



Estrés oxidativo, actividad antioxidante y senescencia celular en fibroblastos con trisomía del cromosoma 21

Ángel Vilches García

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

The background of the cover is a microscopic image of cells. On the left side, there is a cluster of cells stained in a light blue color, showing their cell walls and internal structures. On the right side, there are several elongated, rod-shaped cells stained in a bright orange color. The overall background has a dark, textured appearance.

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**Estrés oxidativo,
actividad antioxidante
y senescencia celular
en fibroblastos con
trisomía del cromosoma 21**

Ángel Vilches García
TESIS DOCTORAL
2013



Facultad de Farmacia
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Doctorado en Biotecnología

**ESTRÉS OXIDATIVO, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y
SENESCENCIA CELULAR EN FIBROBLASTOS
CON TRISOMÍA DEL CROMOSOMA 21**

Memoria presentada por Ángel Vilches García para optar al título de doctor por la
Universidad de Barcelona

Doctorando

Directora

Co-director

Tutora

Ángel
Vilches García

M^a Carmen
Domínguez Luengo

Víctor
Rodríguez Sureda

Josefa
Badia Palacín

Ángel Vilches García

2013

A mis padres,
hermanos
y abuelos

Para tí Ana

*"No puede haber cosa más alegre y
feliz que la vejez pertrechada con los
estudios y experiencias de la juventud"*

Cicerón

Índice

Resumen	III
Abreviaturas.....	V
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
1. SÍNDROME DE DOWN	3
1.1 Aspectos generales del síndrome de Down	3
1.2 Aspectos clínicos del síndrome de Down	4
1.3 Origen de la trisomía del cromosoma HSA21	5
1.4 Cromosoma 21 humano (HSA21).....	6
1.4.1 Correlación genotipo-fenotipo	7
1.4.2 Búsqueda de genes candidatos.....	8
1.5 Modelos murinos del síndrome de Down	10
2. ESTRÉS OXIDATIVO	12
2.1 Radicales libres	13
2.2 Fuentes de producción de radicales libres	15
2.3 Daño oxidativo a moléculas biológicas	16
2.4 Defensa frente a radicales libres: papel antioxidante.....	21
3. MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS EN EL SÍNDROME DE DOWN	25
3.1 Estrés oxidativo en el síndrome de Down	25
3.1.1 Sobreexpresión del gen SOD1 en el síndrome de Down	28
3.1.2 Daño oxidativo a lípidos y a proteínas en el síndrome de Down	29
3.2 Disfunción mitocondrial en el síndrome de Down	32
4. SENESCENCIA CELULAR.....	34
4.1 Regulación de la senescencia	35
4.2 Características de las células senescentes.....	37
4.2.1 Marcadores de senescencia celular.....	37
4.2.2 Resistencia a la apoptosis.....	38
4.3 Inductores de senescencia	39
4.3.1 Senescencia inducida por los radicales libres.....	39
4.4 Senescencia celular en el síndrome de Down.....	42
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS	45
CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS	49
1. OBTENCIÓN DE FIBROBLASTOS PRIMARIOS	51
2. MANTENIMIENTO DE CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS	52
3. TRATAMIENTOS CON PRO-OXIDANTES	52
4. DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD CELULAR (XTT)	54
5. MEDICIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)	55
5.1 Medición en placa de 96 pocillos para fluorescencia.....	55
5.2 Detección de peróxidos intracelulares por microscopía de fluorescencia	56
6. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES INTRACELULARES DE ATP	56
7. DETECCIÓN DEL ANIÓN SUPERÓXIDO (O ₂ ^{•-}) Y RED MITOCONDRIAL	57
8. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL.....	58
8.1 Visualización del RNA total por electroforesis en geles de agarosa.....	58
9. PCR CON RETROTRANSCRIPTASA A TIEMPO REAL.....	59
10. ENSAYOS ENZIMÁTICOS (SOD, GPx, CAT, β-Gal pH 4 y 6, β-Glu pH 3,5).....	62

11. DETERMINACIÓN DEL MALONDIALDEHIDO (MDA) POR HPLC.....	66
12. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y WESTERN BLOT.....	66
13. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA POR ELISA	68
14. DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD SA- β -GALACTOSIDASA	68
15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	69
CAPÍTULO 4: RESULTADOS	71
1. CITOTOXICIDAD CELULAR DEBIDA A LOS PRO-OXIDANTES	73
2. PRODUCCIÓN INTRACELULAR DE RADICALES LIBRES	74
2.1 Producción intracelular de ROS en microplaca	74
2.2 Detección de los peróxidos mediante microscopía de fluorescencia.....	76
3. ACTIVIDAD MITOCONDRIAL	77
3.1 Determinación proteica de los complejos de la CTE mitocondrial.....	78
3.2 Determinación del contenido de ATP intracelular.....	79
3.3 Detección del anión superóxido mitocondrial y de la red mitocondrial.....	80
4. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICA (SOD, GPX Y CAT).....	81
4.1 Expresión del mRNA de los genes SOD1, SOD2, GPx y CAT.....	83
4.2 Cambios en la expresión proteica de las enzimas SOD1 y SOD2	84
4.3 Determinación de la actividad enzimática SOD, GPx y CAT.....	85
4.4 Ratio enzimática antioxidante SOD/GPx+CAT	86
5. LIPOPEROXIDACION Y MODIFICACION OXIDATIVA DE PROTEÍNAS	88
5.1 Determinación del contenido de malondialdehído (MDA)	88
5.2 Detección y cuantificación de proteínas carboniladas	89
6. ESTUDIO DE LA SENESCENCIA CELULAR.....	90
6.1 Expresión proteica de p21 y p53.....	90
6.2 Actividad β -Galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -Gal).....	92
6.3 Determinación de enzimas lisosomales	94
6.4 Determinación del citocromo C y caspasa 9.....	94
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN.....	97
CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES	115
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA	119
AGRADECIMIENTOS.....	143

Resumen

El síndrome Down constituye la cromosomopatía más frecuente que ocurre en 1 de cada 700 a 1000 nacimientos y está causado por la trisomía completa o por una parte del cromosoma 21 humano (HSA21). Aún se desconoce cómo la presencia del cromosoma 21 extra da lugar al fenotipo característico de este síndrome. En este sentido la participación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) ha sido propuesta como uno de los mecanismos que intervienen en la patogénesis del mismo. Dicho mecanismo se fundamenta en la sobreexpresión de al menos 16 genes del HSA21 relacionados con el metabolismo de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y con la generación de energía mitocondrial. Uno de estos genes es el que codifica una importante enzima del sistema antioxidante celular, el gen *SOD1*, propuesto como potencial culpable del estrés oxidativo inusual en los individuos con SD.

En condiciones normales, los ROS, producidos *in vivo* principalmente por la respiración aeróbica, se eliminan de la célula por la acción de las enzimas antioxidantes, superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx). La Cu/Zn superóxido dismutasa (SOD1) convierte el radical superóxido a peróxido de hidrógeno, el cual es eliminado por la glutatión peroxidasa y/o catalasa a agua y oxígeno. La sobreexpresión de la SOD1 puede producir un desequilibrio en la relación de las enzimas antioxidantes (SOD1, GPx y CAT) generando estrés oxidativo y podría resultar en el daño oxidativo a biomoléculas tales como ácidos grasos poliinsaturados en los lípidos de las membranas, proteínas esenciales y el DNA, ya que existe una variabilidad en los niveles de enzimas antioxidantes dentro de la población con SD, lo que puede estar relacionado con una desregulación compleja que afecte no sólo a los genes del HSA21 sino también en otros cromosomas. Así, el daño celular puede ser inducido por los ROS y asociarse a algunas de las alteraciones celulares en el SD, causando diversas patologías y conducir a un envejecimiento prematuro.

Se obtuvieron 18 muestras de fibroblastos primarios fetales humanos, 9 de ellos con síndrome de Down (FT21) y 9 controles (FC), en los cuales se evaluó la disminución de la capacidad endógena antioxidante debido a la sobreexpresión de la SOD1, causando un exceso en la producción intracelular de ROS y el origen prematuro de estrés oxidativo asociado al daño oxidativo a lípidos y proteínas, así como a una disfunción mitocondrial. Se analizaron varios marcadores de senescencia celular con la finalidad de contribuir al conocimiento de un nuevo aspecto de la patología de este síndrome, el envejecimiento prematuro. Estos mecanismos fisiopatológicos podrían estar relacionados con la aparición y establecimiento de la senescencia celular prematura en los fibroblastos con trisomía del cromosoma 21.

Abreviaturas

ADP: Adenosín bifosfato	LO·: Radical alcoxilipídico
ATP: Adenosín trifosfato	LPO: Lipoperóxidos
CAT: Catalasa	LPx: Lipoperoxidación
CDKI: Inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas	MDA: Malondialdehído
CIOH: Acido hipocloroso	N ₂ : Nitrógeno
CoQ: Coenzima Q	O ₂ : Oxígeno
DDR: Respuesta al daño en el DNA	¹ O ₂ : Oxígeno singlete
DMSO: Dimetilsulfoxido	O ₂ ^{-·} : Radical superóxido
DNA: Ácido desoxirribonucleico	OH·: Radical hidroxilo
EEM: Error Estandar de la Media	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
FC: Fibroblastos control	OH·: Radical hidroxilo
FT21: Fibroblastos con trisomía 21	RL: Radicales libres
GPx: Glutati6n peroxidasa	ROS : Especies reactivas del oxígeno
GR: Glutati6n reductasa	RNA: Ácido ribonucleico
GSH: Glutati6n reducido	mRNA: RNA mensajero
GSSG: Glutati6n oxidado	RNS: Especies reactivas del nitr6geno
H ₂ O ₂ : Per6xido de hidr6geno	R·: Radical -ilo
HNE: 4-hidroxinonenal	ROOH: Per6xido
HPLC: Cromatografía l6quida de alta presi6n	ROO·: Radical peroxilo
NAC: N-acetilcisteína	RO·: Radical alcoxilo
MDA: Malondialdehido	R-SH: Grupos sulfhidrilos
NADH: Nicotinamida adenina dinucle6tido	RT-PCR: PCR con retrotranscriptasa reversa
NADPH: Nicotinamida adenina dinucle6tido difosfato	SA-β-Gal: Actividad β-galactosidasa asociada a senescencia
NO: 6xido n6trico	SOD: Super6xido dismutasa
NO·: Radical nitroxi	TBA: Ácido tiobarbit6rico
L·: Radical lip6dico	TBARS: Reactantes del ácido Tiobarbit6rico
LOOH: Hidroper6xido lip6dico	
LOO·: Radical peroxilip6dico	

A microscopic image showing plant cells. The cells are arranged in a grid-like pattern, with some cells containing bright orange, oval-shaped structures, likely chloroplasts. The background is dark, making the cells and chloroplasts stand out.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1. SÍNDROME DE DOWN

A lo largo de la historia muchos datos han puesto de manifiesto la existencia de personas afectadas con síndrome de Down (SD), desde restos arqueológicos u obras de arte hasta los primeros informes documentados (el primero atribuido a Etienne Esquirol en 1838) en los que se empezó a utilizar los términos de "cretinismo", "mongolismo" o "idiocia furfurácea". En 1886, el médico inglés John Langdon Down describió detalladamente las características físicas de un grupo de pacientes que presentaban muchas similitudes, hablando por primera vez de una patología de tipo sindrómica [1]. En 1909, G. E. Shuttleworth mencionó por primera vez en una comunicación científica la edad materna como factor de riesgo en el SD [2]. En 1932, se hizo referencia a un reparto anormal de material cromosómico como posible causa del SD. En 1956, Tjio y Levan demostraron la existencia de 46 cromosomas en el ser humano y poco después, en el año 1959, de forma paralela, el equipo formado por Lejeune, Gautrier y Turpin [3] en Francia y el equipo de P. Jacobs en el Reino Unido [4] descubrieron que las células de individuos con SD tienen tres copias del cromosoma 21, definiendo así la causa genética de la patología. En 1961, la OMS hizo efectivo el cambio de nomenclatura y la condición de "mongolismo" pasó a denominarse oficialmente síndrome de Down o trisomía 21.

1.1 Aspectos generales del Síndrome de Down

El síndrome de Down (SD; OMIM 190685) es un trastorno genético causado por la presencia de una copia extra del cromosoma 21 humano (HSA21) (o una parte del mismo), en vez de los dos habituales, produciendo la trisomía del par 21 [3].

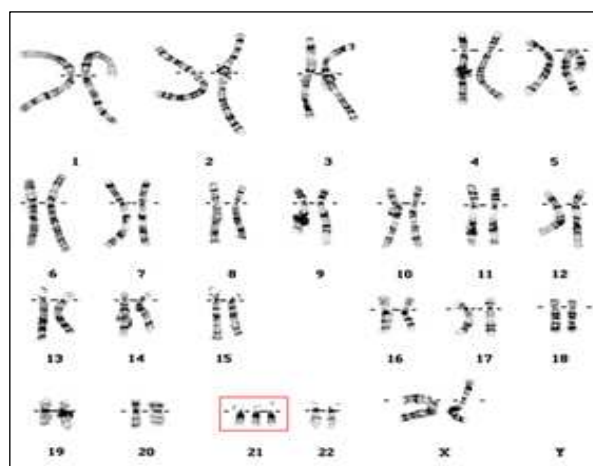


Figura 1. Cariotipo de una niña con síndrome de Down, se aprecian 3 copias del cromosoma 21. La nomenclatura científica es 47, XX,+21(mujer) o 47, XY,+21(hombre).

INTRODUCCIÓN

La trisomía 21 es la aneuploidía autosómica humana más frecuente, presentando una incidencia variable de 1/700 a 1/1200 nacimientos vivos. Representa la principal causa genética de retraso mental (el 25% de todos los casos) y de anomalías cardíacas congénitas. Si bien el retraso mental, la hipotonia muscular, el retraso de crecimiento, las dismorfologías físicas y las alteraciones neuropatológicas asociadas con la enfermedad de Alzheimer (individuos > 35 años) son características constantes en los individuos con SD, han sido descritos más de 100 rasgos fenotípicos distintivos del SD apareciendo con una penetrancia variable y una expresividad diferencial [5]. Aunque algunos aspectos del SD son congénitos, otros pueden aparecer en la infancia y en la juventud tal vez como resultado de la maduración prematura, como retraso del crecimiento, desarrollo retardado, disminución de la sensibilidad al dolor y otros más se producen en la edad adulta o en la tercera edad (envejecimiento prematuro y demencia). El SD cursa a menudo con alteraciones endocrinas, musculares, gastrointestinales, cardiológicas, oculares, auditivas e inmunológicas [6, 7]. Ninguna de las numerosas anomalías es específica de este síndrome, como tampoco es única [8]. Hoy en día la esperanza de vida de los individuos con SD ha aumentado considerablemente en los últimos 30 años, pasando de los 26 a los 60 años. Entre los factores que pueden haber contribuido a esta mejoría se incluyen: modernización de los tratamientos de algunas de las causas de mortalidad más frecuentes y los cambios en la práctica médica, incluyendo la cirugía cardíaca para niños con síndrome de Down, en circunstancias que no habrían sido atendidas en el pasado. Como contrapunto, hay que añadir que la gran disparidad social hace que determinadas etnias o poblaciones queden privadas de dichos avances médicos y por lo tanto, no vean aumentada la esperanza de vida en los individuos con SD de la misma manera que las sociedades occidentales.

1.2 Aspectos clínicos del Síndrome de Down

Todos los individuos con SD presentan severos fenotipos neurológicos y conductuales, disfunción cognitiva y un bajo coeficiente intelectual (CI entre 30 y 70) [9]. La infancia se caracteriza por un atraso en el desarrollo cognitivo que conduce a un retraso mental moderado y a un descenso del CI desde el primer año de vida hasta la infancia tardía. En los individuos adultos se produce un deterioro cognitivo que ha sido relacionado con un envejecimiento acelerado. A esto, hay que añadir además, la aparición precoz de síntomas neuropatológicos relacionados con la enfermedad de Alzheimer en la cuarta década de vida aunque hay estudios que describen el depósito de proteína amiloide ya en la segunda década [10]. Morfológicamente, se ha visto que a nivel macroscópico el cerebro de los individuos con SD presentan un tamaño y peso reducidos [11], un cierto grado de hipoplasia tanto en el cerebelo [12] como en los

lóbulos frontal y parietal [13] así como también en el hipocampo [14]. A nivel microscópico, hay estudios que demuestran una reducción relativa en el número de neuronas, así como alteraciones en el patrón de laminación a nivel de la corteza cerebral, del hipocampo y del cerebelo [15]. Además, estudios funcionales han demostrado que los procesos de aprendizaje dependientes del hipocampo se ven particularmente afectados y también existen evidencias de alteraciones funcionales a nivel de corteza prefrontal y cerebelo [16]. El descubrimiento de alteraciones en los mecanismos de LTP (*Long Term Potentiation*) y LTD (*Long Term Depression*) subyacentes a los procesos de memoria y aprendizaje [17], y de alteraciones morfológicas en las espinas dendríticas [18, 19] en individuos con SD podrían ayudar a entender mejor las causas de los déficits cognitivos y la búsqueda de potenciales dianas terapéuticas para dichas disfunciones.

1.3 Origen de la trisomía del cromosoma HSA21

La trisomía del HSA21 puede ser de varios tipos dependiendo del origen citogenético: 1) Trisomía completa o simple (95% de los casos; 47,XX/XY,+21) que consiste en tener una copia extra del cromosoma 21 completo. La causa más frecuente que da lugar a esta trisomía es una no-disyunción meiótica que puede ser de origen materno (en un 93% de los casos) o paterno; pero también puede darse la no-disyunción en las primeras divisiones embrionarias y dar lugar a un mosaicismo (1,5% de los casos; 47,+21/46) en el que un porcentaje variable de células del individuo serán aneuploides y el resto serán euploides [20-22]. 2) Trisomía parcial debido a translocaciones (3,5-4% de los casos); estas pueden ser robertsonianas [p.e. 46,-14, +Rob (14,21)/46,-21, +Rob (21,21)], que ocurre cuando se produce una fusión de los brazos largos o bien de los brazos cortos a nivel del centrómero entre dos cromosomas acrocéntricos, o recíprocas cuando se produce un intercambio de material cromosómico entre HSA21 y cualquier otro cromosoma [23, 24].

El origen de la trisomía del HSA21 se debe principalmente a una no-disyunción meiótica durante la ovogénesis en un 90,9% (en meiosis I es del 77%, frente a un 23% en meiosis II). En este punto se ha demostrado una relación clara entre la edad materna y el proceso de no-disyunción meiótica, aunque las causas son desconocidas por el momento. El riesgo de tener un hijo con SD se incrementa de forma lineal hasta los 38 años de edad de la madre, a partir de esta edad el riesgo aumenta de manera exponencial [25, 26]. La edad paterna y condiciones mitóticas influyen un 4,5% cada una. En estas últimas, en meiosis I ocurren un 70% de no disyunciones y el 30% restante ocurre en meiosis II, suelen ocurrir por una formación incorrecta del aparato mitótico y por tanto una pérdida de eficiencia en la maquinaria meiótica [27-29].

1.4 Cromosoma 21 humano (HSA21)

En el año 2000, y como consecuencia de la investigación promovida por el Proyecto Genoma Humano, se publicó la secuencia prácticamente completa del brazo largo (q) del cromosoma 21 humano [30]. El HSA21 es el más pequeño de los cromosomas autosómicos humanos y representa aproximadamente entre el 1-1,5% del genoma humano, mostrando un contenido de 33,5 Mb de DNA en su brazo largo, con 127 genes conocidos, 98 genes previstos y 59 pseudogenes, mientras que el brazo corto mostró un contenido de entre 5-15 Mb de DNA.

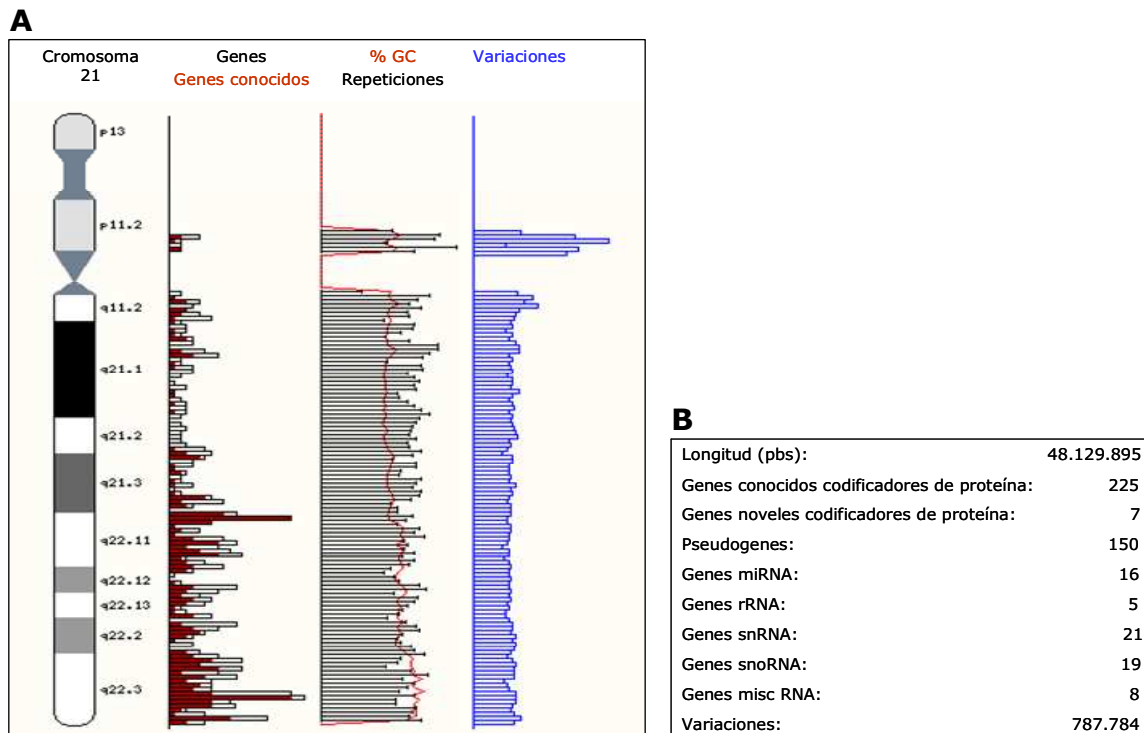


Figura 2. (A) Gráfica resumida de los genes conocidos, repeticiones y variaciones del cromosoma 21 humano (HSA21). **(B)** Estadística del cromosoma 21 humano (HSA21). Figura modificada procedente de la referencia [31].

La posterior investigación sistemática, realizada con técnicas de análisis más preciso, ha incrementado el cálculo de genes en el HSA21 hasta >500 y estimando entre 261-364 genes registrados en las bases de datos GenBank y SwisProt que codifican proteínas (Figura 2). Las proteínas son incluidas en diversas clases funcionales como son factores de transcripción, reguladores y moduladores, proteasas e inhibidores de proteasas, vía de la ubiquitina, interferones y respuesta inmune, quinasas, moléculas de adhesión, receptores, metabolismo energético, etc, estas clases irán aumentando su contenido en número de genes [31-34]. Es de interés que aproximadamente el 1% del HSA21 corresponde a secuencias no génicas conservadas, estas secuencias no son transcritas "funcionalmente" y no corresponden a genes que codifican a proteínas [35, 36]. El significado de la conservación de estas secuencias indica que son funcionales, aunque su función es desconocida.

Se están realizando notables avances en el intento por conocer la anotación funcional de todos estos genes del HSA21, y por definir tanto sus funciones moleculares como los procesos biológicos en los que intervienen. En la actualidad, de los ~364 genes humanos registrados del HSA21, se ha comprobado la presencia de ~235 genes en 3 regiones ortólogas del genoma murino (Figura 3), una de ellas es la porción distal del cromosoma 16 (MMU16) que posee 23,3 Mb, otra corresponde al centrómero del cromosoma 17 (MMU17) que posee 1,1 Mb y la última es una porción interior del cromosoma 10 (MMU10) que posee unas 2,2 Mb [37].

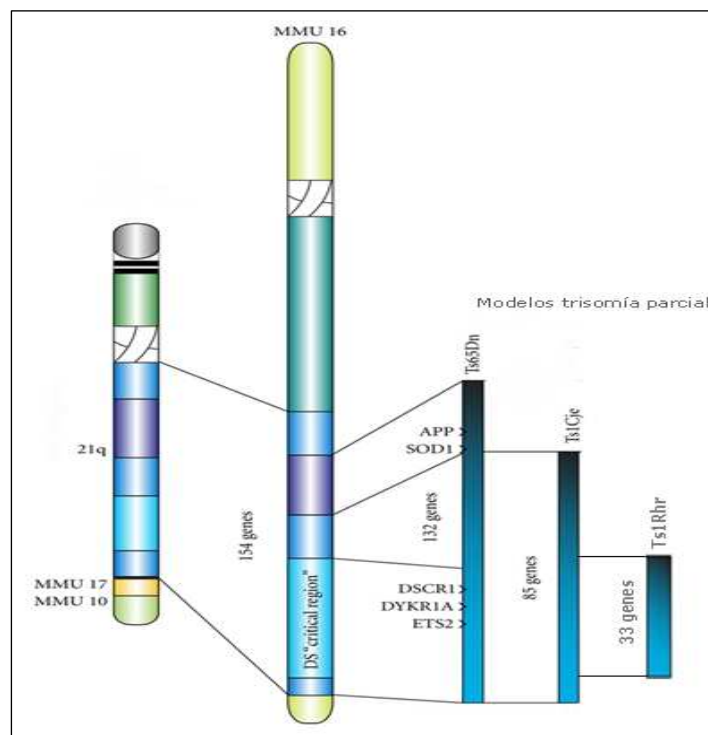


Figura 3. Cromosoma 21 humano (HSA21) con los cromosomas ortólogos de ratón (MMU10, MMU16 y MMU17). Esquema de los segmentos génicos involucrados en la llamada "región crítica del síndrome de Down" (DSCR) en HSA21 y diferentes modelos trisómicos de ratón. El ratón Ts65Dn (trisómico para MMU16) contiene todos los genes de la DSCR y otros como el de la SOD1 y APP. Figura modificada procedente de la referencia [7].

1.4.1 Correlación genotipo-fenotipo

La investigación biológica actual sobre el SD intenta comprender las bases moleculares y efectos causados por la presencia de un HSA21 extra, provocando los fenotipos propios del SD. Existen dos hipótesis importantes, la primera de ellas es "la hipótesis de la dosis génica", cada vez más respaldada, es considerada por muchos autores como la hipótesis central y consiste en explicar el fenotipo del SD como consecuencia de la sobreexpresión de determinados genes presentes en el HSA21. La

segunda hipótesis es “la amplificación de la inestabilidad del desarrollo”, trata de explicar un efecto inespecífico causado por un desequilibrio cromosómico.

1. En la primera hipótesis, el fenotipo del SD estaría causado por un exceso de dosis tanto de genes como de secuencias no codificantes (microRNAs, secuencias reguladoras, etc...) específicos del HSA21, que mostrarán **efectos debidos a la dosis de gen** (gene dosage effect); es decir, al haber 3 copias en lugar de 2, existiría un incremento del 50% en los niveles de RNA y de proteínas derivadas de cada gen. A estos dos mecanismos habría que añadir los efectos epistáticos causados sobre otros productos genómicos localizados en otros cromosomas, con su correspondiente efecto de composición alélica. Al menos, algunos de estos incrementos provocarían perturbaciones en las vías y en los procesos celulares en los que intervienen los productos de estos genes [5, 38, 39].
2. En la segunda hipótesis, se aboga más bien por un efecto inespecífico mediado por un desequilibrio cromosómico en la homeostasis genética y en cierta medida el fenotipo no depende de una elevada expresión de los genes (no sensible a la dosis). Así, las perturbaciones quizás se sumen unas a otras, induciendo anomalías en el desarrollo de diversos órganos, tejidos y sistemas del organismo [5, 7].

1.4.2 Búsqueda de genes candidatos

Un análisis de la expresión temporal y espacial de todos los genes del HSA21 sería crítico para determinar cuales de esos genes serían especialmente relevantes en el conjunto de fenotipos del SD para establecer una relación entre la expresión de genes específicos y su contribución a determinados fenotipos, y por último, para entender la variabilidad fenotípica entre los individuos con SD. Una herramienta útil para buscar genes candidatos ha sido analizar individuos con distintas trisomías parciales que presentaban numerosos rasgos fenotípicos característicos del SD.

En 1993, se pudo acotar una región denominada como DSCR (*Down Syndrome Critical Region*), es una pequeña región en la parte distal del brazo largo del HSA21 (21q22.2-22.3) con un tamaño que oscila entre 3,8-6,5 Mb de DNA y con 33 genes que contribuyen a la aparición de las características fenotípicas del SD [40, 41], cuya sola aparición en trisomía ya se considera suficiente para producir el fenotipo en el SD [42, 43]. Sin embargo, esta asignación de la DSCR, actualmente es motivo de controversia ya que existen individuos con trisomía parcial de regiones no incluidas en dicha región que presentan algunas de las características fenotípicas del SD [42, 44].

Además, se ha descrito que el modelo murino trisómico para la región DSCR, el Ts1Rhr, no presenta las mismas alteraciones en el hipocampo que las observadas en el SD o en el modelo trisómico Ts65Dn [45]. Otra de las estrategias empleadas para buscar genes candidatos, enfocada principalmente al SNC, consiste en realizar estudios de expresión diferencial entre células o tejidos euploides y trisómicos, tanto provenientes de modelos murinos como el Ts65Dn o el Ts1Cje [38, 39, 46-48] como de muestras humanas [49, 50]. Para ello, se han utilizado distintas técnicas desde RT-PCR o hibridación *in situ*, hasta microarrays o SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) a la hora de identificar la expresión variable de los genes del HSA21 o de sus ortólogos murinos.

Todos estos estudios coinciden en demostrar la sobreexpresión de 1,5 veces de la mayoría de los genes dispuestos en trisomía respecto a los diploides, tanto del HSA21 como de sus ortólogos en MMU16. Ahora bien, en aquellos estudios en los que se ha realizado un análisis de la expresión manteniendo la individualidad de las muestras, se observa que la mayoría de los genes presentan variabilidad interindividual tanto en las muestras trisómicas como en euploides, si bien al hacer el promedio, se detecta la sobreexpresión en el pool trisómico [48]. Estos resultados han permitido establecer distintas categorías de genes: 1) los que presentan unos niveles de sobreexpresión significativos respecto a los euploides y poca variabilidad en su expresión. Se postula que estos genes son buenos candidatos para los rasgos comunes presentes en el SD [48, 49, 51]; 2) los que presentan cierto solapamiento en sus niveles de expresión con los de los genes euploides. Estos genes serían los responsables de aquellos fenotipos variables presentes en SD; y por último, 3) aquellos genes que presentan unos niveles de expresión indistinguibles de los de los genes euploides. Estos tendrían un efecto modulador o un bajo efecto en el fenotipo del SD.

Esta variabilidad de la expresión de distintos genes presente tanto en los ratones trisómicos como en los individuos con SD se explicaría en gran medida por la composición alélica diferencial entre individuos. Se sugiere que la aparición de los distintos fenotipos presentes en SD sería consecuencia de sobrepasar un determinado umbral tanto en la expresión de genes (o secuencias no génicas) localizados en el HSA21 (MMU16 en el ratón), como en los localizados en otros cromosomas que interaccionan de alguna manera con los primeros. Como resultado, existirían determinadas combinaciones alélicas que sobrepasarían ese umbral y por lo tanto, darían lugar a la aparición de un determinado fenotipo y otras combinaciones que, al no sobrepasar ese umbral, tendrían un efecto silencioso sobre el mismo fenotipo [5].

INTRODUCCIÓN

En la tabla 1 se presenta el progreso realizado en la identificación de genes 'dosis-sensibles' que puedan ser responsables de diversos fenotipos del SD.

Fenotipo	Genes dosis-sensibles que son candidatos	Referencias
Aprendizaje, memoria, desarrollo cerebral	OLIG1 ^a , OLIG2 ^a	Chakrabarti et al., 2010
	DYRK1A	Smith et al., 1997; Altafaj et al., 2001; Ahn et al., 2006
	SIM2	Ema et al., 1999
	DSCAM	Alves-Sampaio et al., 2010
	SYNJ1	Voronov et al., 2008
	APP	Netzer et al., 2010
Neurodegeneración	APP ^a	Salehi et al., 2010
	DYRK1A	Liu et al., 2008
Control motor	APP	Trazzi et al., 2011
	DYRK1A	Altafaj et al., 2001
Anomalías cardíacas	ITSN1, SINJ1, DSCR1	Chang y Min, 2009
	DSCAM	Korbel et al., 2009
	SLC19A1	Locke et al., 2010
	COL6A1	Davies et al., 1994, 1995
Leucemias	ETS2, ERG	Rainis et al., 2005; Stankiewicz y Crispino, 2009
Reducción de tumores sólidos	ETS2 ^a	Sussan et al., 2008
	DSCR1 ^a	Baek et al., 2009
	ADAMTS1, ERG, JAM2, PTTG1IP	Reynolds et al., 2010
Alteraciones craneofaciales	ETS2	Sumarsono et al., 1996
Estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, envejecimiento prematuro.	SOD1	Groner et al., 1994; Busciglio et al., 1995; Capone et al., 2002; Engidawork et al., 2003; Roizen et al., 2003

Tabla 1. Genes 'dosis-sensibles' que son candidatos a causar fenotipos propios del síndrome de Down. Tabla modificada procedente de la referencia [31].

1.5 Modelos murinos del SD

La idea de utilizar modelos murinos del SD surge de la necesidad de entender las causas moleculares que conducen a las distintas alteraciones presentes en los diferentes fenotipos del SD. Para que un modelo animal sea útil con vistas al estudio del SD, son necesarias dos condiciones: la primera es que el fenotipo del modelo animal posea rasgos importantes del SD, y la segunda, que el modelo animal sea trisómico para uno o más genes de los contenidos en el HSA21. En 1978, Charles Epstein escribió: "Para estudiar la trisomía 21 humana sería muy útil disponer de un modelo murino de aneuploidía para un cromosoma o segmento de cromosoma que fueran homólogos a la parte del HSA21 que origina el SD. Una vez que se localicen en el genoma del ratón los sitios génicos de la Cu/Zn superóxido dismutasa (SOD1), los genes antivíricos, y la glicinamida ribonucleótido sintasa [algunos de los pocos genes que entonces se conocían del HSA21], será posible estudiar sistemáticamente las consecuencias de la aneuploidía sobre las funciones de estos loci".

Varios grupos han dedicado sus esfuerzos a estudiar la función de los genes contenidos en el cromosoma HSA21 desde que a principios de siglo XXI apareció la secuencia completa [30]. Los estudios en modelos celulares de sobreexpresión de muchos de esos genes contribuyen en gran medida a entender su función, sin embargo son limitados y es imprescindible el estudio de la función génica *in vivo*, por tanto los científicos generaron modelos murinos. Uno de los organismos utilizado de forma extensiva en experimentación ha sido el ratón, que comparte un 99% de sus genes con el ser humano. Estudios de genómica comparativa pusieron de manifiesto la sintenia entre el HSA21 y el MMU16 en un 80% [30], mientras que el 20% restante era sinténico con los cromosomas MMU10 y MMU17 [52]. Inmediatamente el objetivo preferente fue conseguir un ratón trisómico para el MMU16 necesario para identificar genes 'dosis-sensibles' implicados en el fenotipo del SD, así, el primer gen del HSA21 identificado en el MMU16 fue el de la SOD1 [53]. A partir de aquí se han conseguido varios modelos de ratón trisómicos para el estudio del SD (Tabla 2).

Los ratones transgénicos se producen al pretender conocer la consecuencia de la sobreexpresión de uno, dos o tres genes y no la de un conjunto amplio de genes, ya que se trata de establecer la correlación más estricta entre genotipo y fenotipo. Estos modelos complementan a los trisómicos, pero no son perfectos al sobreexpresar un gen o unos pocos, sin embargo en la trisomía 21 se sobreexpresan varios genes conjuntamente y hoy sabemos que los unos influyen sobre los otros. En cualquier caso, es una buena aproximación para obtener información sobre el SD [31, 45].

Tabla 2. Modelos de ratón trisómicos para el síndrome de Down [20].

Ratones	Características de los modelos murinos.
Ts65Dn	Trisomía parcial del MMU16 translocada al centrómero del MMU17 (3 copias con ~104-132 genes del MMU16 ortólogos al HSA21, entre ellos todos los de la DSCR) [5, 37].
Ts1Cje	Similar al Ts65Dn aunque con ~85 genes ortólogos a los contenidos en el HSA21.
Ts1Rhr	Trisomía para la región DSCR (contiene tres copias de una región del MMU16 que es ortóloga a la región DSCR con 33 genes del HSA21).
Triple trisómico	Contienen 3 copias para los cromosomas MMU10, MMU16 y MMU17 con un total de ~250 genes ortólogos a los contenidos en el HSA21. Este modelo de SD es el más completo.
Tc1	Es un ratón transcromosómico, contiene una copia libre del HSA21 con algunas deleciones (~83% de los genes del HSA21). El Tc1 tiene una ventaja, permitir estudiar los genes humanos del HSA21 que no se encuentran en regiones ortólogas de MMU10, MMU16 y MMU17.
Transgénicos de YACs, BACs y PACs	Se generan a partir de cromosomas artificiales de levaduras (YACs, <i>Yeast Artificial Chromosome</i>), de bacterias (BACs, <i>Bacterial Artificial Chromosome</i>) y del bacteriófago P1 (PACs, <i>P1 bacteriophage Artificial Chromosome</i>), contienen distintos fragmentos cromosómicos y cubren aproximadamente 2 Mb del HSA21 [54].
Transgénicos	Sólo sobreexpresan un gen (DYRK1A, SOD1, PFKL, S100b, SIM2, ETS2, APP, PEP19, DSCR1).

2. ESTRÉS OXIDATIVO

El término "estrés oxidativo", popularizado por Helmut Sies [55-57], se define como "una alteración en el balance pro-oxidante/antioxidante a favor de los primeros, dando lugar a posibles daños a biomoléculas". Los daños repercuten de forma directa o indirecta en el tejido, siendo la importancia del daño dependiente de la duración y de la naturaleza del sistema estresado [57-63]. El estrés oxidativo, o más bien el exceso de radicales libres (RL), en relación con las defensas antioxidantes está involucrado en mayor o menor grado en la patogénesis de múltiples enfermedades y en el envejecimiento [64-66]. Según la "*Hipótesis de los Radicales Libres del Envejecimiento*" [67], el incremento de los RL produce un aumento del estrés oxidativo que favorecería la senescencia prematura en las células. Esta se podría producir por modificaciones oxidativas a las biomoléculas, que alteran sus funciones biológicas celulares, contribuyendo al envejecimiento prematuro [68].

En la actualidad, se admite que el proceso de envejecimiento se produce bajo dos mecanismos básicos: uno de orden genético y el otro involucra a los procesos de oxidación por RL. Sin embargo, se sigue manteniendo la ambigüedad originada a mediados de los 80, acerca de si el estrés oxidativo causa daño celular, o más bien si el daño celular causa estrés oxidativo por aumento de los RL de forma secundaria, inclinándose esta ambigüedad en la mayoría de las patologías (Tabla 3) en las que los RL actúan en mayor grado hacia la primera suposición [69-72].

Tabla 3. Múltiples patologías en las que se observa la implicación, en mayor o menor medida de radicales libres.

Infarto agudo de miocardio	Artritis reumatoide	Enfermedad granulomatosa crónica
Fibrinolisis	Shock	Síndrome de Batten
Angioplastia coronararia (ACTP)	Diabetes	Tumores
Deficiencias inmunitarias	Aterosclerosis	Síndrome de Down
Arteriosclerosis	Esofagitis	Envejecimiento
Deficiencia de mieloperoxidasa	Enfisema pulmonar	

El estrés oxidativo, debido a la dificultad existente para detectar directamente los RL, se puede conocer mediante la medición de los productos de las reacciones oxidativas (peroxidación lipídica, oxidación del DNA, oxidación de proteínas o de carbohidratos), o mediante el conocimiento de la depleción de sustancias antioxidantes. Un aumento del estrés oxidativo puede estar producido por tres condicionantes, por un aumento mantenido de los radicales libres de oxígeno o de nitrógeno que superarían los mecanismos de defensa, por una disminución de la defensa antioxidante y por la acción conjunta de ambos mecanismos lo que provocaría un daño oxidativo crónico.

2.1 Radicales libres

Los radicales libres (RL) (Tabla 4) pueden ser definidos como especies químicas, moléculas o átomos, capaces de existir independientemente, con uno o más electrones desapareados en su última capa u orbital electrónico, es decir, con un número impar de electrones [73-75]. La existencia del electrón desapareado, es lo que le confiere su altísima reactividad con gran cantidad de moléculas biológicas (lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.), ya que tiende rápidamente a ganar o ceder un electrón para conseguir así una conformación estable y esto hace que su vida media sea muy corta. Como consecuencia de la formación continuada de RL, debe existir en el organismo un adecuado sistema no sólo de defensa antioxidante sino también de reparación del daño oxidativo producido [76]. La Dra. Gerschman adjudicaba a los RL una relación estrecha con algunas patologías, tales como diabetes mellitus, artritis reumatoide, cáncer, enfermedades neurodegenerativas (Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica), síndrome de Down, sin dejar de tener en cuenta algunas situaciones en que los RL están comprometidos más directamente, tales como: toxicidad del oxígeno, acción tóxica de numerosos xenobióticos e incluso el envejecimiento, entre otras [69].

Tabla 4. Especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN) [69, 72].

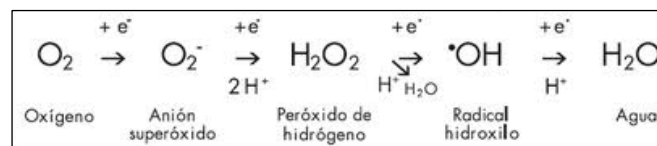
Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERO/ERN)		
	Radicales	No Radicales
Especies reactivas de oxígeno (ERO)	Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
	Hidroxilo (OH^{\bullet})	Acido hipocloroso (HOCl)
	Peroxilo (RO_2^{\bullet})	Acido hipobromoso (HOBr)
	Alcoxilo (RO^{\bullet})	Ozono (O_3)
	Hidroperoxilo (HO_2^{\bullet})	Oxígeno singlete (1O_2)
Especies reactivas de nitrógeno (ERN)	Oxido nítrico (NO^{\bullet})	Ácido nitroso (HNO_2)
	Dióxido de nitrógeno (NO_2)	Catión nitrosilo (NO^+)
	Anión nitroxilo (NO^-)	
	Peroxonitrito ($ONOO^-$)	
	Acido peroxinitroso ($ONOOH$)	
	Alquil peroxinitrito ($ROONO$)	

En los organismos vivos, los RL se están formando continuamente, siendo los más abundantes y reactivos los centrados en el oxígeno. Dichos RL se agrupan dentro del término genérico de "especies reactivas del oxígeno" (ERO), haciéndose referencia con este término, a un conjunto de moléculas que incluyen no sólo a los radicales de oxígeno propiamente dichos, entre los que se encuentran los radicales $O_2^{\bullet-}$ y OH^{\bullet} , sino también a algunas moléculas, no radicales, derivadas del oxígeno e involucradas

INTRODUCCIÓN

directamente en la producción de radicales del oxígeno, como puedan ser el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y el ácido hipocloroso (HClO), existiendo además las "especies reactivas de nitrógeno" (ERN) [77, 78].

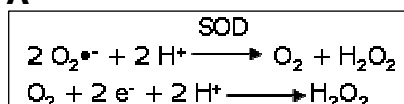
El **radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$)** procede de la reducción univalente del oxígeno molecular (O_2). No es el radical más reactivo y se forma espontáneamente en medios aerobios, probablemente, la principal fuente de radicales $\text{O}_2^{\cdot-}$ sea la cadena de transporte de electrones (CTE) mitocondrial (aproximadamente entre un 5% y un 10% de los electrones transportados) [79, 80]. También es producido por enzimas como la NADPH oxidasa, xantina (XO), óxido nítrico sintasa (NOS), lipooxigenasa y ciclooxigenasa [81]. El daño biológico directo que puede causar este radical es muy selectivo y de él deriva el H_2O_2 y los demás RL [73]. Suele producir reacciones con otros radicales como el óxido nítrico o con iones Fe que contienen determinadas proteínas [75] y tiene la capacidad de reaccionar con los lípidos de las membranas celulares alterando con ello su funcionalidad.



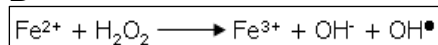
Reducción univalente del oxígeno [81].

El **peróxido de hidrógeno (H_2O_2)** es la forma menos reactiva y más estable de las ERO. Se forma entre otras vías, por adición de un electrón y dos protones al radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ catalizado por el enzima SOD. En general, cualquier sistema biológico que genera radicales $\text{O}_2^{\cdot-}$ puede producir H_2O_2 por dismutación, siempre que el radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ no sea interceptado por alguna otra molécula. La importancia del H_2O_2 se debe a su participación en numerosas reacciones que dan lugar a la generación de otros RL, además de su capacidad para atravesar con mucha facilidad las membranas biológicas [82]. Una vez que ha difundido, puede dar lugar a la formación del radical OH^{\cdot} vía oxidación de metales de transición en una reacción conocida como reacción de Fenton, además de degradar proteínas con el grupo hemo (mioglobina, hemoglobina y citocromo C) liberando así iones Fe^{2+} , entre otras acciones [74, 77, 83].

A

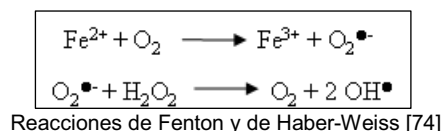


B



(A) Dismutación del anión superóxido catalizada por la SOD. (B) Reacción de Fenton: Formación de radical hidroxilo a partir de peróxido de hidrógeno [83].

El **radical hidroxilo (OH•)** es la molécula más reactiva capaz de reaccionar con diferentes biomoléculas, lo que causa disfunción celular [83, 84]. En los organismos vivos la principal fuente de producción parece ser la descomposición del H₂O₂ en presencia de metales de transición, principalmente el hierro y cobre. La reacción de Haber-Weiss genera radicales OH• a partir de H₂O₂ y aniones superóxido, y es activada en presencia de los cationes Fe(III), generados en la reacción de Fenton [74, 77, 83]. Los radicales OH• pueden iniciar la lipoperoxidación al abstraer un átomo de H de un grupo metileno (-CH₂-) de un ácido graso poliinsaturado (PUFA).



El **oxígeno singlete (¹O₂)** que no se trata de un radical en sí, pero junto al radical OH•, es considerada como una de las ERO capaces de reaccionar directamente con biomoléculas que contienen dobles enlaces conjugados como puedan ser ácidos grasos, generándose endoperóxidos [85, 86].

El **ácido hipocloroso (ClOH)** al igual que el H₂O₂ y el ¹O₂ no se puede considerar un RL en sí, pero se incluye dentro del término ERO, por su capacidad para oxidar importantes biomoléculas así como producir e interactuar con otros RL [87].

Los **radicales peroxilo (ROO•) y alcoxilo (RO•)** se forman cuando el radical OH• reacciona con compuestos orgánicos y también por la descomposición de peróxidos orgánicos o hidroperóxidos (ROOH), reacción catalizada por metales de transición. Son capaces de abstraer un átomo de H⁺ de otras moléculas e iniciar reacciones de gran importancia biológica como la lipoperoxidación [85, 86, 88].

