



NUEVA FUNCIÓN NEUROPROTECTORA DE WRAP53 EN LA ISQUEMIA: BÚSQUEDA DE DIANAS MOLECULARES CON VALOR PRONÓSTICO EN ICTUS

-IRENE SÁNCHEZ MORÁN-

DIRECTORES:

DRA. ÁNGELES ALMEIDA PARRA

DRA. CRISTINA RODRÍGUEZ GONZÁLEZ

Dra. Ángeles Almeida Parra, Jefe del Grupo Neurobiología Molecular del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL. Hospital Universitario de Salamanca, Universidad de Salamanca, CSIC) y del Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG. Universidad de Salamanca, CSIC) y Profesora Asociada del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca y Dra. Cristina Rodríguez González, Investigadora del IBSAL y del IBFG

CERTIFICAN:

Que el trabajo doctoral realizado bajo su dirección por D^a Irene Sánchez Morán, titulado **“Nueva función neuroprotectora de *Wrap53* en la isquemia: búsqueda de dianas moleculares con valor pronóstico en ictus”**, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de doctor por la Universidad de Salamanca y autorizan su presentación

Y para que así conste, firman la presente certificación en Salamanca, a 10 de octubre de 2017.

VNIVERSITAS
STVDII
SALAMANINI




Fdo.: Ángeles Almeida Parra



Fdo.: Cristina Rodríguez González



**Junta de
Castilla y León**

Consejería de Educación

UNIÓN EUROPEA

Fondo Social Europeo



Este trabajo ha sido financiado con subvenciones concedidas por la Consejería de educación de la Junta de Castilla y León, programa ERIDI 2007-2013 cofinanciado por el Fondo Social Europeo *Operational Programme ESF* Castilla y León 2007/2013 y el Instituto de Salud Carlos III, a través de los proyectos PI12/00685 y PI15/ 00473.

ABREVIATURAS

53BP1: *p53 Binding Protein*

7-AAD: 7-amino-actinomicina D

ACE: arteria carótida externa

ACI: arteria carótida interna

ACM: arteria cerebral media

AMPA: ácido- α -amino-3-(hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico)

AP: apurínicos o apirimidínicos

AR: ácido retinoico

ATM: *Ataxia Telangiectasia Mutated*

ATP: adenosín trifosfato

BB: *Binding Buffer*

BCA: ácido bicinrónico

Bcl-2: *B-cell lymphoma 2*

BDNF: *Brain Derived Neurotrophic Factor*

BER: *Base Excision Repair*

BHE: barrera hematoencefálica

BNIP3: *Bcl-2/adenovirus E1B 10kDa-Interacting Protein*

BSA: seroalbúmina bovina

CAD: *Caspase Activated DNase*

CB: cuerpos de Cajal

CCCP: cianuro de carbonilo 3-clorofenilhidrazona

CP: perinfarto contralateral

CPT: camptotecina

C_t: ciclo umbral

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

DEPC: di-etil piro-carbonato

DilC₁(5): 1,1',3,3',3',3'-hexametilindolcarbocianina

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNA-PKcs: *DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit*

DSBs: *Double Strand Breaks*, roturas de doble cadena

GAPDH: gliceraldheído 3-fosfato deshidrogenasa

GFP: proteína verde fluorescente

GWAS: *Genome Wide Association*

HBSS: *Hank's Balanced Salt Solution*

HR: *Homologous Recombination*

IP: perinfarto ipsilateral

KRPG: *Krebs Ringer Phosphate Glucose*

MAP2: *Microtubule Associated Protein 2*

MCAO: oclusión de la arteria cerebral media

MDC1: *Mediator of DNA damage Checkpoint protein 1*

mitoSNO: *mitochondria-targeted S-nitrosothiol*

MRE11: *Meiotic REcombination 11*

mRNA: RNA mensajero

NAT: *Natural Antisense Transcript*

NB: medio Neurobasal

NBS1: *Nijmegen Breakage Syndrome 1*

NER: *Nucleotide Excision Repair*

NHEJ: *Non-Homologous End Joining*

NIHSS: *National Institutes of Health Stroke Scale*

NMDA: ácido *N*-metil-D-aspartato

NMX: normoxia

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintasa

OGD: *Oxygen and Glucose Deprivation*

OptiMEM: medio mínimo esencial optimizado

PBS: tampón fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PDL: poli-D-Lisina

PIKKs: *phosphatidylinositol-3-kinase-related kinases*

PSA: persulfato sódico amónico

PTPM: poro de transición de permeabilidad mitocondrial

ROS: especies reactivas de oxígeno

RNA: ácido ribonucleico

RNP: ribonucleoproteína

RNS: *Reactive Nitrogen Species*

rt-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

scaRNAs: pequeños RNAs específicos de Cuerpos de Cajal

SDS: dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE: electroforesis de poliacrilamida en presencia de SDS

SF: suero fetal

siRNA: *small interfering RNA*, RNA pequeño de interferencia

SMN: *Survival of Motor Neuron*

SNAP: *S-nitroso-N-acetylpenicillamine*

SNP: *Single Nucleotide Polyporphism*

snRNPs: *small nuclear RiboNucleoProteins*

SOD: superóxido dismutasa

SBS: *Single Strand Breaks*, roturas de cadena simple.

