional a la activación de la DDR, las células fueron sometidas a un reto genotóxico con etopósido como inductor de daño en MSCs y adipocitos para evaluar la generación de DSBs y la activación de la DDR 48 h post tratamiento para la evaluación de la capacidad reparativa. Como se observa en la gráfica 6 ambos tipos celulares, MSCs y adipocitos, son sensibles al efecto del etopósido en la misma magnitud, sin embargo, muestran menos

capacidad de reparación los adipocitos que las MSCs. Lo anterior puede explicarse al considerar el mecanismo de acción que tiene el etopósido sobre las células. De manera general, el etopósido al bloquear el ciclo celular en la fase S tardía y G2 temprana, causa rompimientos de una y doble cadena del ADN ya que su principal blanco es la enzima topoisomerasa II (enzima responsable de los cambios topológicos del ADN). Por otro lado, el etopósido se une al ADN de manera covalente y formar un complejo topoisomerasa II-ADN; para que así esta enzima no sea capaz de sellar los rompimientos de las cadenas del ADN. Otro aspecto importante es que induce genotoxicidad debido a que el etopósido contiene un grupo fenólico el cual es crucial para su actividad antitumoral, ya que al oxidarse por la acción de algunas enzimas o de radicales genera metabolitos reactivos (quinonas), los cuales actúan como citotóxicos al interactuar con macromoléculas de la célula (Musalli, 2001). Por lo tanto, aunque el etopósido puede actuar como un agente citotóxico y genotóxico para células proliferantes y postmitóticas, su acción como inhibidor de la topoisomerasa lleva a que las proliferantes sean más sensibles. Sin embargo, es importante señalar, que a pesar de que los adipocitos generaron menos DSBs por el etopósido, su capacidad de reparación también fue menor con respecto a los MSCs; esto puede indicar la vulnerabilidad de los adipocitos a la acumulación de daño por estímulos externos.

Activación de la DDR en MSCs y adipocitos

A la par de la evaluación de los DSBs durante la cinética de reparación, también se evaluó la activación de la DDR. Como se esperaba, en MSCs, la reparación de los DSBs fue de la mano con la actividad de la DDR (Gráfica 7A). Sin embargo, algo que es interesante es que, en el caso de adipocitos, los valores de la DDR aún mantienen una elevación comparado con su control negativo y con las MSCs (Gráfica 7B). Tomando en cuenta esto, se realizó un análisis de correlación entre los DSBs y la activación de la DDR, tanto para MSCs como para adipocitos (figura 8A y 8B) en los que inmediatamente se notan las diferencias en ambos tipos celulares. Mientras que en MSCs existe una correlación positiva que es estadísticamente positiva, en adipocitos esta correlación se pierde, esto por el aumento en la actividad de la DDR aun en ausencia de daño. Lo anterior es

importante ya que existen trabajos previos que señalan que el papel de la DDR en la diferenciación puede ir más allá de la reparación del ADN.

Como ejemplo de lo anterior, existen trabajos como los realizados por Bredemeyer *et al* en 2008 y Sherman en 2010 que revelan el papel que tienen los DSBs y los elementos de la DDR en la diferenciación de las células hematopoyéticas. El desarrollo y la función de la respuesta inmune adaptativa requiere la inducción programada y una subsecuente reparación de DSBs durante los re-arreglos de los genes del receptor de antígenos. Las señales de la expresión génica inducidas por los DSBs programados cambia a través de mecanismos dependientes e independientes de ATM, con uno de los mecanismos dependientes de ATM involucrando la activación de cascadas de señalización que regula la transcripción de genes dependientes de NF- κ B. Estos programas genéticos inducidos por DSBs involucra muchos genes que son expresados solo en linfocitos B y T codificando proteínas que regulan procesos requeridos para una diferenciación normal de linfocitos y funciones de linfocitos maduros

La exposición de células pre-B a agentes físicos y químicos inductores de DSBs regulan el mismo programa genético multifuncional que las programadas por DSBs. Por lo tanto, los DSBs fuera del loci del receptor de antígenos también activa el programa de la DDR que regula la expresión de genes específicos de linfocitos. Estos datos sugieren que la inducción de DSBs no fisiológicos, como los que ocurren en las quimioterapias, en el linaje de las células B y en otros linajes celulares podría tener efectos adversos en el desarrollo celular y su función (Oeffinger *et al*, 2007).