Las **especies reactivas de nitrógeno (ERN)** incluyen especies derivadas de nitrógeno. Entre las ERN se encuentran los radicales óxido nítrico (NO•), dióxido de nitrógeno (NO₂•) y peroxinitrito (ONOO⁻), entre otros (Tabla 3). El NO• es capaz de reaccionar con especies como el radical O₂•⁻ para formar ONOO⁻ de gran importancia debido a su capacidad para modificar biomoléculas como proteínas [75, 89, 90].

2.2 Fuentes de producción de radicales libres

Los RL se producen fisiológicamente en pequeñas cantidades y cuando se generan niveles elevados, el origen puede ser exógeno o endógeno. Las principales fuentes de producción de RL **exógenas** son factores ambientales (polución, humo del tabaco), compuestos de naturaleza pro-oxidante en la dieta y contaminantes químicos, también se pueden generar por el efecto de radiaciones electromagnéticas o ionizantes y en el proceso de metabolización de determinados fármacos [91].

Uno de los principales mecanismos moleculares de producción **endógena** de RL es la cadena de transporte de electrones (CTE), ya que la mitocondria constituye la fuente principal de RL. La CTE puede ser considerada como la mayor fuente de producción de RL, ya que del total del O_2 que llega a la CTE, entre el 90-95% del mismo es metabolizado a H_2O mediante la vía de la reducción tetravalente, sin formación de intermediarios tóxicos; sin embargo, entre el 5-10% del O_2 consumido sufre una reducción monovalente por electrones provenientes de la CTE que escapan al control de la misma, sobre todo en situaciones de daño mitocondrial, dando lugar a la formación de radicales $O_2^{\bullet -}$ [71, 80, 92].

Los sistemas de transporte de electrones de la membrana del retículo endoplasmático y en concreto el sistema NADPH/NADPH citocromo P_{450} , es capaz de reducir ciertos compuestos en una reducción monovalente, generando RL [91]. Otras fuentes son los peroxisomas, orgánulos ricos en oxidasas y que generan H_2O_2 , el cual es depurado por enzimas específicas (catalasas) y transformado en H_2O .

La xantina oxidasa es una enzima que cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina y de ésta a ácido úrico, acoplado a dicha oxidación una reducción monovalente del O_2 , con la consiguiente formación del radical $O_2^{\bullet -}$ [78].

Los neutrófilos y fagocitos mononucleares (monocitos/macrófagos), poseen en su membrana el sistema flavoproteico citocromo b_{254} -NADPH oxidasa, sistema productor de RL. Así, durante la actividad fagocitaria se produce un incremento en el consumo de O_2 , denominado "estallido respiratorio" ('respiratory burst'), y un 70-90% de este O_2 es utilizado en la producción del radical $O_2^{\bullet -}$ y el H_2O_2 , los cuales pueden producir radical OH^{\bullet} si en el exterior del neutrófilo existen iones metálicos que puedan catalizar la reacción, aunque normalmente no están libres en los sistemas biológicos, en determinadas situaciones fisiopatológicas como es el caso de fagocitosis e inflamación, el pH bajo puede ayudar a la liberación de los mismos [93].

2.3 Daño oxidativo a moléculas biológicas

Los RL tienen una gran capacidad de reacción con moléculas de todo tipo, tanto radicales como no radicales, esto justifica su implicación en una amplia variedad de procesos fisiológicos y patológicos. Los RL pueden dañar la mayor parte de moléculas biológicas o biomoléculas, causando daño oxidativo celular y dando lugar a nuevas especies reactivas capaces de continuar la acción oxidativa.

A) Daño oxidativo a lípidos

En los lípidos se produce el mayor daño oxidativo en un proceso que se conoce como lipoperoxidación (LPx) o enranciamiento oxidativo, representa una forma de daño hístico que puede ser desencadenado por el O_2 , el 1O_2 , el H_2O_2 y el OH^\bullet , afectando a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs–polyunsaturated fatty acids) como las membranas celulares, lo que indica una mayor susceptibilidad conforme aumenta el número de dobles enlaces [85, 86]. Este proceso se considera un factor muy importante en el envejecimiento de células aeróbicas [86, 94]. La LPx es un proceso continuo y fisiológico que en condiciones normales actúa como un renovador de membranas biológicas aunque su excesiva activación está relacionado con la patogénesis de numerosas enfermedades y procesos patológicos como diabetes, fibrosis pulmonar, SD, etc, por tanto es importante establecer el papel del daño oxidativo en la patogenia y evolución de la enfermedad [95].

Los productos finales del proceso de LPx son aldehídos, gases hidrocarbonados y varios residuos químicos, como los n-Alcanales, 2-Alquenaes, entre otros, incluyendo dentro de estos productos el malondialdehído (MDA) y los 4-hidroxi-alquenaes [85]. El MDA, formado durante las últimas etapas de la ruptura de endoperóxidos durante la reestructuración intramolecular de los ácidos grasos, puede ser metabolizado a nivel celular, por ejemplo por la aldehído deshidrogenasa hepática, y/o excretado. Está involucrado en el daño a la célula, ya que reacciona y modifica residuos aminados de proteínas, especialmente a la lisina, ataca los grupos sulfhidrilo (-SH) y produce entrecruzamientos intra e intermoleculares con las proteínas, está involucrado en la formación de pigmentos como la lipofuscina durante el envejecimiento [96]. En la lipoperoxidación se producen los 4-hidroxi-alquenaes y en particular el 4-HNE (4-hidroxinonenal) que es muy reactivo. El 4-HNE es un producto de la oxidación del ácido araquidónico [97]. Muchos de los aldehídos formados reaccionan rápidamente con los componentes celulares, pueden causar mutaciones en el DNA, y producir daños estructurales y funcionales al reaccionar con proteínas [98].

Se consideran tres fases en la lipoperoxidación: iniciación, propagación y terminación (Figura 4): La **Iniciación** se produce cuando cualquier especie reactiva ataca o abstrae un átomo de H del doble enlace de un grupo metileno (-CH₂-) de los PUFAs, generando un radical lipídico [73, 85, 99]. En la **Propagación**, el radical lipídico tiende a estabilizarse por reordenación molecular formando un dieno conjugado que pueden sufrir varias reacciones posteriores, pero en condiciones aeróbicas reaccionan con el O_2 formando radicales peroxilo (ROO^\bullet). El peroxilo puede sustraer un átomo de hidrógeno de otra molécula vecina, la cual puede ser otro PUFA, formándose así un hidroperóxido ($ROOH$) y un nuevo radical lipídico (R^\bullet). Además, los

INTRODUCCIÓN

radicales ROO^{\bullet} pueden reaccionar con residuos de aminoácidos de proteínas, dañando la función de enzimas y receptores de membrana u oxidar el colesterol de las membranas celulares. El grado de propagación de la cadena depende de varios factores, entre ellos la concentración de O_2 , la composición de ácidos grasos, la relación de lípido-proteína y la presencia de antioxidantes. Los hidroperóxidos (ROOH) son los productos primarios de la LPx y en condiciones fisiológicas son relativamente estables [100], pero sus grupos $-\text{OOH}$ se encuentran localizados en medio de la cadena hidrocarbonada de los PUFAs, originando una distorsión del espacio hidrofóbico y una pérdida de la función biológica de las membranas celulares [71, 101]. La LPx sigue propagándose llegando a la fase de **Terminación** cuando dos hidroperóxidos reaccionan entre sí dando un tetróxido o cuando son neutralizados por los antioxidantes. Los tetróxidos son inestables y al romperse generan aldehídos como el MDA [96], que es un indicador de LPx.

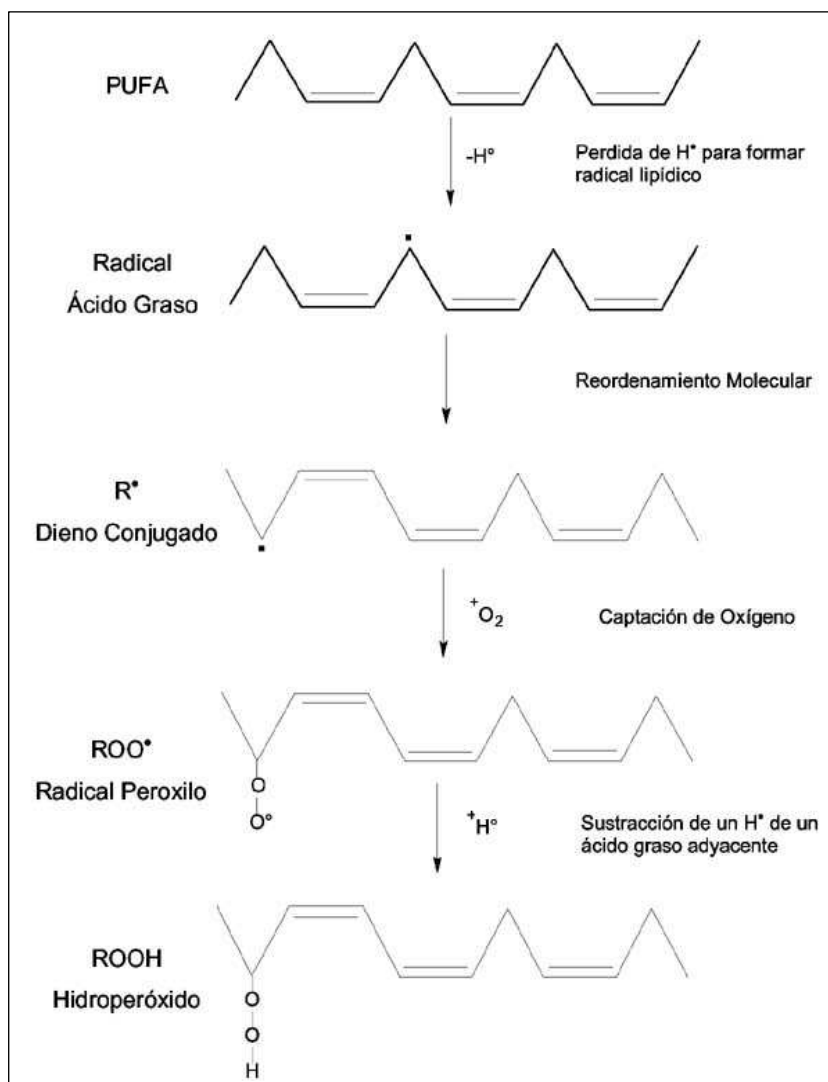


Figura 4. Mecanismo de lipoperoxidación [73, 85].

B) Daño oxidativo a proteínas

Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser atacados por los RL, sobre todo por el radical OH^{\bullet} [102]. Se produce el daño oxidativo sobre un grupo de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, histidina, triptófano y metionina; además se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, hay fragmentación de la proteína por ruptura de enlaces peptídicos y por último, formación de grupos carbonilos que impiden el normal desarrollo de sus funciones. El sistema de oxidación catalizada por metales es el mecanismo más importante en la modificación oxidativa de las proteínas. El envejecimiento conlleva la acumulación de proteínas dañadas debido a un aumento con la edad de la velocidad de oxidación de las mismas, a una disminución de la capacidad de degradar estas proteínas, o ambos a la vez [102]. Estas oxidaciones pueden dar lugar a un cambio conformacional de la proteína y en consecuencia a una pérdida o modificación de su actividad biológica y a una alteración en la susceptibilidad a la degradación [93].

El ataque de los RL a proteínas pueden ser difusos (dando lugar a modificaciones generalizadas) o ataques selectivos (dando lugar a modificaciones en sitios específicos). En las primeras modificaciones se producen ataques en diferentes regiones de la estructura proteica, dando lugar a alteraciones estructurales, agregaciones intra e intercatenarias, fragmentación y/o desnaturalización. La introducción de grupos carbonilo en las proteínas es un ejemplo de modificación oxidativa global de las proteínas. Esta modificación causa generalmente la pérdida de la función estructural o catalítica de las proteínas afectadas [103]. Este daño es comúnmente observado como consecuencia secundaria de cadenas de propagación de RL, entre las que destaca la lipoperoxidación y especialmente la producción de entrecruzamiento catalítico por parte del MDA [96, 104]. Los ataques selectivos causan un daño oxidativo en el cual juegan un papel importante los metales de transición, siendo los enzimas que contienen dichos metales los que aparentemente presentan mayor riesgo de sufrirlas [105]. Estas modificaciones son generalmente llamadas "oxidaciones catalizadas por metales" y casi siempre implican cambios covalentes. Se produce la oxidación de los grupos $-\text{SH}$ de los aminoácidos, siendo éstas, las principales modificaciones que permiten su degradación proteolítica [106].

Generalmente, las células eliminan las proteínas modificadas oxidativamente mediante proteólisis. Sin embargo, algunas proteínas oxidadas pueden presentar una mayor resistencia a ser eliminadas, que junto con una mayor tasa de formación, contribuiría al acúmulo de proteínas oxidadas y a los efectos dañinos derivados de ellas. Se ha sugerido que esta diferencia en la susceptibilidad a la proteólisis depende del grado de oxidación de las proteínas, de manera que las proteínas parcialmente

INTRODUCCIÓN

desnaturalizadas o poco oxidadas presentan una menor resistencia a la proteólisis [107], que las que están muy oxidadas [108]. El envejecimiento conlleva la acumulación de proteínas dañadas debido a un aumento con la edad de la velocidad de oxidación de las mismas, a una disminución de la capacidad de degradar estas proteínas, o ambos a la vez [102].

C) Daño oxidativo a carbohidratos o azúcares

Los monosacáridos actúan como captadores (*scavengers*) de radicales OH^\bullet y O_2^\bullet [109]. Los RL también provocan la disminución del contenido de ATP intracelular alterando la vía glucolítica y mitocondrial. En la vía glucolítica, los RL producen la inactivación de la vía de la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH), la disminución de nicotinadenosin-dinucleótido (NAD^+), una discreta acidosis intracelular y el aumento del Ca^{2+} libre. Por otra parte, los monosacáridos, en condiciones fisiológicas se autooxidan y forman cetoaldehídos e intermediarios oxidantes como el radical O_2^\bullet , que es captado por la glucosa e impide su acción sobre otras moléculas. Estos productos son extremadamente reactivos y capaces de alterar la estructura espacial de las proteínas (aparición de puentes, entrecruzamientos, acortamientos, cambios conformacionales, etc.) [110, 111].

D) Daño oxidativo al DNA

Las alteraciones del DNA, como consecuencia de la interacción con los RL son importantes en diversas patologías e incluso en el envejecimiento, en las que el estrés oxidativo está elevado y puede producir un mayor número de mutaciones, entrecruzamientos, roturas espontáneas en las cromátidas y pérdida de fragmentos cromosómicos, llegando incluso a la pérdida total de determinados cromosomas [112]. Los principales agentes involucrados en el daño directo son los radicales OH^\bullet y el H_2O_2 [113, 114]. Dentro de las alteraciones más frecuentes en las bases púricas, destaca la formación de la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8OHdG), con un alto efecto mutagénico. Respecto a las bases pirimidínicas, se encuentran los glicoles de timina (T) y citosina (C), además de los hidratos de pirimidina, los cuales dan lugar a fragmentación.

El DNA mitocondrial presenta una mayor tasa de mutación por modificaciones oxidativas de sus bases que son responsables del mal funcionamiento de los complejos de la CTE, principal fuente de ERO mitocondriales, incrementando su producción y produciendo así un círculo vicioso [115]. La 8OHdG es 16 veces superior a la encontrada en el DNA nuclear, esto podría traducirse en una disfunción mitocondrial dando lugar al desarrollo del fenotipo característico de la senescencia celular [116-118].

2.4 Defensa frente a radicales libres: papel antioxidante

El organismo ha desarrollado una serie de mecanismos de defensa antioxidante enzimática y no enzimática (Tabla 5), diseñados para protegerse de la acción de los RL. Según Halliwell, podemos definir antioxidante como "cualquier sustancia que, en bajas concentraciones respecto al sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato" [75, 119]. Como sustrato oxidable se pueden considerar casi todas las moléculas orgánicas o inorgánicas que se encuentran en las células, tales como proteínas, lípidos, carbohidratos y DNA. Los antioxidantes al interactuar con un RL le ceden un electrón oxidándose a su vez y transformándose luego en un RL débil no tóxico; debido a que interactúan más rápido con los RL que con el resto de moléculas presentes, así impiden que otras moléculas se unan al O₂. Su acción la ejercen en la membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular, es decir, tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos, alterando su propia integridad molecular evitan alteraciones de moléculas funcionalmente vitales. Los antioxidantes exógenos actúan como moléculas suicidas, por lo que su reposición debe ser continua a través de la ingesta de nutrientes que los contengan [75, 120-122].

Tabla 5. Defensa antioxidante		
1.- Antioxidantes enzimáticos (captadores): Superóxido dismutasa (SOD) Glutation peroxidasa (GPx) Catalasa (CAT)	Reacción Enzimática	
	$2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$ $2GSH + H_2O_2 \longrightarrow GSSG + H_2O$ $2GSH + ROOH \longrightarrow GSSG + ROH + H_2O$ $2H_2O_2 \longrightarrow O_2 + 2H_2O$	
2.- Antioxidantes no enzimáticos (captadores):	Glutati6n Vitamina E Vitamina C Coenzima Q Carotenoides Flavonoides Fitoestr6genos	Cofactores Cobre Zinc Manganeso Hierro Selenio
3.- Preventivos:	Transferrina Ferritina Ceruloplasmina Albumina Bilirrubina Metalotioneina 1cido 6rico	

El sistema de defensa antioxidante (Figura 5) est1 constituido por un grupo de sustancias que al estar presentes en concentraciones bajas respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidaci6n de este, aunque al haber un exceso de RL se pueda producir da1o oxidativo a biomol6culas [123]:

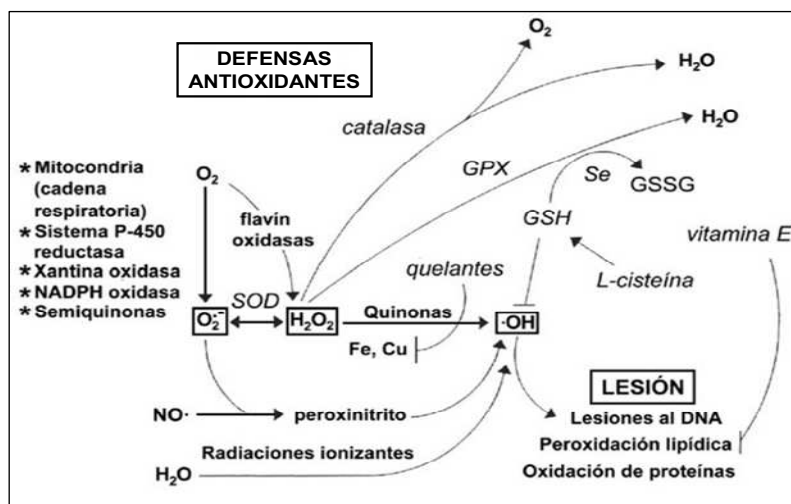


Figura 5. Defensa antioxidante y lesión a biomoléculas.

A) Sistema antioxidante enzimático

El sistema antioxidante enzimático está basado en un complejo enzimático de defensa que incluye a la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), tioredoxina reductasa y glutatión reductasa (GR). El objetivo es la dismutación del radical $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 y cuya acumulación se evita al ser transformado en agua y oxígeno molecular, consumiendo glutatión (GSH) y $NADPH^+$.

A1) Superóxido dismutasa (SOD)

La superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1) pertenece a una familia de metaloenzimas conocida por acelerar la dismutación espontánea del radical $O_2^{\bullet-}$ hacia H_2O_2 y O_2 , aumentando la velocidad 109 veces [77]. La SOD también puede actuar como una peroxidasa, capaz de utilizar el H_2O_2 como reductor para formar el radical $O_2^{\bullet-}$ [124-126]. Las SODs se encuentran ampliamente distribuidas en los organismos aeróbicos, jugando un papel importante en el control de los niveles del radical $O_2^{\bullet-}$, siendo la primera defensa contra estos radicales [127, 128]. Al generar H_2O_2 en presencia de hierro libre puede presentar una acción pro-oxidante, debiendo ser complementada su acción con sistemas que eliminen el H_2O_2 , como el sistema catalasa y glutatión (GSH) [129].

En mamíferos existen tres grandes familias separadas en base a los metales que contienen y/o su localización en la célula. Dos son intracelulares, la superóxido dismutasa cobre/zinc (Cu/Zn-SOD) y la manganeso (Mn-SOD), la otra es extracelular (Ec-SOD) [127, 128]. La Cu/Zn-SOD (SOD1), presenta un peso molecular de 32.000 daltons, estando constituida por dos subunidades idénticas, con un átomo de Cu y otro de Zn cada una [130]. De estos dos metales, el Cu es el que presenta actividad catalítica, localizándose en el sitio activo de la enzima, mientras que el Zn desempeña

una función básicamente estructural [131]. Esta familia se localiza principalmente en el citosol de la célula y el gen que codifica esta enzima se encuentra en la región 21q22.11 del HSA21 humano, que corresponde al MMU16 de ratón [128]. La Mn-SOD (SOD2), está constituida por cuatro subunidades idénticas, con un átomo de Mn por unidad y un peso molecular de 80.000 daltons, su localización es mitocondrial primordialmente [130] y el gen que la codifica se localiza en el HSA6 humano [128]. La Ec-SOD (SOD3), fue descubierta en 1982 por Stefan Marklund en tejido pulmonar, tratándose de un tetrámero de 135.000 daltons, contiene un átomo de Cu por subunidad y el gen que la codifica se localiza en el HSA4 humano, además se presenta con menos actividad que las intracelulares.

A2) Catalasa (CAT)

La catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6) es una enzima antioxidante que se halla prácticamente en todas las células de animales y plantas [132]. Se trata de una enzima intracelular ferriporfirínica, constituida por 4 subunidades, cada una con un grupo hemo enlazado en su centro activo y localizada principalmente en peroxisomas, mientras que en las mitocondrias y citosol la actividad es muy baja [133]. La función de la catalasa es doble, actividad catalítica y peroxidativa [134]. Dentro de los peróxidos eliminados se encuentra el H_2O_2 y los hidroperóxidos alquilo (metanol, etanol, ácido fórmico y fenoles), siendo en este caso la reactividad de la catalasa inversa a la longitud de la cadena. Se ha observado que la descomposición de H_2O_2 es muy rápida, mientras que las peroxidasas son realmente lentas [134]. La catalasa presenta una afinidad por el H_2O_2 baja y necesita altas concentraciones del mismo para poder trabajar rápido [135], aunque se ha observado un rápida inactivación de la actividad catalasa a concentraciones de H_2O_2 superiores a 0,1M [134], igualmente se ha observado la inactivación de la catalasa por el radical $O_2^{\cdot -}$ [136].

A3) Glutación peroxidasa (GPx)

La glutatión peroxidasa (GPx) (EC 1.11.1.9) está formada por cuatro subunidades idénticas y cada una de ellas contiene un residuo de selenio-cisteína que es esencial para su actividad enzimática. Comparte sustrato con la catalasa, catalizando la reducción de diferentes hidroperóxidos ($ROOH$ y H_2O_2) usando glutatión reducido (GSH) y dando lugar a la formación de glutatión disulfuro oxidado (GSSG) y un producto de reducción. El GSSG, a su vez, es reducido a GSH por la glutatión reductasa (GR) en presencia de $NADPH+H^+$ formando un ciclo redox, impidiendo que se agoten las reservas de GSH. En organismos vivos se encuentran dos grandes grupos, la glutatión peroxidasa-selenio dependiente y la selenio independiente [137].

Las selenio dependientes son tetraméricas, conteniendo selenio en forma de enlaces covalentes selenio-cisteína en su centro activo. Son activas frente a hidroperóxidos orgánicos y H_2O_2 , localizándose primordialmente en citosol (70%), y en menor cantidad en mitocondrias (30%), en la matriz mitocondrial y en lugares de contacto entre la membrana externa e interna mitocondrial [137, 138]. En mamíferos existen 4 formas de GPx: GPx-C o forma celular que es ubicua, tiene mayor afinidad por el H_2O_2 que por el lipoperóxido; GPx-P o forma extracelular, presenta afinidad semejante por ambos sustratos; GPx-GI o gastrointestinal; GPx-PH, tiene afinidad específica para los lipoperóxidos. Las formas GPx-C y GPx-P no tienen capacidad de reaccionar con los lipoperóxidos [137-140]. El segundo grupo lo forma la glutatión S-transferasa (GSTs), que no requiere selenio para su actividad catalítica, presentando en general una menor afinidad por el H_2O_2 , se localiza en citosol, mitocondrias y fracciones celulares que contengan membranas [137, 141].

A4) Glutatión reductasa (GR)

Se trata de una flavoproteína (EC 1.6.4.2.) encargada de catalizar la reducción del glutatión disulfuro oxidado (GSSG) dependiente del $NADPH+H^+$, hacia glutatión reducido (GSH), necesitando un coenzima de dinucleótido de flavina-adenina (FAD).

B) Sistema antioxidante no enzimático

Los antioxidantes no enzimáticos son esenciales ya que pueden prevenir la lipoperoxidación o participar en reacciones enzimáticas antioxidantes debido a que muchos actúan como cofactores de enzimas [142]. El glutatión (GSH) es un tripéptido compuesto por cisteína, glicina y glutamato [143], sintetizado en dos pasos por la glutamato cisteína ligasa (EC 6.3.2.2) y la glutatión sintetasa (EC 6.3.2.3), consumiendo una molécula de ATP en cada paso [144]. El GSH puede también ser obtenido de la dieta y se encuentra prácticamente en todas las células, presentando un importante papel como antioxidante intracelular. El GSH puede reaccionar directamente con los RL, sin necesidad de intervención enzimática [145].

Las vitaminas C y E interaccionan directamente con los RL y con los radicales lipídicos, haciendo de estos compuestos unos excelentes antioxidantes hidrosolubles [146-149]. El coenzima Q transporta electrones en la CTE, pero además inhibe la LPx [150] y mantiene el pool de vit. E [151], aunque es capaz de producir radicales $O_2^{\cdot-}$ [152, 153]. Los carotenoides como el β -caroteno reaccionan con el radical peroxilo, radicales OH^{\cdot} y $O_2^{\cdot-}$, y otras especies reactivas [154]. Los elementos trazas (Cu, Zn, Mn, Fe, Se) están presentes en las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx. Por tanto, la regulación de estas enzimas antioxidantes no es únicamente función de los niveles de estrés oxidativo, sino también de la disponibilidad de estos elementos [155].

3. MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS EN EL SÍNDROME DE DOWN

El SD es considerado una condición multifactorial y la gran variabilidad fenotípica que existe en los individuos puede explicarse en parte por la "hipótesis de la dosis génica", aunque hoy día vamos conociendo cada vez mejor que incluso puede producirse una disminución en la expresión de otras proteínas [7, 156, 157]. Otra vertiente para explicar la variabilidad fenotípica es la "hipótesis de la inestabilidad del desarrollo amplificada", que postula que las características fenotípicas no son exclusivas de genes específicos del HSA21 sino que hay un pequeño número de genes en otros cromosomas que causan un desequilibrio, con un gran impacto en la expresión génica global y en la regulación de vías de señalización celular [158].

Una síntesis de las dos versiones argumenta que, en un escenario trisómico, algunos genes sensibles a la dosis, cuyo triplicado de por sí tendría efectos modestos o restringidos, puede dar cuenta de la gran cantidad de fenotipos en el SD. Así, una desregulación compleja de un grupos de genes no sólo en el HSA21 puede enmascarar algunas alteraciones comunes celulares en el SD tales como el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial [159, 160].

3.1 Estrés oxidativo en el síndrome de Down

El estrés oxidativo está considerado como uno de los mecanismos que intervienen en la patogénesis y progresión del SD debido a una desregulación de la expresión génica asociada a la trisomía 21 [161]. De hecho, se han descrito varias fuentes que podrían originar el estrés oxidativo en el SD [162-165], ya que en el HSA21 se encuentran alrededor de 20 genes importantes (Tabla 6) involucrados en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) [166].

Tabla 6. Genes localizados en el HSA21 implicados en la producción de los ROS.
Tabla modificada procedente de la referencia [156].

Factor 6 de la subunidad F0 de la ATP sintetasa (ATP5J)
Factor O de la subunidad F1 de la ATP sintetasa (ATP5O)
Proteína precursora amiloide (APP)
Represor de la respuesta al estrés oxidativo (BACH1)
Proteína ribosomal mitocondrial (MRPS6)
Cu/Zn-Superóxido dismutasa (SOD1)
Flavoproteína 3, 10 KDa NADH deshidrogenasa (ubiquinona) (NDUFV3)
Región 1 crítica del síndrome de Down (DSCR1)
Carbonil reductasa 1 (CBR1)
Carbonil reductasa 3 (CBR3)
Factor nuclear eritroide 2 (NRF2)
DYRK1A

INTRODUCCIÓN

El aumento de la producción de ROS, condición necesaria para el estrés oxidativo, está causado por la sobreexpresión de algunos genes codificados por el HSA21, y además puede estar acompañada por algún grado de disfunción mitocondrial [160, 167]. Existe un gran número de parámetros o biomarcadores de estrés oxidativo medidos en tejidos, células y fluidos corporales de pacientes con SD (Tabla 7). Juntos, estos biomarcadores amplían e informan sobre anomalías relacionadas con el estrés oxidativo en individuos con SD desde la vida fetal y con regulaciones dependientes de la edad y de los individuos [164, 168].

Tabla 7. Cambios publicados en los parámetros de estrés oxidativo en células, tejidos y fluidos corporales de pacientes con síndrome de Down. Tabla modificada procedente de la referencia [158].

Células/Tejidos/ Fluidos corporales	Parámetros y biomarcadores de estrés oxidativo
Cerebro fetal	↑ SOD1; = GPx; ↑ MDA
Cerebro	↑ GCP y carbonil reductasa
Líquido amniótico	↑↑ Isoprostanos
Eritrocitos y neutrófilos	↑ SOD1 y GPx; = CAT; ↑↑ ratio SOD1/Gpx+CAT; ↑ MDA y lipofuscina
Leucocitos, sangre total	↑ 8OHdG dependiente de la edad
Plasma	↑↓ GSSH:GSH dependiente de la edad; ↑ kinurena urinaria; ↑ ácido úrico, ascórbico y alantoina; ↓ hipoxantina y xantina; ↑ NO; ↓ Vitamina E
Orina	↑ 8OHdG, MDA, isoprostano 8,12-iso-iPF2alfa-VI, ácido kinurénico y antranílico
Suero	↑ Ácido úrico
Líquido amniótico (perfil de transcripción del mRNA)	Desregulación de genes involucrados en la respuesta al estrés oxidativo; fosfolípidos, moléculas transportadoras de iones, corazón, músculo, proteínas estructurales y genes reparadores del daño al DNA.

Normalmente, las células toleran un cierto grado de estrés oxidativo ya que tienen el potencial para activar una serie de mecanismos protectores como incrementar la producción de las enzimas antioxidantes SOD, GPx, CAT y antioxidantes no enzimáticos como el GSH, además los organismos activan el gasto de antioxidantes de la dieta (vitaminas antioxidante, carotenoides, licopeno, etc) [169]. Los biomarcadores de estrés oxidativo utilizados proporcionan evidencias de un estado pro-oxidante en individuos con SD; se ha descrito que se generan niveles excesivos de daño oxidativo a biomoléculas, que existe un equilibrio alterado del GSSH:GSH, niveles anormales de dos antioxidantes plasmáticos hidrofílicos (ácido úrico y ascórbico), disminución de la vit. E y un exceso de actividad xantina oxidasa [164].

Si bien el aumento del estrés oxidativo es detectable durante el embarazo [170] y aumenta con la edad en individuos con SD, los adultos con SD no muestran un aumento significativo del daño oxidativo en todas las biomoléculas. De hecho, las numerosas investigaciones realizadas en individuos con SD de diversas edades (niños, adolescentes y adultos) muestran diferencias en los biomarcadores de estrés

oxidativo, produciéndose un estado pro-oxidante mayor en individuos con SD más jóvenes (niños). Esto podría ayudar a comprender los mecanismos que causan esta aparente, y paradójica “compensación” del estado pro-oxidante en individuos con SD de edad más avanzada (adolescentes y adultos) [171]. Se ha demostrado que las células responden al estrés oxidativo mediante un incremento en la síntesis de GSH y tiorredoxina (TRX), además de la actividad SOD [172]. Estas investigaciones parecen contradictorias con los procesos reconocidos y relacionados con el envejecimiento, como son una pérdida progresiva de las defensas antioxidantes y el aumento del daño oxidativo relacionado con la edad que generan una acumulación de productos oxidados [171]. Parece probable que los individuos más jóvenes con SD experimentan un tipo de estrés oxidativo crónico, mientras que se hacen más resistentes mediante la activación de mecanismos de defensa que contrarrestan a lo largo de su vida [173].

Considerando que los recién nacidos con SD presentan niveles elevados de ROS, responsables de la patogénesis de muchas manifestaciones clínicas, el estrés oxidativo promueve la supervivencia de los fenotipos celulares más resistentes (Figura 6). Esta hipótesis se apoya en el aumento compensatorio de la tasa metabólica y en la activación de mecanismos de plasticidad en regiones cerebrales vulnerables en el SD producidos antes de la aparición de la demencia. Los genes, APP, DYRK1A, SOD1, y RCAN1, una vez sobreexpresados serían responsables de alteraciones neuronales y de los mecanismos compensatorios durante el envejecimiento [174].

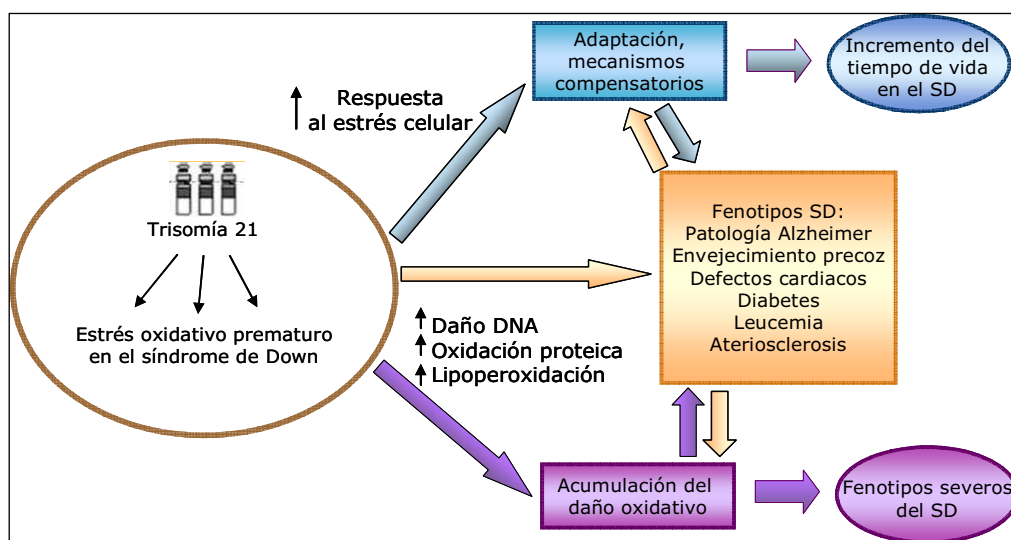


Figura 6. Presunta adaptación del síndrome de Down al estrés oxidativo. El estrés oxidativo se relaciona con la patogénesis y progresión del SD. La acumulación del daño oxidativo conduce a fenotipos severos, mientras que la inducción de mecanismos compensatorios en respuesta al estrés oxidativo crónico podría dar lugar a la “adaptación” y podría contribuir a mejorar la vida de los sujetos con SD. Figura adaptada procedente de la referencia [171].

3.1.1 Sobreexpresión del gen SOD1 en el síndrome de Down

Entre los genes del HSA21 se encuentra uno de los más importantes en la detoxificación de los ROS, el que codifica para la enzima antioxidante SOD1. Al producirse un exceso de ROS, las células pueden adaptarse, sufrir daño oxidativo e incluso morir mediante diferentes mecanismos, como apoptosis o necrosis [175]. En el caso del SD, la sobreexpresión del gen SOD1 puede generar estrés oxidativo [176] (Figura 7), que podría jugar un papel importante en la expresión clínica del SD. El estrés oxidativo se produce en el desarrollo embrionario en una gran variedad de tejidos y tipos celulares (Tabla 7), incrementándose significativamente con el envejecimiento [162, 171].

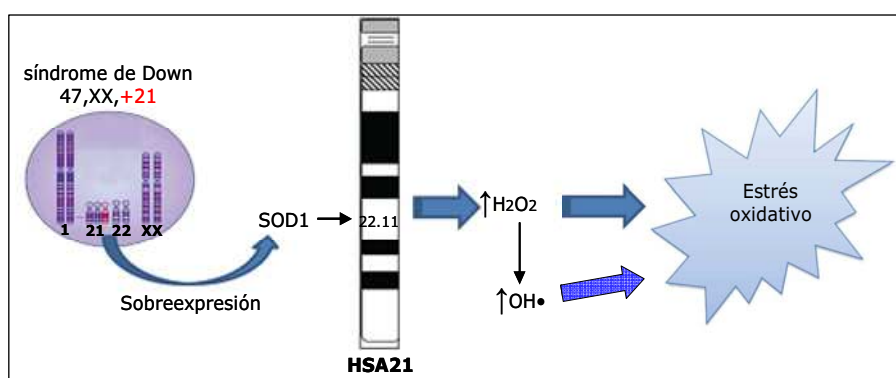


Figura 7. Sobreexpresión del gen SOD1 y síndrome de Down. Las condiciones incrementadas del estrés oxidativo están causadas por la sobreexpresión de algunos genes codificados en el HSA21. Algunos de estos, como el de la enzima antioxidante Cu/Zn-superoxido dismutasa (SOD1) pueden llevar directa o indirectamente al estrés oxidativo. Figura adaptada procedente de la referencia [171].

La enzima SOD1 está en la primera línea de defensa antioxidante que canaliza el flujo de generación de radicales libres de oxígeno hacia la formación de H_2O_2 , que en condiciones normales, será neutralizado por la acción de otras enzimas antioxidantes como la catalasa y la glutatión peroxidasa [177, 178]. La sobreexpresión de la SOD1 produce una alteración en la relación enzimática antioxidante: SOD y (GPx+CAT), originando un exceso de H_2O_2 a partir de los radicales $O_2^{\bullet-}$ y de formar otros radicales libres de oxígeno altamente reactivos. Uno de estos radicales formados es el radical OH^\bullet , el más reactivo, formado a través de la reacción de Fenton al interaccionar con metales de transición [179]. Este desequilibrio enzimático antioxidante se produce al existir un incremento aproximado de un 50% en los niveles de SOD1 en una gran variedad de tejidos (incluido el cerebro) y células, como eritrocitos, linfocitos T y B, y fibroblastos [180, 181].

Se produce un estado pro-oxidante en los tejidos y células de pacientes con SD al desequilibrarse la capacidad endógena antioxidante y como consecuencia, se produce un daño oxidativo a las biomoléculas, generando lesión celular [75, 164]. Sin

embargo, en células postmitóticas como neuronas, células musculares cardíacas y fibroblastos, se ha observado una capacidad adaptativa al aumentar otras enzimas antioxidantes como la CAT y la GPx, además de sistemas de reparación del DNA, importantes para la viabilidad celular [182, 183]. Se ha descrito la existencia de vías inducibles que reparan el DNA nuclear (nDNA); sin embargo, no se ha demostrado que las mitocondrias puedan generar una respuesta adaptativa frente al estrés oxidativo que proteja al DNA mitocondrial (mtDNA). Esta diferencia respecto al nDNA, puede deberse a los diferentes mecanismos de reparación del DNA presentes en ambos genomas [184] y puede contribuir si la actividad de la Mn-SOD (SOD2) no se incrementa en respuesta al estrés oxidativo [185].

3.1.2 Daño oxidativo a lípidos y a proteínas en el síndrome de Down

La sobreexpresión de la SOD1 si no está equilibrada con otros enzimas antioxidantes, puede incrementar las reacciones de los ROS con las biomoléculas. Un primer efecto sería la lipoperoxidación de los lípidos de las membranas celulares y otro sería el que afecta a la estructura y función de las proteínas al ser modificadas oxidativamente [57, 75]. El radical OH^\bullet generado a partir del exceso de H_2O_2 , es capaz de iniciar la lipoperoxidación al actuar sobre los PUFAs de las membranas celulares e incrementar el daño oxidativo a las proteínas por oxidación de sus grupos funcionales, produciendo cambios estructurales y funcionales, originando una pérdida o modificación de su actividad biológica y una alteración en la susceptibilidad a la degradación [186]. La SOD1 también puede actuar con una actividad peroxidasa generando radicales $\text{O}_2^{\bullet-}$ a partir del H_2O_2 , entre otros [187, 188]. El estrés oxidativo originado por el exceso de SOD1 puede ser causado por: 1) la disminución de radicales $\text{O}_2^{\bullet-}$, que inhiben la reacción de terminación del radical hidroperóxido lipídico y por lo tanto, aumenta su concentración; 2) una elevada concentración de H_2O_2 estimula la autooxidación de hidroquinonas, mientras que la falta del radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ inhibe la reacción de terminación del radical semiquinona; 3) el aumento de la concentración de H_2O_2 , que inhibe algunas enzimas antioxidantes y permite la producción del radicales OH^\bullet , especialmente en presencia de metales catalíticamente activos. Estos radicales dañan estructuras celulares, bases nitrogenadas, inducen uniones y rompen cadenas [189].

La asociación entre el estrés oxidativo y determinadas enfermedades es conocida [64-66], entre ellas el SD [164]. Los ROS tienen un efecto citotóxico a través de la lipoperoxidación, que es un proceso autocatalítico con consecuencias biológicas importantes como el daño oxidativo celular. La sensibilidad de las células a los radicales libres depende fundamentalmente del equilibrio en su capacidad endógena antioxidante SOD/(GPx+CAT). En células de individuos con SD, esta relación se

INTRODUCCIÓN

encuentra más elevada que en personas diploides y por tanto, son más sensibles a los RL. Sin embargo, las células con sobreexpresión de GPx y CAT están protegidas frente a los efectos de los RL. Para compensar el exceso de dosis génica de la SOD1, se incrementa la actividad GPx al acumularse niveles excesivos de H₂O₂. La actividad enzimática GPx es el principal mecanismo que contribuye a la eliminación de productos de la lipoperoxidación ya que cataliza la conversión de los hidroperóxidos en alcoholes [190, 191].

Como consecuencia del estrés oxidativo se desencadena la peroxidación lipídica, generándose aldehídos biológicamente activos implicados en procesos patológicos, los más destacados son el MDA y el 4-HNE. El MDA es el aldehído más abundante de la lipoperoxidación, considerado un biomarcador de estrés oxidativo al formarse por la fragmentación de los hidroperóxidos lipídicos [75, 85, 100]. Además, tiene una alta reactividad química y puede provocar otras alteraciones estructurales, celulares y funcionales. Los niveles de MDA en fluidos corporales (plasma y orina), en células (eritrocitos y neutrófilos) de individuos con SD están incrementados, indicando una tasa elevada de daño oxidativo a lípidos en estos individuos [192]. Además, el MDA está incrementado con la edad y por tanto, no sólo es un buen biomarcador de peroxidación lipídica sino que podría ser un buen biomarcador de envejecimiento. Este daño oxidativo podría estar determinado inicialmente por la sobreexpresión de la actividad SOD1 y/o disminución de las actividades de la GPx y CAT. Esto conduciría a una disminución de la capacidad endógena antioxidante, siendo importante en la patogénesis del SD [189, 193, 194].

Otro producto aldehídico de la lipoperoxidación es el 4-HNE, un aldehído que por su elevada toxicidad y capacidad para reaccionar con macromoléculas causa mayores efectos perjudiciales en las células. Se han observado niveles elevados del 4-HNE en cerebros de individuos con SD [195], aunque es un producto poco estable y continuamente se está eliminando o detoxificando por varias vías [196]. Además, puede ser metabolizado por varias enzimas como son la alcohol deshidrogenasa y la aldehído deshidrogenasa produciendo un aumento del ácido 4-nonenico y del 1,4-dihidroxinonenal [197]. Por otro lado, el 4-HNE puede reaccionar rápidamente con el glutatión, grupos tioles, DNA y otras biomoléculas [198]. Esto puede generar aductos proteicos a través de grupos sulfhidrilos (-SH) o aminos (-NH₂) de los aminoácidos proteinogénicos [199] o puede contribuir a la formación de grupos carbonilos de proteínas (GCP) [200].

Cuando los ROS atacan a las proteínas se forma una amplia variedad de productos tóxicos debido a la diferente naturaleza de los aminoácidos, ofreciendo una multitud de lugares de ataque [201]. El biomarcador de daño oxidativo de proteínas

más utilizado son los GCP, ya que se pueden originar en las proteínas mediante varias vías oxidativas. Los GCP tienen una mayor ventaja sobre los productos de la LPx (MDA) como biomarcador de estrés oxidativo, ya que las proteínas oxidadas son más estables durante un periodo de tiempo más largo [202].

Los ROS pueden inducir directa o indirectamente reacciones secundarias a través de subproductos de estrés oxidativo, originando varios tipos de modificaciones oxidativas en las proteínas. El ataque directo a proteínas se produce en residuos de Lys, Arg, Pro o Thr por medio de los ROS, aunque Cys y Met son particularmente propensos al ataque oxidativo por los ROS, la otra forma directa de ataque es por los sistemas de oxidación catalizados por metales, capaces de dañar el esqueleto proteico [203]. Las formas indirectas de oxidación proteica se produce por la unión covalente de algunos aldehídos formados durante la lipoperoxidación y productos como aldehídos y cetonas producidos en reacciones de reducción de azúcares (glicación) o de glicoxidación no enzimática de las proteínas [204]. Por ello, la presencia de GCP no indica necesariamente una oxidación directa de los residuos aminoacídicos y por tanto deben ser considerados como un biomarcador amplio de oxidación proteica, indicando un grado de estrés oxidativo más severo. La carbonilación de proteínas es un daño oxidativo irreversible que generalmente conduce a una pérdida de la actividad, termoestabilidad y expone aminoácidos hidrofóbicos en su superficie, causando la pérdida de la función catalítica o estructural de las proteínas afectadas, por tanto el aumento del nivel de proteínas modificadas oxidativamente se considera como un indicador generalizado no sólo de estrés oxidativo, sino también de enfermedad derivada de la disfunción de la proteína [205]. De hecho, el daño proteico o el incremento de los GCP provocado por el aumento de los ROS, indican la susceptibilidad particular de ciertas proteínas a modificaciones postraduccionales perjudiciales, siendo esta modificación un proceso no aleatorio y que probablemente esté implicado en las bases moleculares del envejecimiento, en enfermedades relacionadas con la edad y en enfermedades neurodegenerativas, ya que podría tener efectos perjudiciales en la función celular y en órganos [206].

En individuos con SD existen niveles significativamente elevados de GCP [192, 195, 207]. Mientras que las proteínas moderadamente carboniladas son degradadas por el proteosoma, las que están más carboniladas tienden a formar agregados de alto peso molecular siendo resistentes a la degradación y acumulándose como proteínas dañadas o desplegadas [208]. Tales agregados pueden actuar como pro-oxidantes produciendo un daño adicional [102], además de ser más resistentes a la degradación proteolítica y actuar como inhibidores de hidrolasas lisosomales. El propio proteosoma, responsable de la degradación de las proteínas oxidadas, es susceptible a la modificación oxidativa y a la inactivación [208-211]. Experimentos *in vitro* demuestran

que los RL y los productos de lipoperoxidación pueden inactivar al proteosoma durante el envejecimiento ya que pueden alterar las actividades proteolíticas, reaccionando con los componentes del sistema proteolítico celular [212]. Estudios realizados en el líquido amniótico de mujeres embarazadas de fetos con SD se ha encontrado un aumento del daño oxidativo a proteínas y lípidos, una reducción de los niveles del glutatión y de la tiorredoxina, generando un incremento del estrés oxidativo [167]. La oxidación de proteínas específicas y lipoperoxidación producen estrés oxidativo prematuro y podría estar relacionado con algunos rasgos característicos del SD, incluyendo el envejecimiento prematuro, la discapacidad cognitiva y también el elevado riesgo de cáncer e inmunodeficiencia [171, 213].