TBS: tampón tris salino

t-PA: activador tisular del plasminógeno

TTBS: tampón tris salino con tween 20

TEMED: *N,N,N,N'*-tetrametilendiamina

u.a. unidades arbitrarias

XRCC4: *X-ray Repair Cross-Complementing protein 4*

XLF: *XRCC4-Like Factor*

$\Delta\Psi_m$: potencial de membrana mitocondrial

INTRODUCCIÓN.....	1
1. ICTUS.....	3
1.1. TERAPIA CLÍNICA ACTUAL EN EL ICTUS ISQUÉMICO.....	4
1.2. FISIOPATOLOGÍA DEL ICTUS ISQUÉMICO.....	6
1.2.1. Mecanismos moleculares de la cascada isquémica.....	7
1.2.1.1. Fallo energético.....	7
1.2.1.2. Excitotoxicidad.....	7
1.2.1.3. Incremento de Ca ²⁺	8
1.2.1.4. Estrés oxidativo.....	9
1.2.1.5. Disfunción de la barrera hematoencefálica y daño vascular.....	10
1.2.1.6. Inflamación.....	10
1.2.1.7. Muerte celular. Necrosis y apoptosis.....	11
1.3. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN LA ISQUEMIA.....	13
1.3.1. Síntesis de ROS en isquemia y reperusión. Mecanismos antioxidantes.....	14
1.3.2. Efecto de los ROS sobre biomoléculas.....	16
1.3.2.1. Peroxidación lipídica.....	16
1.3.2.2. Oxidación y modificación de proteínas.....	17
1.3.2.3. Daño en el DNA.....	17
1.4. REPARACIÓN DEL DAÑO EN EL DNA TRAS LA ISQUEMIA.....	19
1.4.1. Reparación por escisión de nucleótidos.....	19
1.4.2. Reparación por escisión de bases.....	19
1.4.3. Reparación de roturas de doble cadena.....	20
1.4.3.1. Señalización del daño en el DNA.....	20
1.4.3.2. Reparación de DSBs en neuronas.....	22
1.5. INFLUENCIA GENÉTICA EN EL ICTUS.....	24
1.5.1. Variabilidad genética y riesgo de ictus.....	24
1.5.2. Farmacogenética e ictus.....	24
1.5.3. Variabilidad genética y pronóstico funcional tras el ictus.....	25
2. WRAP53.....	27
2.1. EL GEN <i>Wrap53</i>	27

2.2. LA PROTEÍNA WRAP53.....	29
2.2.1. Estructura y localización de WRAP53.....	29
2.2.2. Funciones de WRAP53.....	30
2.2.2.1. Mantenimiento de los Cuerpos de Cajal.....	30
2.2.2.2. Biogénesis de ribonucleoproteínas.....	32
2.2.2.3. Síntesis de telómeros.....	32
2.2.2.4. Reparación de roturas de doble cadena en el DNA.....	33
2.2.3. Variantes polimórficas de <i>Wrap53</i>	34
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	37
1. HIPÓTESIS.....	39
2. OBJETIVOS.....	41
MATERIAL Y MÉTODOS.....	43
1. CULTIVOS CELULARES.....	45
1.1. CULTIVO PROMARIO DE NEURONAS.....	45
1.1.1. Especie ensayada y condiciones del animalario.....	45
1.1.2. Cultivo primario de neuronas corticales.....	45
1.2. LÍNEAS CELULARES.....	47
1.2.1. HEK293T.....	47
1.2.2. SH-SY5Y.....	48
2. MODELO DE ISQUEMIA EXPERIMENTAL <i>IN VITRO</i>.....	48
3. TRANSFECCIONES CELULARES.....	49
3.1. TRANSFECCIONES CON PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN.....	49
3.2. SILENCIAMIENTOS MEDIANTE siRNA.....	50
4. TRATAMIENTOS CELULARES.....	52
4.1. INDUCCIÓN DE DAÑO EN EL DNA.....	52
4.2. MODULACIÓN DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL POR NITROSILACIÓN.....	52

5. DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.....	53
5.1. DETERMINACIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO.....	53
5.2. DETERMINACIÓN DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.....	54
6. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	55
7. DETERMINACIÓN DE LA APOPTOSIS NEURONAL POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	56
8. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE ANÁLISIS DE TRANSFERENCIA TIPO WESTERN BLOT.....	57
8.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.....	57
8.1.1. Extracción de proteínas totales.....	57
8.1.2. Fraccionamiento subcelular de proteínas.....	58
8.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS.....	59
8.3. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN SDS-PAGE.....	60
8.4. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT.....	61
8.5. “STRIPPING” DE MEMBRANAS DE NITROCELULOSA.....	62
9. INMUNOCITOQUÍMICA Y MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA.....	62
10. OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DEL RNA.....	64
10.1. EXTRACCIÓN DEL RNA TOTAL.....	64
10.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA A TIEMPO REAL.....	64
11. MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL <i>IN VIVO</i>.....	67
12. ESTUDIO CLÍNICO.....	69
12.1. POBLACIÓN DE PACIENTES.....	69
12.2. VARIABLES CLÍNICAS.....	70
12.3. GENOTIPADO DE LOS POLIMORFISMOS rs 2287498 Y rs 2287499 DE <i>Wrap53</i> ...	71
13. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	72

RESULTADOS.....	73
1. IMPLICACIÓN DE <i>Wrap53</i> EN LA ISQUEMIA NEURONAL.....	73
1.1. LA ISQUEMIA EXPERIMENTAL NO MODIFICA LA EXPRESIÓN DE LOS TRANSCRITOS <i>WRAP53α</i> Y <i>p53</i> EN CÉLULAS SH-SY5Y DIFERENCIADAS.....	75
1.2. LOS NIVELES DE TRANSCRITO <i>WRAP53β</i> AUMENTAN DE FORMA PROGRESIVA E INDEPENDIENTE DE <i>p53</i> DURANTE LA REOXIGENACIÓN TRAS LA ISQUEMIA....	77
2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA WRAP53 EN NEURONAS SOMETIDAS A ISQUEMIA EXPERIMENTAL.....	79
2.1. LA ISQUEMIA INDUCE LA ACUMULACIÓN DE LA PROTEÍNA WRAP53 DURANTE LA FASE DE REOXIGENACIÓN <i>IN VITRO</i>	79
2.2. EL DAÑO EN EL DNA MEDIADO POR LOS RADICALES LIBRES DE OXÍGENO GENERADOS TRAS LA ISQUEMIA PROMUEVE LA MUERTE NEURONAL.....	80
2.3. WRAP53 SE TRANSPORTA Y ACUMULA EN EL NÚCLEO EN RESPUESTA A LA ISQUEMIA <i>IN VITRO</i>	83
3. FUNCIÓN DE WRAP53 EN LA SUPERVIVENCIA NEURONAL DESPUÉS DE LA ISQUEMIA.....	87
3.1. WRAP53 MODULA LA SUSCEPTIBILIDAD DE LAS NEURONAS A LA APOPTOSIS INDUCIDA POR LA ISQUEMIA.....	87
3.2. WRAP53 PROMUEVE LA REPARACIÓN DEL DNA DAÑADO FAVORECIENDO LA SUPERVIVENCIA NEURONAL DESPUÉS DE LA ISQUEMIA.....	91
3.3. LA ACUMULACIÓN DE WRAP53 EN NEURONAS TRAS LA ISQUEMIA ES SENSIBLE AL ESTRÉS OXIDATIVO.....	94
4. VALOR PRONÓSTICO DE LOS POLIMORFISMOS rs2287498 Y rs2289499 DE <i>Wrap53</i> EN EL ICTUS ISQUÉMICO.....	98
4.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO GENERAL DE LA COHORTE DE PACIENTES CON ICTUS ISQUÉMICO.....	98
4.2. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO rs2287498 CON EL PRONÓSTICO FUNCIONAL DE LOS PACIENTES DE ICTUS ISQUÉMICO.....	101
DISCUSIÓN.....	105
CONCLUSIONES.....	113
BIBLIOGRAFÍA.....	117