Otro ejemplo de cómo la DDR influencia a los programas de diferenciación celular se ha documentado por los trabajos de Chao *et al* en 2006 y de Zheng *et al* en 2008 en los cuales se usa el modelo de diferenciación neuronal. Los resultados de sus experimentos sugieren una relación entre las señales de la DDR mediadas por p53 a través de DSBs inducidos por factores intrínsecos y extrínsecos y la diferenciación neuronal a partir de células troncales neuronales. Un agente genotóxico como la radiación ionizante induce la expresión de p53 en células troncales neuronales

(CTN) en la zona subventricular lo que lleva a estas células a la diferenciación. Consistente con el papel de p53 en la promoción de la diferenciación neuronal inducida por DSBs, las CTN de la zona subventricular deficientes en p53 muestran un incremento en la proliferación y capacidad de auto renovación y expresión baja de marcadores de diferenciación del linaje glial y neuronal. Es también notable que p21, el blanco principal de las señales de p53, inhibe la auto renovación posiblemente a través de su acción en el bloqueo de la progresión del ciclo celular. La pérdida de p53 podría relajar los puntos de control dependientes de p21, resultando en un incremento de la auto renovación de las CTN y a la inhibición de la diferenciación. Combinados estos datos sugieren un papel potencial de las señales de la DDR (dependientes de p53) iniciadas por DSBs en la supresión de la auto renovación de las CTN y las células precursoras en favor de la diferenciación.

Algo importante de mencionar es que los adultos supervivientes de cánceres infantiles tratados con drogas genotóxicas exhiben una mayor incidencia tanto en trastornos inmunológicos como en neurológicos que la población general. Esto podría deberse a que agentes físicos y químicos que inducen DSBs regulan el mismo programa genético multifuncional. Por lo tanto, la inducción de DSBs como en la quimioterapia, podría tener efectos adversos en el desarrollo celular y la función. Este tipo de evidencias emergentes sugiere una posible conexión entre los trastornos neurológicos y la corrupción de los programas de diferenciación celular causados por el incremento en la frecuencia de DSBs (Sacchi *et al*, 2008).

Por último, hay que señalar que también existen evidencias de que la DDR puede tener una influencia opuesta sobre la diferenciación. Un ejemplo es el dado por el sistema de diferenciación del músculo esquelético. En los progenitores de músculo esquelético un punto de control de la diferenciación activado por daño al ADN que coordina la reparación y la expresión de genes específicos para la diferenciación durante el arresto del ciclo celular fue identificado por Puri *et al* en 2002. Durante la exposición a estrés genotóxico este punto de control del ciclo celular retiene la transcripción de genes de diferenciación mientras el ADN es reparado. La fosforilación trascendente de MyoD por el daño al ADN activa a c-abl que inhibe la

transcripción dependiente de MyoD de genes del músculo y es, aparentemente el evento clave en la coordinación de la reparación y diferenciación. El mecanismo que desencadena la inhibición de la transcripción de genes del músculo depende de la fase del ciclo celular en la cual los mioblastos se arrestan en respuesta al daño (Puri *et al* 2002).

En el caso de la adipogénesis, no es claro si la DDR tiene la capacidad de activar puntos de control que inhiban la diferenciación, o si bien, como ocurre en células hematopoyéticas y neuronales la generación de DSBs fomenta la diferenciación, se requiere de ensayos adicionales que permitan observar a detalle el papel que tiene la DDR en la adipogénesis.

A pesar de ello, existen estudios que señalan como algunos elementos de la reparación del ADN y de la DDR están involucrados en la adipogénesis. Uno de ellos, es un estudio realizado por Khan y colaboradores en 2017 en el que evalúa el papel que tiene SNEV (una proteína helicasa involucrada en la DDR y en la reparación de DSBs mediante recombinación homologa) en la regulación de la adipogénesis a partir de células estromales adiposas humanas. En este trabajo se encontró que al disminuir la actividad de SNEV se perturbaba la diferenciación adipogénica llevando a su vez a una acumulación de daño oxidativo en el ADN.

Otro trabajo realizado por Takagi y colaboradores revela que, por lo menos en pre-adipocitos de ratón, ATM cumple un papel en la adipogénesis. En este modelo ATM tiene como blanco a C/EBP β , un factor de transcripción involucrado en la adipogénesis. ATM fosforila a C/EBP β y ambos forman un complejo con p300, una histona acetil transferasa, lo que a su vez lleva a la regulación transcripcional de C/EBP α otro factor de transcripción crucial para la adipogénesis tanto en ratón como en humano.