3.2 Disfunción mitocondrial en el síndrome de Down

El incremento de actividad de SOD1 en el SD, al no estar acompañada por una mayor actividad de la GPX y CAT, podría incrementar la producción de ROS en las mitocondrias de diversas células (fibroblastos, neuronas, células endoteliales, etc) de individuos con SD y modelos animales [171, 214]. El resultado es que las mitocondrias son menos eficientes con el tiempo, apareciendo lesiones, cambios estructurales y conformacionales en sus lípidos, en sus proteínas y, lo que es más grave, en el propio mtDNA. A diferencia del nDNA, el mtDNA carece de intrones y no se encuentra protegido por proteínas del tipo histonas y otras proteínas asociadas al DNA perdiendo mecanismos de reparación [215-217]. El mtDNA es más vulnerable al daño oxidativo, lo que termina por producir modificaciones oxidativas en las bases nitrogenadas, roturas en las cadenas de mtDNA y mutaciones o pérdida de bases en sus nucleótidos, y además, está menos sometido a la acción de procesos reparadores intrínsecos [115]. La presencia de estas mutaciones podría explicar la asociación del SD con el envejecimiento prematuro [159, 218-221].

Gran parte de las proteínas codificadas por el mtDNA pertenecen a la CTE y por tanto se produce un mal funcionamiento mitocondrial y disminución del rendimiento energético. De hecho, en fibroblastos dérmicos procedentes de fetos humanos con SD existe un déficit selectivo en la eficacia catalítica del complejo I (NADH deshidrogenasa) y del complejo V (ATP sintetasa), incrementando la generación de ROS mitocondriales, en particular el radical $O_2^{\bullet-}$ [222]. El ataque directo de los ROS a estas proteínas provoca lo que se conoce como un "círculo vicioso", ya que se produce un incremento en la producción de ROS. Por otra parte, el daño al nDNA puede provocar una disminución en la enzima antioxidante SOD2, ya que está codificada en genes nucleares, y la disminución de su actividad provocaría un exceso de radicales $O_2^{\bullet-}$ en las mitocondrias [223-225]. Esta situación produce disfunción mitocondrial, caracterizada por una disminución del potencial de membrana mitocondrial [$\Delta\Psi$ (m)],

de la producción de ATP y de la actividad enzimática [159]. Las células intentan compensar esta disminución en la respiración celular a través de la biogénesis mitocondrial, aumentando el número de moléculas de mtDNA y de mitocondrias. Al mismo tiempo, se produce un exceso de ROS al incrementarse el número de mitocondrias, provocando un aumento del estrés oxidativo y daño celular [226]. Por lo tanto, la disfunción mitocondrial está estrechamente unida al aumento del estrés oxidativo y al establecimiento de la senescencia celular, lo que contribuiría al envejecimiento prematuro (Figura 8) [227], que es un rasgo fenotípico del SD [214].

En dos modelos animales de ratón (Ts1Cje y Ts2Cje), se han identificado posibles proteínas diana susceptibles de ser modificadas por productos derivados de la lipoperoxidación, como son el 13-HPODE y 4-HNE. Las proteínas identificadas se pueden clasificar en tres categorías: las que participan en la generación de ATP, en la formación del citoesqueleto neuronal y los enzimas antioxidantes [228]. Al estar afectadas estas proteínas, se vería afectada la CTE con la consecuencia clara de una disminución en la producción de ATP y por tanto una deficiencia respiratoria celular.

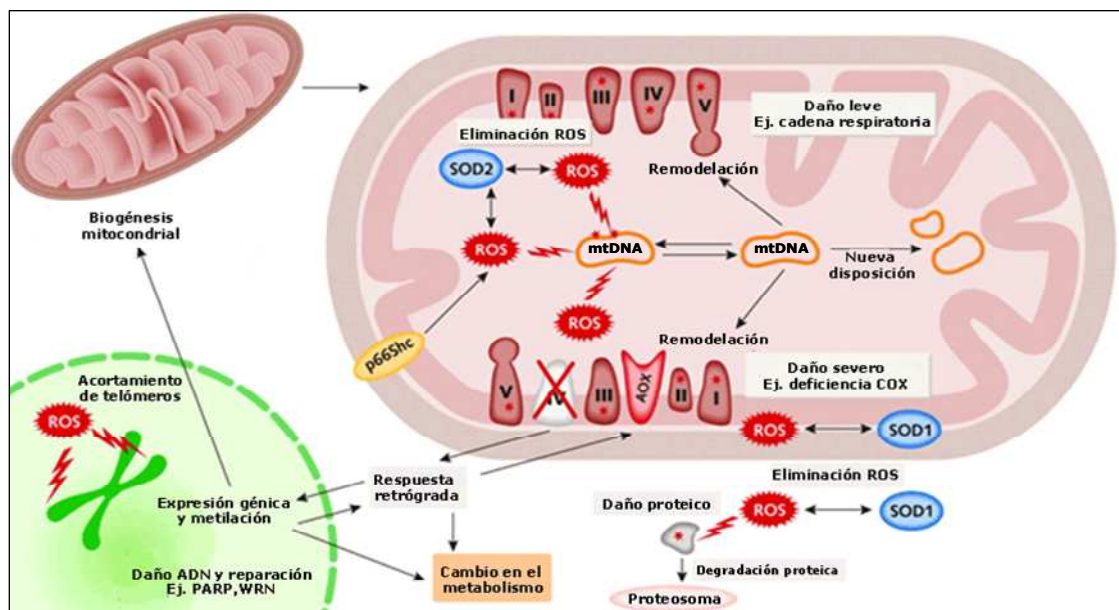


Figura 8. Eventos moleculares relacionados con el estrés oxidativo y la senescencia celular. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son capaces de dañar biomoléculas: lípidos, proteínas, mtDNA y nDNA. Estos eventos están relacionados con la biogénesis mitocondrial producido durante el envejecimiento biológico. Figura adaptada procedente de la referencia [227].

4. SENESCENCIA CELULAR

En el año 1961, Hayflick y Moorhead demostraron que los fibroblastos humanos en cultivo sufrían una parada permanente e irreversible del ciclo celular después de sucesivas divisiones celulares [229, 230]. Estos investigadores lanzaron la hipótesis de la existencia de factores celulares que se iban perdiendo en las sucesivas divisiones celulares, hecho que limitaba la proliferación de las células normales. Este punto donde las células dejan de proliferar se denominó "límite de Hayflick" [229] y fue la primera observación de la senescencia celular.

La senescencia celular se puede definir como la pérdida irreversible de la capacidad proliferativa de células que se mantienen en un estado metabólicamente activo necesario para su supervivencia. La senescencia se puede dividir en dos subtipos: la senescencia replicativa y la senescencia prematura inducida por estrés (Figura 9). La senescencia replicativa es consecuencia de la erosión o acortamiento de los telómeros causada por la repetida replicación del DNA en ausencia de telomerasa. La senescencia prematura inducida por estrés se activa de forma rápida en respuesta a diferentes tipos de estrés extrínseco como daño en el DNA, daño en la estructura de la cromatina, estrés oxidativo o sobreexpresión de oncoproteínas [231-235] (ver apartado 4.3.1 del capítulo 1).

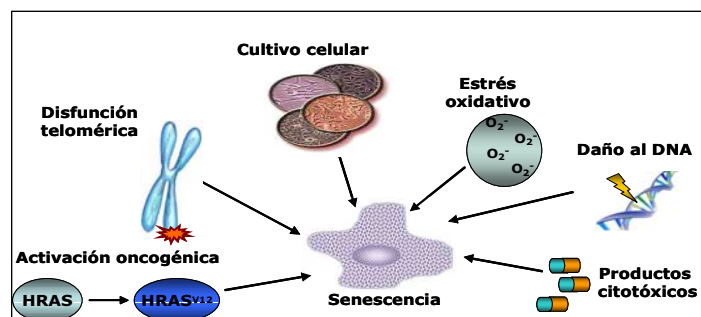


Figura 9. Múltiples factores inducen senescencia. Diferentes tipos de estrés pueden provocar la activación de la senescencia. La senescencia replicativa se activa como consecuencia de la disfunción de los telómeros, mientras que la senescencia prematura o inducida por estrés se activa como consecuencia de la activación oncogénica o por daño en el DNA, entre otros. Figura adaptada de la referencia [233].

La senescencia replicativa dependiente de telómeros contribuye de forma fundamental a la limitación de la proliferación de los fibroblastos humanos, ya que existe un acortamiento de los telómeros por falta de telomerasa, confiriendo una capacidad replicativa limitada en condiciones *in vitro* [234, 236]. Los fibroblastos humanos han desarrollado mecanismos de reparación de daño en el DNA muy eficientes y esto se puede interpretar como un potencial proliferativo de los fibroblastos humanos en cultivo celular *in vitro*, sin embargo, tanto la falta de

telomerasa como la evolución en la maquinaria de reparación de daño al DNA, hacen difícil la inmortalización *in vitro* de células humanas [237, 238].

Aunque inicialmente la senescencia se consideró como un efecto debido al mantenimiento en condiciones subóptimas de las células en cultivo, hoy día no hay duda de que la senescencia es un mecanismo celular que ocurre tanto *in vitro* como *in vivo* y se considera una barrera frente a la transformación celular, evitando la proliferación de células potencialmente cancerígenas [239]. Se ha demostrado que la senescencia está presente en etapas tempranas de células con un elevado estrés oxidativo [240-243]. De hecho, el proceso de estrés oxidativo requiere un exceso en la producción de ROS proveniente fundamentalmente de las mitocondrias. Los ROS generados en las mitocondrias no sólo causan daño oxidativo sino que pueden modular vías de señalización enzimático-genéticas implicadas en las respuestas al estrés oxidativo [223, 244-246]. En células provenientes de SD se ha observado un exceso de ROS, un aumento en la red mitocondrial, disfunción mitocondrial y una tasa reducida de proliferación [180, 223, 247-250]. Estos hallazgos apoyan la importancia del estrés oxidativo para desencadenar la senescencia prematura.

4.1 Regulación de la senescencia

Como hemos mencionado anteriormente, la senescencia es un mecanismo complejo activado por las células en respuesta a diferentes tipos de estrés. Esta respuesta celular tiene como finalidad detener la proliferación de células dañadas para evitar que el daño se propague. Aunque este mecanismo es complejo y existen muchas proteínas relacionadas con la senescencia, hoy día no hay ninguna duda de que en la gran mayoría de los casos, la senescencia se establece y se mantiene a través de dos principales vías de supresión tumoral, la vía de p53 y la vía de p16/RB (Figura 10). Estas dos vías pueden interactuar, pero también pueden detener el ciclo celular de forma independiente. Se ha propuesto que según el tipo de estrés se activaría una vía o la otra, e incluso se ha observado que existen diferencias entre especies y tipos celulares a la hora de activar la senescencia [232, 234, 235].

La vía de p53 se activa principalmente como respuesta al daño en el DNA (p.e. por estrés oxidativo o disfunción telomérica) por medio de p53, un factor supresor de tumores denominado "el guardián del genoma". La respuesta está mediada por varias quinasas, la ATM/ATR (*Ataxia Telangiectasia Mutated/Rad3-related*) y la CHK1/CHK2 (*Checkpoint kinase 1/2*), sin embargo, también se puede activar a través de ARF (p14ARF humano y p19ARF murino). ARF (*Alternative Reading Frame*) se codifica en el locus INK4a/ARF y su transcripción genera dos transcritos correspondientes a ARF y p16 (también denominada CDKN2a o p16INK4a) [251]. ARF incrementa la vida media

INTRODUCCIÓN

de p53 secuestrando a HDM2 (*Human Double Minute 2*) en el núcleo, ya que HDM2 es una E3 ubiquitín-ligasa que media la degradación de p53 (Figura 10).

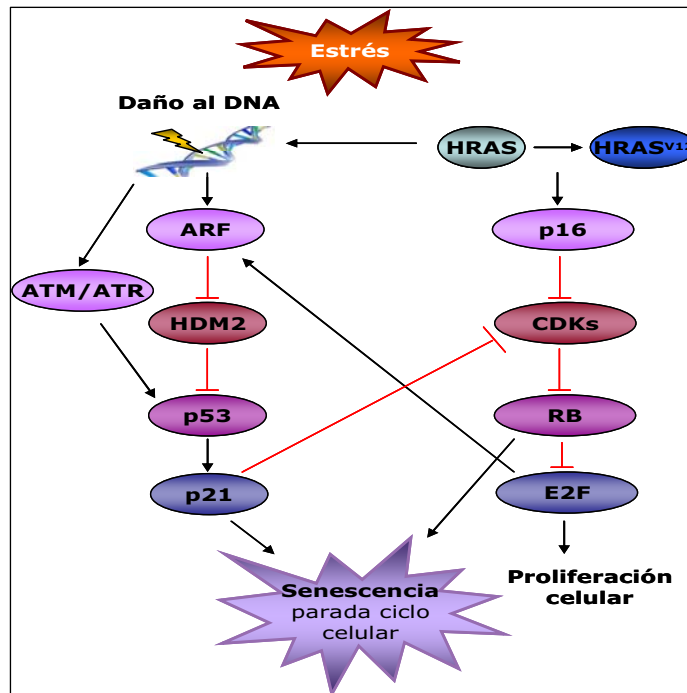


Figura 10. Control de la senescencia por las vías de p53 y p16/RB. Las señales inductoras de senescencia, incluyendo daño en el DNA o activación de oncogenes, activan la vía de p53 o la de p16/RB. Algunas señales como la activación de oncogenes pueden activar las dos vías. P53 se puede activar a través de ATM/ATR o a través de ARF. ARF activa a p53 por la inhibición de HDM2, que degrada a p53. Una vez activa, p53 induce senescencia a través de p21. Algunas señales de estrés producen la activación de p16. Tanto p16 como p21 inhiben los complejos Ciclina/CDKs impidiendo la fosforilación de RB (proteína del retinoblastoma). RB hipofosforilado suprime la actividad de E2F, factor de transcripción que regula la expresión de genes necesarios para la progresión del ciclo celular. E2F también puede disminuir la proliferación activando la expresión de ARF. Figura adaptada procedente de la referencia [232].

La activación de p53 tiene múltiples consecuencias en la expresión génica, quizás la más relevante es la activación transcripcional de p21 (también denominada CDKN1A, p21Cip1, Waf1 o SDI1), un inhibidor del complejo Ciclina E/CDK2 que provoca la parada del ciclo celular. Lo que determina si ésta parada es reversible o acaba induciendo senescencia continúa siendo una pregunta sin respuesta, aunque una posibilidad sería la severidad del daño causado. Una reparación rápida del DNA inhibiría la vía de señalización p53-p21, mientras que una reparación incorrecta, lenta o incompleta produce una señal que acabaría induciendo senescencia [232]. En algunas células en senescencia replicativa, se ha observado que la inactivación de p53 hace revertir la senescencia. Esta manipulación experimental causa la reanudación de la proliferación celular hasta que las células mueren debido a la inestabilidad genómica causada por la disfunción telomérica, fenómeno conocido como crisis mitótica [252]. Eso ha hecho que algunos autores hablen de senescencia mediada por p53 como senescencia reversible [232, 234].

4.2 Características de las células senescentes

Se consideran células senescentes cuando no se pueden dividir pero continúan siendo metabólicamente activas y presentan una serie de características que permiten su identificación. Estas características las diferencian de células que también se encuentran en un estado no proliferativo, como las células quiescentes y las células post-mitóticas. Las células quiescentes están en un estado latente reversible del cual pueden salir y comenzar a proliferar en respuesta a señales fisiológicas adecuadas. Las células post-mitóticas han perdido de forma permanente su capacidad de proliferar, usualmente debido a su diferenciación [232].

Las células mitóticas pueden entrar en senescencia al encontrarse expuestas a eventos potencialmente perjudiciales para el DNA. Cuando esto ocurre, las células dejan de proliferar de forma esencialmente irreversible (parada de crecimiento), frecuentemente se hacen resistentes a señales de muerte celular (resistencia a apoptosis), adquieren numerosas modificaciones en su expresión génica, con cambios importantes en la expresión de genes reguladores del ciclo celular (expresión génica alterada), aumenta el tamaño y presentan formas anchas e irregulares, así como un incremento de gránulos en el citoplasma (cambios morfológicos). Juntas, todas estas características forman el llamado fenotipo senescente [232].

4.2.1 Marcadores de senescencia celular

Los cambios morfológicos que experimentan las células senescentes fueron particularmente bien estudiados *in vitro* por Bayreuther et al., en 1988 [253] (Figura 11) y aunque son fácilmente observables en células en cultivo, no sucede lo mismo *in vivo*.

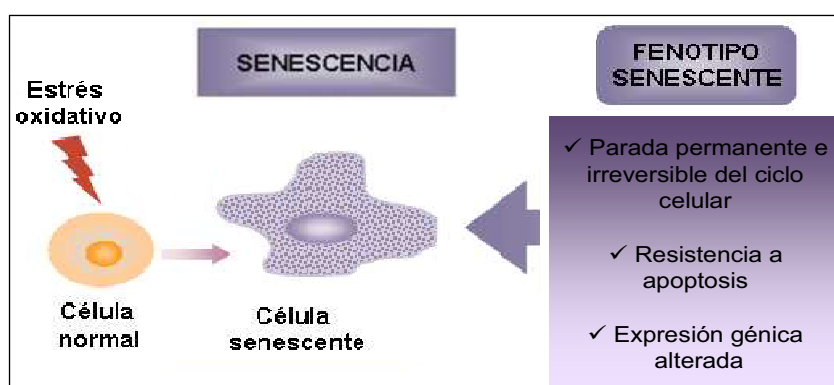


Figura 11. Fenotipo senescente inducido por estrés oxidativo. Cuando una célula normal está expuesta a un estímulo como el estrés oxidativo, entra en senescencia adquiriendo un fenotipo senescente determinado con unas características reconocibles *in vitro*. La célula deja de proliferar, adquiere una resistencia a la apoptosis y comienza a desarrollar una expresión génica alterada. Una característica esencial es el aumento la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal), incrementándose la biogénesis lisosomal.

Por ello, uno de los principales marcadores de senescencia es la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal, a pH 6 subóptimo), ya que se puede detectar en muchas células senescentes [254], tanto *in vitro* como *in vivo*. Se cree que esta actividad deriva de la enzima lisosomal β -galactosidasa (pH 4) y refleja un incremento en la biogénesis lisosomal, hecho que se produce de forma característica en las células senescentes [255], pero no de forma exclusiva. Esta falta de especificidad la encontramos también en otros marcadores de senescencia como por ejemplo la disminución o ausencia de replicación del DNA o la expresión de proteínas relacionadas con las vías de señalización que inducen senescencia (como p21, p53, p16 y ARF) [232, 233]. En ausencia de replicación del DNA es imposible diferenciar entre células senescentes, quiescentes o diferenciadas; mientras que en la expresión proteica de p21, p52, p16 y ARF nos encontramos con el problema de que dichas rutas no son específicas de senescencia, sino que intervienen en otros muchos procesos celulares. Así pues, actualmente no existe un único marcador específico de senescencia, por lo que para determinar la presencia de células senescentes tanto *in vitro* como *in vivo* se utiliza una combinación de varios de los marcadores mencionados.

4.2.2 Resistencia a la apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada es una respuesta frente al estrés y al daño celular, considerándose, como la senescencia, un mecanismo importante supresor tumoral. Mientras que la senescencia evita la proliferación de células dañadas, la apoptosis las elimina. La disfunción mitocondrial no sólo es capaz de inducir senescencia celular sino que es capaz de inducir muerte celular por medio de apoptosis. En neuronas, astrocitos y fibroblastos de fetos con SD se ha observado un incremento en la producción de ROS mitocondriales acompañada con un descenso tanto en la actividad redox mitocondrial como en el $\Delta\Psi$ mitocondrial provocando muerte celular por apoptosis [256].

Muchos tipos celulares adquieren resistencia a ciertas señales apoptóticas cuando se vuelven senescentes. Por ejemplo, fibroblastos humanos senescentes son resistentes a la apoptosis inducida por privación de factores de crecimiento o estrés oxidativo, pero son sensibles a las señales apoptóticas inducidas por Fas L [257, 258]. Esta resistencia a la apoptosis puede ser debida en parte a cambios en la expresión de proteínas pro o antiapoptóticas [259].

Tanto la apoptosis como la senescencia celular comparten un efector común, p53, que parece ser importante en esta resistencia a la apoptosis. Aunque aún no está claro lo que determina que una célula active una respuesta u otra, parece ser que depende de la naturaleza e intensidad de la señal de factores importantes así como

del tipo celular [260]. En fibroblastos humanos senescentes se ha observado que p53 se encuentra reclutado preferentemente en promotores de genes relacionados con parada del ciclo celular (p21 y GADD45) en lugar de encontrarse en promotores de genes reguladores de apoptosis [261].

4.3 Inductores de senescencia

Aunque son muchos los tipos de estrés que pueden inducir senescencia, casi todos ellos se pueden englobar en los dos tipos de senescencia mejor estudiados: senescencia inducida por daño en el DNA (p.e. daño por los RL) y senescencia inducida por activación de oncogenes.

4.3.1 Senescencia inducida por los radicales libres

Existen varias teorías que intentan explicar el proceso de envejecimiento [262]. En 1956, el Dr. Harman fue el primero en proponer la conexión entre el estrés oxidativo y el envejecimiento a través de su reconocida "*Teoría del envejecimiento asociado a radicales libres*" (FRTA) [67]. Sin embargo, esta teoría del envejecimiento no fue tomada en consideración hasta el descubrimiento de la enzima SOD en 1969 por McCord y Fridovich [263]. Esta hipótesis fue reformulada 16 años más tarde como la "*Teoría del envejecimiento asociado a radicales libres mitocondriales*" [264] y refinada en 1980 por Miquel, J. et al., ya que la mitocondria es la fuente principal y diana de los ROS, por lo que hay una fuerte conexión entre ambas teorías [265]. Miquel et al., afirmaron que los radicales libres producidos en las mitocondrias atacan al genoma mitocondrial (mtDNA) provocando su inestabilidad. El mtDNA codifica varias proteínas hidrofóbicas de la membrana mitocondrial interna, y los daños oxidativos sobre estructuras mitocondriales (principalmente al mtDNA) originan un déficit en la fosforilación oxidativa y una disminución de la capacidad de replicación mitocondrial que podrían estar implicados en el proceso de envejecimiento [266-269].

Harman postuló que: "el envejecimiento es una consecuencia de la acumulación de cambios moleculares que tienen lugar en el organismo, y que estarían causados por radicales libres". En este sentido los cambios originados por dichos radicales serían una causa importante de senescencia celular al deteriorar estructural y funcionalmente las diferentes biomoléculas. Harman se apoyó en la convergencia de varias líneas de investigación para enunciar su hipótesis: i) evidencias de la producción de los RL *in vivo*; ii) los RL causan graves daños a las biomoléculas *in vitro*, especialmente a los lípidos; iii) y los efectos nocivos de la exposición a la irradiación y a la hiperoxia mejoran al administrar antioxidantes [67]. Los ROS, además de ser potencialmente tóxicos, son considerados como moléculas fisiológicamente costosas debido a la necesidad de mantener una red de defensas

antioxidantes bastante elaborada [240]. De hecho, la existencia de tales defensas se tomó como una evidencia de la toxicidad inherente a los ROS. En consecuencia, la utilización del O₂ por organismos aerobios fue considerado como una necesidad vital para su supervivencia y potencialmente perjudicial: un fenómeno que se conoce como la "paradoja del oxígeno" [270].

Poco a poco, la FRTA se modificó y finalmente se fusionó con la "hipótesis del estrés oxidativo" [55-57]. El proceso de envejecimiento puede ser definido como el "daño estructural basado en la hipótesis del estrés oxidativo". Esta hipótesis explica como la brecha entre los pro- y antioxidantes, se ensancha progresivamente durante el envejecimiento debido a un aumento en la tasa de generación de ROS y/o a una disminución en las defensas antioxidantes, lo que conduce a un aumento acelerado de los daños biomoleculares y las pérdidas en las funciones fisiológicas [240].

En las dos últimas décadas, se ha producido un cambio fundamental sobre el papel de los ROS en la fisiología celular. Se han mostrado a los ROS como tóxicos por causar daño oxidativo en las biomoléculas, según la hipótesis del envejecimiento, sin embargo hay otros puntos de vista, que sin modificar esta hipótesis, consideran los ROS esenciales para la supervivencia celular. En condiciones fisiológicas, los ROS tienen un papel regulador en una amplia gama de funciones, ya que actúan como segundos mensajeros. Estas vías incluyen regulación de genes, señalización celular, diferenciación celular, senescencia celular y apoptosis, entre otros. De hecho, tienen dianas específicas activando o inhibiendo diferentes enzimas como proteín-quinasas, MAPK-quinasas, fosfatasa, citoquinas, factores de transcripción y de crecimiento, cascadas dependientes de genes, etc, por medio de la oxidación/reducción de grupos sulfhidrilos de cisteínas, provocando efectos de señalización reversibles. Bajo ciertas condiciones, como la sobreproducción de ROS, se puede alterar la regulación de la señalización por parte de estos y podría llevar a la activación de vías de señalización peligrosas y al incremento de varias patologías, así como a la senescencia celular prematura y su deriva en el envejecimiento [241, 244].

Hoy en día, los ROS han generado un gran interés de estudio ya que están involucrados en el proceso de senescencia celular: los niveles elevados de ROS están asociados a la senescencia replicativa acortando los telómeros y la senescencia inducida por estrés, dañando directamente el DNA e induciendo una respuesta al DNA dañado (RDD) [232, 240]. Las mitocondrias son la mayor fuente de producción de ROS, y este aumento conduce al daño del DNA y a la RDD, formando un bucle de retroalimentación positiva que inicia la senescencia [245, 271]. Antes de iniciar la senescencia, las células incrementan la red mitocondrial, el número de moléculas de mtDNA y la producción mitocondrial de radicales O₂^{•-}. Con el tiempo, estos cambios

mitocondriales evolucionan hacia una disfunción mitocondrial grave que se caracteriza por un aumento adicional de la producción de ROS, disminución del potencial de la membrana mitocondrial, disminución de ATP, y activación de AMPK (Figura 12). Tanto el incremento de la red mitocondrial como el de ROS, parece ser dependiente de la vía de p53, que activa a uno de los mecanismos efectores de la senescencia, la disfunción mitocondrial [272]. Así pues, la RDD es el inicio de la senescencia celular independientemente de cómo esté provocada y es capaz de originar una disfunción mitocondrial como una consecuencia tardía [273-275].

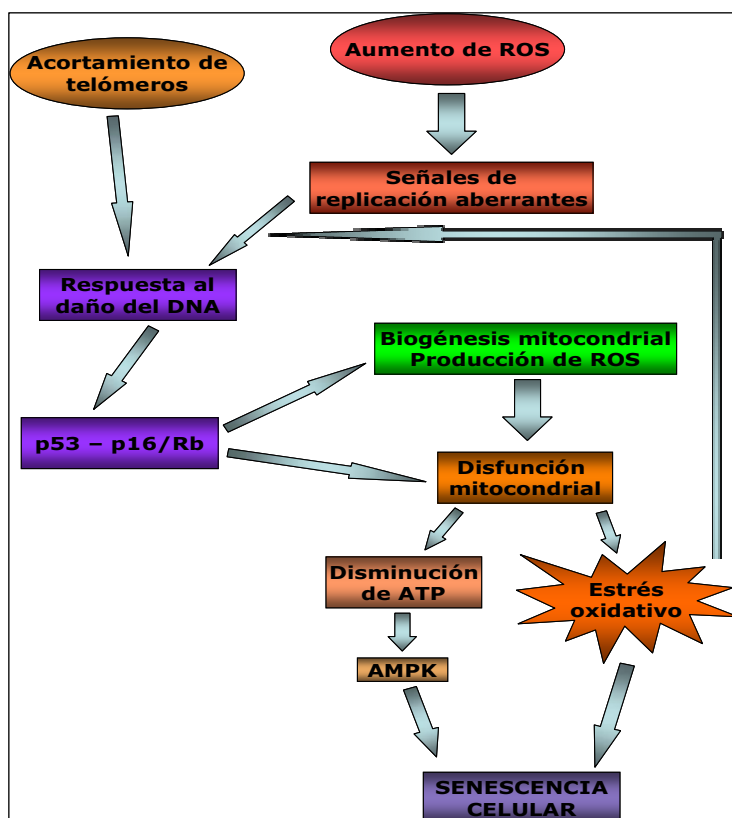


Figura 12. La disfunción mitocondrial como un mecanismo efector de la senescencia celular. El aumento de los ROS provocan un aumento de la biogénesis mitocondrial y disfunción mitocondrial a través del daño al DNA y activación de las vías p53 y retinoblastoma. La actividad de estos factores de transcripción convergen en la mitocondria para inducir senescencia, caracterizada por un aumento del estrés oxidativo. Los efectos de la disfunción mitocondrial pueden activar y mantener las vías de p53 y retinoblastoma, generando una retroalimentación positiva que contribuye al estado de senescencia celular. Figura adaptada procedente de la referencia [272].

La disfunción mitocondrial conduce a una elevada producción de ROS, siendo ambos causa-efecto de una continua RDD y originando una amplia gama de cambios como resultado de la señalización a través de varios factores de transcripción, como p53 y p21, necesarios para la senescencia celular [246]. Los ROS contribuyen de manera estocástica al mantenimiento a largo plazo de los daños producidos en el DNA,

generando un bucle de retroalimentación estable y auto-sostenible (Figura 12). Durante la fase de establecimiento de la senescencia, el bucle es necesario y suficiente para mantener la parada celular en respuesta al daño del DNA [245] e incluso persiste en la senescencia irreversible, tanto *in vivo* como en *in vitro*.

4.4 Senescencia celular en el síndrome de Down

La hipótesis de Harman propone que los RL producen daño oxidativo a las biomoléculas, acumulándose y originando daños irreversibles celulares que derivan en el envejecimiento. Una pregunta importante es si la actividad elevada de la SOD es un factor determinante en la producción de RL en el SD y cuál es el impacto de otras enzimas antioxidantes como la GPx y la CAT en la eliminación de estos RL.


En individuos con SD podría producirse un estado pro-oxidante al existir una sobreexpresión de la SOD1 en un 50% [276], no acompañada de un incremento de las enzimas antioxidantes GPx y CAT. Este desequilibrio genera un exceso de ROS que actúa produciendo daño oxidativo a los lípidos, proteínas y DNA [164]. Además, dichos individuos muestran de forma prematura varios marcadores asociados al envejecimiento, incluyendo la acumulación del daño al DNA (mitocondrial y nuclear), acumulación mutaciones y mayor sensibilidad a mutágenos cromosómicos. Estos fenotipos sugieren un defecto en la reparación del DNA en el SD, lo que no es sorprendente, ya que casi todos los síndromes progeroides se caracterizan por defectos de reparación del DNA [166]. El estrés oxidativo en el SD depende del aumento de los ROS debido a un patrón anormal de expresión asociado con la trisomía del HSA21 (Tabla 6), principalmente debido a la sobreexpresión de la SOD1 [277]. Por todo lo anteriormente expuesto, se puede pensar que la sobreproducción de ROS podría estar relacionado con el envejecimiento prematuro en el SD al causar daño oxidativo a las biomoléculas [180].

El incremento de ROS en individuos con SD también se debe a un mal funcionamiento de las mitocondrias, o lo que es lo mismo, a una disfunción mitocondrial [168, 214]. De hecho, uno de los principales ROS producidos en las mitocondrias es el radical $O_2^{\cdot-}$ [278, 279]. El resultado es que las mitocondrias son menos eficientes con el tiempo, ya que parecen lesiones o cambios conformacionales en sus lípidos, en sus proteínas y, lo que es más grave, en el propio mtDNA. Las lesiones producidas a las proteínas de la membrana mitocondrial interna, originan una alteración en la eficiencia de la CTE y, consecuentemente, en el metabolismo oxidativo. Las lesiones producidas al mtDNA provocan cambios más radicales, como la traducción errónea de proteínas de la CTE que pueden aumentar la producción de ROS entrando en un "círculo vicioso" y una disminución en la capacidad de replicación

mitocondrial. Por tanto, las mutaciones en el mtDNA tienen un papel en la patogénesis e incluso en la etiología del SD, y podrían explicar la asociación del SD con el envejecimiento prematuro [218]. Todos estos cambios mitocondriales conducen a un mecanismo efector involucrado en la senescencia celular prematura en el SD, la disfunción mitocondrial.

En varios tipos celulares de individuos con SD (neuronas, fibroblastos, macrófagos, entre otros), se observa que aumentan los ROS (3 o 4 veces mayor que en células no trisómicas) [159, 160, 278], debido al desequilibrio en los mecanismos enzimáticos de defensa antioxidante [68, 180, 249]. Este desequilibrio genera un exceso de H_2O_2 , molécula relativamente estable, capaz de generar otros ROS y atravesar fácilmente las membranas celulares teniendo acceso a todos los orgánulos y dominios hidrofílicos celulares [240, 245]. Se produce un aumento en el daño oxidativo a biomoléculas y muy especialmente en las mitocondrias [280]. Esto contribuye al establecimiento y mantenimiento de un estado senescente prematuro mediante un bucle de retroalimentación positiva [68, 224, 241, 246]. Más aún, la adición al medio de cultivo de productos antioxidantes contrarresta parcialmente el incremento de ROS esos en las células del SD y disminuyen la entrada en senescencia celular [160].

La senescencia celular también se ha estudiado utilizando varios modelos de ratón, el más utilizado es el Ts65Dn. Las células de este ratón tienen una similaridad genética y fenotípica con las células humanas con trisomía 21. Los fibroblastos dérmicos de ratones Ts65Dn recién nacidos, presentan una baja proliferación celular y un reducido número de células capaces de dividirse *in vitro*, es decir, la tasa de crecimiento respecto a fibroblastos dérmicos control se encuentra reducida. Esta discapacidad en la proliferación de los fibroblastos Ts65Dn viene acompañada de unas características morfológicas y bioquímicas propias del estado senescente: morfología irregular (poliédrica) con aumento de tamaño y la aparición temprana de la actividad SA- β -gal. Estas características junto con la reducida tasa de crecimiento demuestran que los fibroblastos dérmicos Ts65Dn entran en estado de senescencia prematuramente [281, 282]. En fibroblastos dérmicos de ratón (no trisómicos) con senescencia celular prematura existe un incremento en la producción de ROS mitocondriales. Esto compromete la función mitocondrial a través de la inactivación de centros Fe-S en determinadas proteínas de la CTE (complejos I, III y V), o por medio de la LPx de la cardiolipina que es un fosfolípido necesario para el funcionamiento normal de la CTE. Además, se ha observado un incremento en la red mitocondrial para compensar la disfunción mitocondrial en respuesta al estrés oxidativo y a la senescencia celular prematura [281].

A microscopic image showing plant cells with prominent cell walls. Several cells contain bright orange chloroplasts. The background is dark, making the cells and chloroplasts stand out.

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

En este estudio partimos de la hipótesis de que los fibroblastos con trisomía del cromosoma 21 (HSA21) procedentes de fetos humanos, debido a un efecto de dosis génica, pueden tener una mayor expresión y actividad de la SOD1, lo que podría producir un desequilibrio en el sistema antioxidante enzimático. Este desequilibrio implicaría una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), causando daño oxidativo molecular, que podría estar asociado con la senescencia celular prematura.

Los objetivos concretos son:

1. Valorar la producción intracelular de ROS en fibroblastos con trisomía 21 (FT21) y la susceptibilidad a dos agentes pro-oxidantes generadores de radicales libres (AAPH y t-BHP). Evaluar el grado de estrés oxidativo durante el proceso de replicación celular *in vitro* a pases bajos (3-7) y a pases altos (8-12).
2. Cuantificar los niveles intracelulares de ATP para evaluar la función mitocondrial durante el proceso de senescencia replicativa *in vitro*. Determinar la expresión proteica de los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones y de la enzima antioxidante mitocondrial SOD2.
3. Cuantificar la expresión y la actividad de las enzimas antioxidantes (SOD1, SOD2, GPx y CAT) para analizar si existe un desequilibrio en el sistema antioxidante enzimático en los fibroblastos FT21 y en fibroblastos diploides y los posibles cambios durante el proceso de senescencia replicativa *in vitro*.
4. Estudiar si existe daño oxidativo molecular a través de marcadores de oxidación de lípidos (MDA) y proteínas (GCP) en los fibroblastos con trisomía 21, y si se acentúa durante el proceso de senescencia replicativa *in vitro*.
5. Analizar la expresión proteica de p21, p53, citocromo C y caspasa 9 activada, así como la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal) y las actividades enzimáticas lisosomales β -galactosidasa y β -glucuronidasa, para determinar en qué momento del proceso de replicación celular *in vitro* aparecen signos de senescencia en los fibroblastos FT21.



CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

1. OBTENCIÓN DE FIBROBLASTOS PRIMARIOS

Para realizar este trabajo se utilizaron 18 muestras de fibroblastos primarios humanos, de los cuales, 9 son fibroblastos con trisomía 21 (FT21) Y 9 son fibroblastos control (FC), procedentes de biopsias de piel abdominal de 18 fetos humanos que se obtuvieron de abortos legales, de los cuales 9 eran fetos con trisomía del cromosoma 21 (HSA21) y 9 eran fetos controles. Los fetos fueron recogidos con el consentimiento informado del padre y de la madre dentro de las 12 horas *post-mortem* por medio del Banco del Tejido Fetal perteneciente al Hospital Universitario Vall d'Hebron (fetaltissuepath@vhebron.net). Las características de los fetos están esquematizadas en la siguiente tabla:

Tabla 8. Características de los fetos con trisomía del cromosoma 21 (HSA21) y control.

Cariotipo	Edad Gestacional	Diagnóstico
46 XX	22 semanas	Malformación cardíaca compleja.
46 XY	22 semanas	Anhidramnios con ruptura previa de membranas y la ausencia de anomalías congénitas.
46 XX	14 semanas	Encefalocele occipital.
46 XY	16 semanas	Oligoamnios, ruptura previa membrana
46 XX	9 semanas	Cardiopatía.
46 XY	14 semanas	Encefalocele.
46 XX	14 semanas	Cardiopatía.
46 XX	18 semanas	Linfoma materno.
46 XY	19 semanas	Malformación cardíaca compleja.
47 XY 21	20 semanas	Síndrome de Down.
47 XY 21	16 semanas	Síndrome de Down.
47 XY 21 t(21, 21)	22 semanas	Síndrome de Down.
47 XX 21	15 semanas	Síndrome de Down.
47 XY 21	15 semanas	Síndrome de Down.
47 XX 21	16 semanas	Síndrome de Down.
47 XY 21	18 semanas	Síndrome de Down.
47 XY 21	14 semanas	Síndrome de Down.
47 XX 21	18 semanas	Síndrome de Down.

2. MANTENIMIENTO DE CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS

Los fibroblastos primarios procedentes de fetos humanos se cultivaron en cajas de cultivo de 25 cm² (Ref. 3289, Corning Incorporated, MA, USA) en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium* con 4.5 g/l de Glucosa y 30 mg/l L-Glutamina; Cambrex, Belviers, Bélgica) suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS) (Labclínics, España), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y HEPES 10 mM (Cambrex, Belviers, Bélgica). Todas las cajas de cultivo fueron mantenidas en una estufa a 37°C con el CO₂ al 5% y un 85% de humedad, los cultivos se realizaron en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar vertical. Al llegar a la confluencia, las células fueron lavadas con un tampón fosfato-salino (Dulbecco's PBS sin Ca/Mg; pH 7.4; 1.47 mM KH₂PO₄, 9.58 mM Na₂HPO₄, 136.99 mM NaCl, 2.68 mM KCl, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), tripsinizadas (0,25% tripsina en PBS; BD, Madrid, España) y resuspendidas en 1 mL de DMEM con 10% de FBS.

A continuación se realizaron tres alícuotas celulares de cada caja de cultivo, de las cuales, una alícuota se llevó a una caja de cultivo de 75 cm² (Ref. 430641, Corning Incorporated, MA, USA) para realizar los experimentos a pases bajos (PB, 3-7) y pases altos (PA, 8-12), el resto de alícuotas se centrifugaron a 1500 r.p.m./4°C/5 minutos para sustituir el medio por 1 mL de DMEM con dimetilsulfóxido al 10% (DMSO; D8418, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) y congelándose 24 horas a -80°C, después se pasaron a nitrógeno líquido con una temperatura de -180°C.

Cada tripsinización o pase, se lleva cabo con una frecuencia media de entre 5-7 días. Debido al proceso de senescencia replicativa que sufren las células, la capacidad proliferativa disminuye con el número de pases, por lo que se fijó el duodécimo pase como límite para su utilización. Para la sustitución de fibroblastos primarios en la estufa, se descongelan las alícuotas en un baño termostatzado a 37°C/10 minutos, se llevan a una caja de 75 cm² y se le añaden 10 mL de medio de cultivo fresco, al día siguiente se sustituye el medio de cultivo para eliminar los restos de DMSO.

3. TRATAMIENTOS CON PRO-OXIDANTES EN LOS FIBROBLASTOS PRIMARIOS

Para valorar la viabilidad celular, generación de ROS, contenido intracelular de ATP y radical O₂^{•-} mitocondrial, las células FT21 y FC se sometieron a dos tratamientos pro-oxidantes diferentes. Uno de los tratamientos pro-oxidantes se realizó con el 2,2'-azo-bis(2-amidino-propano) dihidrocloruro (AAPH 10 mM; 440914-100G, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), el otro se llevó a cabo con el ter-butil hidroperóxido (t-BHP 100 µM; 416665-25mL, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). Paralelamente se utilizaban condiciones basales en ambos tipos de células (no tratadas) con un tampón salino de Hank (HBSS; H1387-10x1L, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA).

El AAPH es un compuesto azoderivado, compuesto azoico o azocompuesto soluble en agua que se utiliza ampliamente para generar RL. Un *grupo azo* es un grupo funcional del tipo R-N=N-R', en donde R y R' son grupos que contienen átomos de carbono, y los átomos de nitrógeno están unidos por un enlace doble. La descomposición termodinámica y/o por irradiación del AAPH produce nitrógeno molecular (N₂) y 2 radicales de carbono o grupos funcionales alquilos (alifáticos, R y R') (Figura 13) sin participación de enzimas ni biotransformaciones, y la tasa y el lugar de generación de radicales es fácilmente medido y controlado. Los radicales de carbono pueden combinarse para producir productos estables o reaccionar con el O₂ para dar radicales alcoxilo (RO[•]) y peroxilo (ROO[•]). La vida media del AAPH es de aproximadamente 175 horas (37 °C; pH 7), haciendo que la tasa de generación de RL esencialmente constante durante las primeras horas en solución [283, 284].

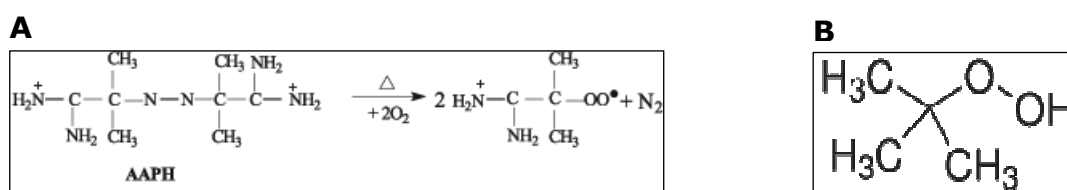


Figura 13. (A) AAPH 2,2'-azo-bis(2-amidino-propano) dihidrocloruro se somete a termolisis, generando nitrógeno (N₂) y dos radicales alquilo (basados en el carbono), los cuales reaccionan con el O₂ para dar radicales alcoxilo (RO[•]) y peroxilo (ROO[•]). (B) Estructura química del tert-butil hidroperóxido. Figuras adaptadas procedentes de las referencias [283, 285].

El tert-butil hidroperóxido (t-BHP) es un peróxido orgánico que contiene un grupo funcional peróxido (R-O-O-R') capaz de originar dos radicales centrados en el oxígeno. Si el R' es un hidrógeno, el compuesto se denomina hidroperóxido, al cual se le une un grupo alquilo, el tert-butil, que es un grupo derivado del butano al cual se le ha eliminado un H en un C terciario (Figura 13). Los radicales oxilo son bastante inestables y se cree que son transformados a otros radicales relativamente más estables como los centrados en el carbono. El t-BHP se utiliza como generador de radicales alcoxilos y peroxilos, es decir, es un agente oxidante capaz de inducir estrés oxidativo porque inicia la LPx de las membranas celulares y la oxidación de las proteínas originando GCP. Por otro lado, se ha observado como el t-BHP produce una disminución en las actividades de las enzimas antioxidantes (SOD, GPx, CAT, GR) y en los niveles de GSH aumentando el GSSG [285].

Después de la tripsinización y conteo de las células, se sembraron en placas de 96 pocillos manteniéndose en la estufa 1 día. El día del experimento, se lavaron dos veces con HBSS y se añadieron los tratamientos pro-oxidantes AAPH 10 mM en HBSS (células tratadas con AAPH), t-BHP 100 μM en HBSS (células tratadas con t-BHP) y las condiciones basales con HBSS (células no tratadas) en el momento en que lo indicaba

el protocolo, incubándose durante 1 hora a 37°C, 5% de CO₂ y un 85% de humedad. Posteriormente, se lavaron 2 veces con HBSS para la determinación correspondiente.

4. DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD CELULAR (XTT)

Para determinar las concentraciones idóneas de los diferentes tratamientos pro-oxidantes causando una inducción máxima en la producción de ROS y una mínima citotoxicidad, se realizaron experimentos de citotoxicidad celular en las células FT21 y FC por medio del kit del XTT (Ref. 11465015001, Roche Pharma S.A., Madrid, España). La sal de tetrazolio XTT amarilla se escinde a formazán naranja por un mecanismo celular complejo que es cuantificado por espectofotometría. Esta biorreducción ocurre solamente en las células viables y está correlacionada directamente con la producción de NADPH mitocondrial por parte de las deshidrogenasas mitocondriales en las células metabólicamente activas en el cultivo. Para la determinación de la citotoxicidad celular (XTT), las cajas de células se lavaron dos veces con PBS, se tripsinizaron (tripsina 0,25%) durante 10 minutos y se recogieron las células para ser centrifugadas a 1500 r.p.m./4°C/5 minutos, eliminando el medio de cultivo con restos de tripsina. A continuación se añadieron 5 mL de medio fresco realizándose el conteo de células en la cámara de Neubauer (Ref. 12028111, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) para sembrar las células en placas de poliestireno transparentes de 96 pocillos de fondo claro (Ref. 3596, Corning Incorporated, MA, USA) a una concentración de 5×10^3 células por pocillo.