INTRODUCCIÓN

1. ICTUS

El ictus es un síndrome clínico que surge como consecuencia de la interrupción brusca del flujo sanguíneo que irriga una parte del cerebro, lo que produce una alteración transitoria o definitiva de la función cerebral en la zona afectada (Donnan *et al.* 2008). De manera general, los ictus pueden clasificarse en isquémicos o hemorrágicos dependiendo de su causa. El ictus isquémico es resultado de la oclusión de un vaso sanguíneo, generalmente como consecuencia de trombosis, embolismos o disminución del flujo sanguíneo por enfermedades de los vasos cerebrales (arteriales o venosos), sanguíneas o del corazón. Los ictus hemorrágicos son consecuencia de una rotura vascular y la posterior extravasación de sangre en el tejido (Saenger & Christenson 2009).

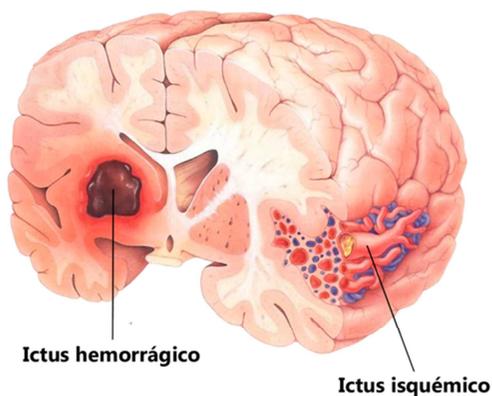


Figura 1. Clasificación de los tipos de ictus según su etiología. (A) Ictus hemorrágico causado por rotura de vaso sanguíneo cerebral. (B) Ictus isquémico debido a una obstrucción vascular.

El ictus es la principal causa neurológica de muerte y discapacidad en el adulto en países desarrollados, siendo además la primera causa de mortalidad en mujeres y la segunda en los hombres (Mozaffarian *et al.* 2016). En nuestro país ocurren unos 120.000-130.000 casos anuales. A los 6 meses del accidente cerebrovascular, el 26% de los pacientes han fallecido, el 32% serán dependientes y el 42% restantes se mantendrán independientes. En datos globales, entre los supervivientes de un ictus, el

44% tendrán algún tipo de discapacidad funcional (Mar *et al.* 2013). Desde el punto de vista económico, el ictus supone entre el 3% y el 6% del gasto sanitario.

El riesgo a padecer un ictus es más elevado en edades avanzadas, aunque también puede ocurrir en individuos jóvenes. La incidencia y el tipo de infarto parecen tener una clara dependencia del sexo, siendo las mujeres más propensas a esta enfermedad cerebrovascular. Además de los citados, destacan otros factores de riesgo como la hipertensión, dislipemia, fibrilación auricular, diabetes mellitus, obesidad e infarto de miocardio, así como hábitos de vida poco saludables como el tabaquismo y el sedentarismo (Gardener *et al.* 2015).

Gracias a las mejoras en prevención primaria y tratamiento, la mortalidad asociada a la enfermedad ha disminuido en los últimos años (Brouns & De Deyn 2009), no así la prevalencia de la misma. Es más, debido al envejecimiento de la población se prevé que el impacto demográfico, sanitario y social del ictus aumente en las próximas décadas. Según datos del observatorio nacional del Ictus (observatoriodelictus.com), uno de cada 6 españoles sufrirá un ictus a lo largo de su vida. Por tanto, el ictus es actualmente un importante problema sociosanitario que precisa de estrategias determinadas para su detección, manejo y tratamiento.

1.1. TERAPIA CLÍNICA ACTUAL EN EL ICTUS ISQUÉMICO AGUDO

La normalización de la función cerebral tras un ictus isquémico depende del tamaño del área afectada, de la duración de la isquemia, la restauración completa del flujo sanguíneo y la aplicación de medidas terapéuticas destinadas a la protección y reparación del tejido dañado (Brouns & De Deyn 2009). La estrategia de tratamiento del ictus en su fase aguda tiene dos objetivos principales: la recuperación (recanalización) del flujo sanguíneo y la protección y reparación del tejido afectado.

Recanalización. Consiste en intentar establecer el flujo sanguíneo (reperusión) rápidamente en la zona infartada entre las 6-8 horas desde el inicio del daño para evitar que la magnitud de la lesión progrese. Actualmente, la única terapia farmacológica aprobada es la forma

recombinante del activador tisular del plasminógeno o t-PA (NINDS 1995), que es eficaz hasta 6 horas tras la aparición de los síntomas. Sin embargo, sólo aquellos pacientes que cumplen los criterios de inclusión pueden beneficiarse de este tratamiento. En 2004 la Administración de Medicamentos y Alimentos americana (www.fda.gov) aprobó la trombectomía mecánica en pacientes con ictus isquémico no candidatos a trombolisis sistémica, o bien como terapia de rescate en los pacientes que no responden al tratamiento intravenoso con t PA (Bergui *et al.* 2005; Ramee *et al.* 2004). Ambas estrategias (trombolisis/trombectomía) pueden combinarse en algunos casos (Smith *et al.* 2008), si bien en los últimos años se demostró que la trombectomía endovascular o extracción del trombo mediante dispositivo mecánico es el tratamiento más efectivo para la recanalización después del ictus (Goyal *et al.* 2016).