Lo anterior junto a los resultados del presente trabajo da pie a considerar un papel importante que podría tener ATM junto a otros elementos de la DDR en la regulación de la adipogénesis. Se hace énfasis sobre todo en los resultados obtenidos a partir de las correlaciones, en donde se observa que existe una correlación entre los DSBs

y los elementos de la DDR en MSCs, correlación que se pierde durante la diferenciación hacia adipocitos, atribuyendo esta falta de correlación a una actividad mas elevada y sostenida de la DDR. Por lo tanto, se debe de tomar en cuenta como una perspectiva el correlacionar la actividad de la DDR (particularmente ATM) con la cantidad de células que se diferencian a adipocitos. En cuanto a la capacidad de las células de responder a un agente genotóxico externo, se demostró que tanto las MSCs como adipocitos terminalmente diferenciados son vulnerables al daño inducido por el etopósido y tienen la capacidad de reparar daños en el ADN de tipo DSBs, por lo que aún queda por responder, si después de la activación de la DDR y la reparación del ADN aún mantienen sus funciones; en el caso de MSCs, que tan efectivamente pueden aun diferenciarse y en el caso de los adipocitos, si esto altera sus características metabólicas como podría ser su función secretora. Lo anterior es de importancia dado que puede contribuir a conocer más sobre el efecto que tiene el daño al ADN acumulado por adipocitos sobre algunas enfermedades metabólicas.

Conclusiones

- Las células MSCs se diferencian hacia el linaje adipogénico.
- Hay una tendencia hacia la acumulación basal baja de DSBs a través de la adipogénesis.
- En la adipogénesis hay una tendencia hacia el incremento moderado de la activación de la DDR.
- Las MSCs poseen una capacidad de reparación de DSBs más eficiente que los adipocitos.
- Hay una correlación positiva entre el daño en el ADN de DSBs y la activación de la DDR en células MSCs, no así, en adipocitos diferenciados.

Referencias

Agnez-Lima, L. F., Melo, J. T., Silva, A. E., Oliveira, A. H. S., Timoteo, A. R. S., Lima-Bessa, K. M. y Menck, C. F. (2012). DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 751(1), 15-28.

Arad, G., Hendel, A., Urbanke, C., Curth, U., & Livneh, Z. (2008). Single-stranded DNA-binding protein recruits DNA polymerase V to primer termini on RecA-coated DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 283(13), 8274-8282.

Ariza, R. R., Keyse, S. M., Moggs, J. G., & Wood, R. D. (1996). Reversible protein phosphorylation modulates nucleotide excision repair of damaged DNA by human cell extracts. *Nucleic acids research*, 24(3), 433-440.

Arunkumar, A. I., Stauffer, M. E., Bochkareva, E., Bochkarev, A., & Chazin, W. J. (2003). Independent and coordinated functions of replication protein A tandem high affinity single-stranded DNA binding domains. *Journal of Biological Chemistry*, 278(42), 41077-41082.

Batra, V. K., Beard, W. A., Shock, D. D., Pedersen, L. C., & Wilson, S. H. (2008). Structures of DNA polymerase β with active-site mismatches suggest a transient abasic site intermediate during misincorporation. *Molecular cell*, 30(3), 315-324.

Berquist, B. R., & Wilson III, D. M. (2012). Pathways for repairing and tolerating the spectrum of oxidative DNA lesions. *Cancer letters*, 327(1-2), 61-72.

Biton, S., Dar, I., Mittelman, L., Pereg, Y., Barzilai, A., & Shiloh, Y. (2006). Nuclear ataxia-telangiectasia mutated (ATM) mediates the cellular response to DNA double strand breaks in human neuron-like cells. *Journal of Biological Chemistry*, 281(25), 17482-17491.

Blackford, A. N., & Jackson, S. P. (2017). ATM, ATR, and DNA-PK: the trinity at the heart of the DNA damage response. *Molecular cell*, 66(6), 801-817.

Bordin, D. L., Lima, M., Lenz, G., Saffi, J., Meira, L. B., Mésange, P., ... & Henriques, J. A. (2013). DNA alkylation damage and autophagy induction. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 753(2), 91-99.

Bredemeyer, A. L., Helmink, B. A., Innes, C. L., Calderon, B., McGinnis, L. M., Mahowald, G. K., ... & Mandik-Nayak, L. (2008). DNA double-strand breaks activate a multi-functional genetic program in developing lymphocytes. *Nature*, 456(7223), 819-823.