A continuación se añadieron los tratamientos pro-oxidantes según el apartado 3 del capítulo 3. Posteriormente se volvió a lavar dos veces con HBSS para eliminar los pro-oxidantes y se añadió 100 µL de HBSS y 50 µL de la mezcla de reacción [120 µL del reactivo acoplador de electrones (sal de tetrazolio XTT amarilla) + 6 mL de agente marcador] a cada pocillo. Las placas se incubaron a 37 °C, 5% CO₂ y 85% de humedad durante 4 horas obteniendo un color naranja en el medio, a continuación se leyó en un espectofotómetro de microplacas (UVM 340, OASYS, Biochrom, Holliston, MA, USA), con el programa Digiread y a una absorbancia de 460 nm con un filtro de referencia de 680 nm. Se tomó como el 100% de la viabilidad celular las células FT21 y FC no tratadas, es decir, en condiciones basales (HBSS). Posteriormente, para la determinación de la cantidad de proteínas se vació el medio color naranja de la placa de 96 pocillos, le lavó dos veces con HBSS y se añadió a cada pocillo 50 µL de NaOH 0,25 N (Ref. S8045-500G, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) para la lisis de las células y calcular las proteínas por el método de Coomassie (Bradford) Protein Assay (Ref.23200; Thermo Scientific Pierce Protein Biology Products, Rockford, IL, USA). Este experimento se realizó tres veces por triplicado para cada tipo celular y tratamiento, y en cada pase celular.

5. MEDICIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

La DCFH-DA (5-(γ -6) clorometil 2',7'-diclorofluoresceína diacetato; [DCFH-DA; Ref. C-6827, 20 eppendorf con 50 μ g/eppendorf, MW=577.8 g/mol, Molecular Probes, Life Technologies S.A., Alcobendas, España]) es la sonda fluorescente más popular, frecuentemente usada para detectar peróxidos celulares y otros ROS. La DCFH-DA entra en las células acumulándose principalmente en el citosol, al entrar, es desacetilada por esterasas para originar 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH). Este es un producto no fluorescente y es convertido en 2',7'-diclorofluoresceína (DCF⁻) por los ROS, siendo fácilmente visualizado por fluorescencia a 525 nm al ser excitada la sonda a 488 nm. Aunque la DCFH-DA puede detectar los peróxidos celulares eficientemente si son descompuestos a radicales peroxilo, por ejemplo por medio de metales de transición, también detecta radicales alcoxilo, NO^{*}₂ y OH^{*}, así como peroxinitritos con gran eficiencia. En menor medida detecta el radical O^{*}₂ y no radicales H₂O₂ y ¹O₂. Por tanto, la fluorescencia emitida por la DCF⁻ es un ensayo generalizado del estrés oxidativo para detectar los ROS en general y ninguno en particular [286].

5.1 Medición en placa de 96 pocillos para fluorescencia

Previamente a la medición de los ROS intracelulares, se procedió de igual forma que en el apartado 4 de capítulo 3 para sembrar en placas de poliestireno negras de 96 pocillos de fondo claro (Ref. 3603, Corning Incorporated, MA, USA) a una concentración de 10⁴ células por pocillo.

A continuación se añadió a cada pocillo 50 μ L de la sonda (DCFH-DA, 7,21 μ M en HBSS) y se incubaron las placas durante 30 minutos a 37°C, 5% de CO₂ y 85% de humedad. Después se eliminó el exceso de sonda y se añadieron los tratamientos pro-oxidantes según el apartado 3 del capítulo 3. Después de la incubación, se lavaron con HBSS y se lisaron mediante la adición de 50 μ L de Triton X-100 (Ref. 93443-100 mL, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) al 0,5% en PBS. Las placas se mantuvieron protegidas de la luz durante 3 minutos en un agitador y la fluorescencia emitida por la DCF⁻ se leyó en un fluorímetro de microplacas (Twinkle LB 970, Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Alemania), con el programa Mikro Win 2000 a una fluorescencia de 538 nm con un filtro de excitación de 485 nm. Este experimento se realizó tres veces por triplicado para cada tipo celular y tratamiento, y en cada pase celular.

5.2 Detección de peróxidos intracelulares por microscopia de fluorescencia

Para observar la fluorescencia producida por la sonda DCFH-DA en las células FT21 y FC, que al penetrar en estas, se oxida hasta DCF⁻ emitiendo fluorescencia verde al ser excitada con el filtro azul, se sembraron las células a una concentración de 5×10^4 células por pocillo en placa de 24 pocillos (Ref. 3524, Corning Incorporated, MA, USA), se incubaron en una estufa a 37°C, 5% CO₂ y 85% humedad durante 4 días. El protocolo seguido es el del apartado 5.1 del capítulo 4, aunque sólo se utilizó un tratamiento pro-oxidante (t-BHP 100 µM) y condiciones basales (HBSS) (apartado 3 del capítulo 3). La placa se llevó al microscopio de fluorescencia (Nikon eclipse Ti-S) para la realización de las fotografías de fluorescencia con un aumento total de 200X. Este experimento se realizó tres veces por triplicado para cada tipo celular y tratamiento, tanto a PB como a PA.

6. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES INTRACELULARES DE ATP

El contenido intracelular de ATP se midió mediante el ensayo de luciferasa *Adenosine 5'-triphosphate (ATP) Bioluminescent Assay Kit* (Ref. FLAA-1KT, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) de acuerdo con las instrucciones suministradas por el fabricante. Previamente a la determinación del ATP intracelular, se procedió de igual forma que en el apartado 4 del capítulo 3 para sembrar las células en placas de 96 pocillos con fondo claro especiales para lecturas luminométricas (Ref. 3610, Corning Incorporated, MA, USA) una concentración de 5×10^3 células por pocillo.

A continuación se añadieron los tratamientos pro-oxidantes según el apartado 3 del capítulo 4. Este protocolo se basa en el método Crouch, S.P., et al. [287], una reacción de la luciferina en presencia de ATP a través de la cual se obtiene la emisión de luz:

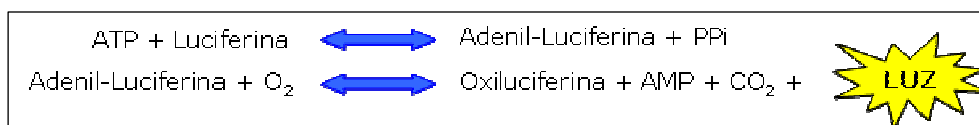


Figura 14. Método para determinar la cantidad de ATP por medio de la luciferina y midiendo la cantidad de luz emitida. Figura adaptada procedente de la referencia [287].

La cantidad de luz emitida es proporcional a la cantidad de ATP presente en las células. Tras mantener las placas de 96 pocillos en el incubador a 37°C, 5% CO₂ y 85% humedad durante 24 horas, se les añadieron los tratamientos pro-oxidantes junto con las condiciones basales, colocándose las placas en un luminómetro RS Luminoskan (Ref. 5300160, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). La cantidad de ATP se calculó relativizando las medias \pm EEM de los pocillos de las células FT21 respecto a las medias \pm EEM de los pocillos de células FC para cada tratamiento

(HBSS, AAPH 10 mM, t-BHP 100 μ M) en cada placa, así que el contenido de ATP para las células FC en cada tratamiento es el 100%. Este experimento se realizó tres veces por triplicado para cada tipo celular y tratamiento, y en cada pase celular.

7. DETECCIÓN DEL ANIÓN SUPERÓXIDO ($O_2^{\bullet-}$) MITOCONDRIAL Y RED MITOCONDRIAL POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Para la detección del anión superóxido mitocondrial ($O_2^{\bullet-}$) y de la red mitocondrial en células vivas, se procedió de igual forma que en el apartado 5.2 del capítulo 3 para sembrar las células a una concentración de 5×10^4 células por pocillo en placas de 24 pocillos (Ref. 3524, Corning Incorporated, MA, USA). Se incubaron en una estufa a 37°C, 5% CO_2 y 85% humedad durante 4 días, a continuación se utilizó una sonda fluorescente *MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide Indicator* (Ref. M36008, Molecular Probes, Life Technologies S.A., Alcobendas, España) y se siguieron las instrucciones según el fabricante (MitoSOX: 5 μ M en HBSS durante 10 minutos). La sonda penetra rápidamente en las mitocondrias y es oxidada por el radical $O_2^{\bullet-}$ mitocondrial y no por otras ERO/ERN, emitiendo fluorescencia roja al ser excitada con el filtro verde (excitación 510 nm y emisión 580 nm) en el microscopio de fluorescencia (Nikon eclipse Ti-S), además el producto oxidado puede unirse al nDNA emitiendo una elevada fluorescencia.

Para localizar las mitocondrias y observar la red mitocondrial en las células, se utilizó una sonda fluorescente *MitoTracker® Green FM* (Ref. M-7514, Molecular Probes, Life Technologies S.A., Alcobendas, España) y se siguieron las instrucciones del fabricante (Mitotracker: 50 nM en HBSS durante 45 minutos), emitiendo fluorescencia verde al ser excitada con el filtro azul (excitación 490 nm y emisión 516 nm) en el microscopio de fluorescencia. Además se añadió otra sonda fluorescente para realizar una contratiñación de núcleos con *Hoechst 33342* (Ref. H3570, Molecular Probes, Life Technologies S.A., Alcobendas, España) siguiendo las instrucciones del fabricante (5 μ L en 40 mL HBSS durante 5 minutos), los núcleos fluorescentes se observan en el microscopio de fluorescencia con el filtro UV (excitación 350 nm y emisión 461 nm). Este experimento se realizó tres veces por triplicado para cada tipo celular y tratamiento, tanto para PB como para PA.

8. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

La extracción del RNA total de las células FT21 y FC se llevó a cabo con el *RNeasy Mini Kit* (Ref. 74104, Qiagen, Hilden, Alemania) a partir de 1×10^6 células por columna. Antes de empezar se añadieron 10 μL de β -mercaptoetanol (M3148-25mL; Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) en 1mL de RLT (puede mantenerse a temperatura ambiente durante un mes), preparar el mismo día según la cantidad de muestras (siempre para una más): p.e. 8 muestras: 30 μL de β -mercaptoetanol + 3000 μL RLT, tampón RPE está concentrado (antes de utilizar por primera vez se añadió 4 volúmenes de etanol (96-100%) (Ref. 459844-2.5L; Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) y se preparó la DNase I disolviendo el liofilizado en 550 μL de agua RNase free (Ref. 79254, Qiagen, Hilden, Alemania) para inyectar el agua mediante una aguja y jeringa estériles, se mezcló bien mediante por inversión (**NO VORTEAR**) y se alícuotó para la congelación a -20°C (9 meses).

Para el protocolo de extracción las células se recogieron en un pellet, lavándose dos veces con PBS, depositándose rápidamente en un eppendorf sin RNAsas y se homogeneizó con el tampón de lisis (*RNeasy Mini Kit*) pasando el lisado al menos cinco veces por una jeringa sin RNAsas con una aguja de 0,7 x 30 mm. Después se siguieron las instrucciones del fabricante para obtener el RNA total esperándose una cuantificación superior a 30 μg . La cuantificación y la integridad del RNA se determinaron con el *RNA nano Lab Chip Kit Bioanalyzer* (Agilent, Palo Alto, CA, USA).

8.1 Visualización del RNA total por electroforesis en geles de agarosa

Una vez cuantificado el RNA total obtenido, se mezcló 1 μg de RNA con tampón de carga de RNA desnaturizante compuesto de formaldehído al 18,5%, formamida al 50%, MOPS 40 mM, Ficoll al 4% y azul de bromofenol (Ref. B5525-10G, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) como marcador del frente de la electroforesis. A esta mezcla se le añadió bromuro de etidio a una concentración de 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y se calentó a 95°C con el fin de desnaturizar el RNA. La mezcla se cargó en un gel de agarosa al 1% (Ref. A9539-50G, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) disuelta en tampón MOPS y formaldehído 0,6 M en condiciones desnaturizantes. A continuación, se procedió a la electroforesis a 80 V en un sistema horizontal de electroforesis (Mini Subcell GT System, BioRad) conectado a una fuente de alimentación Power-Pac 2000 (BioRad). El RNA total, debido a la capacidad del bromuro de etidio de hidrolizarse en presencia de luz ultravioleta y emitir fluorescencia, se visualizaron en un transiluminador ultravioleta (*UVP Mini dark room transilluminator*, UVP, Upland, Ca, USA).

Se consideraron como aptos todos los RNAs que permiten apreciar las bandas correspondientes a los RNA ribosomales 18S y 28S sin degradación como muestra la figura 15.

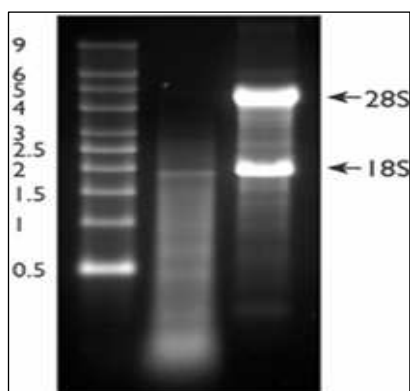


Figura 15. Fotografía de una electroforesis en condiciones desnaturalizantes, en la primera columna se muestra el marcador, en la segunda el RNA degradado y en la tercera el RNA intacto.

9. PCR CON RETROTRANSCRIPTASA A TIEMPO REAL

Para determinar la cuantificación relativa del mRNA de las enzimas antioxidantes (SOD1, SOD2, GPx y CAT) en las células FT21 y FC se llevó a cabo una PCR con retrotranscriptasa (RT-PCR) a tiempo real con el equipo ABI PRISM 7000 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems, CA, USA). La cuantificación relativa nos permite conocer si un gen está más o menos expresado en los fibroblastos con trisomía 21 (FT21) respecto a los fibroblastos control (FC) en relación a un gen de referencia (gen que no varía su expresión ni por el tipo de muestra ni por el tipo de tratamiento) que se usa para normalizar los resultados.

La RT-PCR a tiempo real se realizó en dos pasos. Primero se llevó a cabo la síntesis de cDNA de cadena sencilla con el *RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (#K1632, Fermentas, Madrid, España) a partir de 1,5 µg de RNA total, se descongelaron todos los componentes de kit, agitándose bien, se centrifugaron y se dejaron en hielo, después se utilizaron eppendorf estériles para añadir el volumen de muestra y agua DEPC calculado previamente hasta 11 µL (hielo), se añadió 1 µL de "random hexamer primer" (hielo) con un volumen final 12 µL, se mezcló bien, se centrifugó e incubó durante 5 minutos a 65°C (PCR System 2700), las muestras se enfriaron en hielo y se hizo un spin de todas ellas (siempre se utilizaron eppendorfs de 1,5 mL como adaptadores en la centrifuga) y de nuevo se dejaron en hielo, a

MATERIALES Y MÉTODOS

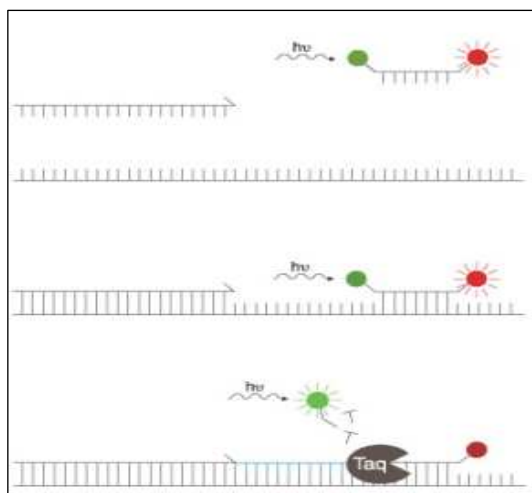
continuación se preparó la mezcla de reacción (tabla 9) (en exceso para una muestra más) y se añadieron 8 μL a cada muestra.

Tabla 9. Reactivos y volúmenes para la realización de la síntesis del cDNA.

Nº de Muestras	1	12
5X Reaction Buffer	4 μL	52
RiboLock™ RNase Inhibitor (20 u/μl)	1 μL	12
10 mM dNTP Mix	2 μL	26
RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/ μl)	1 μL	12
TOTAL volumen en eppendorf	20 μL	

A continuación se mezcló bien y se centrifugó, iniciándose el proceso de síntesis de cDNA consistente en los siguientes ciclos de temperatura: 5 minutos a 25°C; 60 minutos a 42°C (random hexamers primer) y finalmente calentar 5 minutos a 70°C. Por último se mantuvo el producto de la retrotranscripción a -20°C al utilizarse en menos de una semana o a -80°C para almacenamientos más largos.

En un segundo paso se realizó la PCR a tiempo real mediante sondas Taqman MGB ("*minor groove binder*") de 18-22 pb, marcadas en el extremo 5' con 6-FAM como fluorocromo reportero, cuyo mínimo de emisión está a la longitud de onda de 535 nm. En situación de no amplificación, no se detecta fluorescencia debido a que este fluorocromo permanece neutralizado por otro, TAMRA, situado en el extremo 3' por medio de transferencia de energía de tipo Forster (FRET). En esta transferencia, la energía de baja longitud de onda del fluoróforo situado en el extremo 5' es transferida al fluoróforo de energía de mayor longitud de onda ubicado en el extremo 3' bloqueándose la liberación de fluorescencia. De ese modo, se necesita la hidrólisis de la sonda para que el fluoróforo reportero quede libre del fluoróforo secuestrador y, por lo tanto, se emita fluorescencia. Iniciada la PCR, los cebadores hibridan con sus secuencias específicas en sus cDNA dianas y la polimerasa comienza a amplificar. Una vez alcanzada la zona de hibridación de la sonda Taqman®, y debido a la capacidad 5' exonucleasa de la polimerasa usada, tras hidrolizarse el fluoróforo reportero fijado en la sonda se liberará fluorescencia, la cual será registrada por un sistema capaz de detectar la fluorescencia emitida en el rango del espectro de emisión del fluoróforo reportero utilizado (Figura 16). Por lo tanto, se necesita la hibridación específica tanto de los cebadores como de las sondas para que la amplificación y la detección del producto sean posibles.



1-Hibridación específica de de sondas y cebadores.

2-Inicio de amplificación. La fluorescencia del marcador reportero FAM está secuestrada por el fluoróforo ubicado en 3'(TAMRA) por FRET.

3-Amplificación y emisión de fluorescencia. La fluorescencia del fluoróforo reportero FAM es liberada al hidrolizarse el fluoróforo ubicado en 5'(FAM) por la actividad exonucleasa de la polimerasa.

Figura 16. Esquema con las etapas de la PCR a tiempo real y el principio que permite relacionar la emisión de fluorescencia con la cantidad de producto amplificado.

Cada muestra se analizó por triplicado y las reacciones (los reactivos se mantuvieron en hielo) se prepararon en placas de 96 pocillos (MicroAmp optical 96 well reaction plate, Applied Biosystems, CA, USA) a partir de 15 ng de cDNA, 1µl de las sondas TaqMan® gene expression assays y 10 µl de TaqMan Universal PCR Master Mix, (20x TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems, CA, USA). Una vez preparadas las reacciones, se sellaron con papel adhesivo óptico (MicroAmp Optical Adhesive Film, Applied Biosystems, CA, USA), el cual no interfiere con la emisión de fluorescencia pero si evita la evaporación durante los periodos de desnaturalización. La reacción de PCR fue de 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Las sondas TaqMan® usadas para analizar la expresión de las enzimas antioxidantes (SOD1, SOD2, GPx y CAT) fueron las siguientes: Hs00166575_m1 para SOD1, Hs00167309_m1 para SOD2 y Hs00829989_gH para GPx1 y Hs00156308_m1 para CAT. La expresión de la polimerasa 2A (POL2A; Hs00172187_m1) y el RNA ribosomal 18S (18S; 4310893E) fueron usados como controles endógenos (genes de referencia) para normalizar la variación en las cantidades de cDNA de diferentes muestras. Se llevaron a cabo PCRs previas con los distintos pares de cebadores y sondas TaqMan® utilizados para amplificar cada cDNA utilizando distintas concentraciones de cDNA, con el fin corroborar que la eficacia de amplificación obtenida era del 100%.

Para evaluar la expresión relativa de las enzimas antioxidantes se usó el método comparativo *RQ Study*. Este método requiere que tanto los genes diana (SOD1, SOD2, GPx y CAT) como los genes de referencia (POL2A y 18S) tengan la misma eficiencia de amplificación a cualquier rango de concentración (*Abi Prism 7000 RQ Plate and RQ Study, User Guide*). Este método utiliza fórmulas aritméticas para calcular el valor de expresión relativo del gen diana (RQ) en la muestra problema (en

MATERIALES Y MÉTODOS

este caso las células FT21), normalizado con el gen de referencia y en relación a un calibrador (en este caso las células FC). El valor RQ se calcula según la fórmula $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$ y $\Delta\Delta CT = [C_T (FT21, \text{gen diana}) - C_T (FC, \text{gen diana})] - [C_T (FT21, \text{gen referencia}) - C_T (FC, \text{gen referencia})]$, donde C_T es el ciclo de PCR en el que la amplificación del gen (diana o de referencia) alcanza un umbral fijado. Este análisis se realizó con el *software RQ Manager* (Applied Biosystems, CA, USA). Todas las muestras se analizaron por triplicado para una placa, realizándose el experimento 9 veces para PB y para PA.

10. ENSAYOS ENZIMÁTICOS (SOD, GPx, CAT, β -Gal pH 4 y 6, β -Glu pH 3,5)

Todas las lecturas de los ensayos enzimáticos se realizaron en un espectrofotómetro UV-visible de doble haz Perkin-Elmer λ 2, provisto de portacubetas múltiple termostatzado. Previamente a la determinación de las actividades enzimáticas se lavaron las cajas de células dos veces con PBS, se tripsinizó (tripsina 0,25%) durante 10 minutos para recoger el pellet celular y se centrifugó a 1500 r.p.m., 4°C, 5 minutos para volver a lavar el pellet dos veces con PBS, seguidamente se añadieron 300 μ L de H_2O_d a cada eppendorf y se sonicaron 2 ciclos durante 10 segundos en hielo, se centrifugó a 15.000 r.p.m, 10 minutos, 4°C y se descartó el pellet, recogiendo el sobrenadante para valorarle las proteínas por el Coomassie (Bradford) Protein Assay (Ref.23200; Thermo Scientific Pierce Protein Biology Products, Rockford, IL, USA). A continuación se llevaron a cabo los ensayos enzimáticos en las células FT21 y FC tres veces por duplicado tanto a PB como a PA.

10.1 Determinación de actividades enzimáticas

A) Superóxido dismutasa (SOD) [EC 1.15.1.1]

Fundamento: La determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD) se realizó de acuerdo con el método descrito por Andersen, H.R. et al. [288] (Figura 17) por medio del kit comercial (Ref. SD125, RANSOD, Randox, Crumlin, Reino Unido).

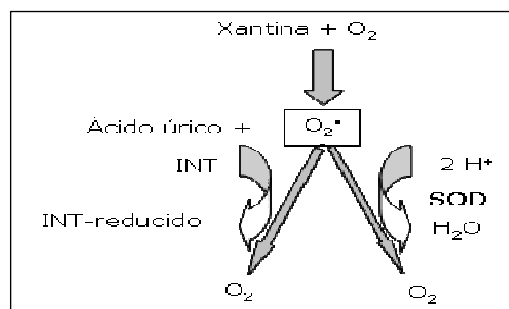


Figura 17. Método de Andersen para determinar la actividad superóxido dismutasa (SOD). Figura adaptada procedente de la referencia [288].

La reacción consiste en un generador y un detector de superóxidos. El generador (xantina) sirve para producir los radicales libres y para controlar la velocidad de la reacción. En ausencia de SOD, los radicales reaccionan con el detector (INT) y en presencia de SOD, ésta compite con el detector por el superóxido. Este método utiliza xantina y xantina oxidasa (EC 1.2.3.2) como fuentes de superóxidos e INT como indicador de la eliminación de radicales, la temperatura de la cubeta se mantuvo a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,1$. La reducción del INT es medida a 500 nm.

Cálculo de la actividad: Se define una unidad de SOD como la cantidad de SOD necesaria para inhibir la velocidad de reducción del INT un 50%. La curva patrón se construyó según el kit comercial representando el logaritmo de la actividad remanente frente a las unidades de SOD en cubeta. La actividad SOD de las células se calculó interpolando en la curva patrón el valor de DO de la actividad remanente obteniéndose así las unidades SOD en cubeta. A partir de ellas y teniendo en cuenta las proteínas celulares (lisados celulares) utilizadas en el ensayo, el resultado final se expresó en U/mg prot. celulares.

B) Glutación Peroxidasa (GPx) [EC 1.11.1.9]

Fundamento: La determinación de la actividad de la glutación peroxidasa (GPx) se realizó de acuerdo con el método descrito por Plagia, D.E. y Valentine, W.N. [289] (Figura 18) por medio del kit comercial *BIOXYTECH® cGPx-340* (Ref. 21037, *OxisResearch™*, *Deltaclon*, Madrid, España). La reacción se inicia al añadirse un peróxido en exceso. La oxidación de dos moléculas de glutación (GSH), va unida a la oxidación de NADPH, catalizada a su vez por la glutación reductasa (GR). El consumo de NADPH se registra midiendo el descenso de absorbancia a 340 nm. Como peróxido iniciador de la reacción se utiliza el ter-butil hidroperóxido.

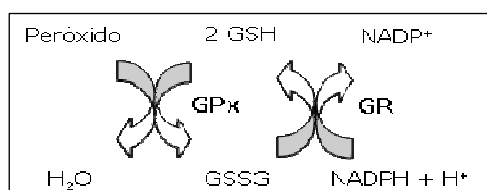


Figura 18. Método de Plagia y Valentine para determinar la actividad glutación peroxidasa (GPx). Figura adaptada procedente de la referencia [289].

Cálculo de la actividad: Las lecturas se realizaron al aire con cubetas de cuarzo de 1 mL de capacidad monitorizando el descenso de absorbancia a 340 nm por el consumo de NADPH a intervalos de 60 segundos durante un tiempo total de 3 minutos, la temperatura de la cubeta se mantuvo a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,1$. Debido a la

MATERIALES Y MÉTODOS

inestabilidad del ter-butil hidroperóxido y la oxidación espontánea del NADPH en ausencia de ter-butil hidroperóxido fue necesario introducir un blanco para cada serie de ensayos. La actividad se calculo a partir de:

$$\Delta\text{DO}/\text{min}^{\text{"CORREGIDA"}} = \Delta\text{DO}/\text{min}^{\text{"MUESTRA"}} - \Delta\text{DO}/\text{min}^{\text{"BLANCO"}}$$

$$\text{Actividad (U/mg prot. celulares)} = \Delta\text{DO}/\text{min}^{\text{"CORREGIDA"}} \times 107936.5$$

C) Catalasa (CAT) [EC 1.11.1.6]

Fundamento: La determinación de la actividad de la catalasa se realizó de acuerdo con el método descrito por Aebi, H., [134] por medio del kit comercial *BIOXYTECH® Catalase-520* (Ref. 21042, OxisResearch™, Deltaclon, Madrid, España). La descomposición del H₂O₂ se mide por el descenso de absorbancia a 240 nm. La reacción se inicia al añadir la muestra. Las lecturas se realizaron al aire con cubetas de cuarzo de 1 mL de capacidad monitorizando el descenso de absorbancia a 240 nm por la desaparición de H₂O₂ a intervalos de 15 segundos durante un tiempo total de 1 minuto de tiempo. La temperatura de la cubeta se mantuvo a 37°C ± 0,1. Para corregir la hidrólisis no enzimática se introdujo un blanco sin muestra al principio de cada serie de medidas.

$$\text{Cálculo de la actividad: Actividad enzimática (k/I)} = 229,5 \times \log A_1/A_2$$

K: constante de primer orden de la reacción enzimática.

A1: valor de la absorbancia a los 15 segundos.

A2: valor de la absorbancia a los 30 segundos.

D) β-Galactosidasa (β-Gal pH 4 y 6) [EC 3.2.1.23]

Fundamento: El buffer Glicina 0,2 M a pH 10,4 se preparó en un volumen de 500 mL de H₂O miliQ, conteniendo 7,507 g de glicina y 4 g de hidróxido sódico (buffer para la parada de la reacción). Se prepararon 10 mg de 4-Metil-Umbeliferona (Sigma M1508-10 g) en 10 mL de buffer glicina (congelar alicuotado a -20 °C). El sustrato para la reacción (4-MU-β-D-Gal 2 mM: Sigma M1633-250 mg) se sonica, después se calienta en el baño húmedo a 70 °C y se mezcla con el buffer para el ensayo enzimático [0,0068 g/10 mL buffer ensayo (61,4 mL ác. cítrico 0,1 M + 38,6 mL de fosfato-Na₂ 0,1 M a pH 4,4 y añadir 0,584 g ClNa hasta pH 4)]. Después de sonicar la células, se añadió 25 µL de H₂O_d (blanco)/muestra diluida 1/20 + 100 µL de sustrato (por duplicado y en tubos de 5 mL), se incubaron en un baño húmedo a 37 °C durante 30 minutos, a continuación se paró la reacción añadiendo 1,25 mL del buffer Glicina.

Cálculo de la actividad: Para la lectura de la fluorescencia se utilizó una cubeta de cuarzo semimicro (104F-QS de 10 mm, Hellma) y un fluorímetro (F-2500 FL Spectrophotometer) con una longitud de onda (λ) de excitación de 365 nm y una

longitud de onda de emisión de 450 nm. Previo a la lectura de los blancos y muestras se preparó una curva patrón de 4-MU [dilución 1/1000: 50 µl stock 4-MU en 50 mL de buffer Glicina sol. trabajo, a continuación los puntos de la curva: 1000 ng/mL (4 ml sol. trabajo), 750 ng/mL (3 mL sol. trabajo + 1 mL buffer glicina), 500 ng/mL, 250 ng/mL, 100 ng/mL, 50 ng/mL, 25 ng/mL, 10 ng/mL, 5 ng/mL y 0 ng/mL] . El cálculo de la actividad en la muestra se realiza a partir de la siguiente fórmula:

Actividad enzimática (nmol/mg/min) = [(ng/mL-BI)/mg prot.] x 0,009249916 x f.dil.

E) β-Glucuronidasa (β-Glu pH 3,5) [EC 3.2.1.31]

Fundamento: El buffer Glicina 0,2 M a pH 10,4 se preparó en un volumen de 500 mL de H₂O miliQ, conteniendo 7,506 g de glicina y 4 g de hidróxido sódico (buffer para la parada de la reacción). Se prepararon 10 mg de 4-Metil-Umbeliferona (Sigma M1508-10 g) en 10 mL de buffer glicina (congelar alicuotado a -20 °C). El sustrato para la reacción (4-MU-β-D-Gluc 3,46 mM: Sigma M9130-25 mg) se sonica si está turbio y se mezcla con el buffer para el ensayo enzimático [0,0122 g/10 mL buffer ensayo (94 mL ác. acético 0,04 M + 6 mL de acetato-Na 0,04 M a pH 3,5)]. Después de sonicar la células, se añadió 25 µL de H₂O_d (blanco)/muestra diluida 1/2 + 100 µL de sustrato (por duplicado y en tubos de 5 mL), se incubaron en un baño húmedo a 37 °C durante 30 minutos, a continuación se paró la reacción añadiendo 1,25 mL del buffer Glicina.

Cálculo de la actividad: Para la lectura de la fluorescencia se utilizó una cubeta de cuarzo semimicro (104F-QS de 10 mm, Hellma) y un fluorímetro (F-2500 FL Spectrophotometer) con una longitud de onda (λ) de excitación de 365 nm y una longitud de onda de emisión de 450 nm. Previo a la lectura de los blancos y muestras se preparó una curva patrón de 4-MU [dilución 1/1000: 50 µl stock 4-MU en 50 mL de buffer Glicina sol. trabajo, a continuación los puntos de la curva: 1000 ng/mL (4 ml sol. trabajo), 750 ng/mL (3 mL sol. trabajo + 1 mL buffer glicina), 500 ng/mL, 250 ng/mL, 100 ng/mL, 50 ng/mL, 25 ng/mL, 10 ng/mL, 5 ng/mL y 0 ng/mL] . El cálculo de la actividad en la muestra se realiza a partir de la siguiente fórmula:

Actividad enzimática (nmol/mg/min) = [(ng/mL-BI)/mg prot.] x 0,009249916 x f.dil.

11. DETERMINACIÓN DEL MALONDIALDEHIDO (MDA) POR HPLC

Previamente a la determinación del MDA celular de FT21 y FC, se lisaron las células y se determinaron las proteínas de la misma forma que en el apartado 10 del capítulo 3. Seguidamente se realizó el protocolo para valoración del MDA con el protocolo de Fukunaga, K. et al., [290]. Se añadieron 100 μ L de estándar y muestras en eppendorfs con cierre de seguridad y se mezclaron con 250 μ L de la solución TBA (Ácido Tiobarbitúrico)/DTPA (Ácido acético-dietilen-etriamino-pentanhidro) [TBA 0,2%/DTPA 1 mM (Ref.T-5500-25G /D-6518-5G Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) en tampón acético/acetato 2 M, pH 3,5], se añadió 10 μ L de butilhidroxitolueno (BHT; Ref.47168, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) a todos los eppendorfs y se agitó con el vórtex para incubar durante 45 minutos a 95°C en un baño seco. A continuación, las muestras se colocaron a 4°C en la nevera durante 10 minutos y se añadieron 250 μ L de butanol (Ref. 34867-2.5L, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) para agitar todos los eppendorfs en el vórtex durante 1 minuto (extracción lipídica) y centrifugarlos a 3800 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Para la determinación, se recogieron 100 μ L de la fase superior donde se encuentran los lípidos y el complejo MDA-TBA que queremos determinar para depositarlos en el HPLC (Waters) con unas determinadas condiciones cromatográficas [acetonitrilo al 70% (Ref.221881.1612 grado HPLC, Panreac, Castellar del Vallès, Barcelona, España), (Columna: Symmetry C18.5 μ m, 150*4.6 mm, Waters, Cerdanyola del Vallès, Barcelona, España), flujo:1 mL/min, volumen inyectado:20 μ L, tiempo de retención: 1,4 minutos].

Todas las áreas de las muestras son interpoladas a una recta patrón (B:0 μ M; S1:0,25 μ M; S2:0,5 μ M; S3:1 μ M) realizada con 1,1,3,3-tetraetoxipropano (Ref. T9889-25 mL, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) para determinar la concentración de MDA de las muestras y corregida por su correspondiente proteína. La determinación del MDA celular se realizó tres veces por duplicado tanto a PB como a PA.

12. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y WESTERN BLOT

Para la extracción de proteínas, las células se lavaron con PBS frío y se lisaron con tampón de lisis (HEPES 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, 1% de Triton X, EDTA 1 mM y 10% de glicerol) en presencia de inhibidores de proteasas (Ref. 87786, Thermo Scientific Pierce Protein Biology Products, Rockford, IL, USA) durante 30 minutos/4°C. Después, las células fueron recogidas en un eppendorf y se centrifugaron a 15.000g/10 minutos/4°C. Una vez extraídas las proteínas por centrifugación, se recogió el sobrenadante y se cuantificaron con el Coomassie (Bradford) Protein Assay

Kit (Ref. 23200, Thermo Scientific Pierce Protein Biology Products, Rockford, IL, USA), según las instrucciones del fabricante.

A 50 µg de proteínas se le añadió 7,5 µL tampón de carga 4X (Tris-HCl 0,313 M pH 6,8, 10% de SDS, 0,05% de Azul Bromofenol, 50% de glicerol) y 0,0154 g de DTT (400 mM final en tampón, Ref. D0632-1G, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) y se desnaturalizaron durante 10 minutos/95°C en un baño termostaticado. Las proteínas se cargaron en geles de poliacrilamida de diferente porcentaje (12-14%) en función del peso molecular de la proteína a analizar y se llevó a cabo con dodecilsulfato de sodio (SDS, Ref. L4390-100G, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) una electroforesis (SDS-PAGE) en un tampón de electroforesis [Tris 25 mM, glicina 192 mM (Ref. G8898-500G, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), SDS 0.1% (p/v)], aplicando un voltaje constante de 125 voltios (V). Una vez que las proteínas se separaron en función del peso molecular, se transfirieron a una membrana de PVDF con un tampón de transferencia [Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20% (v/v) (Ref. 1060082500, Merck Millipore, Madrid, España)], aplicando un voltaje constante de 100 V/1 hora. Una vez finalizada la transferencia, las membranas se bloquearon con 5% de leche desnatada en TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM)/1 hora.

Después del bloqueo se incubaron con el anticuerpo primario adecuado (Tabla 10) y diluido en 1% de leche desnatada en T-TBS (Tween-20 0,01%) durante toda la noche en movimiento a 4°C. Posteriormente se realizaron tres lavados de 10 minutos en T-TBS (Tween-20 0,05%) y 3 lavados de 5 minutos en TBS, se incubaron las membranas 1 hora con el anticuerpo secundario (Tabla 10) diluido en 1% de leche desnatada en T-TBS a temperatura ambiente. Finalmente se volvió a lavar igual que antes para revelar la membrana utilizando el sistema de emisión de quimioluminiscencia SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Ref:34078, Thermo Scientific Pierce Protein Biology Products, Rockford, IL, USA). La intensidad de las bandas obtenidas por Western blot se cuantificaron por densitometría con el Quantity One Basic 1-D Analysis Software (versión 4.6.9, Bio-Rad, Munich, Alemania). En todos los casos se normalizó la expresión de la proteína de interés con la intensidad de la banda de la β-actina y se expresó en unidades densitométricas arbitrarias (UDA). Cada Western blot se realizó tres veces por duplicado para cada tipo celular y tratamiento, tanto para PB como para PA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 10. Anticuerpos y dilución utilizados para la realización de los Western Blot.

Anticuerpos	Referencia y casa comercial	Dilución
Primarios		
anti-SOD1	sc-11407; Santra Cruz	1:5.000
anti-SOD2	sc-30080; Santra Cruz	1:2.000
anti-dinitrophenyl-KLH	A-6430; Molecular Probes	1:400.000
anti-p21 Waf1/Cip1	#2947; Cell Signaling	1:1.000
anti-p53	P8999; Sigma-Aldrich	1:2.500
anti-cytochrome c	#4272; Cell Signaling	1:1.000
anti-Cleaved Caspase-9	#9505; Cell Signaling	1:1.000
anti- β -actina	A3854; Sigma-Aldrich	1:1.000
Secundarios		
Goat Anti-Rabbit IgG-HRP	A0545; Sigma-Aldrich	1:10.000
Goat Anti-Mouse IgG-HRP	A2304; Sigma-Aldrich	1:10.000

13. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA POR ENZIMA INMUNO ENSAYO (ELISA)

Previamente a la realización de los kit de ELISA, se lavaron las cajas de células dos veces con PBS y se tripsinizaron con tripsina 0,25% durante 10 minutos para recoger el pellet celular, después se centrifugó a 1500 r.p.m./4°C/5 minutos y se volvió a lavar el pellet dos veces con PBS. A continuación se llevo a cabo la determinación cuantitativa del citocromo C humano, p53 humano y p21 humano en las células FT21 y FC según las instrucciones del fabricante (Tabla 11).

Tabla 11. Anticuerpos utilizados para la realización de las ELISAs.

ELISA	Referencia y casa comercial
Complex I	MSFX-1; Mitosciences, Oregon, USA
Complex III	MSFX-3; Mitosciences, Oregon, USA
Complex V	MSFX-5; Mitosciences, Oregon, USA
Superoxide dismutase (SOD2)	MSFX-12; Mitosciences, Oregon, USA
Human p 53	RBMS256R; Biovondor, Brno, República Checa
Human p21 Waf1/Cip1	#7167; Cell Signaling Technology, USA
Human Cytochrome c	DCTC0, R&D Systems, Inc., Min., USA

14. DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD SA- β -GALACTOSIDASA

La expresión de la enzima β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -Gal), definida como la actividad de esta enzima a pH 6,0 en células senescentes, es otro de los marcadores clásicos para este fenotipo descrito por Dimri, G.P. et al., [254]. La

razón de esta actividad enzimática particular parece ser el aumento de la actividad lisosomal durante la senescencia replicativa [255, 291].

La actividad SA- β -Gal en los fibroblastos FT21 y FC se examinó usando el kit *Senescence β -galactosidase kit* (#9860, Cell Signaling Technology, Beverly, USA). Se sembraron las células a una concentración de 5×10^4 células por pocillo en placa de 24 pocillos (Ref. 3524, Corning Incorporated, MA, USA), incubándose en una estufa a 37°C/5% CO₂/85% humedad durante 4 días. Seguidamente se realizó el protocolo del X-Gal con una solución de tinción que contiene 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosido. Al día siguiente, se comprobó la aparición de un precipitado azul en las células FT21 y FC observándolas al microscopio de contraste (aumento total 200X). Este experimento se realizó tres veces por duplicado para cada tipo celular y tratamiento, tanto para PB como para PA.

15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Todos los datos se introdujeron en una base de datos generada en el programa "GraphPad Prism v 5.0" para Windows XP. A partir de la media \pm EEM de todos los datos se realizó el test de normalidad D'Agostino & Pearson para determinar la bondad de ajuste a una distribución normal. En ausencia de normalidad o cuando las varianzas eran heterogéneas se realizó el test no paramétrico U de Mann-Whitney y al existir normalidad o cuando las varianzas son homogéneas se realizó el test paramétrico t de Student. Además, se utilizó una ANOVA de una vía con un post test de Bonferroni cuando se comparó el efecto de varios tratamientos pro-oxidantes sobre una situación control. Se consideró significativo un valor de $p \leq 0,05$.

A microscopic image of plant cells, likely from a leaf, showing a network of cells with prominent cell walls. Several cells contain bright orange, oval-shaped structures, which are chloroplasts. The background is dark, making the cells and chloroplasts stand out.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS

1. CITOTOXICIDAD CELULAR DEBIDA A LOS PRO-OXIDANTES EN FIBROBLASTOS CON TRISOMÍA DEL CROMOSOMA 21 (FT21) Y CONTROL (FC)

Los fibroblastos con trisomía del cromosoma 21 (FT21) y control (FC) a pases bajos (PB, 3-7), fueron expuestos a concentraciones crecientes de pro-oxidantes para determinar las concentraciones idóneas para causar una mínima citotoxicidad y una máxima producción de radicales libres (RL).

La citotoxicidad producida por los tratamientos pro-oxidantes en ambos tipos de células a PB (3-7) y a PA (8-12) respecto a las células en condiciones basales (no tratados) se muestra en la tabla 12. A PB, el pro-oxidante AAPH no produjo citotoxicidad en los fibroblastos. Sin embargo, el pro-oxidante t-BHP resultó más citotóxico que el AAPH en ambos tipos celulares, aunque de forma no significativa.

A PA, y de forma similar a los PB, el pro-oxidante AAPH produjo un aumento no significativo de la citotoxicidad en las células FT21, mientras que en las células FC no se produjo un aumento de la citotoxicidad. Sin embargo, el agente pro-oxidante t-BHP provocó un aumento de la citotoxicidad en ambos tipos de células, siendo únicamente significativa ($p < 0,001$) en las células FT21.

Tratamiento	Pases Bajos (3-7)		Pases Altos (8-12)	
	FC	FT21	FC	FT21
No tratados	100 ± 3%	100 ± 3%	100 ± 2,5%	100 ± 2%
AAPH (10 mM)	97,81 ± 2,5%	99,09 ± 3%	98,02 ± 2,5%	95,09 ± 2%
t-BHP (100 µM)	93,02 ± 2,5%	93,66 ± 2,5%	96,13 ± 1,95%	89,01 ± 1,85% ^a

Tabla 12. Determinación de la citotoxicidad celular debida a los pro-oxidantes en fibroblastos con trisomía 21 (FT21) y control (FC). La citotoxicidad celular en los fibroblastos con trisomía 21 (FT21) y control (FC) se determinó por el test XTT a pases bajos (3-7) y altos (8-12), en condiciones basales (no tratados), o tras su incubación con los pro-oxidantes AAPH y t-BHP. A partir de los valores obtenidos de la densidad óptica (DO), se calcularon las medias ± EEM expresándose en porcentaje respecto a las células FT21 y FC en condiciones basales (no tratados), tomando ambos tipos celulares como el 100% de viabilidad celular. Las diferencias significativas se determinaron mediante el test t-Student: a: $p < 0,001$.

A continuación se cuantificó el contenido de proteínas celulares para analizar como afectan los tratamientos pro-oxidantes al número de células existentes (tabla 13). A PB, la cantidad de proteína determinada en ambos tipos de células con ambos pro-oxidantes fue similar a la de las células no tratadas. Sin embargo, a PA se encontró una disminución en la cantidad de proteína para ambos tipos de células respecto a los PB, aunque ambos pro-oxidantes provocaron una disminución significativamente mayor en la cantidad de proteína, siendo el pro-oxidante t-BHP el que afectó de forma más importante a ambos tipos de fibroblastos.

RESULTADOS

Tratamiento	Pases Bajos (3-7)		Pases Altos (8-12)	
	FC	FT21	FC	FT21
No tratados	0,523 ± 0,022	0,622 ± 0,031	0,45 ± 0,012	0,466 ± 0,011
AAPH (10 mM)	0,52 ± 0,012	0,599 ± 0,024	0,411 ± 0,01 ^a	0,42 ± 0,01 ^a
t-BHP (100 µM)	0,51 ± 0,015	0,578 ± 0,023	0,372 ± 0,016 ^b	0,382 ± 0,013 ^b

Tabla 13. Determinación del contenido de proteínas celulares debida a los pro-oxidantes en fibroblastos con trisomía 21 (FT21) y control (FC). La cantidad de proteínas celulares en fibroblastos con trisomía 21 (FT21) y control (FC) se determinó por el método Coomassie (Bradford) Protein Assay, a pases bajos (3-7) y altos (8-12), en condiciones basales (no tratados), o tras su incubación con los pro-oxidantes AAPH y t-BHP. A partir de los valores obtenidos de la densidad óptica (DO), se calcularon las medias ± EEM expresándose en mg/mL. Las diferencias significativas se determinaron mediante el test t-Student: a: $p < 0,01$; b: $p < 0,001$.

2. PRODUCCIÓN INTRACELULAR DE RADICALES LIBRES EN FIBROBLASTOS CON TRISOMÍA DEL CROMOSOMA 21 (FT21) Y CONTROL (FC)

2.1 Producción intracelular de ROS en microplaca

Para analizar si las células FT21 tienen mayor producción de ROS respecto a las células FC, valoramos la producción intracelular de ROS en ambos tipos de células durante el proceso de replicación celular *in vitro*, es decir, a pases bajos (PB, 3-7) y pases altos (PA, 8-12). Ambos tipos de fibroblastos se sometieron a dos tratamientos pro-oxidantes, mientras que paralelamente se utilizaban fibroblastos en condiciones basales (no tratados). Para medir la producción intracelular de ROS se utilizó una sonda específica como es la 5-(γ -6) clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato acetyl ester (DCFH-DA), que penetra en las células y es oxidada por los ROS hasta DCF⁻ emitiendo fluorescencia a 538 nm al ser excitada a 485 nm.

Los resultados del análisis de la producción de ROS a PB se muestran en la Figura 19A. La producción intracelular de ROS en las células FT21 se incrementó de forma significativa respecto a las células FC, este incremento se observó tanto en las células no tratadas como en las células con los tratamientos pro-oxidantes. De hecho, la producción basal de ROS, es decir, la de las células que no recibieron tratamiento pro-oxidante, fue un 29% superior ($p < 0,001$) en las células FT21 respecto a las células FC. Al comparar la respuesta de ambos tipos de células frente al pro-oxidante AAPH, se observó que las células FT21 presentaban una producción de ROS un 23% superior ($p < 0,001$) a la observada en las células FC. El tratamiento con el pro-oxidante t-BHP produjo una mayor respuesta en los dos tipos de células, aunque se observó que la producción de ROS en las células FT21 era prácticamente el doble que la observada en las células FC ($p < 0,001$).