La restauración completa de la circulación sanguínea es crítica para la normalización de la función cerebral. Sin embargo, el fenómeno de reperfusión lleva asociado un incremento significativo en el daño tisular y una importante respuesta inflamatoria (Eltzschig & Eckle 2011), ocasionando el denominado “daño por reperfusión”. Por ello, las terapias de recanalización deberían ir acompañadas de tratamientos que minimicen los procesos de neurodegeneración. En este punto es importante la protección del tejido cerebral dañado, especialmente de las neuronas, fenómeno denominado **neuroprotección**. El objetivo de las terapias neuroprotectoras es prevenir la muerte neuronal, y con ello el crecimiento de la zona de lesión, y fomentar la supervivencia celular en la zona de penumbra. Se han llevado a cabo numerosos estudios de sustancias neuroprotectoras que han finalizado con éxito en estudios preclínicos con modelos animales. Sin embargo, hasta el momento, ninguna de ellas han conseguido reproducir los efectos deseados en humanos (Nagy & Nardai 2017; Sutherland *et al.* 2012) No obstante, estos resultados no deben frenar la búsqueda de nuevas estrategias ya que el arsenal terapéutico actual para el ictus isquémico agudo es muy limitado. Además, la trombectomía hace que actualmente la terapia neuroprotectora adquiere especial interés ya que, como hemos indicado, la recanalización rápida tras el ictus puede producir efectos adversos que se podrían prevenir con una terapia protectora eficaz.

Un tratamiento neuroprotector ideal debería actuar en varios puntos de la serie de eventos bioquímicos que se producen a nivel celular en el cerebro

tras la isquemia, proceso denominado cascada isquémica, para potenciar su efectividad. Así, un mejor conocimiento y comprensión de los mecanismos moleculares y bioquímicos que tienen lugar durante el transcurso de la enfermedad permitirá la búsqueda de nuevas dianas moleculares que ofrezcan nuevas opciones de tratamiento. De la misma manera permitirá la descripción de nuevos biomarcadores asociados con el estado funcional de los pacientes que han sufrido un ictus. La identificación de buenos biomarcadores sanguíneos, de fácil y rápida obtención, podría mejorar no sólo el diagnóstico de los pacientes, sino que favorecería la estratificación adecuada de pacientes para ciertos tratamientos, sirviendo como indicadores tempranos de la eficacia terapéutica o implementando la predicción del estado funcional de los pacientes de ictus a largo plazo.

1.2. FISIOPATOLOGÍA DEL ICTUS ISQUÉMICO

Alrededor del 80-85% de todos los ictus son de tipo isquémico (Mozaffarian *et al.* 2016). En estos casos, la obstrucción de un vaso sanguíneo cerebral ocasiona un gradiente de flujo sanguíneo que va a definir dos zonas en el cerebro infartado. Aquella región del cerebro afectada más directamente por la bajada en el flujo sanguíneo, llamada *core* o núcleo isquémico, resulta irreversiblemente dañada por fenómenos de lipólisis, proteólisis y pérdida de la homeostasis, que finalmente concluyen en el fallo bioenergético total y la consecuente muerte por necrosis (Almeida & Bolaños 2001; Moro *et al.* 2005; Bolaños *et al.* 2009; Brouns & De Deyn 2009). La región cerebral que rodea al núcleo necrótico resulta colateralmente dañada por la bajada de flujo sanguíneo. Esta zona, denominada *penumbra*, se caracteriza por preservar su estructura tisular y cierta actividad metabólica. En la zona de penumbra, los mecanismos moleculares de daño cerebral avanzan más lentamente, por lo que es un tejido susceptible de recuperación si se normaliza el flujo sanguíneo y se interfiere en el progreso de la cascada isquémica (Donnan *et al.* 2008). Es precisamente hacia esta zona de penumbra, dónde van dirigidas las medidas terapéuticas actuales mencionadas en el apartado anterior. Si se potencia la supervivencia de las células del área de penumbra, se evita la progresión del tamaño de la lesión y se estimula la recuperación de la función neurológica (Fernández-Gómez *et al.* 2008; Liu 2012; Ramos-Cabrer *et al.* 2011).

1.2.1. Mecanismos moleculares de la cascada isquémica

Cuando tiene lugar un ictus se desencadena una serie de acontecimientos neurobioquímicos agrupados bajo la denominación de cascada isquémica. Esta secuencia de sucesos, que se solapan en el tiempo y en el espacio, se inicia en los primeros minutos tras la aparición de los síntomas y se prolonga hasta varios días después. Los eventos de la cascada isquémica comienzan con un fallo bioenergético celular, debido a la hipoperfusión cerebral, seguido de excitotoxicidad, estrés oxidativo, disfunción de la barrera hematoencefálica, daño vascular, inflamación y finalizan con la muerte celular, tanto de neuronas como de células gliales y endoteliales (Brouns & De Deyn 2009; Gomez-Sanchez *et al.* 2011; Rodríguez *et al.* 2017).

1.2.1.1. Fallo energético

El encéfalo es un órgano con una alta tasa metabólica, se estima que consume en torno al 20% de O₂ y glucosa en relación al total corporal (Raichle & Gusnard 2002). En particular, el cerebro depende del aporte continuo de estos sustratos para obtener energía mediante fosforilación oxidativa. La disminución del flujo sanguíneo interrumpe el aporte de estos recursos metabólicos y conduce al fallo energético. Este evento se traduce, por un lado, en el aumento de la glicolisis anaerobia, con la consiguiente acumulación de lactato en el tejido que supone una bajada del pH por debajo de niveles fisiológicamente estables. Por otro lado las bombas de iones dependientes de ATP alteran su funcionamiento perdiéndose así la homeostasis iónica (Song & Yu 2014).

1.2.1.2. Excitotoxicidad

La excitotoxicidad es un proceso patológico en el que las células nerviosas resultan dañadas por la estimulación excesiva de receptores excitatorios, causada principalmente por glutamato. Tras el accidente isquémico, las células nerviosas afectadas se encuentran en un estado de hiperexcitabilidad, dando lugar a la liberación exacerbada de glutamato al espacio extracelular (Lai *et al.* 2014). Este evento a su vez se magnifica y se prolonga en el tiempo por la inhibición de la reabsorción de las moléculas neuroexcitadoras por parte de neuronas y neuroglia, contribuyendo a la amplificación del daño en oleadas de despolarización, además del

consiguiente edema citotóxico debido al arrastre de agua por ósmosis (Furukawa *et al.* 1997)