Caestecker, K. W., & Van de Walle, G. R. (2013). The role of BRCA1 in DNA double-strand repair: past and present. *Experimental cell research*, 319(5), 575-587.

Cannan, W. J., & Pederson, D. S. (2016). Mechanisms and consequences of double-strand DNA break formation in chromatin. *Journal of cellular physiology*, 231(1), 3-14.

Chao, C., Wu, Z., Mazur, S. J., Borges, H., Rossi, M., Lin, T., ... & Xu, Y. (2006). Acetylation of mouse p53 at lysine 317 negatively regulates p53 apoptotic activities after DNA damage. *Molecular and cellular biology*, 26(18), 6859-6869.

Chen, T., & Dent, S. Y. (2014). Chromatin modifiers and remodellers: regulators of cellular differentiation. *Nature Reviews Genetics*, 15(2), 93-106.

Cobb, J. A., Bjergbaek, L., Shimada, K., Frei, C., & Gasser, S. M. (2003). DNA polymerase stabilization at stalled replication forks requires Mec1 and the RecQ helicase Sgs1. *The EMBO journal*, 22(16), 4325-4336.

De Waard, H., Sonneveld, E., de Wit, J., Esveldt-van Lange, R., Hoeijmakers, J. H., Vrieling, H., & van der Horst, G. T. (2008). Cell-type-specific consequences of nucleotide excision repair deficiencies: Embryonic stem cells versus fibroblasts. *DNA repair*, 7(10), 1659-1669.

Dizdaroglu, M. (2012). Oxidatively induced DNA damage: mechanisms, repair and disease. *Cancer letters*, 327(1-2), 26-47.

Forcales, S. V., & Puri, P. L. (2005, August). Signaling to the chromatin during skeletal myogenesis: novel targets for pharmacological modulation of gene expression. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 16, No. 4-5, pp. 596-611). Academic Press.

Fortini, P., Ferretti, C., & Dogliotti, E. (2013). The response to DNA damage during differentiation: pathways and consequences. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 743, 160-168.

Franchini, D. M., Schmitz, K. M., & Petersen-Mahrt, S. K. (2012). 5-Methylcytosine DNA demethylation: more than losing a methyl group. *Annual review of genetics*, 46, 419-441.

Giglia-Mari, G., Zotter, A., & Vermeulen, W. (2011). DNA damage response. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(1), a000745. Hoeijmakers JH (2009) DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med* **361**: 1475---1485.

Hašplová, K., Hudecová, A., Magdolénová, Z., Bjørnas, M., Gálová, E., Miadoková, E., & Dušinská, M. (2012). DNA alkylation lesions and their repair in human cells: modification of the comet assay with 3-methyladenine DNA glycosylase (AlkD). *Toxicology letters*, 208(1), 76-81.

Hefferin, M. L., & Tomkinson, A. E. (2005). Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA repair*, 4(6), 639-648.

Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411(6835), 366.

Houtgraaf, J. H., Versmissen, J., & van der Giessen, W. J. (2006). A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovascular Revascularization Medicine*, 7(3), 165-172.

Hyka-Nouspikel, N., Lemonidis, K., Lu, W. T., & Nouspikel, T. (2011). Circulating human B lymphocytes are deficient in nucleotide excision repair and accumulate mutations upon proliferation. *Blood*, 117(23), 6277-6286.

Iyama, T., & Wilson III, D. M. (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA repair*, 12(8), 620-636.

Jackson, S. P., & Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461(7267), 1071.

Jiricny, J. (2006). The multifaceted mismatch-repair system. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7(5), 335.

Kass, E. M., & Jasin, M. (2010). Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways. *FEBS letters*, 584(17), 3703-3708.

Kawanishi, S., Hiraku, Y., Pinlaor, S., & Ma, N. (2006). Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation-related carcinogenesis. *Biological chemistry*, 387(4), 365-372.

Khan, A., Dellago, H., Terlecki-Zaniewicz, L., Karbiener, M., Weilner, S., Hildner, F., ... & Hacobian, A. (2017). SNEVhPrp19/hPso4 regulates adipogenesis of human adipose stromal cells. *Stem cell reports*, 8(1), 21-29.