Analizando el efecto que provocan ambos pro-oxidantes en la producción de ROS sobre las células FT21 y FC respecto a sus basales correspondientes, observamos que los dos pro-oxidantes aumentaban la producción de ROS en ambos tipos de

células. El incremento producido por el AAPH fue de 2,5 veces ($p < 0,001$) en ambos tipos de células respecto a sus basales, mientras que el t-BHP incrementó la producción de ROS 6,2 veces ($p < 0,001$) en las células FT21 y 4,2 veces ($p < 0,001$) en las células FC respecto a sus basales.

Los resultados del análisis de la producción de ROS a PA se muestran en la Figura 19B. Al igual que ocurría a PB, la producción intracelular de ROS en las células FT21 estaba incrementada de forma significativa respecto a las células FC, tanto en las células no tratadas como en las células al someterlas a los dos tratamientos pro-oxidantes. Con los pases, la producción basal de ROS en las células FT21 fue significativamente mayor que en las células FC, en concreto un 48% superior ($p < 0,001$), incrementándose desde el 29% a PB. El pro-oxidante AAPH produjo un aumento significativo en la producción de ROS del 35% ($p < 0,001$) en las células FT21 respecto a las células FC, incrementándose desde el 23% a PB. Sin embargo, el tratamiento con el pro-oxidante t-BHP produjo un resultado similar a los PB, es decir, las células FT21 doblaban la producción de ROS ($p < 0,001$) de las células FC. Así que, al comparar como afectan los dos pro-oxidantes a la producción intracelular de ROS en ambos tipos de células respecto a sus basales, tanto a PB como a PA, se observó un incremento significativo ($p < 0,001$) en ambos tipos células, aunque el incremento fue menor con la senescencia replicativa.

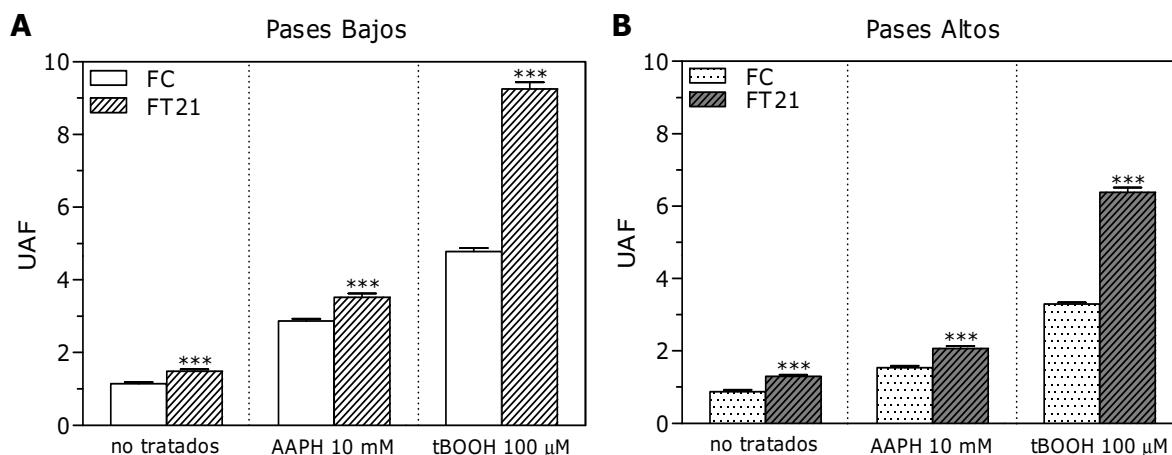


Figura 19. Producción intracelular de ROS en fibroblastos con trisomía 21 (FT21) y control (FC). Determinación de la producción intracelular de ROS en fibroblastos con trisomía 21 (FT21) y control (FC) a pases bajos (3-7) (A) y altos (8-12) (B), en condiciones basales (no tratados), o tras su incubación con los pro-oxidantes AAPH y t-BHP. Los valores se expresan en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF ± EEM). Las diferencias significativas entre FT21 y FC fueron determinadas mediante el test t-Student: ***: $p < 0,001$.

2.2 Detección de los peróxidos intracelulares mediante microscopía de fluorescencia

Para detectar los peróxidos intracelulares en los fibroblastos FT21 y FC por microscopía de fluorescencia, se utilizó la misma sonda anterior, la DCFH-DA. En este caso se utilizó un tratamiento con el pro-oxidante t-BHP, ya que produjo las mayores diferencias en la producción intracelular de ROS tanto a PB como a PA y fibroblastos en condiciones basales (no tratados).

Los resultados de la detección de la fluorescencia a PB se muestran en la Figura 20A. La señal de fluorescencia verde en los FT21 y FC en condiciones basales, era mayor y más intensa para los FT21, y por tanto había una mayor producción de peróxidos intracelulares. La adición del pro-oxidante t-BHP tuvo dos consecuencias inmediatas en las células; la primera fue la disminución del número de células y la segunda fue morfológica, consistió en un aumento del tamaño celular y del núcleo, además de una morfología irregular. Esta segunda consecuencia también se produjo en las células FT21 en condiciones basales. En cuanto a la detección de los peróxidos intracelulares, se observó en ambos tipos de células una señal de fluorescencia verde repartida homogéneamente por todo el citoplasma, aunque los FT21 presentaban una mayor intensidad y por tanto una mayor producción de peróxidos intracelulares respecto a los FC.

Los resultados de la detección de la fluorescencia a PA se muestran en la Figura 20B. La intensidad de la señal fluorescente verde a pases altos fue mayor a la observada a pases bajos. Además, las células FT21 presentaron una mayor intensidad respecto a las células FC, tanto en condiciones basales, como después de tratarlas con el pro-oxidante t-BHP. Como se observa en la Figura 22B, el número de células disminuyó a PA; esta disminución fue más acusada al tratar las células con t-BHP. Las células FT21 adquirieron un volumen celular mayor, un aumento del núcleo celular y una morfología irregular, tanto en condiciones basales como con el t-BHP. Estas modificaciones celulares son similares a las observadas a PB, tanto en las células FT21 en condiciones basales, como en ambos tipos celulares al añadir el t-BHP.

Se observó de forma general un incremento de la señal fluorescente verde en los FT21 respecto a los FC. De forma específica, pudimos observar como el agente pro-oxidante t-BHP causó mayor producción de peróxidos intracelulares en ambos tipos de células, aunque de forma más notable en los FT21. Al igual que ocurrió a PB, dicho efecto produjo una disminución en el número de células, un aumento del tamaño celular con una morfológica poliédrica y un aumento del núcleo celular; en este último caso se vieron principalmente afectados los FT21.

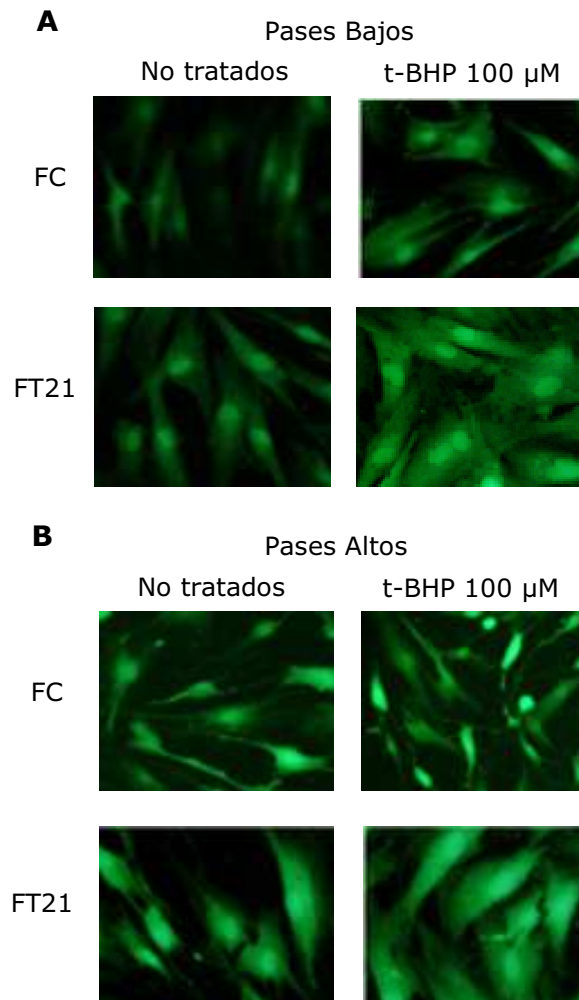


Figura 20. Detección de peróxidos intracelulares por medio de la sonda DCFH-DA a través de microscopía de fluorescencia en fibroblastos con trisomía 21 (FT21) y control (FC). Se detectaron los peróxidos intracelulares en fibroblastos con trisomía 21 (FT21) y control (FC), tanto en condiciones basales (no tratados) como con el tratamiento pro-oxidante (t-BHP), a pases bajos (**A**) y a pases altos (**B**). La señal de fluorescencia verde que se observa en las imágenes corresponde a la oxidación de la sonda DCFH-DA en respuesta a la producción de peróxidos intracelulares. Las imágenes están tomadas con un microscopio de fluorescencia a un aumento total de 200X.

3. ACTIVIDAD MITOCONDRIAL EN FIBROBLASTOS CON TRISOMÍA DEL CROMOSOMA 21 (FT21) Y CONTROL (FC)

El incremento en la producción de ROS intracelulares en los FT21 por una sobreexpresión en la enzima antioxidante SOD1 puede tener múltiples efectos, uno de ellos es una pérdida de la eficiencia en la respiración celular. Esta pérdida viene caracterizada principalmente por una deficiencia en los complejos de la CTE, una disminución en la producción de ATP y un aumento de los ROS en las mitocondrias. Los ROS pueden atacar a las proteínas de la CTE y al DNAm, produciendo un daño oxidativo, que a su vez, aumenta la generación de ROS en la mitocondria conduciendo hacia un "círculo vicioso".

3.1 Determinación proteica de los complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial

Las células FT21 tienen una mayor producción de ROS frente a las células FC y puede verse afectada la fosforilación oxidativa debido al déficit proteico de los complejos de la CTE y de la enzima antioxidante mitocondrial SOD2, originado por el daño oxidativo producido por el exceso de ROS. Para comprobar esta hipótesis, se determinó la cantidad de proteína de varios complejos de la CTE y de la SOD2 en ambos tipos de células a pases intermedios (Figura 21). Las células FT21 presentaban una menor cantidad de proteína respecto a las células FC en los complejos de la CTE y en la enzima antioxidante SOD2 determinados, excepto en la ATP sintetasa, aunque las diferencias entre las células FT21 y FC no fueron significativas. Concretamente, la disminución proteica para el complejo I, III y SOD2 fue del 14%, 24% y 21% respectivamente.

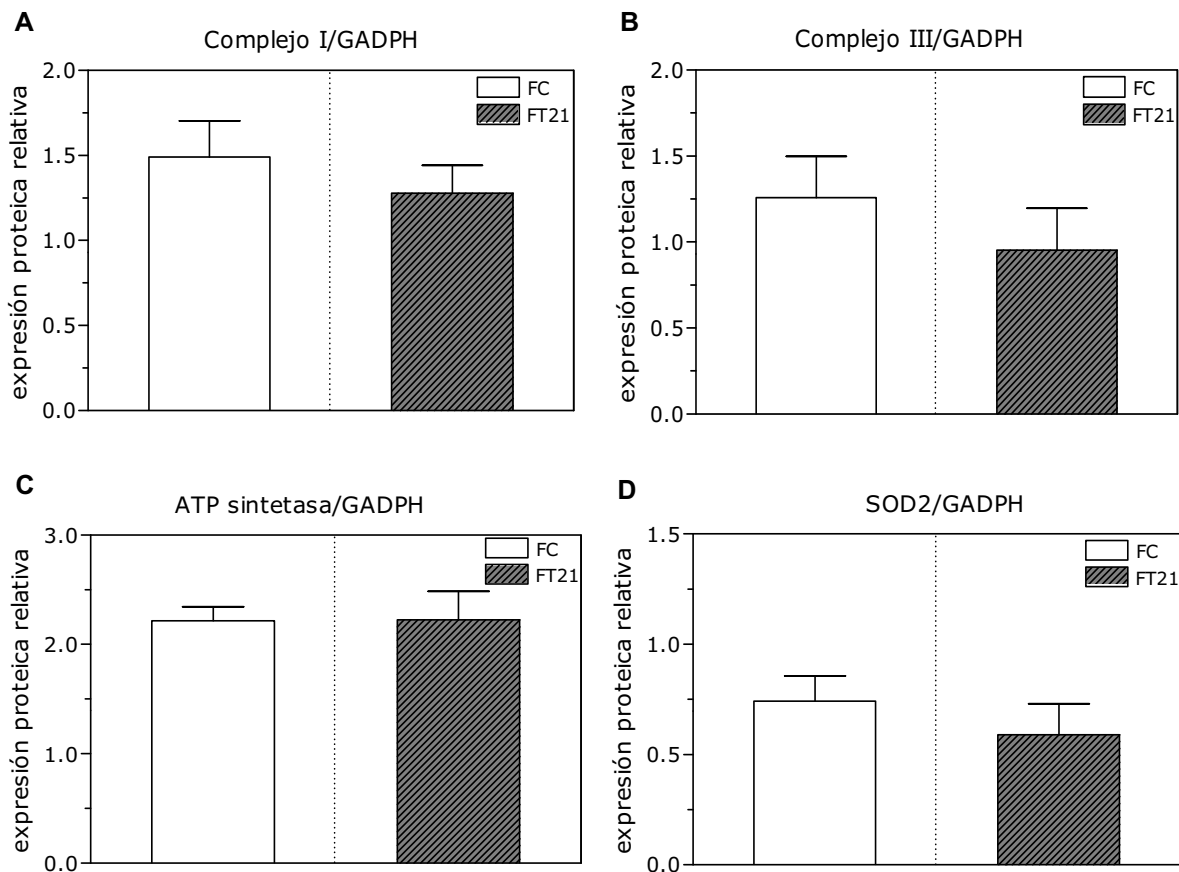


Figura 21. Determinación proteica de los complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y de la enzima antioxidante mitocondrial SOD2 en fibroblastos con trisomía 21 (FT21) y control (FC). La determinación proteica de los complejos I (A), III (B), ATP sintetasa (C) y de la enzima antioxidante SOD2 (D) se realizó por ELISA a pases intermedios en lisados celulares de fibroblastos con trisomía 21 (FT21) y fibroblastos control (FC). Se determinó la absorbancia (DO) y se calcularon las medias \pm EEM expresando los valores relativizados a la GADPH.

3.2 Determinación del contenido de ATP intracelular

Una disminución en la cantidad de proteína de los complejos de la CTE en las células FT21, puede suponer una pérdida de la eficiencia en la respiración celular, que conduzca a una disminución en la producción intracelular de ATP; por tanto, se cuantificó la producción de ATP en ambos tipos de células con los dos tratamientos pro-oxidantes. Los resultados del análisis de los niveles de ATP intracelulares a PB se muestran en la Figura 22A. Los niveles de ATP intracelular en las células FT21 en condiciones basales (no tratados), disminuyeron de forma significativa un 13% ($p < 0,05$) respecto a lo observado en las células FC. Esta reducción fue mayor en las células FT21 respecto a las células FC al añadir los pro-oxidantes AAPH y t-BHP. El pro-oxidante AAPH provocó en las células FT21 una disminución del 40% ($p < 0,001$) en los niveles intracelulares de ATP, mientras que el pro-oxidante t-BHP los redujo un 17% ($p < 0,001$).

Los resultados del análisis de los niveles de ATP intracelulares a PA se muestran en la Figura 22B. Al analizar los niveles de ATP intracelulares en ambos tipos de células en condiciones basales, se observaron diferencias similares a las de PB, es decir, se produjo una disminución significativa del 13% ($p < 0,05$) en las células FT21; sin embargo, al añadir el pro-oxidante AAPH, la disminución en las células FT21 fue del 18% ($p < 0,001$), que es una reducción menor que la producida a PB, mientras que el pro-oxidante t-BHP redujo significativamente en un 15% ($p < 0,01$) el contenido de ATP en las células FT21.

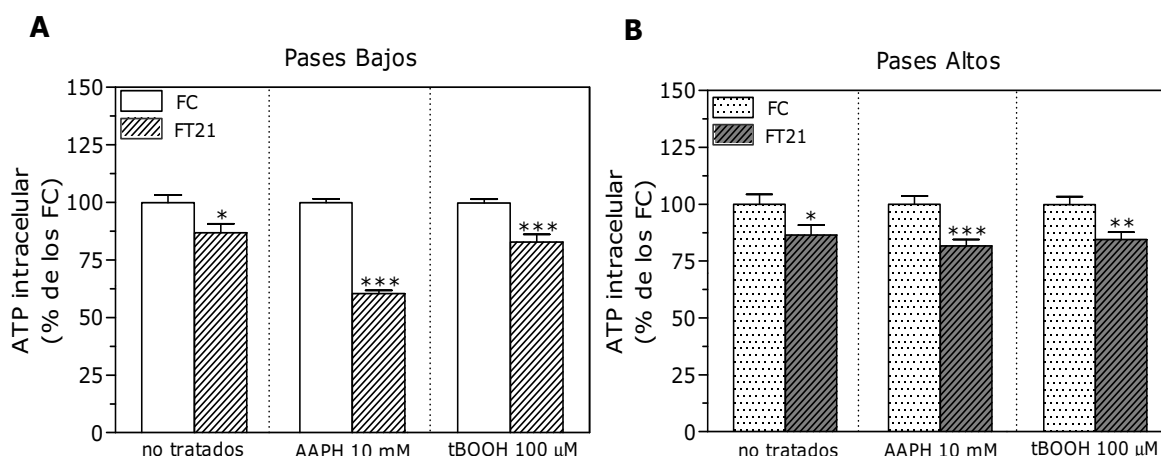


Figura 22. Determinación de los niveles de ATP intracelulares en fibroblastos con trisomía 21 (FT21) y control (FC). Los niveles intracelulares de ATP se valoraron a pases bajos (3-7) (A) y altos (8-12) (B), en condiciones basales (no tratados), o tras su incubación con dos pro-oxidantes AAPH y t-BHP. Los valores de las medias \pm EEM se expresaron en porcentaje respecto a los FC en cada tratamiento pro-oxidante y en condiciones basales, siendo los niveles intracelulares de ATP en los FC el 100%. Las diferencias significativas entre FC y FT21 fueron determinadas mediante el test t-Student; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

3.3 Detección del anión superóxido mitocondrial y de la red mitocondrial

La producción intracelular de ATP puede verse alterada por un exceso de ROS generados en la CTE de las mitocondrias, por ello, se detectaron los radicales superóxidos ($O_2^{\bullet-}$) generados en la CTE en ambos tipos células durante el proceso de replicación celular *in vitro*, es decir, a pases bajos (PB, 3-7) y pases altos (PA, 8-12). Para detectar la formación de los radicales superóxidos ($O_2^{\bullet-}$) mitocondriales y la red mitocondrial en las células FT21 y FC, se utilizaron dos sondas fluorescentes. La sonda fluorescente *MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide Indicator* para detectar el radical $O_2^{\bullet-}$ mitocondrial, que penetra rápidamente en las mitocondrias siendo oxidada por este radical y no por otros RL, y la sonda fluorescente *MitoTracker® Green FM* que se une a las mitocondrias. Se utilizaron fibroblastos en condiciones basales (no tratados) y tratados con el pro-oxidante t-BHP, ya que mostraron las mayores diferencias significativas en la producción intracelular de ROS entre las células FT21 y FC, tanto a PB como a PA.

Los resultados de la detección de las señales de fluorescencia a PB se muestran en la Figura 23A. La detección de los radicales $O_2^{\bullet-}$ mitocondriales en ambos tipos de células y en condiciones basales reveló una mayor señal de fluorescencia roja en las células FT21 respecto a las células FC. Al añadir el pro-oxidante t-BHP a ambos tipos células, la intensidad de la señal fluorescente roja aumentó de forma más acusada en las células FT21, debido al incremento del radical $O_2^{\bullet-}$ mitocondrial. Además, las señales fluorescentes rojas de ambos tipos celulares con el t-BHP eran más intensas que en condiciones basales.

Se añadió la sonda fluorescente *MitoTracker® Green FM* para detectar la red mitocondrial. Esto se hizo para relacionar la producción del radical $O_2^{\bullet-}$ con el lugar en el cual se produce, la CTE de las mitocondrias. Se observó un incremento generalizado y bastante acusado en las células FT21 respecto a las células FC, ya sea en condiciones basales (no tratadas) como al añadir el pro-oxidante t-BHP. Además, la colocalización de las dos sondas mostró que la producción del radical $O_2^{\bullet-}$ se produce en las mitocondrias con mayor intensidad en las células FT21, tanto en condiciones basales como con el pro-oxidante t-BHP.

Los resultados de la detección de las señales de fluorescencia a PA se muestran en la Figura 23B. En relación a la producción del radical $O_2^{\bullet-}$ mitocondrial, observamos que las células FT21 en condiciones basales producían una señal de fluorescencia roja mayor y con más intensidad que las células FC. Al tratar ambos tipos de células con el pro-oxidante t-BHP, se observó el 100% de las células FT21 con señal fluorescente roja, distribuida homogéneamente en toda la célula y con mayor intensidad que en las células FC. Al comparar estos resultados con los producidos en ambos tipos de células

en condiciones basales, pudimos observar como es mayor y más intensa en las células tratadas con el pro-oxidante t-BHP.

Al añadir la sonda fluorescente *MitoTracker® Green FM*, pudimos observar de forma similar a lo ocurrido a PB un incremento generalizado y bastante acusado de la señal de fluorescencia verde en las células FT21, ya sea para los fibroblastos en condiciones basales como para los fibroblastos tratados con t-BHP. Al mismo tiempo, el incremento fue mayor a PA que a PB para ambos tipos de células, ya sea en condiciones basales como con el pro-oxidante t-BHP. Por otra parte, la colocalización de las dos sondas mostró que la producción de los radicales $O_2^{\bullet-}$ mitocondriales es mayor en las células FT21 que en las FC. Además, la intensidad de ambas fluorescencias fue mayor en las células tratadas con el pro-oxidante t-BHP que en condiciones basales. De la misma forma ocurrió al comparar los resultados a PA respecto a PB.

Al igual que ocurrió con la detección de los peróxidos intracelulares por microscopía de fluorescencia, ambas sondas nos ayudaron a observar un efecto con dos consecuencias, como son la reducción del número de células y la alteración de la morfología celular. Estos cambios se produjeron en las células FT21 en condiciones basales y al añadir el pro-oxidante t-BHP sobre ambos tipos de células, afectando en mayor grado a las células FT21, tanto a PB como a PA.

4. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICA INTRACELULAR (SOD, GPX Y CAT) EN FIBROBLASTOS CON TRISOMÍA 21 (FT21) Y CONTROL (FC)

La SOD1 es una enzima con función antioxidante que se diferencia de las otras dos isoformas por su localización, citoplasmática y en el espacio intermembrana de la mitocondria, además de presentar un centro activo de Cu/Zn fundamental para su actividad antioxidante. Por su parte, la SOD2 presenta localización mitocondrial y un centro activo Mn^{2+} , ejerciendo su actividad detoxificante a nivel de la cadena de transporte de electrones (CTE) mitocondrial. Ambas SODs son capaces de eliminar el radical $O_2^{\bullet-}$ reduciendo el estrés oxidativo, pero generando, a su vez, otra especie reactiva de oxígeno como es el H_2O_2 . Este último es eliminado por otras dos enzimas antioxidantes, la GPx y la CAT, que lo transforman en H_2O .

En los fibroblastos FT21 y FC se valoró la expresión a nivel de mRNA, de proteína y las actividades enzimáticas antioxidantes intracelulares SODs, GPx y CAT en condiciones basales, con el objetivo de comprobar si el aumento significativo en la producción intracelular de ROS en las células FT21 está determinado por el aumento en la ratio enzimática antioxidante SOD/GPX+CAT. Además, se estudió la influencia de la senescencia replicativa sobre las enzimas antioxidantes.

RESULTADOS

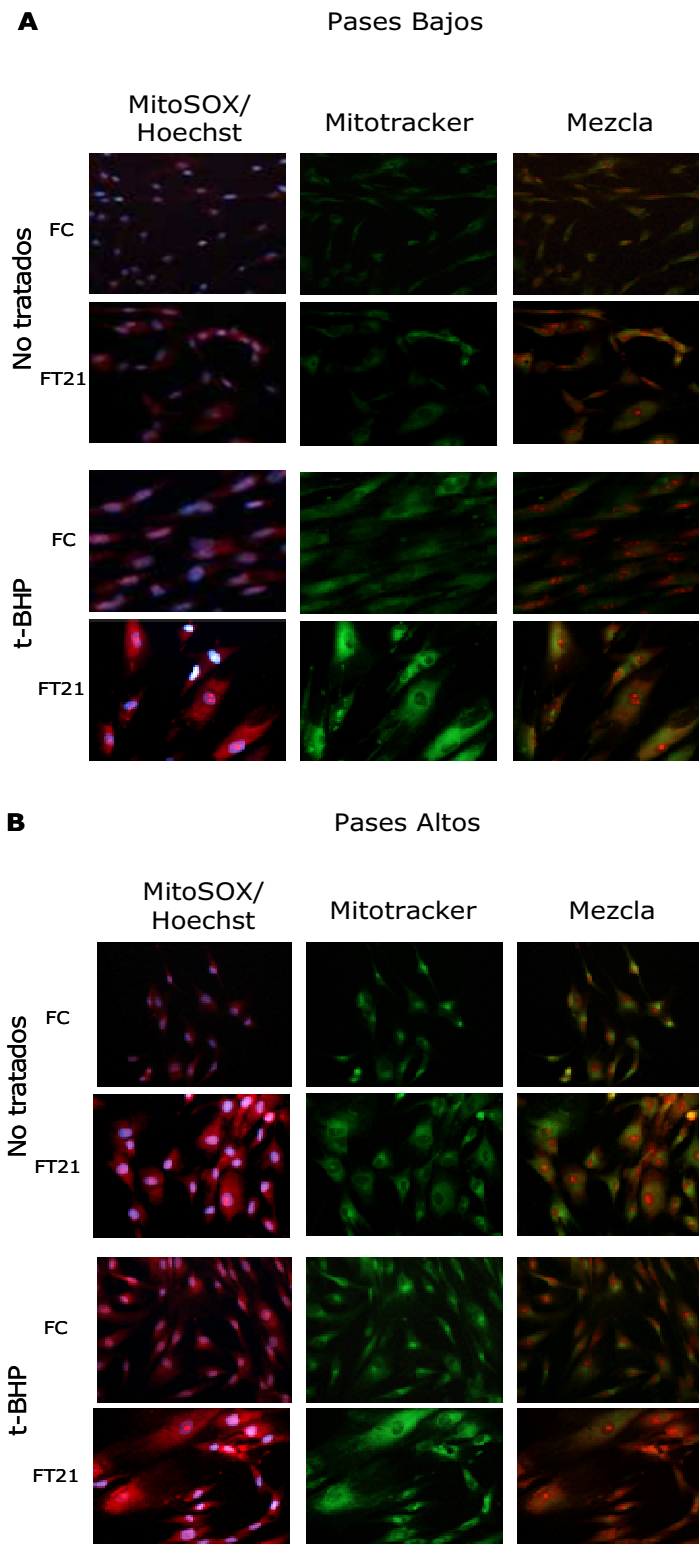


Figura 23. Detección del anión superóxido (O_2^-) mitocondrial y de la red o masa mitocondrial por medio de las sondas fluorescente *MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide Indicator* y *MitoTracker® Green FM*, respectivamente, en fibroblastos con trisomía 21 (FT21) y control (FC) por microscopía de fluorescencia. Ambos tipos celulares son tratadas con el pro-oxidante (t-BHP) y se utilizan los dos tipos de células en condiciones basales (no tratadas), tanto a pases bajos (**A**) como a pases altos (**B**). La señal fluorescente roja corresponde a la oxidación de la sonda *MitoSOX™* en respuesta a la producción mitocondrial del radical superóxido (O_2^-), la señal fluorescente azul marca el núcleo celular por medio de la sonda fluorescente *Hoechst*. La señal fluorescente verde corresponde a la detección de la red o masa mitocondrial por medio de la sonda *MitoTracker®*. La mezcla de ambas fluorescencias da una señal fluorescente amarilla que localiza la producción del radical superóxido (O_2^-) en las mitocondrias. Las imágenes están tomadas con un microcopio de fluorescencia a un aumento total de 200X.

4.1 Expresión del mRNA de los genes SOD1, SOD2, GPx y CAT

Los resultados de los niveles de expresión del mRNA para los genes que codifican las enzimas antioxidantes SOD1, SOD2, GPx y CAT a PB se muestran en la figura 24A. La expresión relativa a nivel del mRNA para el gen SOD1 mostró diferencias significativas entre las células FT21 y FC, incrementándose un 122% ($p < 0,001$) en las células FT21. La expresión relativa del mRNA para el gen de la SOD2 fue un 42% menor ($p < 0,05$) en las células FT21 respecto a las células FC. Sin embargo, las expresiones relativas a nivel del mRNA para los genes GPx y CAT no mostraron diferencias entre las células FT21 y FC.

Los resultados de los niveles de expresión del mRNA para los genes que codifican las enzimas antioxidantes SOD1, SOD2, GPx y CAT a PA se muestran en la figura 24B. A medida que avanzó la senescencia replicativa, es decir, con los pases, se observó como la expresión relativa del mRNA para el gen SOD1 seguía mostrando diferencias significativas entre ambos tipos de células. Estas diferencias indicaron un aumento del 59% ($p < 0,05$) en las células FT21, aunque se produjo una disminución del 63% respecto a la producida en los PB. Sin embargo, la expresión relativa del mRNA para el gen SOD2 en las células FT21 se mantenía disminuida un 28% respecto a las células FC, aunque aumentó un 14% respecto a la producida en los PB. El análisis de la expresión del mRNA para el gen GPx mostró un leve aumento en las células FT21 aunque sin diferencias significativas respecto a las células FC. Sin embargo, a diferencia de lo observado a PB, el análisis de la expresión del mRNA para el gen CAT mostró diferencias significativas entre ambos tipos de células al producirse una disminución del 53% ($p < 0,05$) en las células FT21.

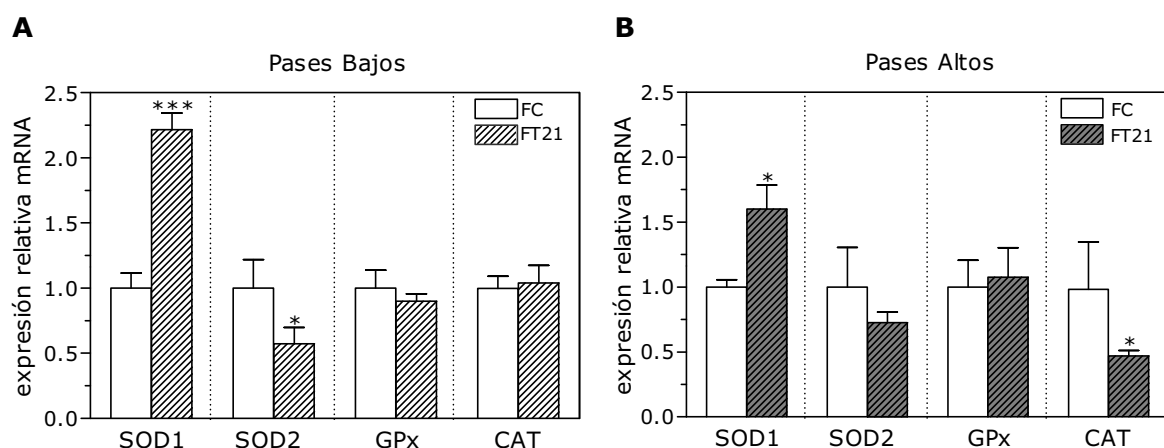


Figura 24. Determinación de los niveles de expresión a nivel de mRNA de los genes que codifican las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa citosólica (SOD1), superóxido dismutasa mitocondrial (SOD2), glutatión peroxidasa dependiente de Se (GPx1) y catalasa (CAT) en fibroblastos con trisomía 21 (FT21) y control (FC). Los niveles de expresión de mRNA de las enzimas SOD1, SOD2, GPx y CAT a pases bajos (3-7) y altos (8-12) en fibroblastos con trisomía 21 (FT21) y control (FC), se calcularon a partir del valor de la expresión relativa del gen diana (RQ) en la muestra problema (en este caso las células FT21), normalizado con el gen de referencia y en relación a un calibrador (en este caso las células FC). Las diferencias significativas entre los fibroblastos FT21 y FC fueron determinadas mediante el test t-Student; *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$.

RESULTADOS

4.2 Cambios en la expresión proteica de las enzimas antioxidantes SOD1 citosólica y SOD2 mitocondrial

Una vez observadas las diferencias en la expresión a nivel del mRNA para los genes que codifican las enzimas antioxidantes, comprobamos si estas diferencias se mantenían al determinar la expresión a nivel de proteína para las enzimas SOD1 y SOD2, ya que estas enzimas mostraban las mayores diferencias. Los resultados de la expresión proteica de la enzima antioxidante SOD1 citosólica a partir del Western Blot en las células FT21 y FC, tanto a PB como a PA, se muestran en la figura 25A. Se encontraron diferencias significativas entre las células FT21 y FC respecto a la expresión proteica de SOD1. Las células FT21 mostraron un aumento significativo del 41% ($p < 0,01$) a PB, mientras que a PA este aumento fue del 35% ($p < 0,05$). Además, con los pases la expresión SOD1 no se incrementó de igual forma en ambos tipos de células, es decir, mientras que el incremento en las células FT21 fue de un 14% debido a que su expresión a PB ya se encontraba elevada significativamente, las células FC lo hicieron en un 19%.

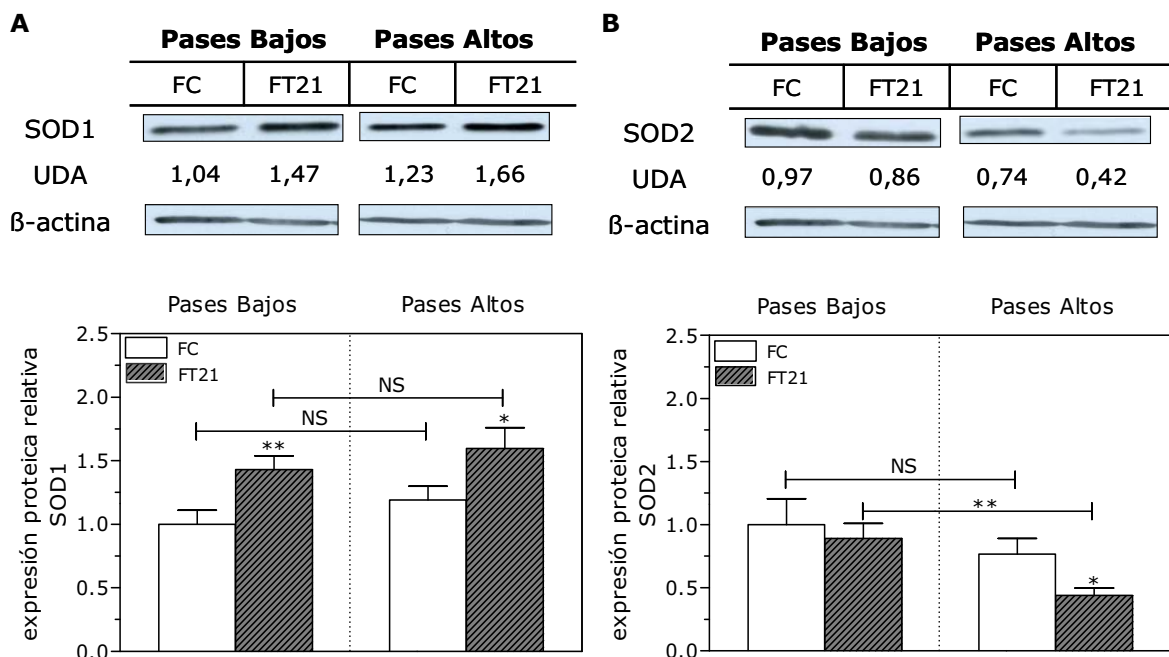


Figura 25. Efecto de los pases celulares en la expresión proteica de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa citosólica (SOD1) y mitocondrial (SOD2) en fibroblastos con trisomía 21 (FT21) y control (FC). La expresión proteica de las enzimas SOD1 (A) y SOD2 (B) se determinó por medio de Western Blot a pases bajos (3-7) y altos (8-12) en lisados celulares de fibroblastos con trisomía 21 (FT21) y control (FC). La expresión de ambas enzimas fue calculada a partir de las densidades ópticas obtenidas por un programa de imagen, expresando los valores de las medias \pm EEM como unidades densitométricas arbitrarias (UDA), normalizadas con la banda de la β -actina. Los niveles de la expresión proteica se expresaron de forma relativa respecto a los fibroblastos control (FC) a pases bajos (PB). Las diferencias significativas entre FT21 y FC fueron determinadas mediante el test t-Student; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

Los resultados de la expresión proteica de la enzima antioxidante SOD2 mitocondrial a partir del Western Blot en las células FT21 y FC, tanto a PB como a PA, se muestran en la figura 25B. La expresión proteica de la enzima SOD2 mostró diferencias entre las células FT21 y FC, pero en este caso sólo fueron significativas a PA. A PB y al contrario de la expresión proteica para la enzima SOD1, la expresión proteica de la SOD2 en las células FT21 disminuyó un 12%, mientras que esa disminución incrementó significativamente hasta un 47% ($p < 0,05$) a PA en las células FT21. Además, la disminución de la expresión SOD2 con los pases fue desigual en ambos tipos de células, es decir, con los pases las células FT21 disminuyeron su expresión de forma significativa en un 51% ($p < 0,01$) debido a que su expresión a PB no se encontraba disminuida significativamente respecto a las células FC, sin embargo las células FC sufrieron una disminución no significativa del 23%.

4.3 Determinación de la actividad enzimática antioxidante SOD, GPx y CAT

Las actividades de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT) fueron determinadas en las células FT21 y FC. Los resultados de las actividades tanto a PB como a PA, se muestran en la figura 26. Al determinar la actividad de la SOD a PB se encontraron diferencias significativas entre las células FT21 y FC, en concreto, un aumento significativo del 35% ($p < 0,01$) en las células FT21, mientras que con los pases, la misma actividad incrementó significativamente hasta un 49% ($p < 0,001$) en las células FT21. Además, ambos tipos de células produjeron un aumento en las actividades SOD respecto a los PB, es decir, las células FT21 mostraron un incremento significativo del 14% ($p < 0,05$), mientras que en las células FC se incrementó tan sólo un 4%.

Los resultados de las actividades de la GPx y CAT no revelaron diferencias entre las células FT21 y FC, aunque hay una disminución de ambas actividades en las células FT21. Las células FT21 presentaron una actividad GPx de un 13% menor a PB respecto a las células FC, mientras que con los pases se produjo un descenso de la actividad del 30%. Sin embargo, se observó que la actividad enzimática GPx disminuyó con los pases en ambos tipos de células, produciéndose un descenso del 39% en los FT21 y un descenso del 13% en los FC, respecto a sus homólogos a PB. Al igual que la actividad de la GPx, la actividad de la CAT disminuyó en las células FT21, encontrándose diferencias significativas entre ambos tipos de células con los pases. A PB, se observó una disminución del 22% en las células FT21, mientras que con los pases, el descenso incrementó un 39% ($p < 0,05$) en las células FT21. Además, con los pases se produjo en ambos tipos celulares un descenso en la actividad CAT, es decir, las células FT21 mostraron un descenso del 29%, mientras que en las células FC el descenso fue del 11%, respecto a sus homólogos a PB.

RESULTADOS

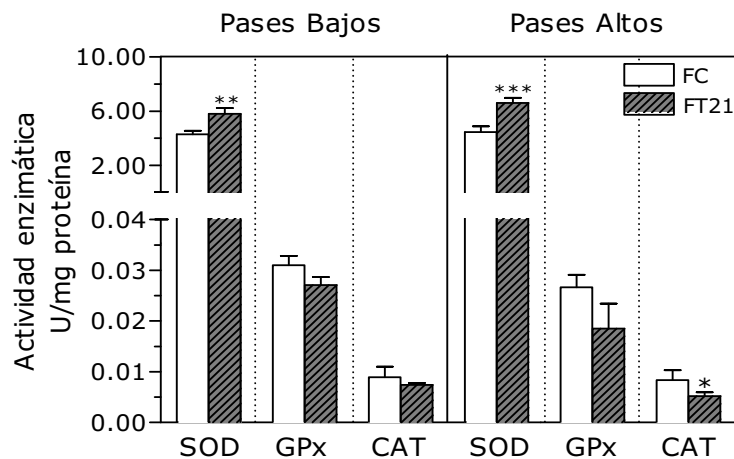


Figura 26. Actividad enzimática antioxidante de la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT) en lisados celulares de fibroblastos con trisomía 21 (FT21) y controles (FC). Las actividades enzimáticas antioxidantes se determinaron en lisados celulares de fibroblastos con trisomía 21 (FT21) y control (FC). Los resultados de la actividad enzimática son expresados como la media \pm EEM en U/mg proteína. Las diferencias significativas entre FT21 y FC fueron determinadas mediante el test t-Student; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

4.4 Ratio enzimática antioxidante SOD/GPx+CAT

A partir de las actividades enzimáticas antioxidantes valoradas en las células FT21 y FC, se calcularon los ratios de sus actividades enzimáticas antioxidantes SOD/GPx, SOD/CAT y SOD/GPx+CAT, mostrándose los resultados en la tabla 14.

	Pases Bajos (3-7)			Pases Altos (8-12)		
	SOD/GPx	SOD/CAT	SOD/GPx+CAT	SOD/GPx	SOD/CAT	SOD/GPx+CAT
FC	1,38	4,82	1,08	1,67	5,32	1,27
FT21	2,13	7,83	1,67	3,57	12,7	2,79
FT21/FC ($\Delta\%$)	54%	62%	56%	114%	139%	119%

Tabla 14. Ratios enzimáticas antioxidantes (SOD/GPx, SOD/CAT y SOD/GPx+CAT) en fibroblastos con trisomía 21 (FT21) y control (FC). Las ratios enzimáticas antioxidantes se calcularon a partir de la determinación de las actividades totales enzimáticas antioxidantes de la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT) a pases bajos (3-7) y altos (8-12). A partir de los valores obtenidos se calculó el incremento (Δ) entre las células FT21 respecto a las células FC, expresándose en porcentaje (%).

Al calcular la ratio de la actividad SOD respecto a la actividad GPx (SOD/GPx) en ambos tipos de células, se observó que aumentaba en los FT21 respecto a los FC. La ratio en las células FT21 se incrementó desde un 54% a PB hasta un 114% a PA. De forma similar, la ratio SOD/CAT aumentó en las células FT21 respecto a las células FC y además, se incrementó respecto a la ratio SOD/GPx en ambos tipos de células, ya que la actividad CAT está más reducida que la actividad GPx. La ratio SOD/CAT en las células FT21 incrementó desde un 62% a PB hasta un 139% a PA. También se calculó la ratio de la actividad enzimática SOD respecto a la suma de las dos

actividades enzimáticas GPx y CAT (SOD/GPx+CAT), ya que estas dos enzimas cooperan para transformar el H₂O₂ en productos no tóxicos y no generar más ROS peligrosos que sean capaces de producir daño oxidativo a las biomoléculas. Esta ratio incrementó en las células FT21 desde un 56% a PB hasta un 119% a PA.

Los resultados de las 3 ratios enzimáticas antioxidantes de la tabla 14 fueron relativizados a las células FC a PB y se muestran en la figura 27. Esto se calculó para observar con mayor claridad que las células FT21 tienen aumentadas sus ratios enzimáticas antioxidantes respecto a las células FC, e incluso aumentan a medida que avanza la senescencia replicativa. Tomando como valor 1 las 3 ratios para las células FC a PB, los valores relativizados para las células FT21 a PB revelaron un aumento generalizado del 54%, 62% y 56% para las ratios SOD/GPx, SOD/CAT y SOD/GPx+CAT respectivamente. Además, estas células aumentaron las ratios a PA hasta un 168%, 162% y 167% para las ratios SOD/GPx, SOD/CAT y SOD/GPx+CAT respectivamente. Estos resultados son muy superiores a los producidos en las células FC a PA, las cuales tienen un aumento en sus ratios enzimáticas del 21%, 10% y 18% para las ratios SOD/GPx, SOD/CAT y SOD/GPx+CAT respectivamente.

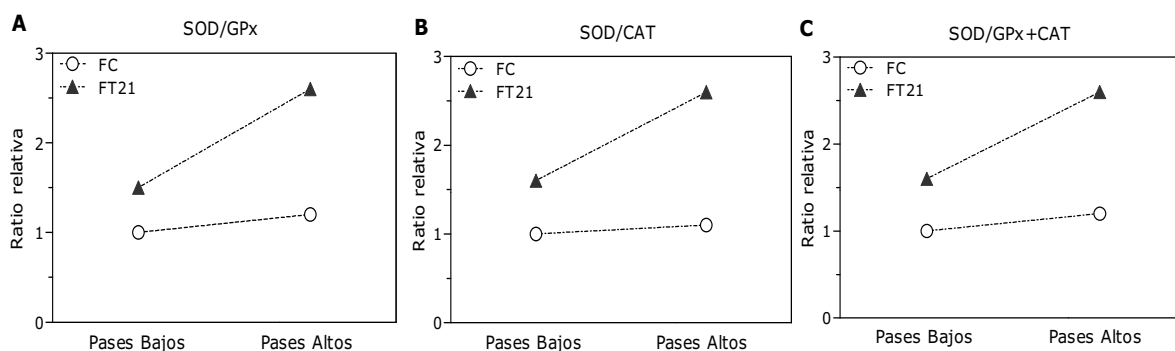


Figura 27. Valores de las ratios enzimáticas antioxidantes (SOD/GPx, SOD/CAT y SOD/GPx+CAT) en fibroblastos con trisomía 21 (FT21) y control (FC). Los valores relativizados de las ratios enzimáticas se muestran a pases bajos (3-7) y a pases altos (8-12). **(A)** Valores de la ratio SOD/GPx relativizados. **(B)** Valores de la ratio SOD/CAT relativizados. **(C)** Valores de la ratio SOD/GPx+CAT relativizados. A partir de los valores obtenidos de la tabla 14, se tomó como valor 1 el de las células FC a pases bajos, a partir de aquí se calculó el valor relativo que muestra las veces que aumentan las ratios enzimáticas antioxidantes para las células FT21 y FC a pases bajos y altos.

5. LIPOPEROXIDACION Y MODIFICACION OXIDATIVA DE PROTEÍNAS CELULARES EN FIBROBLASTOS CON TRISOMÍA 21 (FT21) Y CONTROL (FC)

La excesiva generación de radicales libres en las células provoca peroxidación en los lípidos y como consecuencia biológica se produce daño oxidativo celular. Los RL tienen un efecto citotóxico a través de la lipoperoxidación sobre los PUFAs de las membranas celulares, incrementado su rigidez y el riesgo de ruptura. En el proceso autocatalítico de la lipoperoxidación (LPx) se producen varios productos, entre ellos el malondialdehído (MDA) que se considera un biomarcador importante ya que es el aldehído más abundante de la LPx. Además, los RL son capaces de generar daño oxidativo a las proteínas de forma directa o indirecta modificando su actividad biológica y alterando la susceptibilidad a la degradación. El marcador de daño oxidativo a las proteínas más utilizado son los grupos carbonilo de proteínas (GCP) que se pueden introducir en las proteínas mediante varias vías oxidativas. La unión covalente de algunos aldehídos formados durante la LPx y la glicación no enzimática de las proteínas o la interacción con los productos de oxidación de la glucosa forman GCP en las proteínas.