En esencia se trata de un efecto neurotóxico debido a la activación excesiva de las neuronas mediada por glutamato que constituye el mecanismo principal de inducción del daño isquémico. Los receptores ionotrópicos tipo NMDA del glutamato son los principales responsables del daño neuronal que sigue a la isquemia debido a su mayor permeabilidad al Ca^{2+} y, por tanto, su mayor contribución al desequilibrio iónico (Rodríguez-Rodríguez *et al.* 2013). La excitación fisiológica de los receptores tipo NMDA es imprescindible para promover la supervivencia neuronal (Jimenez-Blasco *et al.* 2015), sin embargo, una activación exacerbada como la que tiene lugar tras la isquemia, activa cascadas de señalización que acaban en muerte neuronal. Entre los eventos que se disparan tras la sobreexcitación neuronal mediada por glutamato destacan la activación de enzimas generadoras de radicales libres como la óxido nítrico sintasa (Parathath *et al.* 2007), la activación de proteínas que regulan la señalización transcripcional de genes de muerte celular como la familia de quinasas MAPK (Raigneaud *et al.* 1995) y la activación de proteasas como las calpainas (Araújo *et al.* 2010). La activación de Cdk5 por calpainas tras excitotoxicidad activa la muerte neuronal por apoptosis mediada por activación aberrante de proteínas de ciclo celular (Maestre *et al.* 2008; Veas-Pérez de Tudela *et al.* 2016). Además, esta acumulación de quinasas dependientes de ciclinas, en concreto Cdk1, modifica la estructura de la ATP-sintasa de la cadena transportadora de electrones inhibiendo la fosforilación oxidativa (Veas-Pérez De Tudela *et al.* 2015). Todos estos eventos: la desregulación del gradiente electroquímico, la inhibición de la síntesis de ATP, el aumento de radicales libres, conllevan la disfunción mitocondrial y a la muerte neuronal.

1.2.1.3. Incremento de Ca^{2+}

El aumento de Ca^{2+} intracelular en las neuronas a través de receptores NMDA, AMPA, canales de calcio dependientes de voltaje o la liberación desde orgánulos intracelulares, como la mitocondria y retículo endoplásmico, inicia diversos eventos dañinos para la célula, ya que se trata de un importante mensajero secundario del que depende la activación de una gran cantidad de enzimas. Entre ellas, la proteína quinasa C, la fosfolipasa A_2 , la fosfolipasa C, la ciclooxigenasa, la óxido nítrico sintasa, la

calpaína y otras proteasas y endonucleasas, se activan en condiciones patológicas y tienen consecuencias fatales para la neurona. La producción de especies reactivas de oxígeno, la liberación de moléculas de inflamación o la activación de proteasas intra y extracelulares son un claro ejemplo de estos fenómenos, que culminarán con la activación de genes de inflamación, apoptosis y/o necrosis (Eltzschig & Eckle 2011; Mehta *et al.* 2007; Yuan *et al.* 2003).

1.2.1.4. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo tiene lugar cuando se produce un desequilibrio entre los sistemas antioxidantes endógenos y la excesiva producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) y de especies reactivas del nitrógeno (RNS, *Reactive Nitrogen Species*) (Rodrigo *et al.* 2013). Como resultado de la isquemia, y particularmente durante el fenómeno de reperfusión, tiene lugar una generación excesiva de ROS y RNS como el anión súper óxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($\cdot OH$), el óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$).

Los ROS están muy implicados en el daño por isquemia y reperfusión, y se generan durante ambos procesos por diferentes vías. Los ROS se acumulan como subproductos de la cadena respiratoria durante el periodo de oclusión, así como durante la reoxigenación (Moro *et al.* 2005; Bolaños *et al.* 2009). También se generan como consecuencia de la activación patológica de enzimas, como la Xantina Oxidasa (XO) y la ciclooxigenasa (Rodrigo *et al.* 2013), o durante la respuesta inflamatoria, como es el caso de las óxido nítrico sintasas (Moro *et al.* 2004) o las NADPH oxidasas (Gray & Jandeleit-Dahm 2015).

Debido a su alta reactividad, los ROS interaccionan con proteínas, fosfolípidos de membrana y DNA causando peroxidación lipídica, daño en membranas, disfunción mitocondrial y mutaciones en el DNA (Barzilai & Yamamoto 2004; Niki 2009; Yan 2014). Todo ello conduce a la pérdida de la homeostasis y la desregulación de los procesos celulares, no sólo en neuronas y glía, sino también en células endoteliales y células del sistema inmunológico (Basuroy *et al.* 2008; Brouns & De Deyn 2009).

1.2.1.5. Disfunción de la barrera hematoencefálica y daño vascular

La integridad de la barrera hematoencefálica (BHE) garantiza el mantenimiento del microambiente del sistema nervioso central. Sin embargo, este microambiente se ve comprometido como consecuencia del daño mecánico y químico al endotelio vascular. Tras la isquemia, se produce la inflamación de los vasos sanguíneos y el aumento de permeabilidad de los mismos. Además, la activación de ROS y proteasas como las metaloproteasas (Hurtado *et al.* 2002) contribuyen a la degradación de la lámina basal del endotelio (Terasaki *et al.* 2014). Con la reperfusión se produce una segunda oleada de daño en la BHE, que puede resumirse en una hiperemia inicial que aumenta la permeabilidad de la BHE, una posterior hipoperfusión debido a la oclusión de la microvascularización (fenómeno de no reflujo) y, por último, un aumento reflejo de la permeabilidad celular debido de nuevo a la inflamación, a los ROS y a la digestión enzimática (Woodruff *et al.* 2011). La pérdida de permeabilidad selectiva de la BHE permite la infiltración de gran cantidad de fluido, provocando un edema que agrava el proceso isquémico por la compresión debida al exceso de volumen (Gebruers 2011). La disfunción de la BHE aumenta tanto el riesgo natural como el asociado al tratamiento con trombolíticos de la transformación hemorrágica, con sus consecuentes complicaciones (Khatri *et al.* 2012). Todos estos eventos constituyen el daño isquémico secundario, que continúa hasta días después del accidente cerebrovascular.

1.2.1.6. Inflamación

Después de la isquemia cerebral tiene lugar una fuerte reacción inflamatoria. Un evento temprano tras la oclusión de las arterias cerebrales es la inducción de la expresión de genes proinflamatorios, así como la activación del sistema inmune residente, la microglía (Jin *et al.* 2013). Se produce, por tanto, una liberación de mediadores inflamatorios, como citocinas y quimiocinas, que movilizan la liberación de moléculas de adhesión y el reclutamiento de células inmunes desde el flujo sanguíneo (Cuartero *et al.* 2015; Siniscalchi *et al.* 2014). Las moléculas de adhesión e inflamación contribuyen a la disfunción de la BHE facilitando la infiltración de más células inmunes que retroalimentan la señalización proinflamatoria, colaborando con la hipoperfusión de la zona infartada (Famakin 2014; George & Steinberg

2015). La respuesta inflamatoria, originada tanto por las células inmunes residentes como las circulantes, supone el aumento de mediadores inflamatorios tóxicos que, por sí mismos, son capaces de inducir apoptosis causando daño cerebral (Siniscalchi *et al.* 2014).