Khanna, K. K., & Shiloh, Y. (2010). *The DNA damage response: implications on cancer formation and treatment*. Dordrecht, The Netherlands:: Springer

Kruhlak, M. J., Celeste, A., Dellaire, G., Fernandez-Capetillo, O., Müller, W. G., McNally, J. G., ... & Nussenzweig, A. (2006). Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *J Cell Biol*, 172(6), 823-834.

Kryston, T. B., Georgiev, A. B., Pissis, P., & Georgakilas, A. G. (2011). Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 711(1-2), 193-201.

Latella, L., Lukas, J., Simone, C., Puri, P. L., & Bartek, J. (2004). Differentiation-induced radioresistance in muscle cells. *Molecular and cellular biology*, 24(14), 6350-6361.

Lieber, M. R. (2008). The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *Journal of Biological Chemistry*, 283(1), 1-5.

Lieber, M. R., Ma, Y., Pannicke, U., & Schwarz, K. (2003). Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nature reviews Molecular cell biology*, 4(9), 712.

Lozano-Salgado J. (2016). Respuesta de la reparación del ADN en células troncales adultas, antes y después de su diferenciación a adipocitos (tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México. México.

Markovitsi, D., Gustavsson, T., & Banyasz, A. (2010). Absorption of UV radiation by DNA: spatial and temporal features. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 704(1-3), 21-28.

Martin, L. M., Marples, B., Coffey, M., Lawler, M., Lynch, T. H., Hollywood, D., & Marignol, L. (2010). DNA mismatch repair and the DNA damage response to ionizing radiation: making sense of apparently conflicting data. *Cancer treatment reviews*, 36(7), 518-527.

Medina-Gómez, G., & Vidal-Puig, A. (2009). Adipose tissue as a therapeutic target in obesity. *Endocrinología y nutrición: organo de la Sociedad Espanola de Endocrinología y Nutrición*, 56(8), 404-411.

Menendez, D., Shatz, M., Azzam, K., Garantziotis, S., Fessler, M. B., & Resnick, M. A. (2011). The Toll-like receptor gene family is integrated into human DNA damage and p53 networks. *PLoS Genet*, 7(3), e1001360.

Metzger, L., & Iliakis, G. (1991). Kinetics of DNA double-strand break repair throughout the cell cycle as assayed by pulsed field gel electrophoresis in CHO cells. *International journal of radiation biology*, 59(6), 1325-1339.

Monsalve, D. M. (2014). Implicación de las cinasas humanas VRK1 y VRK2 en las rutas de respuesta a daño génico y apoptosis.

Musalli-Galante P. (2001). ¿Es la técnica de electroforesis unicelular (ensayo cometa) capaz de predecir el efecto de fármacos antineoplásicos? Estudio inicial sobre la inducción de daño al ADN de sustancias antineoplásicas con mecanismos de acción conocidos (tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México. México.

Naka, K., & Hirao, A. (2011). Maintenance of genomic integrity in hematopoietic stem cells. *International journal of hematology*, 93(4), 434-439.

Nouspikel, T. D. N. A. (2009). DNA repair in mammalian cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(6), 994-1009.

Oeffinger, K. C., Mertens, A. C., & Sklar, C. A. (2007). Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. *Oncology Times*, 29(1), 26.

Polesskaya, A., & Rudnicki, M. A. (2002). A MyoD-dependent differentiation checkpoint: ensuring genome integrity. *Developmental cell*, 3(6), 757-758.

Polo, S. E., & Jackson, S. P. (2011). Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes & development*, 25(5), 409-433.

Preston, B. D., Albertson, T. M., & Herr, A. J. (2010, October). DNA replication fidelity and cancer. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 20, No. 5, pp. 281-293). Academic Press.

Puri, P. L., Bhakta, K., Wood, L. D., Costanzo, A., Zhu, J., & Wang, J. Y. (2002). A myogenic differentiation checkpoint activated by genotoxic stress. *Nature genetics*, 32(4), 585-593.

Ramos-Espinosa, P., Rojas, E., & Valverde, M. (2012). Differential DNA damage response to UV and hydrogen peroxide depending of differentiation stage in a neuroblastoma model. *Neurotoxicology*, 33(5), 1086-1095.

Rojas, E., Lopez, M. C., & Valverde, M. (1999). Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 722(1-2), 225-254.

Rooney, J. P., George, A. D., Patil, A., Begley, U., Bessette, E., Zappala, M. R., ... & Begley, T. J. (2009). Systems based mapping demonstrates that recovery from alkylation damage requires DNA repair, RNA processing, and translation associated networks. *Genomics*, 93(1), 42-51.