5.1 Determinación del contenido de malondialdehído (MDA)

Se realizó la cuantificación del MDA por HPLC y se normalizó a la cantidad de proteínas en ambos tipos de células. Los resultados de la cuantificación del MDA en las células FT21 y FC, tanto a PB como a PA se muestran en la figura 28. Al analizar los resultados a PB, no se encontraron diferencias entre ambos tipos de células, aunque a PA aumentó la producción del MDA un 10% en las células FT21 respecto a las células FC. Sin embargo, a medida que avanzó la senescencia replicativa en las células FT21, se produjo un aumento significativo del MDA un 21% ($p < 0,01$), mientras que las células FC lo aumentaron de forma no significativa un 9%. Por tanto, las células FT21 aumentaron el MDA un 12% más que las células FC con los pases.

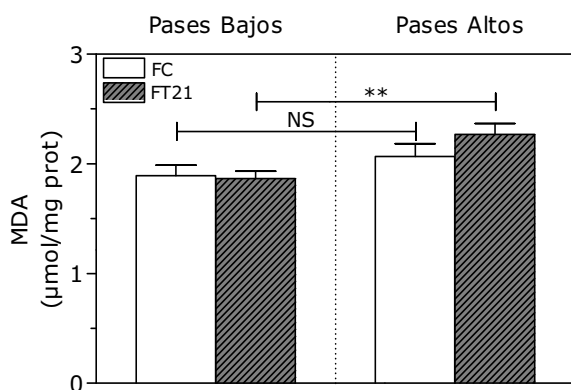


Figura 28. Contenido de malondialdehído (MDA) en fibroblastos con trisomía 21 (FT21) y control (FC). La determinación de la cantidad del complejo MDA-TBA por HPLC se realizó a pases bajos (3-7) y altos (8-12) en lisados celulares de fibroblastos con trisomía 21 (FT21) y control (FC). Los valores obtenidos se interpolan a una recta patrón conocida. Los valores obtenidos de la concentración de MDA se normalizan a su cantidad proteica celular correspondiente y se expresan como la media \pm EEM de $\mu\text{mol/mg prot}$. Las diferencias significativas entre FT21 y FC fueron determinadas mediante el test t-Student; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

5.2 Detección y cuantificación de proteínas carboniladas

Los resultados del western blot de proteínas carboniladas en las células FT21 y FC, tanto a PB como a PA, se muestran en la figura 29A. De forma general, se observan diferencias significativas entre las células FT21 y FC, mostrando un aumento significativo del 15% ($p < 0,05$) en las células FT21 a PB, mientras que debido a los pases, las células FT21 muestran un aumento significativo del 9% ($p < 0,05$), ya que ambos tipos de células aumentan su contenido en proteínas carboniladas.

Los resultados de las proteínas carboniladas relativizadas a las células FC a PB se muestran en la figura 29B. Al igual que ocurre con el MDA, las proteínas carboniladas aumentan con los pases, aunque en este caso lo hacen significativamente en ambos tipos celulares. Las proteínas carboniladas mostraron un incremento significativo del 14% ($p < 0,05$) en las células FT21, mientras que en las células FC se incrementaron significativamente un 20% ($p < 0,01$). El incremento con los pases fue menor en las células FT21 que en las células FC al encontrarse más elevadas a PB.

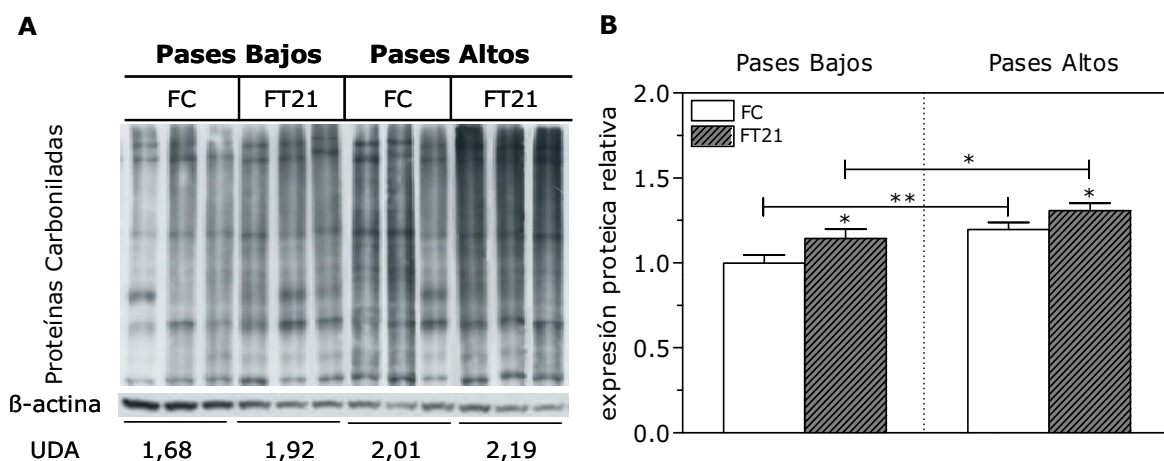


Figura 29. Determinación de las proteínas carboniladas en fibroblastos con trisomía 21 (FT21) y control (FC).

(A) La detección de las proteínas carboniladas se realizó por medio de Western Blot a pases bajos (3-7) y altos (8-12) en lisados celulares de fibroblastos con trisomía 21 (FT21) y control (FC). La expresión fue calculada a partir de las densidades ópticas obtenidas por un programa de imagen, expresando los valores de las medias \pm EEM como unidades densitométricas arbitrarias (UDA), normalizadas con la banda de la β -actina. (B) La cantidad de proteínas carboniladas se expresó de forma relativa respecto a los fibroblastos control (FC) a pases bajos (PB). Las diferencias significativas entre FT21 y FC fueron determinadas mediante el test t-Student; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

6. ESTUDIO DE LA SENESCENCIA CELULAR EN FIBROBLASTOS CON TRISOMÍA 21 (FT21) Y CONTROL (FC)

La senescencia celular es la pérdida irreversible de la capacidad proliferativa en las células, manteniendo un estado metabólicamente activo necesario para su supervivencia. La senescencia se puede dividir en dos subtipos: la senescencia replicativa y la senescencia prematura inducida por estrés (p.e. estrés oxidativo). La producción excesiva de RL *in vitro*, provocada por una sobreexpresión de la SOD1 en las células FT21, puede provocar daño oxidativo a las biomoléculas alterando su función biológica, este estado se ha relacionado con la inducción de la senescencia celular.

6.1 Expresión proteica de p21 y p53

El objetivo fue analizar si existe una posible senescencia prematura en las células FT21 *in vitro*, y si se relaciona con la expresión de p21 y p53 en ambos tipos de células. Se analizó mediante Western Blot la expresión proteica de p21 y p53 en los fibroblastos con trisomía 21 (FT21) y control (FC), tanto a PB como a PA. Los resultados de la expresión proteica de p21 se muestran en la figura 30A. Al analizar los resultados obtenidos por Western Blot, se observó que hay un incremento significativo de la expresión proteica de p21 en las células FT21 respecto a las células FC, de hecho, estas diferencias aumentan con los pases. Los valores de las unidades densitométricas arbitrarias (UDAs) en las bandas de p21 a PB, produjeron un incremento significativo del 18% ($p < 0,05$) en las células FT21, mientras que a PA estas diferencias significativas llegan hasta el 26% ($p < 0,05$). Los resultados de la expresión proteica relativa revelaron que ambos tipos de células aumentaron significativamente la expresión de p21 con la senescencia replicativa, siendo este aumento más acusado en las células FT21. Mientras que en las células FT21 aumentaba la expresión de p21 un 66% ($p < 0,001$), en las células FC aumentó un 31% ($p < 0,05$).

Los resultados de la expresión proteica de p53 se muestran en la figura 30B. Al analizar los resultados obtenidos por Western Blot, se observó que hay un aumento de la expresión proteica de p53 en las células FT21 respecto a las células FC y estas diferencias se incrementaron con los pases. Los valores de las UDAs en las bandas de p53 a PB, produjeron un aumento del 6% en las células FT21, mientras que a PA estas diferencias llegan hasta el 14%. Al analizar la expresión proteica relativa de p53, los resultados mostraron un incremento no significativo en ambos tipos de células con la senescencia replicativa, siendo del 15% en las células FT21, mientras que en las células FC fue del 8%.

Uno de los datos a tener en cuenta, es que los incrementos mostrados con la senescencia replicativa entre las células FT21 y FC para las expresiones de p21 y p53 son iguales, es decir, el incremento producido con los pases en las células FT21 respecto a las células FC en las expresiones de p21 y p53 es del 8%. Además, el incremento de las expresiones de p21 y p53 en las células FT21 con los pases es el doble que en las células FC.

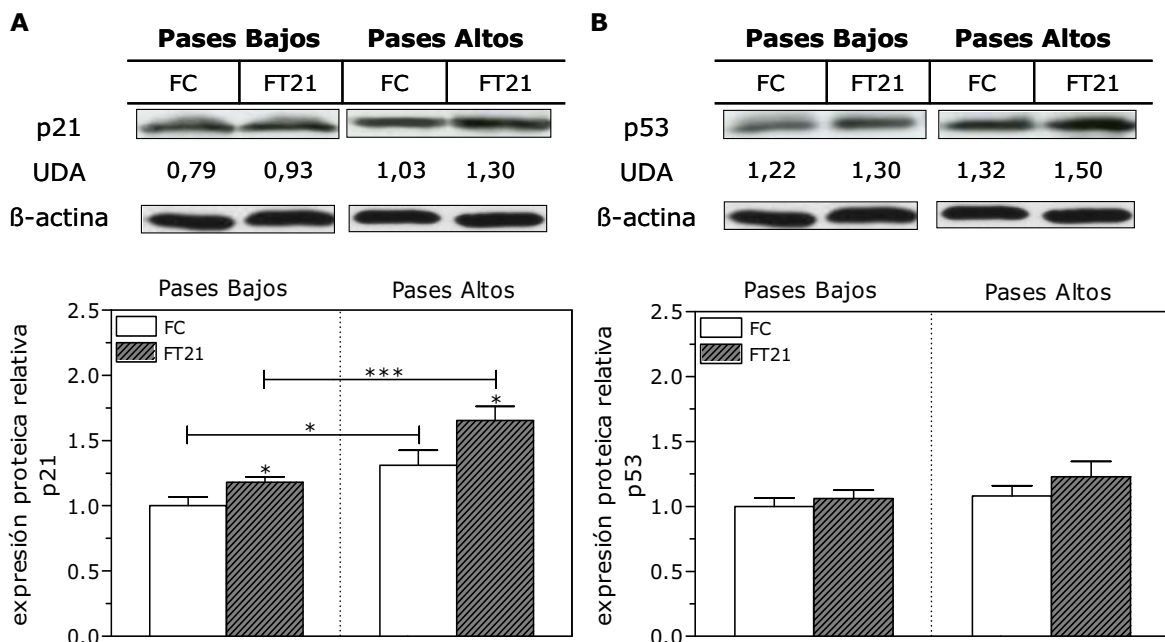


Figura 30. Determinación de las expresiones proteicas de p21 y de p53 mediante Western Blot en fibroblastos con trisomía 21 (FT21) y control (FC). La expresión proteica de p21 (A) y de p53 (B) se determinó por medio de Western Blot a pases bajos (3-7) y altos (8-12) en lisados celulares de fibroblastos con trisomía 21 (FT21) y control (FC). La expresión de ambas proteínas fue calculada a partir de las densidades ópticas obtenidas por un programa de imagen, expresando los valores de las medias \pm EEM como unidades densitométricas arbitrarias (UDA), normalizadas con la banda de la β -actina. La expresión proteica de p21 y de p53 se expresó de forma relativa respecto a los fibroblastos control (FC) a pases bajos (PB). Las diferencias significativas entre FT21 y FC fueron determinadas mediante el test t-Student, mostrando la siguiente significación; *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$.

Se llevó a cabo un análisis de la expresión proteica de p21 y p53 mediante ELISA, relativizando los resultados a las células FC a PB, mostrándose en la figura 31. Los resultados revelaron un aumento en la expresión de p21 y p53 en las células FT21 respecto a las células FC. A PB, se produce un aumento del 15% en las células FT21 para las expresiones de p21 y p53 respecto a las células FC. Sin embargo, a PA se produce un aumento menor en las células FT21 respecto a las células FC. Para la expresión de p53 el aumento es del 8%, mientras que para la expresión de p21 el aumento es del 11%.

De forma similar a los resultados obtenidos mediante el Western Blot, al avanzar la senescencia replicativa, las células FT21 mostraron un aumento significativo del 30% ($p < 0,05$) en la expresión de p21, mientras que las células FC

RESULTADOS

mostraron un aumento significativo del 35% ($p < 0,05$), aunque las células FT21 tienen una mayor expresión proteica de p21.

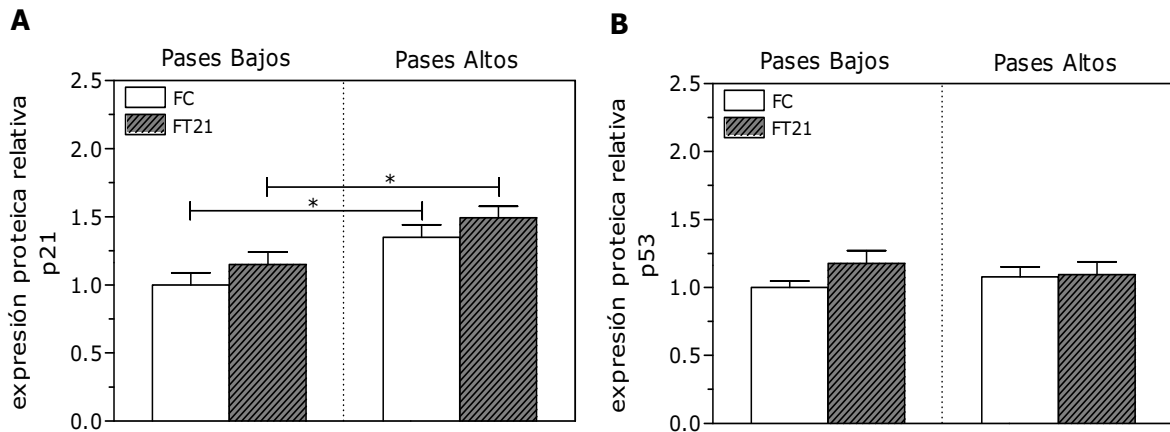


Figura 31. Determinación de las expresiones proteicas de p21 y de p53 mediante ELISA en fibroblastos con trisomía 21 (FT21) y control (FC). La expresión proteica se determinó por medio de un kit de ELISA para p21 (A) y p53 (B) a pases bajos (3-7) y altos (8-12) en lisados celulares de fibroblastos con trisomía 21 (FT21) y control (FC). Se determinó la absorbancia (DO) y los valores de las medias \pm EEM se expresaron como la expresión relativa respecto a las células FC a pases bajos. Las diferencias significativas entre FT21 y FC fueron determinadas mediante el test t-Student; *: $p < 0,05$.

6.2 Actividad β -Galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -Gal)

La SA- β -Gal se detectó en las células FT21 y FC a pases bajos (3-7) y a pases altos (8-12) para analizar si podría existir una senescencia celular prematura en las células FT21 *in vitro*. Los resultados de las fotografías para la actividad SA- β -Gal se tomaron con un microscopio de contraste de fases. Las fotografías de la figura 32A mostraron diferencias entre las células FT21 y FC. A PB se detectó un mayor número de células FT21 de color azul y por tanto con una mayor actividad SA- β -Gal, mostrando el fenotipo senescente característico, un volumen celular grande con una morfología irregular. Con los pases, el fenotipo senescente se observó en un mayor número de células FT21 y FC, aunque llegó a presentarse en el 100% de las células FT21.

A continuación se cuantificaron todas las células positivas para la actividad SA- β -Gal (mínimo 5 campos al azar y 50-100 células por campo) para ambos tipos celulares y se calculó el porcentaje de incremento que se produjo con los pases para ambos tipos de células. Los resultados de la cuantificación de la actividad SA- β -Gal y expresados en porcentaje de PB se muestran en la figura 32B, encontrándose diferencias significativas entre las células FT21 y FC. Las células FT21 presentaron un incremento del 255% en cuanto a células SA- β -Gal positivas durante la senescencia replicativa, mientras que las células FC mostraron un incremento del 194%. Por tanto, al comparar estos incrementos entre ambos tipos celulares, se observó un aumento significativo del 31% ($p < 0,05$) para las células FT21.

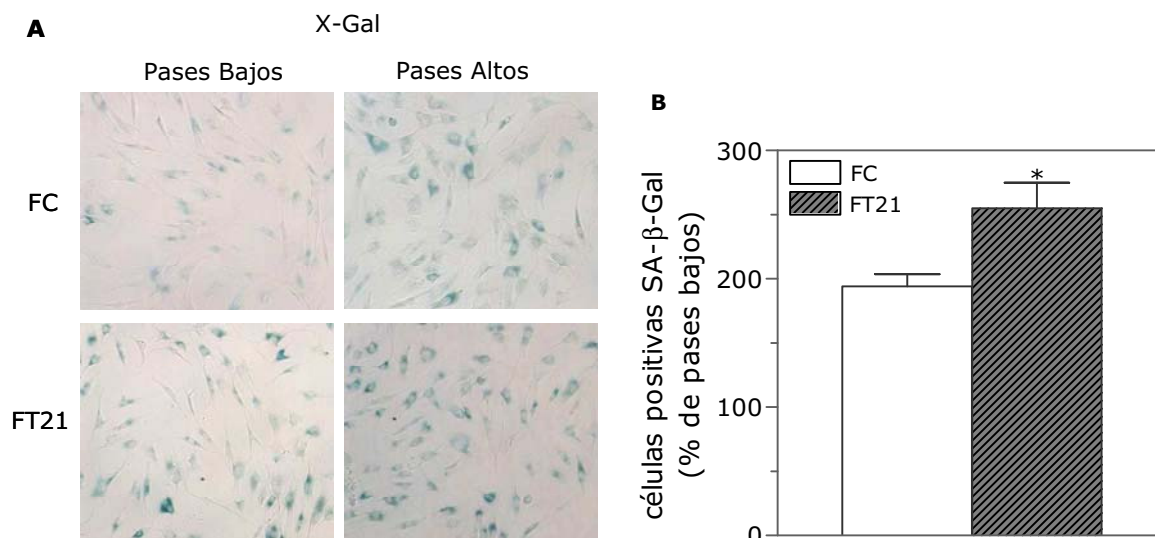


Figura 32. Detección de la actividad SA-β-Galactosidasa por microscopía de contraste de fases y conteo de las células SA-β-Gal positivas en los fibroblastos con trisomía 21 (FT21) y control (FC). (A) La actividad SA-β-Galactosidasa se detectó en las células FT21 y FC, a pases bajos (3-7) y a pases altos (8-12). Las imágenes están tomadas con un microscopio de contraste de fases a un aumento total de 200X. (B) Se contaron un mínimo de 5 campos al azar y de 50-100 células por campo, a continuación se calculó el porcentaje de incremento que se produjo con los pases para ambos tipos celulares. Las diferencias significativas entre FT21 y FC fueron determinadas mediante el test t-Student; *: p<0.05.

Paralelamente, determinamos la actividad β-Galactosidasa lisosomal a pH 6 en ambos tipos de células, tanto a PB como a PA, mostrando los resultados en la Tabla 15. Las mayores diferencias entre ambos tipos de células se produjeron a PB, ya que las células FT21 mostraron un aumento de la actividad β-Galactosidasa lisosomal del 18%, mientras que a PA estas diferencias se redujeron hasta un 3%.

Actividad (nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹)	β-Galactosidasa (pH 6)	
	Pases Bajos	Pases Altos
FC	6,30 ± 0,4	7,97 ± 0,7
FT21	7,42 ± 0,9	8,19 ± 0,6
FT21/FC (Δ%)	18%	3%

Tabla 15. Actividad β-Galactosidasa en fibroblastos con trisomía 21 (FT21) y control (FC). La actividad β-Galactosidasa lisosomal a pH 6 se determinó en los fibroblastos con trisomía 21 (FT21) y control (FC) a pases bajos (3-7) y a pases altos (8-12). Las actividades fueron corregidas por el contenido proteico de los homogenados celulares y los resultados son expresados como las medias ± EEM en nmol·min⁻¹·mg⁻¹.

RESULTADOS

6.3 Determinación de enzimas lisosomales implicadas en la senescencia replicativa

Para determinar si en la senescencia replicativa *in vitro* hay un aumento de la actividad enzimática lisosomal, se determinaron las actividades de la β -galactosidasa a pH 4 y β -glucuronidasa a pH 3,5 en las células FT21 y FC, tanto a PB como a PA (Tabla 16). Los resultados indican una disminución no significativa de la actividad β -galactosidasa (pH 4) en las células FT21 respecto a las células FC, tanto a PB como a PA. Además, ambos tipos de células disminuyen esta actividad con la senescencia replicativa.

La actividad β -glucuronidasa (pH 3,5) aumentó en las células FT21 un 7% respecto a las células FC a PB, sin embargo, con los pases disminuyó un 9%. Además, esta actividad aumenta en ambos tipos de células debido a la senescencia replicativa, aunque en las células FT21 lo hace en un 32% y en las células FC lo hace de forma significativa un 55% ($p < 0,05$).

Actividad (nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹)	FC		FT21	
	Pases Bajos	Pases Altos	Pases Bajos	Pases Altos
β -Galactosidasa (pH 4)	24,88 ± 4,6	23,42 ± 2,2	23,68 ± 2,3	21,05 ± 2,0
β -Glucuronidasa (pH 3,5)	4,22 ± 0,5	6,54 ± 0,7 ^a	4,53 ± 0,7	5,96 ± 0,7

Tabla 16. Efecto de la senescencia replicativa en las hidrolasas lisosomales en fibroblastos con trisomía 21 (FT21) y control (FC). Las actividades de las enzimas lisosomales β -galactosidasa (pH 4) y β -glucuronidasa (pH 3,5) se determinaron a pases bajos (3-7) y altos (8-12) en lisados celulares de fibroblastos con trisomía 21 (FT21) y control (FC). Las actividades fueron corregidas por el contenido proteico de los homogenados celulares y los resultados son expresados como las medias \pm EEM en nmol·min⁻¹·mg⁻¹. Las diferencias significativas entre FT21 y FC fueron determinadas mediante el test t-Student; *: $p < 0,05$.

6.4 Determinación del citocromo C y caspasa 9

El citocromo C es una proteína que participa en la fosforilación oxidativa y es capaz de iniciar la muerte celular por apoptosis. En respuesta a señales apoptóticas, como daño al DNA por estrés oxidativo, el citocromo C se puede liberar al citosol a través de un canal formado en la membrana mitocondrial para activar Apaf-1 que se une a la pro-caspasa 9, ésta se activa (caspasa 9 activada) y se produce apoptosis por la vía de las caspasas. Los resultados anteriores nos indican que las células FT21 tienen aumentados los marcadores de senescencia, como son la expresión de p21 y la SA- β -Gal, así que determinamos el citocromo C y la caspasa 9 que son indicadores de muerte celular por apoptosis.

Los resultados de la cuantificación del citocromo C en las células FT21 y FC por ELISA se muestran en la figura 33. La cuantificación del citocromo C indica que hay diferencias significativas entre ambos tipos de células tanto a PB como a PA. Las

células FT21 mostraron un descenso significativo del citocromo C de un 51% ($p < 0,01$) a PB, mientras que a PA el descenso significativo fue del 31% ($p < 0,05$). Además, al avanzar la senescencia replicativa, la concentración de citocromo C aumenta significativamente un 16% ($p < 0,05$) en las células FT21. Las células FT21 tienen una concentración de citocromo C significativamente menor que las células FC, tanto a PB como a PA.

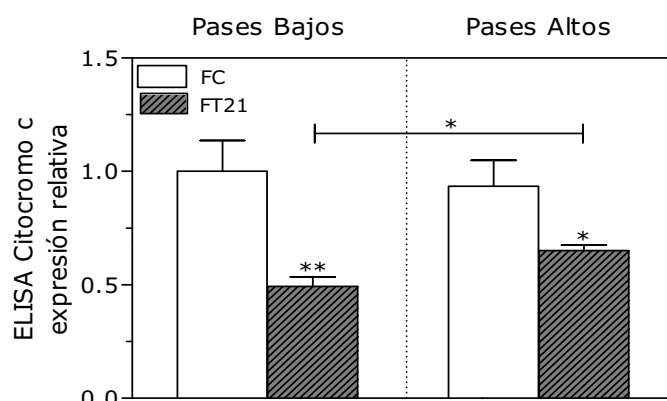


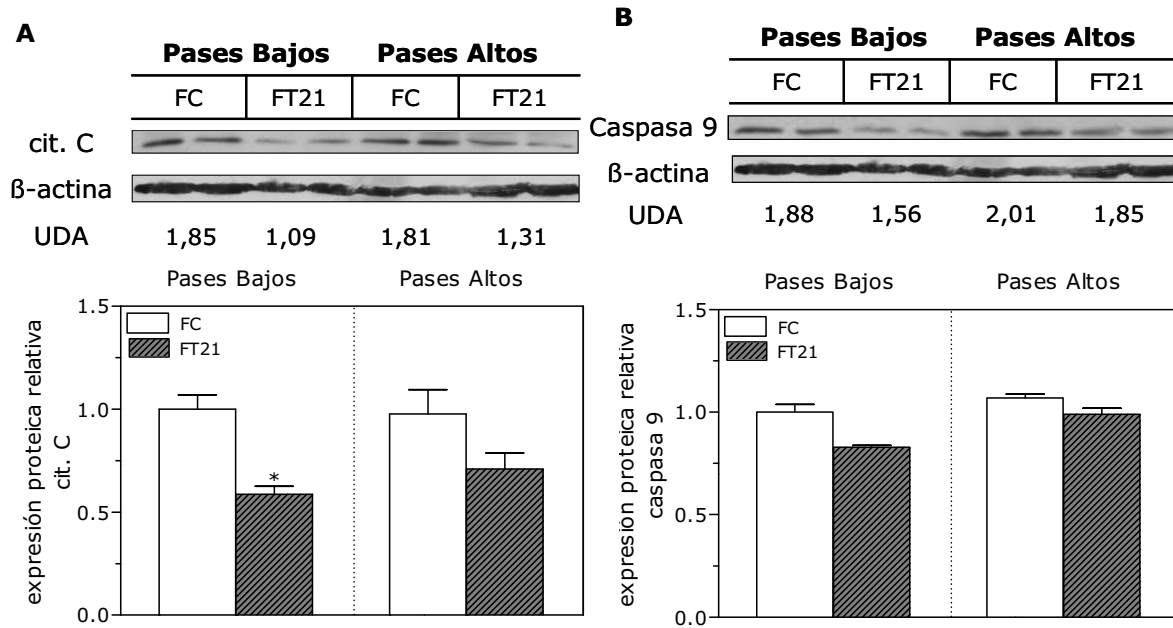
Figura 33. Determinación de la concentración de citocromo C mediante ELISA en fibroblastos con trisomía 21 (FT21) y control (FC). Las concentraciones de citocromo C se determinaron por ELISA a pases bajos (3-7) y altos (8-12) en lisados celulares de fibroblastos con trisomía 21 (FT21) y control (FC). Se determinó la absorbancia (DO) y a continuación se calculó las medias \pm EEM para determinar las concentraciones de citocromo C. Las concentraciones se expresaron de forma relativa respecto a los FC a PB. Las diferencias significativas entre las células FT21 y FC fueron determinadas mediante el test t-Student; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.


A continuación se determinó por western blot la expresión del citocromo C y de la caspasa 9 en las células FT21 y FC, esta última por si estuviera activada por el citocromo C. Los resultados del citocromo C en las células FT21 y FC se muestran en la figura 34A. Al igual que los resultados determinados por ELISA, las células FT21 mostraron un descenso del citocromo C respecto a las células FC, sin embargo las diferencias entre ambos tipos de células sólo fueron significativas a PB. Los resultados mostraron un descenso significativo del citocromo C en las células FT21 del 41% ($p < 0,05$), mientras que a PA el descenso fue de 28%. Además, con la senescencia replicativa, la cantidad de citocromo C aumenta un 20% en las células FT21, mientras que se mantiene constante en las células FC.

Los resultados de la caspasa 9 activada en las células FT21 y FC se muestran en la figura 34B. Para la caspasa 9 activada se encontraron resultados similares al citocromo C, es decir, hay diferencias entre las células FT21 y FC con un descenso en la expresión proteica de la caspasa 9 activada en las células FT21. De hecho, estos

RESULTADOS

resultados están relacionados con los resultados del citocromo C anteriores, ya que éste es el responsable de activar a la caspasa 9 a través de Apaf-1.



A microscopic image showing plant cells with prominent orange chloroplasts. The cells are arranged in a grid-like pattern, and the chloroplasts are scattered throughout the cytoplasm. The background is dark, making the cells and chloroplasts stand out.

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN

El síndrome de Down, la aneuploidía más frecuente causada por la trisomía del cromosoma 21, está asociada con varias manifestaciones clínicas, entre otras: retraso mental, enfermedad de Alzheimer y envejecimiento prematuro. En el SD existe una gran variabilidad fenotípica que puede ser explicada, al menos en parte, por la "hipótesis de la dosis génica", es decir, la sobreexpresión de algunos genes codificados en el cromosoma HSA21 podría contribuir al fenotipo del SD. Uno de estos genes sobreexpresados en el HSA21 es el que codifica para la enzima SOD1, el cual ha sido propuesto como potencial responsable de los ROS en el SD. El aumento de los ROS puede provocar un estado de estrés oxidativo acompañado de una disfunción mitocondrial, ambos son dos mecanismos que se producen en una gran variedad de tejidos y tipos celulares durante el desarrollo embrionario de forma prematura, y por tanto, podrían estar implicados en el desarrollo de algunas características fenotípicas del SD [171, 176, 218]. Sin embargo, no está totalmente aclarada la relación directa entre la causa y efecto de estos mecanismos moleculares con algunas manifestaciones clínicas del SD. Estos hechos nos han llevado a estudiar la posible relación entre una de las características fenotípicas del SD, el envejecimiento prematuro, con el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial; por lo que nos planteamos algunas preguntas que podrían abrir líneas de investigación clínica. ¿Pueden ser ambos mecanismos moleculares determinantes en la aparición fenotípica del envejecimiento prematuro en el SD y en su evolución? ¿Qué papel juegan estos mecanismos en el envejecimiento prematuro?. Para responder a estas cuestiones, hemos utilizado en este trabajo fibroblastos de piel procedentes de fetos con SD (FT21) y de fetos control (FC).

Los organismos aerobios generan una gran cantidad de radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno y nitrógeno relacionadas. Tal vez la más ubicua de estas especies es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que se encuentra en niveles valorables en todos los tejidos animales. A nivel milimolar, o superior, el H_2O_2 es claramente un oxidante tóxico, causando estrés oxidativo. Uno de los principales efectos del estrés oxidativo es la modificación de proteínas celulares, que pueden bloquear las actividades enzimáticas, inhibir las funciones celulares normales, e incluso causar la apoptosis celular o necrosis [270]. Como primera línea de defensa frente al estrés oxidativo, las células poseen una gama de compuestos y enzimas antioxidantes cuya función es mantener bajos los niveles de radicales libres y otros oxidantes reactivos. En principio las defensas antioxidantes primarias deberían ser suficientes en condiciones de niveles de oxidantes bajos o normales, pero no, durante períodos de estrés oxidativo agudo, repetido o crónico. En estas situaciones se produce daño oxidativo a las proteínas, que si no son eliminadas rápidamente, se acumulan con el tiempo y causar un grave deterioro de la función celular [120, 127, 292]. En los fibroblastos FT21, al presentar tres copias para el gen SOD1, se podría provocar un

DISCUSIÓN

desequilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes, generando un estado de estrés oxidativo que puede originar alteraciones celulares y conducir a la aparición precoz del fenotipo senescente.

En este estudio hemos determinado los niveles intracelulares de ROS en los fibroblastos FT21 por medio de una sonda fluorescente y los hemos comparado con fibroblastos FC. Los resultados de este estudio muestran que existe una producción elevada de ROS en los fibroblastos FT21 en condiciones basales, y que la producción aumenta con los pases. Aunque se suele interpretar que esta sonda fluorescente detecta los niveles de H_2O_2 , en realidad detecta los peróxidos celulares y no es específica de ningún radical libre en particular, ya que la sensibilidad de la sonda varía según la especie reactiva a la cual se una [286] y de hecho se considera más bien que el ensayo de la diclorofluoresceína cuantifica el estrés oxidativo [293]. Por tanto, nuestros resultados indican que se produce una situación de estrés oxidativo en las células FT21, que podría ser originado por la sobreexpresión de la enzima SOD1 y probablemente debido a que el equilibrio de la capacidad antioxidante endógena que forman las enzimas SOD, GPx y CAT se ha alterado y no funciona eficientemente. De hecho, estudios realizados en células murinas NIH3T3 transfectadas con el gen SOD1 y en fibroblastos con SD han demostrado que la disminución de la capacidad endógena antioxidante se debe a una alteración en la ratio enzimática antioxidante SOD/GPx+CAT, lo que provoca un aumento del 44% en la generación de H_2O_2 respecto a las células control y posterior transformación de éste en otros ROS [180]. Sin embargo, en nuestros resultados no se observa un aumento tan elevado en condiciones basales ya que los fibroblastos empleados en nuestro estudio proceden de fetos que podrían tener diferentes grados de variabilidad de la trisomía 21, así que es posible que la dosis génica del SOD1 de nuestra población de estudio no sea homogénea. Efectivamente, en estudios donde se ha realizado un análisis de la expresión en muestras de forma individual, se observa que la mayoría de los genes presentan variabilidad interindividual tanto en células con trisomía del cromosoma HSA21 como en las células control, si bien al analizar el promedio, se revela una sobreexpresión en el conjunto de las células trisómicas [48].

El peróxido de hidrógeno estimula la autooxidación de hidroquinonas y permite la producción del radical OH^\bullet especialmente en presencia de metales de transición. El radical OH^\bullet daña varias estructuras celulares (proteínas, lípidos, DNA y RNA) y altera las bases heterocíclicas que contienen nitrógeno e induce enlaces cruzados y roturas en las cadenas de DNA [75]. Se ha descrito que el exceso de ROS podría incrementar el daño oxidativo al nDNA, causar una reparación defectuosa en el mtDNA que podría traducirse en disfunción mitocondrial, dando lugar al desarrollo del fenotipo característico de la senescencia celular [116, 117]. Así, la sensibilidad de las células a

los ROS depende, aparentemente, de la relación entre la SOD y el binomio (GPx+CAT) más que de las cantidades absolutas de antioxidantes individuales. Las células FT21 podrían ser más sensibles al estrés oxidativo, sensibilidad que podría deberse a alteraciones en los procesos de detoxificación del H₂O₂.

La adición de dos agentes pro-oxidantes en ambos tipos de células demostró que producían un incremento en la cantidad de ROS respecto a las condiciones basales. De hecho, estos agentes provocaron una mayor producción de ROS en las células FT21 respecto a las células FC, tanto a PB como a PA, indicando que las células FT21 tienen una mayor susceptibilidad a los pro-oxidantes. A pesar de que las células FT21 mantenían significativamente elevada la producción de ROS respecto a las células FC a PA, observamos una disminución en la producción de ROS en ambos tipos de células, que podría ser debido al descenso simultáneo en el contenido de proteínas celulares. Sin embargo, este descenso en la cantidad de proteínas producido al avanzar la senescencia replicativa afectó en mayor grado a las células FT21, y podría estar ocasionado por una reducción en la proliferación celular al producirse un exceso de ROS, tanto en condiciones basales como al añadir ambos pro-oxidantes. De hecho, varios estudios demostraron que las células que sobreexpresan el gen SOD1 tienen la capacidad de frenar la proliferación celular, que es una característica de senescencia, contribuyendo al desarrollo del envejecimiento prematuro en el SD [249, 294-296].

Al detectar la producción de peróxidos celulares mediante microscopía de fluorescencia, se observó una señal de fluorescencia más elevada en las células FT21, tanto en condiciones basales como al añadir el pro-oxidante t-BHP. Por tanto, no sólo se corrobora la producción excesiva de ROS en las células FT21 respecto a las células control y su incremento con los pases, es decir, durante el envejecimiento *in vitro*, sino que además pudimos observar que las células FT21 presentaban algunas de las características típicas de las células senescentes, como la alteración de la morfología y del tamaño celular, además de una proliferación más lenta. En un estudio realizado por de Haan, et al., en fibroblastos de individuos con SD, se observó que estas células presentaban características típicas de la senescencia celular: fibroblastos morfológicamente más ensanchados y con un tamaño mayor que los fibroblastos control, lo que aumenta tanto el área superficial como el volumen celular, además de una proliferación más lenta [180]. El H₂O₂ a niveles nanomolares estimula el crecimiento y la proliferación celular, mientras que a niveles micromolares causan detención transitoria del crecimiento y pueden inducir alteraciones adaptativas en la expresión génica como mecanismo de protección [297]. A nivel milimolar, o superior, el H₂O₂ es claramente un oxidante tóxico, causando estrés oxidativo. Nuestros resultados muestran que las características senescentes detectadas en los fibroblastos FT21 podrían estar inducidas por concentraciones bajas y/o medias de agua

oxigenada, ya que en un estudio se ha demostrado la aparición de estas características senescentes en fibroblastos del SD con una concentración de H₂O₂ superior a la mostrada en nuestros resultados [180]. De hecho, el H₂O₂ juega un papel importante en las vías de señalización, actuando como segundo mensajero [298-300], y además tiene la capacidad de inducir características senescentes *in vitro*; a concentraciones bajas y medias de agua oxigenada (50-200 μM) predomina el fenotipo senescente, mientras que a concentraciones superiores induce la muerte celular por apoptosis [301]; así, la proporción de células apoptóticas es dependiente del nivel de daño, es decir, cuanto mayor es el daño, mayor es el número de células que entran en apoptosis. Sin embargo, antes de la inducción de uno u otro proceso, las células sufren un cambio morfológico característico (superficie celular ensanchada y aplanada, un mayor volumen nuclear, tamaño heterogéneo, entre otras), detención del ciclo celular en fase G₀-G₁ e inducción de p21 o BCL-2 [176, 301].

En este estudio utilizamos dos pro-oxidantes para determinar la vulnerabilidad al estrés oxidativo de los fibroblastos FT21 en relación con fibroblastos diploides. El pro-oxidante 2,2'-azo-bis(2-amidino-propano) (AAPH) es un iniciador de la generación de radicales libres *in vitro*, ya que penetra rápidamente en las membranas celulares y se acumula en el interior de las células, generando radicales peroxilo [302]. Se ha determinado que el AAPH causa una citotoxicidad máxima del 65% a una concentración de 3 mM en fibroblastos expuestos durante 24 h al pro-oxidante [302]. A pesar de que la concentración empleada en este estudio es tres veces superior, la disminución del tiempo de incubación a 1 h evitó la aparición de efectos citotóxicos sin alterar la generación de ROS inducida por el AAPH. El segundo pro-oxidante empleado fue el tert-butil hidroperóxido (t-BHP), que es un análogo de cadena corta de peróxidos lipídicos capaz de generar citotoxicidad y estrés oxidativo, principalmente por la producción elevada de ROS y por la movilización del ácido araquidónico de los fosfolípidos de las membranas celulares [285, 303]. A diferencia del AAPH, los resultados obtenidos indican que el t-BHP resultó citotóxico para las células FT21, siendo este efecto mayor a pases altos, es decir, en las células envejecidas *in vitro*. Aunque en este estudio se pretendía tener una máxima producción de ROS sin alterar la viabilidad celular, se observó cierto grado de citotoxicidad, sin embargo fue menor que la descrita en varios estudios por Ghosh, et al., y Sarkar, et al.; por ejemplo, en células tratadas con t-BHP 100 μM durante 1h, la viabilidad celular disminuye un 22% [285], mientras que al aumentar la concentración de t-BHP, la viabilidad baja hasta un 45% [304]. El AAPH y el t-BHP generan prácticamente los mismos radicales libres, radicales alcoxilos y peroxilos, aunque el t-BHP tiene una naturaleza química que le confiere la propiedad de generar alguno más que el AAPH, como el radical metil peroxilo, entre otros [283], así que la cantidad de ROS generada por el t-BHP es

mayor que la generada por el AAPH. Por tanto, el t-BHP no sólo induce la máxima producción de ROS en las células FT21, sino que además es el responsable de provocar una vulnerabilidad excesiva al estrés oxidativo. Aunque la vulnerabilidad quedó reflejada al determinar la citotoxicidad celular en las células FT21, también se observó que la concentración de t-BHP utilizada en este estudio podría inducir características típicas de células senescentes.

La causa subyacente del incremento de los ROS puede ser la sobreexpresión del gen SOD1, así como el desequilibrio entre la actividad SOD1 y las actividades GPx y CAT [250]. Esta alteración en el equilibrio entre el estado pro-oxidante y antioxidante produciría un incremento del estrés oxidativo en el SD, que puede afectar la mitocondrial y jugar un papel importante en la patogénesis de este síndrome. Al mismo tiempo, las mitocondrias son la principal fuente y diana de los ROS, particularmente del anión superóxido, que puede ser producido por un defecto en los complejos respiratorios y acumulado por un desequilibrio en el sistema antioxidante [305, 306]. Además, la mitocondria es el orgánulo donde se genera el ATP, y la producción crónica y continuada de ROS origina una disminución en la síntesis de ATP, proceso que ocurre durante el envejecimiento celular [307]. En el presente estudio analizamos ciertos procesos involucrados en la producción de ATP mitocondrial, proporcionando nuevos conocimientos sobre la base molecular de la disfunción mitocondrial y su relación con el estrés oxidativo en los fibroblastos FT21.

Se cuantificó la cantidad de proteína de los complejos respiratorios I y III de la CTE mitocondrial, ya que un déficit proteico puede derivar en un aumento de los ROS mitocondriales. Aunque no se observaron diferencias significativas en la cantidad proteica entre las células FT21 y las células control, los resultados parecen indicar una disminución en la cantidad de proteína en estos complejos que aumentaría la producción de ROS, en concreto la del radical $O_2^{\bullet-}$, que podría afectar la síntesis de ATP. En un estudio se estableció por primera vez una relación inherente a las células FT21 entre la producción excesiva de ROS, un déficit en la actividad de los complejos I y III, y una reducción en la fosforilación oxidativa [222, 279, 280, 308]. Por lo que, el déficit en la respiración celular podría ocurrir por la elevación crónica y continuada de ROS, que serían capaces de inducir mutaciones en el mtDNA [223, 307]. De hecho, las mutaciones serían responsables del mal funcionamiento de los complejos de la cadena respiratoria, incrementando la producción de ROS mitocondriales y produciendo así un círculo vicioso, que deriva en una disfunción mitocondrial [115].

A pesar de que nuestros resultados indican que la cantidad de proteína de la ATP sintetasa (complejo V) se mantiene igual en ambos tipos de células, observamos que las células FT21 tienen un menor contenido de ATP respecto a las células FC en

DISCUSIÓN

condiciones basales y además se mantiene esta disminución con los pases. Al añadir los dos pro-oxidantes, en las células FT21 se observa una disminución mayor en la cantidad de ATP, probablemente debido a la inducción que éstos provocan en la producción de ROS. Es posible que la reducción de la síntesis de ATP observada en las células FT21 en condiciones basales esté relacionada con la disminución de la cantidad de proteínas de los complejos respiratorios I y III observada, ya que su deficiencia puede provocar alteraciones en la fosforilación oxidativa al aumentar los ROS mitocondriales e impedir la correcta producción de ATP. A pesar de producirse una disminución de ATP en las células FT21 en condiciones basales, ésta no fue tan elevada como la descrita recientemente por Valenti, D. et al., en fibroblastos dérmicos fetales y de adultos con SD, siendo del 40-45%, debido a una drástica reducción proteica en la ATP sintetasa y a una reducción de la actividad enzimática de los complejos respiratorios I y III mitocondriales. Por tanto, observaron una disminución de la eficiencia en la ATP sintetasa que impediría el flujo correcto de electrones en la CTE, induciendo un aumento de los ROS mitocondriales. Además, el déficit de ATP provocó un aumento del 25% en la red mitocondrial y en el número de copias de mtDNA, aunque este aumento de la biogénesis mitocondrial, característica de la senescencia celular, no acabó de compensar la disfunción mitocondrial [308].

Los aniones superóxidos son los principales radicales libres que se generan en las mitocondrias y su excesiva o crónica en las mitocondrias pueden provocar una disminución en la síntesis de ATP. Utilizando dos sondas fluorescentes observamos un incremento de aniones superóxido en el interior de las mitocondrias, especialmente en las células FT21, mientras que su producción aumentaba con los pases. Al añadir el pro-oxidante t-BHP a las células, se observó una mayor producción de radicales $O_2^{\bullet-}$ mitocondriales en las células FT21 que se incrementaba claramente con los pases, probablemente relacionado con una mayor susceptibilidad de las células FT21 al estrés oxidativo. Nuestros resultados apoyan los publicados en un estudio, en que se demostró que se producen 3 veces más ROS intracelulares, en particular los radicales $O_2^{\bullet-}$ mitocondriales, en los fibroblastos FT21 que en los fibroblastos control [222]. El radical $O_2^{\bullet-}$ mitocondrial produce un daño acumulativo en las proteínas mitocondriales y en el mtDNA haciendo que las mitocondrias sean funcionalmente menos eficientes con el tiempo y que, como consecuencia, se genere menos ATP [309, 310].

En los fibroblastos FT21 se produce una disminución prematura en la expresión a nivel de mRNA del enzima antioxidante SOD2 mitocondrial, encargada de transformar el anión superóxido a peróxido de hidrógeno en las mitocondrias. Al determinar la expresión proteica de esta enzima por varios métodos, reveló una disminución en las células FT21 respecto a las células FC, aunque sólo se observan diferencias significativas en las células envejecidas con los pases sucesivos. Estos

resultados podrían indicar que la disminución de la SOD2 de forma prematura, produciría la acumulación de radicales $O_2^{\bullet-}$ y por tanto las mitocondrias estarían más expuestas a estos radicales. Con los pases, los radicales $O_2^{\bullet-}$ podrían ejercer un daño acumulativo sobre las proteínas mitocondriales, entre las cuales estaría la enzima SOD2 y por tanto la incapacidad para eliminarlos. Este hecho podría llevar a aumentar la expresión a nivel de mRNA de la SOD2, probablemente para compensar el exceso de los radicales $O_2^{\bullet-}$ mitocondriales, aunque la actividad seguiría siendo insuficiente. En un estudio se demostró un aumento de los niveles de mRNA para la SOD2 en varones con SD respecto a individuos control, sin embargo, en mujeres con SD se produce una disminución, manifestándose una variabilidad interindividual [248]. A pesar de que la disminución o inactivación de la expresión de la SOD2 produciría una disfunción mitocondrial capaz de acelerar la senescencia celular [224, 225], otros estudios muestran que se produce un aumento en la expresión de la SOD2 para evitar la acumulación del anión superóxido mitocondrial y hacer frente al estrés oxidativo, el cual está asociado al envejecimiento o a enfermedades mitocondriales [223, 307].