La respuesta inmune tiene un papel dual en la recuperación del tejido infartado. Además de los descritos efectos deletéreos, supone también un beneficio de cara a una eventual reparación. Las células del sistema inmune eliminan las células dañadas facilitando la remodelación del tejido y permitiendo la recuperación funcional (Cuartero *et al.* 2013; Peruzzotti-Jametti *et al.* 2014). Un ejemplo de la dualidad del sistema inmune innato son los receptores TLR4, que participan en la respuesta inflamatoria promoviendo la expresión de mediadores pro-inflamatorios involucrados en daño cerebral tras la isquemia (Caso *et al.* 2007, 2008). A su vez, modulan la neurogénesis inducida por la isquemia promoviendo la migración de neuroblastos a la zona dañada (Moraga *et al.* 2014).

1.2.1.7. Muerte celular. Necrosis y apoptosis

En los primeros minutos tras la isquemia cerebral, las células localizadas en las áreas más expuestas a la interrupción del flujo sanguíneo sufren muerte celular fundamentalmente por **necrosis**. Este tipo de muerte fulminante es un proceso caspasa-independiente, asociado a fallos en la membrana plasmática y edema citotóxico (Peter 2011). La necrosis debida a una hipoxia aguda puede dispararse desde diferentes puntos de la cascada isquémica, confluyendo generalmente en la desregulación del estado redox y el aumento de Ca^{2+} . El aumento excesivo del Ca^{2+} intracelular activa a las proteínas quinasas ERK 1 y 2 y el sistema calpaina-catepsinas (Liu *et al.* 2014), iniciando una cascada de señalización que culmina con la dilatación de orgánulos celulares y de la propia membrana plasmática. La expansión de las membranas continúa hasta que su integridad se ve comprometida y se produce la liberación de material intracelular al medio, favoreciendo los fenómenos de excitotoxicidad e inflamación y ampliando el daño isquémico (Yuan *et al.* 2003). La necrosis es la forma predominante de muerte en el *core* isquémico tras la oclusión de los vasos.

Las neuronas del área de penumbra pueden sufrir **apoptosis** varias horas e incluso días después del infarto, contribuyendo así a la expansión de la

lesión isquémica (Charriaut-Marlangue *et al.* 1996; Gomez-Sanchez *et al.* 2011; Rodríguez *et al.* 2017). La apoptosis es un tipo de muerte controlada que contribuye mínimamente a la inflamación al no liberar material intracelular al medio. Tiene especial relevancia durante la reperfusión, ya que es un proceso que precisa consumo de energía. La isquemia cerebral activa la apoptosis, tanto por la vía intrínseca como la extrínseca. La vía mitocondrial o intrínseca está caracterizada por cambios en la familia de proteínas Bcl-2 que producen un incremento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, consecuencia de la apertura de poros proteicos (poro de transición de permeabilidad mitocondrial, PTPM) que permiten la liberación de citocromo c desde la matriz mitocondrial y activación de las caspasas efectoras 3, 7 y 9 (Almeida 2013; Broughton *et al.* 2009). También han sido documentados mecanismos de muerte apoptótica alternativos en tejido cerebral infartado que incluyen a un grupo de proteínas liberadas desde PTPM, como AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) la endonucleasa G y la proteína BNIP3 (*Bcl-2/adenovirus E1B 10kDa-Interacting Protein*) (Culmsee *et al.* 2005; Nielsen *et al.* 2009). La vía extrínseca se inicia con la activación de receptores de muerte que por medio de la caspasa 8 puede inducir la apertura PTPM o bien directamente activar caspasas efectoras (Almeida 2013).

La apoptosis por la vía intrínseca y por la vía extrínseca convergen en las fases finales de la muerte celular con la activación de las caspasas efectoras que mediarán en la condensación de la cromatina, “*blebbling*” de la membrana plasmática y desintegración celular en cuerpos apoptóticos (Taylor *et al.* 2008).

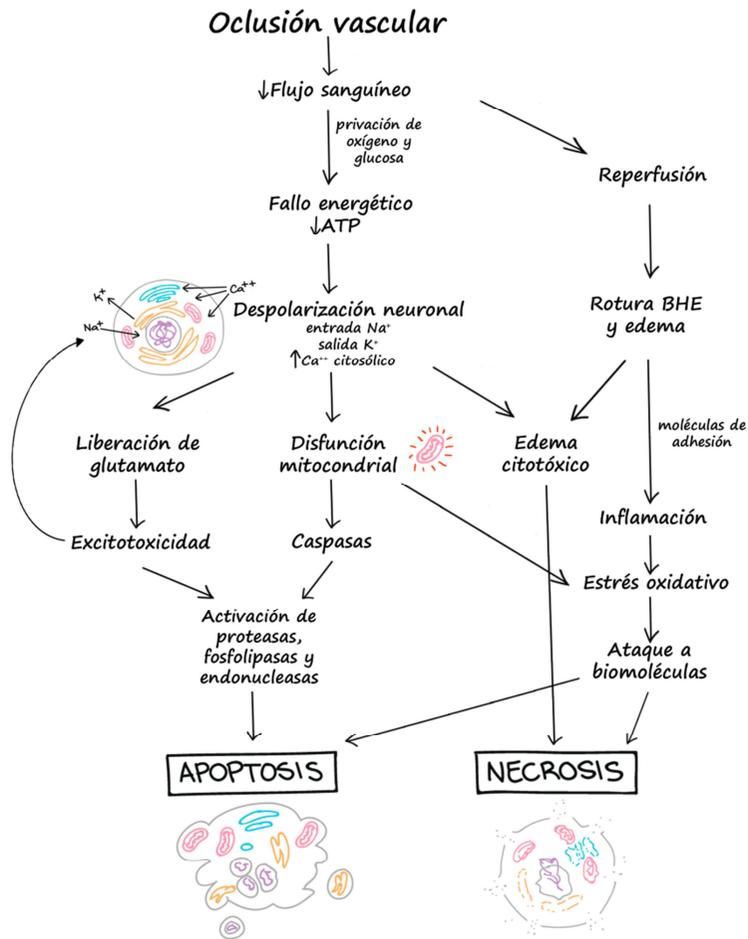


Figura 2. Esquema de la cascada isquémica. En la imagen se presentan de manera resumida los principales eventos moleculares que tiene lugar en el transcurso de la cascada isquémica.