Sacchi, S., Marcheselli, L., Bari, A., Marcheselli, R., Pozzi, S., Luminari, S., ... & Stelitano, C. (2008). Secondary malignancies after treatment for indolent non-Hodgkin's lymphoma: a 16-year follow-up study. *Haematologica*, 93(3), 398-404.

Schneider, L., Fumagalli, M., & di Fagagna, F. D. A. (2012). Terminally differentiated astrocytes lack DNA damage response signaling and are radioresistant but retain DNA repair proficiency. *Cell Death & Differentiation*, 19(4), 582-591.

Scully, R., & Xie, A. (2013). Double strand break repair functions of histone H2AX. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 750(1-2), 5-14.

Sherman, M. H., Bassing, C. H., & Teitell, M. A. (2011). Regulation of cell differentiation by the DNA damage response. *Trends in cell biology*, 21(5), 312-319.

Sherman, M. H., Kuraishy, A. I., Deshpande, C., Hong, J. S., Cacalano, N. A., Gatti, R. A., ... & Teitell, M. A. (2010). AID-induced genotoxic stress promotes B cell differentiation in the germinal center via ATM and LKB1 signaling. *Molecular cell*, 39(6), 873-885.

Shiloh, Y. (1995). Ataxia-telangiectasia: closer to unraveling the mystery. *European Journal of Human Genetics*, 3, 116-138.

Shiloh, Y. (2006). The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends in biochemical sciences*, 31(7), 402-410.

Sibanda, B. L., Chirgadze, D. Y., Ascher, D. B., & Blundell, T. L. (2017). DNA-PKcs structure suggests an allosteric mechanism modulating DNA double-strand break repair. *Science*, 355(6324), 520-524.

Simonatto, M., Latella, L., & Puri, P. L. (2007). DNA damage and cellular differentiation: more questions than responses. *Journal of cellular physiology*, 213(3), 642-648.

Sirbu, B. M., & Cortez, D. (2013). DNA damage response: three levels of DNA repair regulation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(8), a012724.

Sotiropoulou, P. A., Candi, A., Mascré, G., De Clercq, S., Youssef, K. K., Lapouge, G., ... & Blanpain, C. (2010). Bcl-2 and accelerated DNA repair mediates resistance of hair follicle bulge stem cells to DNA-damage-induced cell death. *Nature cell biology*, 12(6), 572.

Srivastava, N., Gochhait, S., de Boer, P., & Bamezai, R. N. (2009). Role of H2AX in DNA damage response and human cancers. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 681(2-3), 180-188.

Takagi, M., Uno, H., Nishi, R., Sugimoto, M., Hasegawa, S., Piao, J., ... & Suganami, T. (2015). ATM regulates adipocyte differentiation and contributes to glucose homeostasis. *Cell reports*, 10(6), 957-967.

Tšuiiko, O., Jatsenko, T., Grace, L. K. P., Kurg, A., Vermeesch, J. R., Lanner, F., ... & Salumets, A. (2018). A speculative outlook on embryonic aneuploidy: Can molecular pathways be involved? *Developmental biology*.

Ullah, I., Subbarao, R. B., & Rho, G. J. (2015). Human mesenchymal stem cells-current trends and future prospective. *Bioscience reports*, 35(2), e00191.

Valverde, M., Lozano-Salgado, J., Fortini, P., Rodriguez-Sastre, M. A., Rojas, E., & Dogliotti, E. (2018). Hydrogen Peroxide-Induced DNA Damage and Repair through the Differentiation of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem cells international*, 2018.

Woodbine, L., Brunton, H., Goodarzi, A. A., Shibata, A., & Jeggo, P. A. (2011). Endogenously induced DNA double strand breaks arise in heterochromatic DNA regions and require ataxia telangiectasia mutated and Artemis for their repair. *Nucleic acids research*, 39(16), 6986-6997.

Xu, B., Kim, S. T., & Kastan, M. B. (2001). Involvement of Brca1 in S-phase and G2-phase checkpoints after ionizing irradiation. *Molecular and cellular biology*, 21(10), 3445-3450.

Zheng, H., Ying, H., Yan, H., Kimmelman, A. C., Hiller, D. J., Chen, A. J., ... & Stommel, J. M. (2008). p53 and Pten control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation. *Nature*, 455(7216), 1129-1133.