Según la "Teoría de los radicales libres del envejecimiento", se produciría una alteración de las actividades enzimáticas antioxidantes generando un aumento de los ROS durante el proceso de envejecimiento [311]. Asimismo, diversos grupos han propuesto que algunas de las manifestaciones clínicas del SD podrían ser debidas al desequilibrio en la ratio de las enzimas antioxidantes originando un exceso en la producción intracelular de ROS [176, 180]. Sin embargo, esta hipótesis no ha sido inequívocamente demostrada, ya que algunos individuos con SD presentan actividad normal de la SOD [312] y ratones transgénicos que sobreexpresan SOD son más resistente a la toxicidad de los ROS [313]. De hecho, hay estudios que demuestran la existencia de mecanismos de regulación en los tejidos senescentes para proporcionar una defensa antioxidante eficaz frente a los radicales libres, al ser generados a una mayor velocidad durante el proceso de envejecimiento [314]. En este estudio, determinamos las expresiones y actividades de las enzimas antioxidantes SOD1, GPx y CAT para valorar si hay un desequilibrio en la actividad enzimática antioxidante y si existe relación con la producción de ROS y la senescencia celular *in vitro*.

Los resultados de este estudio a nivel de mRNA mostraron una expresión elevada de la SOD1 en las células FT21 respecto a las células control, mientras que las expresiones de la GPx y CAT se mantenían constantes, lo que indicaría una alteración en la capacidad endógena antioxidante, aunque la expresión de la CAT disminuye con los pases sucesivos en las células FT21. Algunos autores han demostrado un desequilibrio entre las enzimas antioxidantes debido al aumento de la expresión de mRNA de la SOD1 asociado a una disminución de la expresión de la SOD2 en fibroblastos procedentes de mujeres con SD. Sin embargo, la expresión de la GPx se

DISCUSIÓN

mantenía constante, excepto en varones que disminuía, mientras que la expresión de la CAT se encontraba elevada de forma general y podría compensar la disminución del mRNA de la GPx. A pesar del desequilibrio observado, la GPx y la CAT podrían tener un papel compensatorio en la protección de las células FT21 frente al daño oxidativo ejercido por la producción excesiva de ROS [248].

La expresión de mRNA para las enzimas SOD1 y SOD2 fue diferente en las células FT21, así que para comprobar estos resultados valoramos la expresión proteica de ambas enzimas analizando como influyen en la actividad antioxidante SOD. Los resultados mostraron que las expresiones proteicas de la SOD1 y SOD2 eran contrarias, es decir, mientras que la expresión proteica SOD1 está elevada en las células FT21 respecto a las células FC y además aumenta con los pases, la expresión proteica SOD2 disminuye en las células FT21 y lo hace de una forma más acusada con los pases. Estos resultados a nivel proteico corroboran los resultados a nivel de mRNA y podrían indicar que la expresión SOD1 sería, en mayor parte, la responsable de la actividad enzimática global SOD, del desequilibrio en la eliminación de ROS y como consecuencia, del incremento de la producción intracelular de ROS.

Finalmente se valoraron las actividades de las enzimas antioxidantes SOD, GPx y CAT para determinar si se produce un desequilibrio entre las enzimas antioxidantes y si existe relación con la senescencia celular *in vitro*. Los resultados de este estudio muestran que los fibroblastos FT21 contienen una actividad SOD mayor que los fibroblastos control, probablemente debido a la sobreexpresión del mRNA para el gen SOD1, e incluso se incrementa con los pases, siendo esta actividad SOD similar a la descrita en otros estudios [276]. Diversos estudios han demostrado en células de individuos con SD, que se puede producir el aumento de la actividad GPx, mientras que la actividad de la CAT se mantiene sin cambios significativos, como resultado aparente de un mecanismo de regulación secundario [189, 191]. Sin embargo, en nuestro estudio no se ha encontrado un aumento en las actividades GPx y CAT, sino al contrario, se observa una tendencia a disminuir ambas actividades en las células FT21, siendo significativa la disminución de la CAT con los pases, por tanto se corroboran los resultados de la expresión del mRNA para ambas enzimas. Estos resultados nos llevaron a calcular las diferentes ratios enzimáticas antioxidantes, observando que la ratio SOD/GPx+CAT tiene un valor más elevado en los fibroblastos FT21, es decir, existe un desequilibrio en las enzimas antioxidantes o una disminución de la capacidad endógena antioxidante que se acentúa con los pases. La ratio SOD/GPx fue menor que la SOD/CAT en los fibroblastos FT21, o lo que es lo mismo, el incremento porcentual ($\Delta\%$) en los FT21 respecto a los FC es menor en la ratio SOD/GPx que en la SOD/CAT, manteniéndose estos resultados con los pases. La alteración de las ratios enzimáticas antioxidantes en las células FT21, induciría una

producción excesiva y crónica de peróxido de hidrógeno y otros radicales libres, que podría causar un aumento del estrés oxidativo, contribuyendo a la aparición de características senescentes y como consecuencia desarrollando el proceso de envejecimiento prematuro. Sin embargo, no está claro si la elevada ratio enzimática es la responsable directa de la inducción de estas características senescentes en las células FT21 o si está indirectamente mediada a través de otros cambios celulares, como los producidos en las mitocondrias. Algunos estudios indican que la producción excesiva de ROS en individuos con SD, debida a la alteración en el equilibrio de las enzimas antioxidantes, juega un papel importante ya que sería uno de los mecanismos moleculares relacionados con el envejecimiento prematuro y la aparición de patologías relacionadas con la enfermedad de Alzheimer [68, 315, 316].

Estudios previos realizados en individuos con SD han demostrado que existe un estado pro-oxidante debido a una mayor producción de radicales libres [164] y como hemos comentado con anterioridad, la sensibilidad de las células al aumento de los radicales libres depende, aparentemente, de la relación entre la SOD y el binomio (GPx+CAT) [317]. En este estudio hemos observado que las células FT21 muestran un desequilibrio de las enzimas antioxidantes produciendo un aumento del estrés oxidativo, y por tanto, éste puede ejercer daño oxidativo sobre las biomoléculas produciendo peroxidación lipídica, modificaciones oxidativas de proteínas, de DNA o de carbohidratos [176]. La determinación del MDA, uno de los productos resultantes de la fragmentación que sufren los ácidos grasos poliinsaturados en el proceso de peroxidación, se considera un indicador válido o biomarcador de estrés oxidativo al que son sometidas las estructuras lipídicas de las membranas celulares como consecuencia tanto de la acción de los radicales libres como del paso del tiempo. La lipoperoxidación se ha demostrado en tejidos fetales del SD [318]. En un estudio previo no se observó un aumento significativo de los niveles de MDA en plasma en individuos jóvenes con SD, sin embargo, se encontró una correlación significativamente positiva entre los niveles de MDA y la producción intracelular de ROS, así como del anión superóxido [278]. Por tanto, si la producción de ROS y del anión superóxido se incrementa de forma crónica en las células FT21 podríamos predecir que el MDA celular también estaría elevado.

En nuestro estudio hemos observado que los niveles de MDA únicamente están incrementados significativamente en las células FT21 con los pases, es decir, a medida que avanza la senescencia replicativa, se incrementa el estrés oxidativo debido al desequilibrio de la ratio enzimática antioxidante, produciéndose un incremento en los niveles de MDA en estas células. Diversos estudios afirman que la alteración de la ratio enzimática antioxidante ocurre de forma paralela al aumento del daño en las membranas lipídicas a través de la LPx [319]. A pesar de que en las células FT21 se

produce un aumento en la producción intracelular de ROS y del anión superóxido de forma prematura debido a la sobreexpresión de la SOD1, los niveles de MDA a PB son similares a los encontrados en las células control diploides. Esta discrepancia quizás pueda deberse a que la enzima carbonil reductasa 1, cuyo gen (CBR1) se encuentra en el HSA21, aumenta en individuos con SD [207] y podría proteger a las células frente a la peroxidación de lípidos [320]. Además, el MDA es un producto poco estable ya que puede ser metabolizado, excretado a nivel celular y/o reaccionar rápidamente con las proteínas, produciendo daños estructurales y funcionales al modificar residuos aminados, ataca grupos sulfhidrilo (-SH) y produce entrecruzamientos catalíticos intra e intermoleculares con las proteínas aumentando los GCP, éste es un daño comúnmente observado, así que los niveles intracelulares de MDA podrían no ser indicativos de que no se está produciendo [96, 98]. Sin embargo, a medida que avanza la senescencia replicativa en las células FT21, se incrementa el desequilibrio enzimático antioxidante (SOD/GPx+CAT), aumentando en mayor grado la producción intracelular de ROS, incluido el anión superóxido, ya que las enzimas GPx, CAT y SOD2 no serían capaces de eliminar el exceso crónico de ROS, se incrementa el estrés oxidativo y se produce, como consecuencia, un aumento significativo de los niveles de MDA en las células FT21. Estos resultados están en concordancia con diversos estudios, los cuales encontraron niveles de MDA elevados en suero y eritrocitos de individuos con SD que aumenta con la edad [165, 321]; otros estudios no han encontrado diferencias en los niveles de MDA ni en eritrocitos ni en suero de individuos con SD, aunque si las encontraron en orina [189].

Otro biomarcador de estrés oxidativo son los grupos carbonilos de proteínas (GCP). Se utilizan para determinar el daño oxidativo a proteínas y son más estables que los productos de LPx como el MDA, por tanto proporcionan una ventaja adicional [202]. El incremento y la acumulación de los GCP debido a productos de LPx como el MDA y el HNE están asociados a enfermedades neurodegenerativas, diabetes, síndrome de Down, entre otras [206]. En este estudio se han detectado y cuantificado los niveles de proteínas carboniladas, mostrando un aumento significativo en las células FT21 respecto a las células FC; además se observa que las proteínas carboniladas aumentan en ambos tipos de células con los pases, aunque siguen estando más elevadas en las células FT21. El incremento de los GCP en las células FT21 puede ser debido al estrés oxidativo generado por el exceso de H_2O_2 , el cual aumenta por la sobreexpresión de la SOD1 en estas células [195, 207]. En un estudio realizado en niños con SD se ha demostrado que existe un incremento significativo de cobre que forma parte de la enzima antioxidante Cu/Zn-SOD y que puede intervenir como agente catalítico y producir radicales OH^* muy reactivos, conduciendo al incremento del daño oxidativo en las proteínas del plasma y por tanto originando

niveles elevados de GCP [192]. Un estudio realizado *in vitro* en células procedentes del cortex cerebral de fetos con SD, ha demostrado que existe un elevado estrés oxidativo, el cual aumenta los niveles de TBARs y GCP respecto a los controles [195].

El estrés oxidativo se manifiesta de forma prematura en las células FT21 y origina daño oxidativo en un gran número de biomoléculas, como las proteínas. Este daño puede ser detectado por medio de diferentes biomarcadores de estrés oxidativo desde etapas tempranas en el SD y por lo tanto puede ser un mecanismo regulador de la patogénesis del SD o al menos influir en la aparición de algunas características fenotípicas del SD. Además, existe una evidencia creciente de que se produce un deterioro del proteosoma en enfermedades neurodegenerativas como en el Alzheimer y se presenta en el SD que manifiesta algunas características clínicas similares al Alzheimer [322]. Las proteínas oxidadas pueden actuar como pro-oxidantes, produciendo un daño adicional a otras biomoléculas [102], pero también al proteosoma [209], que es el responsable de la degradación de las proteínas oxidadas [323]. El recambio proteico se produce principalmente en el proteosoma y en los lisosomas, que son las vías intracelulares de degradación de las proteínas oxidadas. Se ha observado en determinadas patologías, como en el síndrome de Down, enfermedades neurodegenerativas, e incluso durante el envejecimiento, defectos en los sistemas celulares de proteolisis, acumulación de proteínas oxidadas y grupos carbonilos en determinados tejidos, originando una pérdida de función celular, sobretodo en el último tercio de vida [324].

Estudios previos realizados en fibroblastos embrionarios senescentes humanos, han abordado la identificación de proteínas carboniladas, así como aquellas proteínas modificadas por glicación y conjugación con productos de LPx. Se han publicado sobre 180 proteínas modificadas, de las cuales, un 35% se encuentran en fibroblastos senescentes (entre ellas, la SOD1 y SOD2) [325, 326]. Estos resultados indican la susceptibilidad particular de ciertas proteínas a modificaciones postraduccionales perjudiciales, lo que sugiere que la modificación proteica no es un proceso aleatorio y probablemente esté implicada en enfermedades relacionadas con la edad, así como en las bases moleculares del envejecimiento [206]. La localización subcelular de las proteínas modificadas indicó que se encuentran en dos fracciones principales: mitocondria (44%) y citosol (32%, incluyendo las proteínas del citoesqueleto), observando que el nivel de daño a proteínas mitocondriales es elevado en fibroblastos senescentes. Además, se observó un aumento en la modificación de las proteínas implicadas en la fosforilación oxidativa durante la senescencia replicativa, como pueden ser la subunidad Fe-S del complejo I y la subunidad α de la ATP sintetasa, produciendo una disfunción mitocondrial [206, 327]. Posteriormente se identificaron proteínas modificadas en enfermedades relacionadas con la edad, con el

DISCUSIÓN

envejecimiento en humanos y en modelos animales mamíferos, donde se ha demostrado un aumento en las proteínas carboniladas. En este caso, las proteínas carboniladas se localizaron principalmente en el citosol (39%), seguido de las mitocondrias (18%), apareciendo, de nuevo, la disfunción mitocondrial como uno de los procesos por el que se origina un mayor número de proteínas carboniladas, por ejemplo, la ATP sintetasa y el complejo respiratorio b-c1 mitocondrial, que coinciden tanto en fibroblastos senescentes como en enfermedades relacionadas con la edad y envejecimiento [206]. Por tanto, estos resultados nos podrían indicar que la disminución en la cantidad proteica de los complejos respiratorios I y III, así como de la enzima antioxidante SOD2 en las células FT21 de nuestro estudio, podría deberse al estrés oxidativo detectado en estas células, el cual es capaz de producir modificaciones oxidativas en las proteínas mitocondriales, disminuyendo su cantidad y acumulándose como proteínas carboniladas. La modificación oxidativa de proteínas influye en la respiración celular y podría causar una disfunción mitocondrial, que junto con el estrés oxidativo intervendrían en la aparición de la senescencia celular prematura en las células FT21.

Como objetivo final de este estudio, se examinó si existe senescencia celular prematura en los fibroblastos FT21 en condiciones basales respecto a los fibroblastos FC y su relación con el estrés oxidativo. Anteriormente, se ha comentado que los fibroblastos FT21 tienen una ratio enzimática antioxidante elevada debido a la sobreexpresión del gen SOD1, creando un ambiente de estrés oxidativo en la célula y probablemente acompañado de disfunción mitocondrial. Ambos mecanismos moleculares podrían intervenir en la aparición, establecimiento y mantenimiento de la senescencia celular. De hecho, observamos que los fibroblastos FT21 mostraban rasgos característicos de células senescentes, como alteraciones de la morfología y tamaño celular. Además, hubo heterogeneidad en cuanto a la tasa de proliferación celular, perdiendo la capacidad replicativa unas células más precozmente que otras; aunque globalmente puede considerarse que la capacidad replicativa disminuye en los fibroblastos FT21 alcanzando la senescencia celular de forma prematura [180, 250]. Por tanto, analizamos si el estrés oxidativo está relacionado con la aparición de la senescencia celular prematura en los fibroblastos FT21. Para ello comenzamos determinando varios marcadores de senescencia celular, uno de los más importantes para la aparición de la senescencia celular es un factor de transcripción, la proteína p21, que en realidad es un inhibidor del complejo Ciclina E/CDK2 del ciclo celular. Según Campisi, J. et al., la activación transcripcional de p21 la realiza otra proteína que también hemos determinado, p53, un factor supresor de tumores denominado "el guardián del genoma", y que es activado por varios factores, uno de ellos es el estrés

oxidativo como consecuencia de la producción excesiva y crónica de ROS, provocando la parada del ciclo celular [232].

Una de las funciones de p21 es inducir una parada del ciclo celular en la fase G₁ cuando es activada por p53 al producirse en las células un exceso de ROS, daño al DNA, acortamiento o erosión de telómeros, entre otros factores, adquiriendo el fenotipo senescente [180]; otros estudios han demostrado que p53 está involucrado en la parada del ciclo celular en la fase G₂ cuando hay un daño grave al DNA, provocando apoptosis y pudiendo contribuir a la patogénesis en individuos con SD [328, 329]. Los resultados de este estudio muestran que las células FT21 tienen una expresión proteica de p21 aumentada significativamente de forma prematura respecto a las células FC, incrementándose significativamente a medida que avanza la senescencia replicativa. Sin embargo, la expresión proteica de p53 es similar en ambos tipos de células, aunque con la senescencia replicativa se incrementa en las células FT21, por lo que estos resultados indicarían que los fibroblastos FT21 podrían entrar en senescencia celular prematuramente, inducida también por el aumento de la expresión de p21. Algunos estudios publicaron la existencia de una relación entre el aumento de la ratio SOD1/GPx1 y la sobreexpresión de p21 en fibroblastos FT21, en fibroblastos murinos NIH3T3 tratados con H₂O₂ y en fibroblastos derivados de un ratón knockout (GPx1^{-/-}), demostrando que el exceso de H₂O₂ genera un estado oxidativo capaz de inducir senescencia celular. Aunque esperábamos observar un aumento mayor de p53 en las células FT21, los estudios anteriores también demostraron que la expresión de p53 se puede mantener constante e incluso disminuir en células tratadas con H₂O₂; el aumento de la expresión de p21 parece ser independiente de la expresión de p53, ya que no encontraron diferencias ni en los niveles de mRNA para p53, ni en los niveles de unión de un oligonucleótido consenso para p53 [68, 180, 330].

Nuestros resultados sugieren que los fibroblastos FT21 contienen un aumento del estrés oxidativo asociado a un déficit en la respiración celular que puede desembocar en una disfunción mitocondrial. Tanto el estrés oxidativo como la disfunción mitocondrial podrían considerarse mecanismos moleculares que afectan a la expresión génica de varios factores de transcripción implicados en la regulación de la senescencia celular. De hecho, la "*hipótesis del estrés oxidativo del envejecimiento*" [55], amplía la "*teoría del envejecimiento asociado a radicales libres*" al proponer que el nivel de estrés oxidativo ejerce un efecto sobre la expresión génica involucrada en la senescencia celular [180]. Los ROS pueden dañar directamente el DNA y así producir lo que se denomina respuesta al DNA dañado (DDR). Se ha demostrado *in vitro* la existencia de un bucle de retroalimentación positiva entre la DDR y la producción de ROS a través de la disfunción mitocondrial, siendo ésta una consecuencia retardada de la DDR. Asimismo, la DDR activaría una secuencia de

expresión génica iniciada por p53 y en la que están involucrados varios factores de transcripción, p21, GADD45, MAPK14 y TGF β . Al aumentar la expresión de p21 se produciría la parada del ciclo celular y por tanto la senescencia celular, mientras que el resto de la secuencia conduciría a una disfunción mitocondrial y a un exceso en la producción de ROS mitocondriales. De esta forma, se sigue alimentando este bucle positivo ya que la DDR no cesa y por tanto se mantiene constante la expresión de p53 [245, 331]. Un estudio publicó que la respuesta al DNA dañado es la responsable de activar no sólo a p53, sino que también activa a p16/Rb, que inducirían un aumento de la biogénesis mitocondrial asociado a un incremento de los ROS mitocondriales y una disfunción mitocondrial, conduciendo a una disminución de ATP y a la activación de la AMPK [272]. Además, este estudio también publicó que p53 puede ser exportado desde el núcleo a la mitocondria, donde puede afectar a la CTE, a la permeabilidad mitocondrial y a la producción de ROS. Por otro lado, p53 activaría a los factores de transcripción ya comentados, produciendo cambios mitocondriales y/o la producción de ROS [272]. Un estudio realizado en fibroblastos primarios humanos y murinos demostró que la proteína de retinoblastoma o pRb no está implicada necesariamente en la inducción de la disfunción mitocondrial y en la producción de ROS. De hecho, demostraron que el principal factor involucrado en el establecimiento y mantenimiento de la senescencia es p21, perteneciente al bucle positivo anterior [245]; estos datos confirman que el aumento en la expresión de p21 que hemos hallado en los fibroblastos FT21 podría estar relacionado con la senescencia celular prematura en estas células.

Utilizamos otro marcador de senescencia celular *in vitro*, la actividad SA- β -Gal [254]. En este estudio ha sido detectada por microscopía y se han contado el número de células SA- β -Gal positivas en ambos tipos de fibroblastos. Se observó un incremento significativo en el número de células FT21 con actividad SA- β -Gal positiva respecto a las células FC y una gran heterogeneidad en cuanto a la tasa de proliferación celular a medida que avanzó la senescencia replicativa. Además, se determinó la actividad de la enzima β -Galactosidasa lisosomal a pH 6 (GAL), produciéndose un incremento de esta actividad en las células FT21 respecto a las células FC, aunque se observó un aumento en ambos tipos de células con la senescencia replicativa. Por tanto se establece una correlación positiva entre las actividades SA- β -Gal y GAL (pH 6), por lo que estos resultados nos indican también una senescencia prematura en los fibroblastos FT21, que podría ser inducida por el exceso de ROS y podría provocar una disminución de la tasa de replicación celular, disminuyendo la población de las células FT21. Un estudio realizado con fibroblastos transfectados con el gen SOD1 mostraron una disminución en la proliferación, análoga a los fibroblastos con SD [180]. En un trabajo anterior ya se observó en fibroblastos

de individuos con SD una baja capacidad replicativa respecto a las células control, resultados similares a los de este estudio [332]. Además, en fibroblastos obtenidos de un modelo murino trisómico (Ts65Dn) se demostró una reducción en el crecimiento, unido a una entrada prematura a un estado no proliferativo o senescente [282].

Por último, se determinó la actividad de las enzimas lisosomales β -galactosidasa a pH 4 (GAL) y β -glucuronidasa (GLU) que nos podrían indicar si en los fibroblastos FT21 se produce un aumento de la actividad lisosomal, así como del número de lisosomas, que podrían contribuir a acelerar el envejecimiento celular [254]. En nuestro estudio se produce un aumento y una correlación positiva entre la actividad SA- β -GAL y la actividad GAL a pH 6 en las células FT21, al determinar la actividad β -galactosidasa a pH 4 en ambos tipos de células, se produjo una disminución no significativa en las células FT21 respecto a las células FC. Sin embargo, la actividad β -glucuronidasa aumentó de forma prematura en las células FT21 respecto a las células FC, aunque aumenta en ambos tipos de células con la senescencia replicativa. En un estudio reciente realizado en fibroblastos dérmicos primarios, se evaluó por primera vez la relación entre las actividades enzimáticas N-acetil- β -hexosaminidasa, β -glucuronidasa, β -galactosidasa, α -manosidasa y α -fucosidasa con la senescencia inducida por estrés y con la senescencia replicativa inducida por los pases en cultivo, determinando que existe una correlación positiva entre el aumento de las actividades enzimáticas y la aparición de la senescencia celular [333]. Otro estudio demostró que las enzimas lisosomales β -galactosidasa y β -glucuronidasa estaban elevadas en fibroblastos humanos fetales (HS74) senescentes respecto a fibroblastos jóvenes [334]. En fibroblastos humanos a los que se les induce senescencia celular, tanto por estrés oxidativo como por pases en cultivo, se produce una mayor capacidad de degradación lisosomal, con un aumento significativo en la actividad de todas las enzimas excepto en la actividad GLU, donde el aumento no fue significativo, y al igual que en nuestros resultados se observó una relación elevada entre la actividad GAL a pH 6 y la actividad SA- β -GAL [333].

Varios tipos celulares, como los fibroblastos humanos, al entrar en senescencia se vuelven resistentes a la apoptosis, aunque son sensibles a ciertas señales apoptóticas [257, 258]. Tanto la apoptosis como la senescencia celular comparten un efector común, p53, que parece ser importante en la resistencia a la apoptosis [260]. A pesar de que en nuestro estudio hemos encontrado indicios claros de senescencia celular prematura en las células FT21, quisimos comprobar la expresión proteica del citocromo C y de la caspasa 9 activada, ambos inductores de apoptosis por la vía de las caspasas. Los resultados indican que las células FT21 contenían niveles significativamente inferiores de citocromo C respecto a las células FC, mientras que los niveles de caspasa 9 activada tendían a disminuir ligeramente. Por tanto, podría

ocurrir que los fibroblastos FT21 adquirieran un estado de resistencia a la apoptosis, predominando la senescencia celular. Esto puede ocurrir porque en fibroblastos humanos senescentes se ha observado que p53 se encuentra reclutada preferentemente en promotores de genes relacionados con la parada del ciclo celular (p21 y GADD45) en lugar de encontrarse en promotores de genes reguladores de apoptosis [261], por lo que de forma similar, también podría ocurrir en los fibroblastos FT21. Sin embargo, en neuronas, astrocitos y fibroblastos de fetos con SD se ha observado un incremento en la producción de ROS mitocondriales acompañada de un descenso tanto en la actividad redox mitocondrial como del potencial de membrana mitocondrial, provocando apoptosis [256].

Un factor determinante en la disminución del citocromo C en las células FT21 podría ser el exceso de ROS, en concreto el peróxido de hidrógeno. Esta especie reactiva tiene la capacidad de atravesar con facilidad las membranas biológicas, formar otras especies reactivas y modificar oxidativamente proteínas que contengan el grupo hemo (mioglobina, hemoglobina y citocromo C) y liberar iones Fe^{2+} [74, 77, 83]. En condiciones fisiológicas normales, el hierro se mantiene unido al grupo hemo del citocromo C, lo que impide su interacción con pequeños ligandos como el peróxido de hidrógeno y otros radicales libres. Una de estas uniones se produce con la metionina en posición 80 del grupo hemo (Met80); sin embargo, estudios *in vitro* han demostrado que el estrés oxidativo/nitrosativo altera la unión Met80-Fe del citocromo C, permitiendo el acceso del H_2O_2 y otros radicales libres al hierro del grupo hemo [335-338]. Estas especies reactivas inhiben la función de transporte del citocromo C ya que actúan como aceptores de electrones generando radicales peroxilo y alcoxilo capaces de modificar oxidativamente al grupo hemo del citocromo C, así se liberaría de la mitocondria para su posterior degradación, sin causar apoptosis [339-341]. De hecho, en células no apoptóticas se han observado alteraciones en la unión M80-Fe producidas por modificaciones llevadas a cabo por radicales libres, de esta forma, se provocaría la liberación mitocondrial del citocromo C sin activar la vía de las caspasas y por tanto, no se inicia la apoptosis [342]. La disminución del citocromo C en las células FT21 podría a una excesiva producción de ROS, generando una alteración estructural en el grupo hemo de la proteína.

En resumen, este estudio muestra que los ROS producidos por el metabolismo celular y no eliminados adecuadamente por un desequilibrio en la capacidad enzimática antioxidante endógena, puede llegar a causar daño oxidativo celular. Ligado al estrés oxidativo se encuentra una posible disfunción mitocondrial al producirse una disminución en la respiración celular y en la generación de ATP. Ambos mecanismos juntos pueden provocar senescencia celular prematura en los fibroblastos con trisomía del cromosoma 21.

A microscopic image showing plant cells. The cells are arranged in a grid-like pattern, with some cells containing bright orange, rod-shaped structures, likely chloroplasts. The text "CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES" is overlaid on the image.

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES

En este estudio se ha analizado el grado de estrés oxidativo, su relación con la disfunción mitocondrial, y la aparición de la senescencia celular en fibroblastos FT21 y fibroblastos diploides, llegando a las siguientes conclusiones:

1. Los niveles intracelulares de ROS están elevados en condiciones basales en los fibroblastos FT21, generando estrés oxidativo crónico. Los tratamientos prooxidantes AAPH y t-BHP, provocan un incremento significativo en la producción de ROS tanto a pases bajos como a pases altos; este incremento es más acentuado en los fibroblastos FT21, que parecen ser menos resistentes al estrés oxidativo inducido.
2. El contenido intracelular de ATP está significativamente disminuido en los fibroblastos FT21, probablemente relacionado con el aumento en la producción de ROS, y en particular del radical $O_2^{\bullet-}$ mitocondrial, ya que la enzima antioxidante SOD2 mitocondrial está disminuida en estas células, lo que refleja deterioro de la función mitocondrial.
3. Los fibroblastos FT21 tienen un aumento en la expresión de la SOD1 (mRNA, proteína y actividad) debido a la mayor dosis génica en el cromosoma HSA21. La expresión del mRNA de la GPx y CAT no parece compensar el aumento de radicales generados por la SOD1, lo que indica que en estas células existe un desequilibrio en la capacidad enzimática antioxidante (ratio SOD1/GPx+CAT).
4. Los niveles de malondialdehído intracelulares (un producto final de la peroxidación lipídica) se incrementan significativamente a medida que avanza la senescencia replicativa en los fibroblastos FT21. El daño oxidativo a las proteínas, valorado a través del contenido de grupos carbonilo de proteínas (GCP), está elevado desde los pases bajos en los fibroblastos FT21 y aumenta durante la senescencia replicativa celular.
5. La expresión proteica de p21 está significativamente elevada de forma prematura en los fibroblastos FT21 y aumenta durante la senescencia replicativa en estas células. La expresión proteica de p53 no varía en los fibroblastos FT21 respecto a fibroblastos diploides. La actividad SA- β -Gal, otro marcador de senescencia celular, indica que los fibroblastos FT21 alcanzan antes la senescencia replicativa que los fibroblastos diploides.
6. Las actividades enzimáticas lisosomales β -Galactosidasa (pH 6) y β -Glucuronidasa aumentan a medida que avanza la senescencia replicativa en ambos tipos de células.

CONCLUSIONES

7. Globalmente los resultados de los marcadores de senescencia, la disminución de la expresión proteica del citocromo C, de la caspasa 9 activada y de la tasa de proliferación celular, así como el aumento de la superficie y volumen celulares, indican que los fibroblastos FT21 entran prematuramente en senescencia celular.

En resumen, podemos concluir que los ROS producidos por el exceso de dosis génica de la SOD1 y no eliminados adecuadamente por el desequilibrio de la capacidad endógena antioxidante, conducen a un estado de estrés oxidativo permanente y a un cierto grado de disfunción mitocondrial. Ambos procesos pueden actuar como mecanismos moleculares que acentúan la senescencia celular.

Tanto el estrés oxidativo como la disfunción mitocondrial son mecanismos fisiopatológicos relacionados con la senescencia celular prematura en los fibroblastos con trisomía del cromosoma 21. Las alteraciones metabólicas que comporta el daño oxidativo celular crónico podrían contribuir a un envejecimiento biológico precoz anterior a la edad cronológica de los individuos con síndrome de Down.

A horizontal strip of a microscopic image showing plant cells. The cells are arranged in a grid-like pattern, with some cells containing bright orange, oval-shaped chloroplasts. The background is dark, making the cells and chloroplasts stand out.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

1. Ward, O.C., *John Langdon Down: the man and the message*. Downs Syndr Res Pract, 1999. **6**(1): p. 19-24.
2. Shaw, J.J., *Mongolian Imbecility*. Proc R Soc Med, 1914. **7**(Sect Study Dis Child): p. 146-7.
3. Lejeune, J., M. Gautier, and R. Turpin, [*Study of somatic chromosomes from 9 mongoloid children*]. C R Hebd Seances Acad Sci, 1959. **248**(11): p. 1721-2.
4. Jacobs, P.A., et al., *The somatic chromosomes in mongolism*. Lancet, 1959. **1**(7075): p. 710.
5. Antonarakis, S.E., et al., *Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(10): p. 725-38.
6. Epstein, C.J., *2001 William Allan Award Address. From Down syndrome to the "human" in "human genetics"*. Am J Hum Genet, 2002. **70**(2): p. 300-13.
7. Patterson, D., *Molecular genetic analysis of Down syndrome*. Hum Genet, 2009. **126**(1): p. 195-214.
8. Shapiro, B.L., *Down syndrome--a disruption of homeostasis*. Am J Med Genet, 1983. **14**(2): p. 241-69.
9. Rachidi, M. and C. Lopes, *Mental retardation and associated neurological dysfunctions in Down syndrome: a consequence of dysregulation in critical chromosome 21 genes and associated molecular pathways*. Eur J Paediatr Neurol, 2008. **12**(3): p. 168-82.
10. Rumble, B., et al., *Amyloid A4 protein and its precursor in Down's syndrome and Alzheimer's disease*. N Engl J Med, 1989. **320**(22): p. 1446-52.
11. Jernigan, T.L. and U. Bellugi, *Anomalous brain morphology on magnetic resonance images in Williams syndrome and Down syndrome*. Arch Neurol, 1990. **47**(5): p. 529-33.
12. Aylward, E.H., et al., *Cerebellar volume in adults with Down syndrome*. Arch Neurol, 1997. **54**(2): p. 209-12.
13. Pinter, J.D., et al., *Neuroanatomy of Down's syndrome: a high-resolution MRI study*. Am J Psychiatry, 2001. **158**(10): p. 1659-65.
14. Pinter, J.D., et al., *Amygdala and hippocampal volumes in children with Down syndrome: a high-resolution MRI study*. Neurology, 2001. **56**(7): p. 972-4.
15. Wisniewski, K.E., *Down syndrome children often have brain with maturation delay, retardation of growth, and cortical dysgenesis*. Am J Med Genet Suppl, 1990. **7**: p. 274-81.
16. Nadel, L., *Down's syndrome: a genetic disorder in biobehavioral perspective*. Genes Brain Behav, 2003. **2**(3): p. 156-66.
17. Kleschevnikov, A.M., et al., *Hippocampal long-term potentiation suppressed by increased inhibition in the Ts65Dn mouse, a genetic model of Down syndrome*. J Neurosci, 2004. **24**(37): p. 8153-60.

BIBLIOGRAFÍA

18. Weitzdoerfer, R., et al., *Fetal life in Down syndrome starts with normal neuronal density but impaired dendritic spines and synaptosomal structure*. J Neural Transm Suppl, 2001(61): p. 59-70.
19. Ferrer, I. and F. Gullotta, *Down's syndrome and Alzheimer's disease: dendritic spine counts in the hippocampus*. Acta Neuropathol, 1990. **79**(6): p. 680-5.
20. Antonarakis, S.E., *10 years of Genomics, chromosome 21, and Down syndrome*. Genomics, 1998. **51**(1): p. 1-16.
21. Sherman, S.L., et al., *Risk factors for nondisjunction of trisomy 21*. Cytogenet Genome Res, 2005. **111**(3-4): p. 273-80.
22. Gomez, D., et al., *Origin of trisomy 21 in Down syndrome cases from a Spanish population registry*. Ann Genet, 2000. **43**(1): p. 23-8.
23. Berend, S.A., et al., *Obligate short-arm exchange in de novo Robertsonian translocation formation influences placement of crossovers in chromosome 21 nondisjunction*. Am J Hum Genet, 2003. **72**(2): p. 488-95.
24. Bandyopadhyay, R., et al., *Parental origin and timing of de novo Robertsonian translocation formation*. Am J Hum Genet, 2002. **71**(6): p. 1456-62.
25. Hook, E.B., *Down syndrome rates and relaxed selection at older maternal ages*. Am J Hum Genet, 1983. **35**(6): p. 1307-13.
26. Allen, E.G., et al., *Maternal age and risk for trisomy 21 assessed by the origin of chromosome nondisjunction: a report from the Atlanta and National Down Syndrome Projects*. Hum Genet, 2009. **125**(1): p. 41-52.
27. Lamb, N.E., et al., *Association between maternal age and meiotic recombination for trisomy 21*. Am J Hum Genet, 2005. **76**(1): p. 91-9.
28. Oliver, T.R., et al., *New insights into human nondisjunction of chromosome 21 in oocytes*. PLoS Genet, 2008. **4**(3): p. e1000033.
29. Freeman, S.B., et al., *The National Down Syndrome Project: design and implementation*. Public Health Rep, 2007. **122**(1): p. 62-72.
30. Hattori, M., et al., *The DNA sequence of human chromosome 21*. Nature, 2000. **405**(6784): p. 311-9.
31. Lana-Elola, E., et al., *Down syndrome: searching for the genetic culprits*. Dis Model Mech, 2011. **4**(5): p. 586-95.
32. Pritchard, M., et al., *Down syndrome and the genes of human chromosome 21: current knowledge and future potentials. Report on the Expert workshop on the biology of chromosome 21 genes: towards gene-phenotype correlations in Down syndrome. Washington D.C., September 28-October 1, 2007*. Cytogenet Genome Res, 2008. **121**(1): p. 67-77.
33. Gardiner, K. and A.C. Costa, *The proteins of human chromosome 21*. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2006. **142C**(3): p. 196-205.
34. Gardiner, K., M.T. Davisson, and L.S. Crnic, *Building protein interaction maps for Down's syndrome*. Brief Funct Genomic Proteomic, 2004. **3**(2): p. 142-56.

35. Dermitzakis, E.T., et al., *Comparison of human chromosome 21 conserved nongenic sequences (CNGs) with the mouse and dog genomes shows that their selective constraint is independent of their genic environment*. *Genome Res*, 2004. **14**(5): p. 852-9.
36. Dermitzakis, E.T., et al., *Numerous potentially functional but non-genic conserved sequences on human chromosome 21*. *Nature*, 2002. **420**(6915): p. 578-82.
37. Gardiner, K., et al., *Mouse models of Down syndrome: how useful can they be? Comparison of the gene content of human chromosome 21 with orthologous mouse genomic regions*. *Gene*, 2003. **318**: p. 137-47.
38. Lyle, R., et al., *Gene expression from the aneuploid chromosome in a trisomy mouse model of down syndrome*. *Genome Res*, 2004. **14**(7): p. 1268-74.
39. Kahlem, P., et al., *Transcript level alterations reflect gene dosage effects across multiple tissues in a mouse model of down syndrome*. *Genome Res*, 2004. **14**(7): p. 1258-67.
40. Delabar, J.M., et al., *Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21*. *Eur J Hum Genet*, 1993. **1**(2): p. 114-24.
41. Korenberg, J.R., et al., *Molecular definition of a region of chromosome 21 that causes features of the Down syndrome phenotype*. *Am J Hum Genet*, 1990. **47**(2): p. 236-46.
42. Korenberg, J.R., et al., *Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(11): p. 4997-5001.
43. Rahmani, Z., et al., *Critical role of the D21S55 region on chromosome 21 in the pathogenesis of Down syndrome*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(15): p. 5958-62.
44. Barlow, G.M., et al., *Down syndrome congenital heart disease: a narrowed region and a candidate gene*. *Genet Med*, 2001. **3**(2): p. 91-101.
45. Olson, L.E., et al., *Trisomy for the Down syndrome 'critical region' is necessary but not sufficient for brain phenotypes of trisomic mice*. *Hum Mol Genet*, 2007. **16**(7): p. 774-82.
46. Dauphinot, L., et al., *The cerebellar transcriptome during postnatal development of the Ts1Cje mouse, a segmental trisomy model for Down syndrome*. *Hum Mol Genet*, 2005. **14**(3): p. 373-84.
47. Amano, K., et al., *Dosage-dependent over-expression of genes in the trisomic region of Ts1Cje mouse model for Down syndrome*. *Hum Mol Genet*, 2004. **13**(13): p. 1333-40.
48. Sultan, M., et al., *Gene expression variation in Down's syndrome mice allows prioritization of candidate genes*. *Genome Biol*, 2007. **8**(5): p. R91.
49. Prandini, P., et al., *Natural gene-expression variation in Down syndrome modulates the outcome of gene-dosage imbalance*. *Am J Hum Genet*, 2007. **81**(2): p. 252-63.

BIBLIOGRAFÍA

50. Bahn, S., et al., *Neuronal target genes of the neuron-restrictive silencer factor in neurospheres derived from fetuses with Down's syndrome: a gene expression study*. *Lancet*, 2002. **359**(9303): p. 310-5.
51. Gardiner, K., *Gene-dosage effects in Down syndrome and trisomic mouse models*. *Genome Biol*, 2004. **5**(10): p. 244.
52. Dierssen, M., et al., *Murine models for Down syndrome*. *Physiol Behav*, 2001. **73**(5): p. 859-71.
53. Francke, U. and R.T. Taggart, *Assignment of the gene for cytoplasmic superoxide dismutase (Sod-1) to a region of chromosome 16 and of Hprt to a region of the X chromosome in the mouse*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. **76**(10): p. 5230-3.
54. Smith, D.J., et al., *Construction of a panel of transgenic mice containing a contiguous 2-Mb set of YAC/P1 clones from human chromosome 21q22.2*. *Genomics*, 1995. **27**(3): p. 425-34.
55. Sohal, R.S. and R.G. Allen, *Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging: a unifying hypothesis*. *Exp Gerontol*, 1990. **25**(6): p. 499-522.
56. Sies, H., *Biochemistry of oxidative stress*. *Angew. Chem. Int. Ed*, 1986. **25**: p. 1058-1071.
57. Sies, H. and E. Cadenas, *Oxidative stress: damage to intact cells and organs*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1985. **311**(1152): p. 617-31.
58. Sies, H., *Biological redox systems and oxidative stress*. *Cell Mol Life Sci*, 2007. **64**(17): p. 2181-8.
59. Miller, N.J., et al., *Serum total antioxidant activity after myocardial infarction*. *Ann Clin Biochem*, 1997. **34 (Pt 1)**: p. 85-90.
60. Ebadi, M., S.K. Srinivasan, and M.D. Baxi, *Oxidative stress and antioxidant therapy in Parkinson's disease*. *Prog Neurobiol*, 1996. **48**(1): p. 1-19.
61. Sies, H., *Antioxidant activity in cells and organs*. *Am Rev Respir Dis*, 1987. **136**(2): p. 478-80.
62. Cadenas, E. and H. Sies, *Oxidative stress: excited oxygen species and enzyme activity*. *Adv Enzyme Regul*, 1985. **23**: p. 217-37.
63. Slater, T.F., *Free-radical mechanisms in tissue injury*. *Biochem J*, 1984. **222**(1): p. 1-15.
64. de Murcia, J.M., et al., *Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(14): p. 7303-7.
65. Richter, C., et al., *Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases*. *Biochim Biophys Acta*, 1995. **1271**(1): p. 67-74.
66. Ames, B.N., *Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases*. *Science*, 1983. **221**(4617): p. 1256-64.

67. Harman, D., *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*. J Gerontol, 1956. **11**(3): p. 298-300.
68. de Haan, J.B., et al., *Fibroblasts derived from Gpx1 knockout mice display senescent-like features and are susceptible to H2O2-mediated cell death*. Free Radic Biol Med, 2004. **36**(1): p. 53-64.
69. Kandaswami, C. and E. Middleton, Jr., *Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids*. Adv Exp Med Biol, 1994. **366**: p. 351-76.
70. Coghlan, J.G., et al., *Reperfusion of infarcted tissue and free radicals*. Lancet, 1991. **338**(8775): p. 1145-6.
71. Orrenius, S., et al., *Role of Ca²⁺ in toxic cell killing*. Trends Pharmacol Sci, 1989. **10**(7): p. 281-5.
72. Bast, A., G.R. Haenen, and C.J. Doelman, *Oxidants and antioxidants: state of the art*. Am J Med, 1991. **91**(3C): p. 2S-13S.
73. Cheeseman, K.H. and T.F. Slater, *An introduction to free radical biochemistry*. Br Med Bull, 1993. **49**(3): p. 481-93.
74. Halliwell, B., J.M. Gutteridge, and C.E. Cross, *Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?* J Lab Clin Med, 1992. **119**(6): p. 598-620.
75. Halliwell, B.G., J.M.C., *Free radicals in biology and medicine*. Clarendon Press Oxford. London., 1999. **Third edition**. .
76. Fridovich, I., *Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas*. J Biol Chem, 1989. **264**(14): p. 7761-4.
77. Casado, J.A., et al., *[Oxidizing agents and free radicals in biomedicine]*. Rev Med Univ Navarra, 1996. **40**(3): p. 31-40.
78. Ballester, M., *[Anti-oxidants, free radicals, and health. A chemical, organic, and physical approach]*. Med Clin (Barc), 1996. **107**(13): p. 509-15.
79. Richter, C. and J. Schlegel, *Mitochondrial calcium release induced by prooxidants*. Toxicol Lett, 1993. **67**(1-3): p. 119-27.
80. Boveris, A. and B. Chance, *The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen*. Biochem J, 1973. **134**(3): p. 707-16.
81. Ramón, J., *Radicales libres y antioxidantes en clínica humana*. Ed. IDEPSA (Internacional de Ediciones y Publicaciones, S.A.), Madrid, España., 1993.
82. Chance, B., H. Sies, and A. Boveris, *Hydroperoxide metabolism in mammalian organs*. Physiol Rev, 1979. **59**(3): p. 527-605.
83. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, *Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts*. Arch Biochem Biophys, 1986. **246**(2): p. 501-14.
84. Halliwell, B., *Free radicals and metal ions in health and disease*. Proc Nutr Soc, 1987. **46**(1): p. 13-26.

BIBLIOGRAFÍA

85. Halliwell, B. and S. Chirico, *Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance*. Am J Clin Nutr, 1993. **57**(5 Suppl): p. 715S-724S; discussion 724S-725S.
86. Sevanian, A. and P. Hochstein, *Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems*. Annu Rev Nutr, 1985. **5**: p. 365-90.
87. Flitter, W.D., *Free radicals and myocardial reperfusion injury*. Br Med Bull, 1993. **49**(3): p. 545-55.
88. Frankel, E.N., *Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids*. Prog Lipid Res, 1984. **23**(4): p. 197-221.
89. Greabu, M. and R. Olinescu, *The formation of oxidative stress condition in the experimental chemically induced hepatotoxicity*. Roczn Akad Med Białymst, 2002. **47**: p. 86-94.
90. Evans, P. and B. Halliwell, *Micronutrients: oxidant/antioxidant status*. Br J Nutr, 2001. **85 Suppl 2**: p. S67-74.
91. Ryrfeldt, A., G. Bannenberg, and P. Moldeus, *Free radicals and lung disease*. Br Med Bull, 1993. **49**(3): p. 588-603.
92. Romero Alvira, D. and J. Bueno Gomez, *[Free radicals of oxygen and antioxidants in medicine]*. Rev Clin Esp, 1989. **184**(7): p. 345-6.
93. Winrow, V.R., et al., *Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction*. Br Med Bull, 1993. **49**(3): p. 506-22.
94. Lippman, R.D., *Rapid in vivo quantification and comparison of hydroperoxides and oxidized collagen in aging mice, rabbits and man*. Exp Gerontol, 1985. **20**(1): p. 1-5.
95. Jenkins, R.R., *Free radical chemistry. Relationship to exercise*. Sports Med, 1988. **5**(3): p. 156-70.
96. Valenzuela, A., *The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress*. Life Sci, 1991. **48**(4): p. 301-9.
97. Esterbauer, H., R.J. Schaur, and H. Zollner, *Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes*. Free Radic Biol Med, 1991. **11**(1): p. 81-128.
98. Frei, B., *Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action*. Am J Med, 1994. **97**(3A): p. 5S-13S; discussion 22S-28S.
99. Esterbauer, H., *Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products*. Am J Clin Nutr, 1993. **57**(5 Suppl): p. 779S-785S; discussion 785S-786S.
100. Corongiu, F.P., et al., *Lipid peroxidation and molecular damage to polyunsaturated fatty acids in rat liver. Recognition of two classes of hydroperoxides formed under conditions in vivo*. Chem Biol Interact, 1986. **59**(2): p. 147-55.
101. Richter, C., *Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes*. Chem Phys Lipids, 1987. **44**(2-4): p. 175-89.