1.3. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN LA ISQUEMIA

Las especies reactivas del oxígeno son moléculas pequeñas y altamente reactivas debido a que presentan electrones desapareados. Se generan de manera natural como consecuencia del metabolismo del oxígeno y gracias a su alto poder de difusión participan en procesos de señalización celular y en el mantenimiento de la homeostasis. En condiciones fisiológicas las células producen anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($\cdot OH$) en pequeñas cantidades. Estas moléculas cumplen funciones reguladoras de diferenciación, proliferación celular o expresión génica entre

otros (Ji *et al.* 2010; Fernandez-Fernandez *et al.* 2012; Hashimoto *et al.* 2014; Huo *et al.* 2015; Bolaños 2016).

La señalización por ROS activa respuestas esenciales en el cerebro. Cabe destacar su papel fundamental en la respuesta antioxidante celular para el mantenimiento de la homeostasis redox (Bolaños 2016; Dröge 2002). Además, los ROS intervienen en la modulación de la transmisión sináptica y la comunicación no sináptica entre neuronas y células gliales (Atkins & Sweatt 1999), así como en la plasticidad de las sinapsis y, por tanto, en el aprendizaje y la memoria (Hu *et al.* 2006).

El mantenimiento del balance entre oxidantes y sistemas antioxidantes es primordial para el correcto funcionamiento del metabolismo. Por ello, cuando tiene lugar una producción súbita de especies reactivas de oxígeno, los sistemas de detoxificación de ROS endógenos pueden no ser suficientes, produciéndose un desequilibrio, denominado “estrés oxidativo”, con consecuencias negativas para la célula (Almeida *et al.* 2002; Bolaños *et al.* 2002; Bolaños *et al.* 2009).

El estrés oxidativo está muy vinculado con la fisiopatología del ictus isquémico debido a la especial sensibilidad del tejido cerebral a los ROS. El encéfalo presenta un alto contenido en lípidos susceptibles de peroxidación y metaboliza una alta tasa de oxígeno. Además, en las neuronas tienen lugar reacciones bioquímicas que involucran sustancias fácilmente oxidables como el hierro o metabolitos ROS-génicos como la dopamina y el glutamato (Crack & Taylor 2005). A todo ello hay que sumar los bajos niveles de antioxidantes que presentan las neuronas (Jimenez-Blasco *et al.* 2015).

1.3.1. Síntesis de ROS en isquemia y reperusión. Mecanismos antioxidantes.

Tras un ictus isquémico se producen dos oleadas de especies reactivas de oxígeno, la primera durante la isquemia y la segunda con el proceso de reperusión (reoxigenación).

Durante la isquemia, la falta de oxígeno y glucosa promueve la producción anaerobia de ATP, aumentando la producción de ácido láctico y con ello la acidosis, que tiene un efecto directo en la inactivación de defensas

antioxidantes, así como en la liberación de pro-oxidantes tales como el hierro. Se produce además la activación de enzimas oxidantes como la xantina oxidasa (XO) o la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) y su isoforma inducible (iNOS), tanto en astrocitos como en neuronas (Almeida *et al.* 2001; Almeida & Bolaños 2001; Bolaños *et al.* 2002). La acidosis también aumenta la excitotoxicidad del glutamato, ya que los receptores NMDA activan a su vez la nNOS (Khoshnam *et al.* 2017). El óxido nítrico (NO, *Nitric Oxide*) a bajas concentraciones tiene un efecto neuroprotector, sin embargo su sobreproducción puede interactuar con $O_2^{\bullet-}$ produciendo peroxinitrito (ONOO⁻), un fuerte oxidante de biomoléculas (Bolaños *et al.* 2009). Otro efecto deletéreo del peroxinitrito junto con el óxido nítrico es la disfunción de la cadena transportadora de electrones con la consiguiente despolarización mitocondrial, la caída de los niveles de ATP (Bolaños *et al.* 2004; Almeida *et al.* 2005) y la consecuente retroalimentación del proceso de producción de ROS.

La reperfusión se considera la etapa más ROS-génica tras un ictus. En el citoplasma, la fuente principal de ROS es la enzima NADPH oxidasa (NOX) que con sus 4 isoformas contribuye de manera notable al estrés oxidativo debido a la reoxigenación (Manzanero *et al.* 2013). Inicialmente se entendía que la generación de ROS durante la reperfusión era de carácter no específico. En la actualidad está aceptado que la principal fuente de ROS es la mitocondria, en concreto el transporte reverso de electrones a través del complejo I (Murphy 2016). Durante la isquemia, el complejo II de la cadena transportadora de electrones utiliza el ubiquinol producido por el complejo I para reducir fumarato a succinato como aceptor final de electrones en ausencia de oxígeno (Chouchani *et al.* 2016). Durante la reperfusión, el exceso de succinato se oxida rápidamente generando una sobreproducción de ubiquinona y forzando a los electrones a viajar en transporte reverso por el complejo I generando una gran cantidad de anión superóxido (Chouchani *et al.* 2014).

El aumento de radicales libres sumado al flujo de Ca^{2+} contribuyen a la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial causando hinchazón de la mitocondria por la entrada de agua y moléculas de alto peso molecular. Todo ello conduce a un desajuste en la cadena transportadora de electrones, aumentando la síntesis de ROS. La disfunción mitocondrial

culmina con la muerte celular por apoptosis o necrosis (Almeida *et al.* 2002; Moro *et al.* 2005).