102. Stadtman, E.R., et al., *Protein modification in aging*. EXS, 1992. **62**: p. 64-72.
103. Levine, R.L., *Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease*. Free Radic Biol Med, 2002. **32**(9): p. 790-6.
104. Gillery, P., et al., [*Aging mechanisms of proteins*]. Diabete Metab, 1991. **17**(1): p. 1-16.
105. Stadtman, E.R., *Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences*. Free Radic Biol Med, 1990. **9**(4): p. 315-25.
106. Stadtman, E.R., *Biochemical markers of aging*. Exp Gerontol, 1988. **23**(4-5): p. 327-47.
107. Levine, R.L., et al., *Turnover of bacterial glutamine synthetase: oxidative inactivation precedes proteolysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(4): p. 2120-4.
108. Davies, K.J., *Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects*. J Biol Chem, 1987. **262**(20): p. 9895-901.
109. Greenwald, R.A. and W.W. Moy, *Effect of oxygen-derived free radicals on hyaluronic acid*. Arthritis Rheum, 1980. **23**(4): p. 455-63.
110. Wolff, S.P. and R.T. Dean, *Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes*. Biochem J, 1987. **245**(1): p. 243-50.
111. Thornalley, P.J., et al., *The oxidation of oxyhaemoglobin by glyceraldehyde and other simple monosaccharides*. Biochem J, 1984. **217**(3): p. 615-22.
112. Roche, E. and D. Romero-Alvira, [*Changes in DNA induced by oxidative stress*]. Med Clin (Barc), 1996. **106**(4): p. 144-53.
113. Aruoma, O.I., B. Halliwell, and M. Dizdaroglu, *Iron ion-dependent modification of bases in DNA by the superoxide radical-generating system hypoxanthine/xanthine oxidase*. J Biol Chem, 1989. **264**(22): p. 13024-8.
114. de Mello Filho, A.C. and R. Meneghini, *Protection of mammalian cells by o-phenanthroline from lethal and DNA-damaging effects produced by active oxygen species*. Biochim Biophys Acta, 1985. **847**(1): p. 82-9.
115. Fukui, H. and C.T. Moraes, *Mechanisms of formation and accumulation of mitochondrial DNA deletions in aging neurons*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(6): p. 1028-36.
116. Perez, V.I., et al., *Thioredoxin 2 haploinsufficiency in mice results in impaired mitochondrial function and increased oxidative stress*. Free Radic Biol Med, 2008. **44**(5): p. 882-92.
117. Druzhyina, N., et al., *Defective repair of oxidative damage in mitochondrial DNA in Down's syndrome*. Mutat Res, 1998. **409**(2): p. 81-9.
118. Richter, C., J.W. Park, and B.N. Ames, *Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(17): p. 6465-7.

BIBLIOGRAFÍA

119. Halliwell, B., et al., *The characterization of antioxidants*. Food Chem Toxicol, 1995. **33**(7): p. 601-17.
120. Gutteridge, J.M. and B. Halliwell, *Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **899**: p. 136-47.
121. Betteridge, D.J., *What is oxidative stress?* Metabolism, 2000. **49**(2 Suppl 1): p. 3-8.
122. Fridovich, I., *Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen?* Ann N Y Acad Sci, 1999. **893**: p. 13-8.
123. Mates, J.M., *Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology*. Toxicology, 2000. **153**(1-3): p. 83-104.
124. Sinet, P.M. and P. Garber, *Inactivation of the human CuZn superoxide dismutase during exposure to O-2 and H2O2*. Arch Biochem Biophys, 1981. **212**(2): p. 411-6.
125. Hodgson, E.K. and I. Fridovich, *The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme*. Biochemistry, 1975. **14**(24): p. 5294-9.
126. Hodgson, E.K. and I. Fridovich, *The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: chemiluminescence and peroxidation*. Biochemistry, 1975. **14**(24): p. 5299-303.
127. Fridovich, I., *Superoxide radical and superoxide dismutases*. Annu Rev Biochem, 1995. **64**: p. 97-112.
128. Monte, M. and E. Sacerdote de Lustig, *[Free radicals of oxygen and superoxide dismutase. Biological and medical aspects]*. Medicina (B Aires), 1994. **54**(1): p. 61-8.
129. de Cavanagh, E.M., et al., *Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities are increased by enalapril and captopril in mouse liver*. FEBS Lett, 1995. **361**(1): p. 22-4.
130. Fridovich, I., *Superoxide dismutases*. Annu Rev Biochem, 1975. **44**: p. 147-59.
131. Dreosti, I.E. and I.R. Record, *Superoxide dismutase (EC 1.15.1.1), zinc status and ethanol consumption in maternal and foetal rat livers*. Br J Nutr, 1979. **41**(2): p. 399-402.
132. Deisseroth, A. and A.L. Dounce, *Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role*. Physiol Rev, 1970. **50**(3): p. 319-75.
133. Eriksson, A.M., et al., *Is the cytosolic catalase induced by peroxisome proliferators in mouse liver on its way to the peroxisomes?* FEBS Lett, 1992. **308**(2): p. 211-4.
134. Aebi, H., *"Catalase in vitro"*. Methods Enzymol, 1984. **105**: p. 121-6.
135. Roberfroid, M., *Toxicology: a science and an art*. Toxicol In Vitro, 1995. **9**(6): p. 839-44.

136. McCord, J.M., *Free radicals and heart disease*. *Bibl Nutr Dieta*, 1989(43): p. 327-37.
137. Mannervik, B., *Glutathione peroxidase*. *Methods Enzymol*, 1985. **113**: p. 490-5.
138. Benzi, G. and A. Moretti, *Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system*. *Free Radic Biol Med*, 1995. **19**(1): p. 77-101.
139. Giugliano, D., *Dietary antioxidants for cardiovascular prevention*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2000. **10**(1): p. 38-44.
140. Maiorino, M., C. Gregolin, and F. Ursini, *Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase*. *Methods Enzymol*, 1990. **186**: p. 448-57.
141. Aniya, Y. and A. Naito, *Oxidative stress-induced activation of microsomal glutathione S-transferase in isolated rat liver*. *Biochem Pharmacol*, 1993. **45**(1): p. 37-42.
142. Krinsky, N.I., *Mechanism of action of biological antioxidants*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1992. **200**(2): p. 248-54.
143. Meister, A. and S.S. Tate, *Glutathione and related gamma-glutamyl compounds: biosynthesis and utilization*. *Annu Rev Biochem*, 1976. **45**: p. 559-604.
144. Dalton, T.P., et al., *Genetically altered mice to evaluate glutathione homeostasis in health and disease*. *Free Radic Biol Med*, 2004. **37**(10): p. 1511-26.
145. Markovic, J., et al., *Role of glutathione in cell nucleus*. *Free Radic Res*, 2010. **44**(7): p. 721-33.
146. Du, J., J.J. Cullen, and G.R. Buettner, *Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer*. *Biochim Biophys Acta*, 2012.
147. Buettner, G.R. and F.Q. Schafer, *Free radicals, oxidants, and antioxidants*. *Teratology*, 2000. **62**(4): p. 234.
148. Buettner, G.R. and B.A. Jurkiewicz, *Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid*. *Radiat Res*, 1996. **145**(5): p. 532-41.
149. Stadtman, E.R., *Ascorbic acid and oxidative inactivation of proteins*. *Am J Clin Nutr*, 1991. **54**(6 Suppl): p. 1125S-1128S.
150. Mellors, A. and A.L. Tappel, *Quinones and quinols as inhibitors of lipid peroxidation*. *Lipids*, 1966. **1**(4): p. 282-4.
151. Mukai, K., et al., *Kinetic study of free-radical-scavenging action of biological hydroquinones (reduced forms of ubiquinone, vitamin K and tocopherol quinone) in solution*. *Biochim Biophys Acta*, 1993. **1157**(3): p. 313-7.
152. Sergediene, E., et al., *Prooxidant toxicity of polyphenolic antioxidants to HL-60 cells: description of quantitative structure-activity relationships*. *FEBS Lett*, 1999. **462**(3): p. 392-6.

BIBLIOGRAFÍA

153. Decker, E.A., *Phenolics: prooxidants or antioxidants?* Nutr Rev, 1997. **55**(11 Pt 1): p. 396-8.
154. Handelman, G.J., *The evolving role of carotenoids in human biochemistry.* Nutrition, 2001. **17**(10): p. 818-22.
155. Harris, E.D., *Regulation of antioxidant enzymes.* J Nutr, 1992. **122**(3 Suppl): p. 625-6.
156. Das, I. and R.H. Reeves, *The use of mouse models to understand and improve cognitive deficits in Down syndrome.* Dis Model Mech, 2011. **4**(5): p. 596-606.
157. Engidawork, E. and G. Lubec, *Molecular changes in fetal Down syndrome brain.* J Neurochem, 2003. **84**(5): p. 895-904.
158. Patterson, D. and A.C. Costa, *Down syndrome and genetics - a case of linked histories.* Nat Rev Genet, 2005. **6**(2): p. 137-47.
159. Busciglio, J., et al., *Altered metabolism of the amyloid beta precursor protein is associated with mitochondrial dysfunction in Down's syndrome.* Neuron, 2002. **33**(5): p. 677-88.
160. Busciglio, J. and B.A. Yankner, *Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons in vitro.* Nature, 1995. **378**(6559): p. 776-9.
161. Lott, I.T., et al., *Beta-amyloid, oxidative stress and down syndrome.* Curr Alzheimer Res, 2006. **3**(5): p. 521-8.
162. Zana, M., Z. Janka, and J. Kalman, *Oxidative stress: a bridge between Down's syndrome and Alzheimer's disease.* Neurobiol Aging, 2007. **28**(5): p. 648-76.
163. Capone, G.T., *Down syndrome: advances in molecular biology and the neurosciences.* J Dev Behav Pediatr, 2001. **22**(1): p. 40-59.
164. Pallardo, F.V., et al., *Multiple evidence for an early age pro-oxidant state in Down Syndrome patients.* Biogerontology, 2006. **7**(4): p. 211-20.
165. Jovanovic, S.V., D. Clements, and K. MacLeod, *Biomarkers of oxidative stress are significantly elevated in Down syndrome.* Free Radic Biol Med, 1998. **25**(9): p. 1044-8.
166. Patterson, D. and D.C. Cabelof, *Down syndrome as a model of DNA polymerase beta haploinsufficiency and accelerated aging.* Mech Ageing Dev, 2012. **133**(4): p. 133-7.
167. Perluigi, M., et al., *Oxidative stress occurs early in Down syndrome pregnancy: A redox proteomics analysis of amniotic fluid.* Proteomics Clin Appl, 2011. **5**(3-4): p. 167-78.
168. Pagano, G. and G. Castello, *Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Down syndrome.* Adv Exp Med Biol, 2012. **724**: p. 291-9.
169. Benzie, I.F., *Evolution of antioxidant defence mechanisms.* Eur J Nutr, 2000. **39**(2): p. 53-61.

170. Perrone, S., et al., *Early oxidative stress in amniotic fluid of pregnancies with Down syndrome*. Clin Biochem, 2007. **40**(3-4): p. 177-80.
171. Perluigi, M. and D.A. Butterfield, *Oxidative Stress and Down Syndrome: A Route toward Alzheimer-Like Dementia*. Curr Gerontol Geriatr Res, 2011. **2012**: p. 724904.
172. Allen, R.G., *Oxygen-reactive species and antioxidant responses during development: the metabolic paradox of cellular differentiation*. Proc Soc Exp Biol Med, 1991. **196**(2): p. 117-29.
173. Zana, M., et al., *Age-dependent oxidative stress-induced DNA damage in Down's lymphocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **345**(2): p. 726-33.
174. Head, E., et al., *Possible compensatory events in adult Down syndrome brain prior to the development of Alzheimer disease neuropathology: targets for nonpharmacological intervention*. J Alzheimers Dis, 2007. **11**(1): p. 61-76.
175. Jomova, K. and M. Valko, *Advances in metal-induced oxidative stress and human disease*. Toxicology, 2011. **283**(2-3): p. 65-87.
176. de Haan, J.B., et al., *Reactive oxygen species and their contribution to pathology in Down syndrome*. Adv Pharmacol, 1997. **38**: p. 379-402.
177. Sies, H., *Strategies of antioxidant defense*. Eur J Biochem, 1993. **215**(2): p. 213-9.
178. McCord, J.M., *Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance*. Clin Biochem, 1993. **26**(5): p. 351-7.
179. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, *Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease*. Biochem J, 1984. **219**(1): p. 1-14.
180. de Haan, J.B., et al., *Elevation in the ratio of Cu/Zn-superoxide dismutase to glutathione peroxidase activity induces features of cellular senescence and this effect is mediated by hydrogen peroxide*. Hum Mol Genet, 1996. **5**(2): p. 283-92.
181. de Haan, J.B., et al., *Cu/Zn-superoxide dismutase and glutathione peroxidase during aging*. Biochem Mol Biol Int, 1995. **35**(6): p. 1281-97.
182. Anuszevska, E.L., B.M. Gruber, and J.H. Kozirowska, *Studies on adaptation to adriamycin in cells pretreated with hydrogen peroxide*. Biochem Pharmacol, 1997. **54**(5): p. 597-603.
183. Spitz, D.R., et al., *Cellular resistance to oxidative stress is accompanied by resistance to cisplatin: the significance of increased catalase activity and total glutathione in hydrogen peroxide-resistant fibroblasts*. J Cell Physiol, 1993. **156**(1): p. 72-9.
184. Bohr, V.A., *Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells*. Free Radic Biol Med, 2002. **32**(9): p. 804-12.

BIBLIOGRAFÍA

185. Jarrett, S.G. and M.E. Boulton, *Antioxidant up-regulation and increased nuclear DNA protection play key roles in adaptation to oxidative stress in epithelial cells*. Free Radic Biol Med, 2005. **38**(10): p. 1382-91.
186. Pastor, M.C., et al., *Antioxidant enzymes and fatty acid status in erythrocytes of Down's syndrome patients*. Clin Chem, 1998. **44**(5): p. 924-9.
187. Yim, M.B., P.B. Chock, and E.R. Stadtman, *Enzyme function of copper, zinc superoxide dismutase as a free radical generator*. J Biol Chem, 1993. **268**(6): p. 4099-105.
188. Yim, M.B., P.B. Chock, and E.R. Stadtman, *Copper, zinc superoxide dismutase catalyzes hydroxyl radical production from hydrogen peroxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(13): p. 5006-10.
189. Muchova, J., et al., *Influence of age on activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation products in erythrocytes and neutrophils of Down syndrome patients*. Free Radic Biol Med, 2001. **31**(4): p. 499-508.
190. Nagata, Y., Y. Yamamoto, and E. Niki, *Reaction of phosphatidylcholine hydroperoxide in human plasma: the role of peroxidase and lecithin:cholesterol acyltransferase*. Arch Biochem Biophys, 1996. **329**(1): p. 24-30.
191. Neve, J., et al., *Selenium, zinc and copper in Down's syndrome (trisomy 21): blood levels and relations with glutathione peroxidase and superoxide dismutase*. Clin Chim Acta, 1983. **133**(2): p. 209-14.
192. Zitnanova, I., et al., *Markers of oxidative stress in children with Down syndrome*. Clin Chem Lab Med, 2006. **44**(3): p. 306-10.
193. Gil, P., et al., *Malondialdehyde: a possible marker of ageing*. Gerontology, 2002. **48**(4): p. 209-14.
194. De La Torre, R., et al., *Overexpression of copper-zinc superoxide dismutase in trisomy 21*. Experientia, 1996. **52**(9): p. 871-3.
195. Odetti, P., et al., *Early glycoxidation damage in brains from Down's syndrome*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **243**(3): p. 849-51.
196. Srivastava, S., et al., *Metabolism of the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-trans-2-nonenal, in isolated perfused rat heart*. J Biol Chem, 1998. **273**(18): p. 10893-900.
197. Parola, M., et al., *4-Hydroxynonenal as a biological signal: molecular basis and pathophysiological implications*. Antioxid Redox Signal, 1999. **1**(3): p. 255-84.
198. Hartley, D.P., J.A. Ruth, and D.R. Petersen, *The hepatocellular metabolism of 4-hydroxynonenal by alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase, and glutathione S-transferase*. Arch Biochem Biophys, 1995. **316**(1): p. 197-205.
199. Uchida, K. and E.R. Stadtman, *Quantitation of 4-hydroxynonenal protein adducts*. Methods Enzymol, 1994. **233**: p. 371-80.
200. Horakova, E., et al., *Mechanisms of iron-induced oxidative modifications of creatine kinase in rat brain in vitro. possible involvement of HNE*. Gen Physiol Biophys, 2002. **21**(3): p. 327-36.

201. Hawkins, C.L. and M.J. Davies, *Generation and propagation of radical reactions on proteins*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1504**(2-3): p. 196-219.
202. Pantke, U., et al., *Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary heart surgery*. Free Radic Biol Med, 1999. **27**(9-10): p. 1080-6.
203. Requena, J.R., R.L. Levine, and E.R. Stadtman, *Recent advances in the analysis of oxidized proteins*. Amino Acids, 2003. **25**(3-4): p. 221-6.
204. Berlett, B.S. and E.R. Stadtman, *Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress*. J Biol Chem, 1997. **272**(33): p. 20313-6.
205. Dalle-Donne, I., et al., *Protein carbonylation in human diseases*. Trends Mol Med, 2003. **9**(4): p. 169-76.
206. Baraibar, M.A., et al., *Protein oxidative damage at the crossroads of cellular senescence, aging, and age-related diseases*. Oxid Med Cell Longev, 2012. **2012**: p. 919832.
207. Balcz, B., et al., *Increased brain protein levels of carbonyl reductase and alcohol dehydrogenase in Down syndrome and Alzheimer's disease*. J Neural Transm Suppl, 2001(61): p. 193-201.
208. Dalle-Donne, I., et al., *Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression*. J Cell Mol Med, 2006. **10**(2): p. 389-406.
209. Friguet, B. and L.I. Szweda, *Inhibition of the multicatalytic proteinase (proteasome) by 4-hydroxy-2-nonenal cross-linked protein*. FEBS Lett, 1997. **405**(1): p. 21-5.
210. Sitte, N., et al., *Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part I--effects of proliferative senescence*. FASEB J, 2000. **14**(15): p. 2495-502.
211. Sitte, N., et al., *Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part II--aging of nondividing cells*. FASEB J, 2000. **14**(15): p. 2503-10.
212. Sitte, N., et al., *Proteasome inhibition by lipofuscin/ceroid during postmitotic aging of fibroblasts*. FASEB J, 2000. **14**(11): p. 1490-8.
213. Perluigi, M. and D.A. Butterfield, *The identification of protein biomarkers for oxidative stress in Down syndrome*. Expert Rev Proteomics, 2011. **8**(4): p. 427-9.
214. Tiano, L. and J. Busciglio, *Mitochondrial dysfunction and Down's syndrome: is there a role for coenzyme Q(10) ?* Biofactors, 2011. **37**(5): p. 386-92.
215. Yakes, F.M. and B. Van Houten, *Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(2): p. 514-9.
216. Croteau, D.L. and V.A. Bohr, *Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(41): p. 25409-12.

BIBLIOGRAFÍA

217. Clayton, D.A., *Transcription of the mammalian mitochondrial genome*. Annu Rev Biochem, 1984. **53**: p. 573-94.
218. Arbusova, S., T. Hutchin, and H. Cuckle, *Mitochondrial dysfunction and Down's syndrome*. Bioessays, 2002. **24**(8): p. 681-4.
219. Howell, N., et al., *mtDNA mutations and common neurodegenerative disorders*. Trends Genet, 2005. **21**(11): p. 583-6.
220. Coskun, P., et al., *A mitochondrial etiology of Alzheimer and Parkinson disease*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1820**(5): p. 553-64.
221. Wallace, D.C., *Mitochondrial diseases in man and mouse*. Science, 1999. **283**(5407): p. 1482-8.
222. Valenti, D., et al., *Deficit of complex I activity in human skin fibroblasts with chromosome 21 trisomy and overproduction of reactive oxygen species by mitochondria: involvement of the cAMP/PKA signalling pathway*. Biochem J, 2011. **435**(3): p. 679-88.
223. Pallardo, F.V., et al., *Mitochondrial dysfunction in some oxidative stress-related genetic diseases: Ataxia-Telangiectasia, Down Syndrome, Fanconi Anaemia and Werner Syndrome*. Biogerontology, 2010. **11**(4): p. 401-19.
224. Velarde, M.C., et al., *Mitochondrial oxidative stress caused by Sod2 deficiency promotes cellular senescence and aging phenotypes in the skin*. Aging (Albany NY), 2012. **4**(1): p. 3-12.
225. Passos, J.F. and T. Zglinicki, *Mitochondrial dysfunction and cell senescence--skin deep into mammalian aging*. Aging (Albany NY), 2012. **4**(2): p. 74-5.
226. Lee, H.C., et al., *Increase in mitochondrial mass in human fibroblasts under oxidative stress and during replicative cell senescence*. J Biomed Sci, 2002. **9**(6 Pt 1): p. 517-26.
227. Jansen-Durr, P. and H.D. Osiewacz, *Healthy ageing: a question of stress, damage and repair. Meeting on mechanisms of biological ageing*. EMBO Rep, 2002. **3**(12): p. 1127-32.
228. Ishihara, K., et al., *Increased lipid peroxidation in Down's syndrome mouse models*. J Neurochem, 2009. **110**(6): p. 1965-76.
229. Hayflick, L., *The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains*. Exp Cell Res, 1965. **37**: p. 614-36.
230. Hayflick, L. and P.S. Moorhead, *The serial cultivation of human diploid cell strains*. Exp Cell Res, 1961. **25**: p. 585-621.
231. Collado, M., M.A. Blasco, and M. Serrano, *Cellular senescence in cancer and aging*. Cell, 2007. **130**(2): p. 223-33.
232. Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna, *Cellular senescence: when bad things happen to good cells*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(9): p. 729-40.
233. Collado, M. and M. Serrano, *The power and the promise of oncogene-induced senescence markers*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(6): p. 472-6.

234. Campisi, J., *Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors*. Cell, 2005. **120**(4): p. 513-22.
235. Ben-Porath, I. and R.A. Weinberg, *The signals and pathways activating cellular senescence*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(5): p. 961-76.
236. Patil, C.K., I.S. Mian, and J. Campisi, *The thorny path linking cellular senescence to organismal aging*. Mech Ageing Dev, 2005. **126**(10): p. 1040-5.
237. Drayton, S. and G. Peters, *Immortalisation and transformation revisited*. Curr Opin Genet Dev, 2002. **12**(1): p. 98-104.
238. Sherr, C.J. and R.A. DePinho, *Cellular senescence: mitotic clock or culture shock?* Cell, 2000. **102**(4): p. 407-10.
239. Collado, M. and M. Serrano, *Senescence in tumours: evidence from mice and humans*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(1): p. 51-7.
240. Sohal, R.S. and W.C. Orr, *The redox stress hypothesis of aging*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(3): p. 539-55.
241. Afanas'ev, I., *Signaling and Damaging Functions of Free Radicals in Aging-Free Radical Theory, Hormesis, and TOR*. Aging Dis, 2010. **1**(2): p. 75-88.
242. Lu, T. and T. Finkel, *Free radicals and senescence*. Exp Cell Res, 2008. **314**(9): p. 1918-22.
243. Kregel, K.C. and H.J. Zhang, *An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007. **292**(1): p. R18-36.
244. Hekimi, S., J. Lapointe, and Y. Wen, *Taking a "good" look at free radicals in the aging process*. Trends Cell Biol, 2011. **21**(10): p. 569-76.
245. Passos, J.F., et al., *Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence*. Mol Syst Biol, 2010. **6**: p. 347.
246. Passos, J.F., et al., *Cellular senescence: unravelling complexity*. Age (Dordr), 2009. **31**(4): p. 353-63.
247. Lott, I.T., *Antioxidants in Down syndrome*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1822**(5): p. 657-63.
248. Sinha, S., *Anti-oxidant gene expression imbalance, aging and Down syndrome*. Life Sci, 2005. **76**(12): p. 1407-26.
249. Kimura, M., et al., *Proliferation dynamics in cultured skin fibroblasts from Down syndrome subjects*. Free Radic Biol Med, 2005. **39**(3): p. 374-80.
250. de Haan, J.B., et al., *An altered antioxidant balance occurs in Down syndrome fetal organs: implications for the "gene dosage effect" hypothesis*. J Neural Transm Suppl, 2003(67): p. 67-83.
251. Lowe, S.W. and C.J. Sherr, *Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles*. Curr Opin Genet Dev, 2003. **13**(1): p. 77-83.

BIBLIOGRAFÍA

252. Beausejour, C.M., et al., *Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways*. EMBO J, 2003. **22**(16): p. 4212-22.
253. Bayreuther, K., et al., *Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(14): p. 5112-6.
254. Dimri, G.P., et al., *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(20): p. 9363-7.
255. Kurz, D.J., et al., *Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells*. J Cell Sci, 2000. **113 (Pt 20)**: p. 3613-22.
256. Roat, E., et al., *Mitochondrial alterations and tendency to apoptosis in peripheral blood cells from children with Down syndrome*. FEBS Lett, 2007. **581**(3): p. 521-5.
257. Murphy, L.O., et al., *Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(8): p. 556-64.
258. Chen, R.H., C. Sarnecki, and J. Blenis, *Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(3): p. 915-27.
259. Zhao, Y., et al., *RSK3 encodes a novel pp90rsk isoform with a unique N-terminal sequence: growth factor-stimulated kinase function and nuclear translocation*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(8): p. 4353-63.
260. Roux, P.P. and J. Blenis, *ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions*. Microbiol Mol Biol Rev, 2004. **68**(2): p. 320-44.
261. Thakur, A., et al., *Aberrant expression of X-linked genes RbAp46, Rsk4, and Cldn2 in breast cancer*. Mol Cancer Res, 2007. **5**(2): p. 171-81.
262. Medvedev, Z.A., *An attempt at a rational classification of theories of ageing*. Biol Rev Camb Philos Soc, 1990. **65**(3): p. 375-98.
263. McCord, J.M. and I. Fridovich, *Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein)*. J Biol Chem, 1969. **244**(22): p. 6049-55.
264. Harman, D., *The biologic clock: the mitochondria?* J Am Geriatr Soc, 1972. **20**(4): p. 145-7.
265. Miquel, J., et al., *Mitochondrial role in cell aging*. Exp Gerontol, 1980. **15**(6): p. 575-91.
266. Miquel, J., E. de Juan, and I. Sevilla, *Oxygen-induced mitochondrial damage and aging*. EXS, 1992. **62**: p. 47-57.
267. Miquel, J., *An update on the mitochondrial-DNA mutation hypothesis of cell aging*. Mutat Res, 1992. **275**(3-6): p. 209-16.
268. Miquel, J., *An update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications*. Exp Gerontol, 1998. **33**(1-2): p. 113-26.

269. Miquel, J. and J.E. Fleming, *A two-step hypothesis on the mechanisms of in vitro cell aging: cell differentiation followed by intrinsic mitochondrial mutagenesis*. *Exp Gerontol*, 1984. **19**(1): p. 31-6.
270. Davies, K.J., *Oxidative stress: the paradox of aerobic life*. *Biochem Soc Symp*, 1995. **61**: p. 1-31.
271. Passos, J.F. and T. Von Zglinicki, *Oxygen free radicals in cell senescence: are they signal transducers?* *Free Radic Res*, 2006. **40**(12): p. 1277-83.
272. Moiseeva, O., et al., *Mitochondrial dysfunction contributes to oncogene-induced senescence*. *Mol Cell Biol*, 2009. **29**(16): p. 4495-507.
273. Passos, J.F., et al., *Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence*. *PLoS Biol*, 2007. **5**(5): p. e110.
274. Passos, J.F., T. von Zglinicki, and T.B. Kirkwood, *Mitochondria and ageing: winning and losing in the numbers game*. *Bioessays*, 2007. **29**(9): p. 908-17.
275. d'Adda di Fagagna, F., *Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response*. *Nat Rev Cancer*, 2008. **8**(7): p. 512-22.
276. Groner, Y., et al., *Cell damage by excess CuZnSOD and Down's syndrome*. *Biomed Pharmacother*, 1994. **48**(5-6): p. 231-40.
277. Tiano, L., et al., *Prolonged coenzyme Q10 treatment in Down syndrome patients: effect on DNA oxidation*. *Neurobiol Aging*, 2012. **33**(3): p. 626 e1-8.
278. Capone, G., et al., *Evidence for increased mitochondrial superoxide production in Down syndrome*. *Life Sci*, 2002. **70**(24): p. 2885-95.
279. Raha, S., et al., *Superoxides from mitochondrial complex III: the role of manganese superoxide dismutase*. *Free Radic Biol Med*, 2000. **29**(2): p. 170-80.
280. Kim, S.H., et al., *Decreased levels of complex III core protein 1 and complex V beta chain in brains from patients with Alzheimer's disease and Down syndrome*. *Cell Mol Life Sci*, 2000. **57**(12): p. 1810-6.
281. Chiba, Y., et al., *Cultured murine dermal fibroblast-like cells from senescence-accelerated mice as in vitro models for higher oxidative stress due to mitochondrial alterations*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2005. **60**(9): p. 1087-98.
282. Contestabile, A., et al., *Widespread impairment of cell proliferation in the neonate Ts65Dn mouse, a model for Down syndrome*. *Cell Prolif*, 2009. **42**(2): p. 171-81.
283. Werber, J., et al., *Analysis of 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride degradation and hydrolysis in aqueous solutions*. *J Pharm Sci*, 2011. **100**(8): p. 3307-15.
284. Niki, E., et al., *Oxidative hemolysis of erythrocytes and its inhibition by free radical scavengers*. *J Biol Chem*, 1988. **263**(36): p. 19809-14.

BIBLIOGRAFÍA

285. Ghosh, M., P. Manna, and P.C. Sil, *Protective role of a coumarin-derived schiff base scaffold against tertiary butyl hydroperoxide (TBHP)-induced oxidative impairment and cell death via MAPKs, NF-kappaB and mitochondria-dependent pathways*. Free Radic Res, 2011. **45**(5): p. 620-37.
286. Halliwell, B. and M. Whiteman, *Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?* Br J Pharmacol, 2004. **142**(2): p. 231-55.
287. Crouch, S.P., et al., *The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity*. J Immunol Methods, 1993. **160**(1): p. 81-8.
288. Andersen, H.R., et al., *Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes*. Clin Chem, 1997. **43**(4): p. 562-8.
289. Paglia, D.E. and W.N. Valentine, *Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase*. J Lab Clin Med, 1967. **70**(1): p. 158-69.
290. Fukunaga, K., T. Suzuki, and K. Takama, *Highly sensitive high-performance liquid chromatography for the measurement of malondialdehyde in biological samples*. J Chromatogr, 1993. **621**(1): p. 77-81.
291. Lee, B.Y., et al., *Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase*. Aging Cell, 2006. **5**(2): p. 187-95.
292. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, *The definition and measurement of antioxidants in biological systems*. Free Radic Biol Med, 1995. **18**(1): p. 125-6.
293. Wang, H. and J.A. Joseph, *Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader*. Free Radic Biol Med, 1999. **27**(5-6): p. 612-6.
294. Lee, M., et al., *Effect of overexpression of wild-type and mutant Cu/Zn-superoxide dismutases on oxidative damage and antioxidant defences: relevance to Down's syndrome and familial amyotrophic lateral sclerosis*. J Neurochem, 2001. **76**(4): p. 957-65.
295. Pendergrass, W., J. Angello, and T.H. Norwood, *The relationship between cell size, the activity of DNA polymerase alpha and proliferative activity in human diploid fibroblast-like cell cultures*. Exp Gerontol, 1989. **24**(5-6): p. 383-93.
296. Segal, D.J. and E.E. McCoy, *Studies on Down's syndrome in tissue culture. I. Growth rates and protein contents of fibroblast cultures*. J Cell Physiol, 1974. **83**(1): p. 85-90.
297. Wiese, A.G., R.E. Pacifici, and K.J. Davies, *Transient adaptation of oxidative stress in mammalian cells*. Arch Biochem Biophys, 1995. **318**(1): p. 231-40.
298. Sundaresan, M., et al., *Requirement for generation of H2O2 for platelet-derived growth factor signal transduction*. Science, 1995. **270**(5234): p. 296-9.
299. Schmidt, K.N., et al., *The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF-kappa B*. Chem Biol, 1995. **2**(1): p. 13-22.

300. Khan, A.U. and T. Wilson, *Reactive oxygen species as cellular messengers*. Chem Biol, 1995. **2**(7): p. 437-45.
301. Bladier, C., et al., *Response of a primary human fibroblast cell line to H₂O₂: senescence-like growth arrest or apoptosis?* Cell Growth Differ, 1997. **8**(5): p. 589-98.
302. Scarpato, R., et al., *Cytotoxicity and genotoxicity studies of two free-radical generators (AAPH and SIN-1) in human microvascular endothelial cells (HMEC-1) and human peripheral lymphocytes*. Mutat Res, 2011. **722**(1): p. 69-77.
303. Cawthon, D., et al., *Evidence of mitochondrial dysfunction in broilers with pulmonary hypertension syndrome (Ascites): effect of t-butyl hydroperoxide on hepatic mitochondrial function, glutathione, and related thiols*. Poult Sci, 1999. **78**(1): p. 114-24.
304. Sarkar, M.K. and P.C. Sil, *Prevention of tertiary butyl hydroperoxide induced oxidative impairment and cell death by a novel antioxidant protein molecule isolated from the herb, Phyllanthus niruri*. Toxicol In Vitro, 2010. **24**(6): p. 1711-9.
305. Koopman, W.J., et al., *Mammalian mitochondrial complex I: biogenesis, regulation, and reactive oxygen species generation*. Antioxid Redox Signal, 2010. **12**(12): p. 1431-70.
306. Fato, R., et al., *Mitochondrial production of reactive oxygen species: role of complex I and quinone analogues*. Biofactors, 2008. **32**(1-4): p. 31-9.
307. Miquel, L.F., JE, *A two-step hypothesis on the mechanisms of in vitro cell aging: cell differentiation followed by intrinsic mitochondrial mutagenesis*. Exp Gerontol, 1984. **19**: p. 31-36.
308. Valenti, D., et al., *Impairment of F1F0-ATPase, adenine nucleotide translocator and adenylate kinase causes mitochondrial energy deficit in human skin fibroblasts with chromosome 21 trisomy*. Biochem J, 2010. **431**(2): p. 299-310.
309. Sohal, R.S. and A. Dubey, *Mitochondrial oxidative damage, hydrogen peroxide release, and aging*. Free Radic Biol Med, 1994. **16**(5): p. 621-6.
310. Miquel J, F.J., *Theoretical and experimental support for an "oxygen radical-mitochondrial injury" hypothesis of cell aging*. In: Johnson J, et al., editors. Free Radicals, Aging and Degenerative Diseases. New York: Alan Liss, 1986, 1986.
311. Harman, D., *Free radicals in aging*. Mol Cell Biochem, 1988. **84**(2): p. 155-61.
312. Jeziorowska, A., et al., *Regular trisomy 21 not accompanied by increased copper-zinc superoxide dismutase (SOD1) activity*. Clin Genet, 1988. **33**(1): p. 11-9.
313. Nakao, N., et al., *Overexpressing Cu/Zn superoxide dismutase enhances survival of transplanted neurons in a rat model of Parkinson's disease*. Nat Med, 1995. **1**(3): p. 226-31.
314. Vanella, A., et al., *Superoxide dismutase activities in aging rat brain*. Gerontology, 1982. **28**(2): p. 108-13.

BIBLIOGRAFÍA

315. Groner, Y., et al., *Down syndrome clinical symptoms are manifested in transfected cells and transgenic mice overexpressing the human Cu/Zn-superoxide dismutase gene*. J Physiol (Paris), 1990. **84**(1): p. 53-77.
316. Chen, Q. and B.N. Ames, *Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(10): p. 4130-4.
317. Michiels, C., et al., *Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress*. Free Radic Biol Med, 1994. **17**(3): p. 235-48.
318. Brooksbank, B.W. and R. Balazs, *Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and lipoperoxidation in Down's syndrome fetal brain*. Brain Res, 1984. **318**(1): p. 37-44.
319. Cristiano, F., et al., *Changes in the levels of enzymes which modulate the antioxidant balance occur during aging and correlate with cellular damage*. Mech Ageing Dev, 1995. **80**(2): p. 93-105.
320. Oppermann, U., *Carbonyl reductases: the complex relationships of mammalian carbonyl- and quinone-reducing enzymes and their role in physiology*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2007. **47**: p. 293-322.
321. Casado, A., M.E. Lopez-Fernandez, and R. Ruiz, *Lipid peroxidation in Down syndrome caused by regular trisomy 21, trisomy 21 by Robertsonian translocation and mosaic trisomy 21*. Clin Chem Lab Med, 2007. **45**(1): p. 59-62.
322. Ciechanover, A., A. Orian, and A.L. Schwartz, *The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mode of action and clinical implications*. J Cell Biochem Suppl, 2000. **34**: p. 40-51.
323. Sitte, N., et al., *Protein oxidation and degradation during proliferative senescence of human MRC-5 fibroblasts*. Free Radic Biol Med, 2000. **28**(5): p. 701-8.
324. Szweda, P.A., B. Friguet, and L.I. Szweda, *Proteolysis, free radicals, and aging*. Free Radic Biol Med, 2002. **33**(1): p. 29-36.
325. Ahmed, E.K., et al., *Protein modification and replicative senescence of WI-38 human embryonic fibroblasts*. Aging Cell, 2010. **9**(2): p. 252-72.
326. Ahmed, E.K., et al., *Protein oxidative modifications and replicative senescence of WI-38 human embryonic fibroblasts*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1119**: p. 88-96.
327. Jang, Y.C. and V.H. Remmen, *The mitochondrial theory of aging: insight from transgenic and knockout mouse models*. Exp Gerontol, 2009. **44**(4): p. 256-60.
328. Scoumanne, A., et al., *The cyclin-dependent kinase inhibitor p21 is regulated by RNA-binding protein PCBP4 via mRNA stability*. Nucleic Acids Res, 2010. **39**(1): p. 213-24.
329. Wolvetang, E.J., et al., *ETS2 overexpression in transgenic models and in Down syndrome predisposes to apoptosis via the p53 pathway*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(3): p. 247-55.

330. Chen, J.H., et al., *Loss of proliferative capacity and induction of senescence in oxidatively stressed human fibroblasts*. J Biol Chem, 2004. **279**(47): p. 49439-46.
331. Takahashi, A., et al., *Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(11): p. 1291-7.
332. Schneider, E.L. and C.J. Epstein, *Replication rate and lifespan of cultured fibroblasts in Down's syndrome*. Proc Soc Exp Biol Med, 1972. **141**(3): p. 1092-4.
333. Knas, M., et al., *The profile of lysosomal exoglycosidases in replicative and stress-induced senescence in early passage human fibroblasts*. Folia Histochem Cytobiol, 2012. **50**(2): p. 220-7.
334. DeJesus, V., et al., *Induction of apoptosis in human replicative senescent fibroblasts*. Exp Cell Res, 2002. **274**(1): p. 92-9.
335. Batthyany, C., et al., *Time course and site(s) of cytochrome c tyrosine nitration by peroxynitrite*. Biochemistry, 2005. **44**(22): p. 8038-46.
336. Estevam, M.L., et al., *Changes in the spin state and reactivity of cytochrome C induced by photochemically generated singlet oxygen and free radicals*. J Biol Chem, 2004. **279**(38): p. 39214-22.
337. Chen, Y.R., et al., *Protein oxidation of cytochrome C by reactive halogen species enhances its peroxidase activity*. J Biol Chem, 2002. **277**(33): p. 29781-91.
338. Cassina, A.M., et al., *Cytochrome c nitration by peroxynitrite*. J Biol Chem, 2000. **275**(28): p. 21409-15.
339. Villegas, J.A., A.G. Mauk, and R. Vazquez-Duhalt, *A cytochrome c variant resistant to heme degradation by hydrogen peroxide*. Chem Biol, 2000. **7**(4): p. 237-44.
340. Florence, T.M., *The degradation of cytochrome c by hydrogen peroxide*. J Inorg Biochem, 1985. **23**(2): p. 131-41.
341. Barr, D.P. and R.P. Mason, *Mechanism of radical production from the reaction of cytochrome c with organic hydroperoxides. An ESR spin trapping investigation*. J Biol Chem, 1995. **270**(21): p. 12709-16.
342. Godoy, L.C., et al., *Disruption of the M80-Fe ligation stimulates the translocation of cytochrome c to the cytoplasm and nucleus in nonapoptotic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(8): p. 2653-8.



AGRADECIMIENTOS

Hay una verdad universal que todos debemos afrontar, queramos o no. Al final todo se acaba. Por mucho que deseara la llegada este día, nunca me han gustado los finales. El último día de verano, el último capítulo de un buen libro, separarte de un buen amigo, pero los finales son inevitables. Llega el otoño, cierras el libro, dices adiós, ¡hoy es uno de esos días para mí!. Hoy me despido de todo lo que me era familiar, todo lo que me resultaba cómodo, ¡paso página!. Hay personas tan importantes para mí, que estarán ahí pase lo que pase. Ellos son mi tierra firme, mi estrella polar, y esa voz de mi corazón que siempre me acompañará, ¡siempre!.

Uno de los tesoros más preciados es el agradecimiento, así que, en primer lugar dar las gracias a mis directores de tesis, Dra. Domínguez y Dr. Rodríguez:

Gracias M^a Carmen, por creer y confiar en mí, y sobretodo por ofrecerme la oportunidad de dedicarme a la investigación, por tu orientación científica, por la paciencia y meticulosa revisión de todos los trabajos realizados durante mi estancia en el laboratorio. Gracias por dirigir y supervisar este trabajo en el que estamos involucrados desde hace varios años, ¡gracias!.

Gracias Victor, ¡sobran las palabras!. Gracias por enseñarme a ver la ciencia desde varios puntos de vista, a plantearme todo y sobretodo por dedicarme parte de tu tiempo. Gracias por encauzarme en este senda e intentar que no me desviara, por los consejos justos y tan necesarios para avanzar, entiendo que estoy al principio del camino y queda mucho por recorrer, aunque como dijo Antonio Machado: *"Caminante, son tus huellas el camino y nada más; caminante, no hay camino, se hace camino al andar..."*. Gracias por todos los momentos alegres, risueños e incluso por la comprensión en aquellos momentos de tensión, por esos silencios que lo dicen todo y por todo el apoyo, el cual siempre me ha hecho creer que lo conseguiría.

Gracias a tod@s los compañeros, pasados y presentes, que han compartido el día a día conmigo en el laboratorio de Fisiopatología Celular perteneciente al CIBBIM y de los cuales he tenido la suerte de aprender algo nuevo cada día:

Gracias a los Dres. Schwartz (Padre e Hijo) por toda vuestra ayuda y facilidad para trabajar en el CIBBIM-nanomedicina. Por otra parte, agradecer a las Dras. María Goya y Elisa Llurba la participación en varios proyectos de investigación, así como el apoyo y el interés demostrado en cada momento.

Gracias a la Dra. Sánchez, ¡Olga no cambies nunca!, gracias por ser como eres, porque a lo largo de estos años siempre has estado a mi lado (con el trabajo experimental, con la tesis, con la estadística del GraphPad Prism 5...), porque hemos reído y gruñido, porque me has enseñado. Gracias por tu tiempo, por tus ánimos ("de mica en mica... s'omple la pica"), por tu alegría, por tu apoyo incondicional y por mi

AGRADECIMIENTOS

defensa frente a los argumentos con fina dialéctica de Victor (incluido el levantamiento de ceja). ¡Cuánto voy a echar de menos esas "discusiones"...!, ¡Gràcies per tot!.

Gracias a Natalia por la ayuda prestada y por la participación activa en este trabajo durante la estancia en el laboratorio. Gracias por la amistad y por las charlas, que junto con Olga parecíais "Pepito Grillo". Gracias a Olga Gibernet, a Pilar Bermúdez, a Noemí, a la Dra. Martín (Pili), a Marc, a Silvia y a Isabel por vuestra ayuda, comprensión y apoyo, por todos los momentos que hemos compartido y sobretodo por brindarme vuestra amistad.

Gracias al equipo Ecogen C.F., y en particular a Javi, Jordi, Vicente, David, Julián y Mario. Gracias por esas pachangas de los martes (¡que alivio!) y por ese gran equipo de fútbol 7. Espero que sigáis como siempre y no olvidéis, al menos una vez a la semana, del partido y sobretodo del tercer tiempo. Gracias por todo el apoyo y la ayuda mostrada.

Dar las gracias a aquell@s que han sufrido y se han enfadado por dentro, porque este día no llegaba, pero que nunca han dejado de estar a mi lado:

Gracias a la familia de Isabel y Gustavo, tanto Ana como yo os queremos agradecer vuestro cariño y amistad, además de la ayuda prestada durante los 6 años en Barcelona. No olvidaremos aquel domingo lluvioso cargando la furgoneta y la posterior despedida.

Gracias a mis amig@s de la carrera, Chudi, Rosma, Martín, Juanjo, Banderas, M^a Luisa, Clemente, Chema, Rafa, Zule, Leo y más gente que me dejó, por convertir 5 años en 5 días, por esas clases, prácticas y excursiones tan amenas y divertidas, por todos los momentos vividos en Granada y por supuesto por el "Gran Viaje".

Agradecer a mis amig@s de Canena la comprensión, la sinceridad, los ánimos y amistad mostrados durante todos estos años. En particular quiero agradecer a Carlos, Juan, Lomas, López, Pedro, Victor y Sergio vuestra amistad desde que eramos pequeños. Aunque cada uno estemos en diferentes ciudades, siempre hay una llamada de teléfono, un whatsapp, unas navidades o algún finde para juntarnos y contar los unos con los otros, ¡gracias por estar ahí!.

Una mención especial la familia de Ana, a sus padres Luis y Patro, a su hermana María y su cuñado Jose M^a, a sus dos sobrinos (a Alvaro y al que llegará en breve, aún no sabemos su nombre pero según su hermano se puede llamar George, el hermano de Peppa Pig, Alberto, Pablo, Rober...). Gracias por vuestro cariño, acogida y paciencia desde el primer día.

Gracias a mis padres, hermanos y abuelos por haberme apoyado en todas mis decisiones y por estar siempre a mi lado. Agradezco su educación humilde y aquella que me recuerda mis orígenes, un pueblo blanco rodeado de olivares en la puerta de la Loma de Úbeda, con gente amable y humilde. Esta sensación me recuerda mi infancia, jugando al fútbol, al escondite y a churro en los jardines, a llamar a las puertas hasta las tantas de la noche, sin ningún tipo de preocupación ya que erais vosotros, mis padres y abuelos los que estabais ahí para curarme las rodillas sangrientas al caerme de la bicicleta, para enseñarme que los estudios (del cole y del conservatorio) eran prioritarios, o para darme algún duro e ir al "palo" o a la "juanita" y comprar chuches o cromos. Agradecer a mi padre y a mi madre todo lo que me habeis dado, ique es demasiado!, ya que sin vuestro sacrificio, comprensión y confianza no hubiera podido avanzar, no sólo durante el desarrollo de esta tesis, sino desde que di mi primer paso, ¡gracias porque ser mi tierra firme por la cual camino!.

Por último, agradecer a Ana todo su apoyo, por comprender lo que significa escribir una tesis doctoral, ya que tú lo has vivido en primera persona. Ana ha sido la estrella polar que me ha guiado durante los últimos 8 años. Sin su cariño, amor, comprensión y ternura mi vida no sería lo mismo. ¡Gracias enana!.

*"La memoria del corazón elimina los malos recuerdos
y magnífica los buenos, y gracias a ese artificio,
logramos sobrellevar el pasado"*
Gabriel García Márquez.