Las neuronas están preparadas para combatir el estrés oxidativo a tres niveles, regulando la generación de ROS, neutralizando los ROS producidos o reparando las proteínas, lípidos o DNA dañados por los radicales libres (Liu *et al.* 2011; Quintana-Cabrera *et al.* 2012; Lopez-Fabuel *et al.* 2016)

La eliminación de ROS de la célula se lleva a cabo mediante diversos sistemas antioxidantes, que constituyen el mecanismo de defensa frente a los efectos deletéreos de los mismos. Entre ellos se encuentran la superóxidodismutasa (SOD), con isoformas citosólica (Cu/ZnSOD o SOD1), mitocondrial (MnSOD o SOD2) o extracelular (SOD3), y la catalasa, presente en el citosol y peroxisomas. Dichas enzimas se encargan de la reducción de $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 y de H_2O_2 a H_2O , respectivamente. A la actividad de estas enzimas se suman sustancias con poder antioxidante, como el ácido ascórbico o vitamina E, y sistemas antioxidantes como el glutatión, la tioredoxina o la peroxirredoxina (Hekimi *et al.* 2011).

1.3.2. Efecto de los ROS sobre biomoléculas

Los radicales libres son moléculas muy inestables por lo que tienen una alta capacidad para reaccionar con las biomoléculas adyacentes modificando su estructura y función.

1.3.2.1. Peroxidación lipídica

Este proceso consiste en la degradación oxidativa de lípidos, producida mayormente por el radical peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$). La peroxidación lipídica es consecuencia y a la vez está implicada en la patogénesis del ictus isquémico. La oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de membrana produce la alteración de la organización de las membranas en términos de fluidez, permeabilidad, incluso integridad, conduciendo finalmente a la pérdida de función biológica (Niki 2009). Además, como resultado de la peroxidación lipídica se producen metabolitos secundarios tóxicos que pueden alterar proteínas y bases del DNA, contribuyendo así con la citotoxicidad de los ROS (Lee *et al.* 2012).

1.3.2.2. Oxidación y modificación de proteínas

Los ROS atacan aquellos sustratos más susceptibles a la oxidación, como son los grupos carboxilo, los residuos azufrados y los aminoácidos aromáticos (especialmente tirosina y triptófano). La oxidación de estos residuos provoca cambios conformacionales reversibles o irreversibles en la estructura de las proteínas. Las modificaciones oxidantes irreversibles incluyen la carbonilación, la formación de nitrotirosina (y dinitrotirosina) y la formación de ácido sulfónico. Estos cambios irreversibles conducen a la agregación de las proteínas aberrantes y a su posterior degradación (Lehotský *et al.* 2004), contribuyendo a la disfunción celular. Actualmente se discute que ciertas oxidaciones reversibles de residuos cisteína, como la formación de disulfuros, la S-nitrosilación, S-sulfonación y S-glutationilación, puedan tener efectos protectores frente al daño tisular en contexto de tolerancia isquémica (Yan 2014).

1.3.2.3. Daño en el DNA

El daño en el DNA consecuencia de la isquemia puede ser un daño activo o un daño pasivo.

Comúnmente, nos referimos al **daño activo** como aquel acometido por endonucleasas celulares cuyo fin es la fragmentación internucleosomal del DNA. Esta fragmentación apoptótica del DNA es un proceso controlado de autodestrucción que ocurre de manera irreversible como fase final de la cascada isquémica en aquellas células que han resultado excesivamente dañadas (Li *et al.* 2011). En este proceso intervienen endonucleasas como la desoxinucleasa activada por caspasa (CAD, *Caspase Activated DNase*) y otras enzimas independientes de caspasa como AIF, flavoproteína mitocondrial que se transloca al núcleo tras la apertura del PTPM y lleva a cabo la fragmentación del DNA a gran escala (Broughton *et al.* 2009).

El **daño pasivo** del DNA es aquel inducido por estrés oxidativo y constituye la fuente principal de inestabilidad genómica tras el ictus. Se trata de un evento más temprano en la cascada isquémica que la fragmentación internucleosomal, por lo que es potencialmente reparable si se activan los mecanismos competentes. Este tipo de daño puede producirse por un ataque directo o indirecto de los radicales libres (Iyama & Wilson 2013).

El principal efector del ataque directo de los ROS al DNA es el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), un fuerte oxidante que directamente extrae átomos de hidrógeno, capaz también de reducir dobles enlaces de las bases nitrogenadas. Como consecuencia del proceso de reoxigenación después de la isquemia se han descrito modificaciones en el DNA causadas por estos radicales de oxígeno, siendo las más comunes:

- *Desaminaciones* por pérdida de grupos amino de las bases nitrogenadas (Shefa *et al.* 2017)

- *Generación de sitios AP* (apurínicos o apirimidínicos), en los que la hebra de DNA ha perdido la base nitrogenada completa (Li *et al.* 2011)

- *Modificaciones de bases* causadas por oxidación. De los más de 100 tipos de modificaciones potenciales descritas, la más prevalente y mejor caracterizada es la 8-oxodeoxiguanidina (8-oxo-dG) (Dizdaroglu & Jaruga 2012).

- *Roturas de la cadena de DNA*. El radical $\cdot\text{OH}$ genera roturas de cadena simple (SSBs, *Single Strand Breaks*) cuando interacciona con los residuos azúcar de la cadena de nucleótidos (Liu *et al.* 1996). Si se producen dos SSBs muy próximas pueden causar roturas de doble cadena (DSBs, *Double Strand Breaks*). Las DSBs también pueden evolucionar desde lesiones de tipo SSBs por procesamiento enzimático (Mladenov & Iliakis 2011). Las roturas de doble cadena suponen la forma más deletérea de daño en el DNA puesto que, si no se repara, activan respuestas de muerte celular (Bohgaki *et al.* 2010).

El daño pasivo en el DNA también puede ser producido por ataque indirecto de los ROS por mediación de otros metabolitos secundarios como los generados por la interacción de los radicales libres con lípidos y proteínas, que son capaces de inducir roturas de cadena simple en el DNA o entrecruzamientos de proteínas con el material genético (Luxford *et al.* 2002). De hecho, pueden producirse *enlaces cruzados DNA-proteína*, lesiones que modifican la estructura helicoidal del DNA formados por uniones covalentes aberrantes entre proteínas y DNA (Tretyakova *et al.* 2015).

1.4. REPARACIÓN DEL DAÑO EN EL DNA TRAS LA ISQUEMIA

Las neuronas son células post-mitóticas muy vulnerables al estrés oxidativo. Por este motivo, y debido a la limitada capacidad neurogénica del cerebro adulto, se necesitan herramientas de reparación para mantener la integridad del genoma y asegurar así la supervivencia neuronal. Los mecanismos más importantes para reparar el daño en el DNA ocasionado por la reoxigenación en neuronas se resumen en la **Figura 3**.

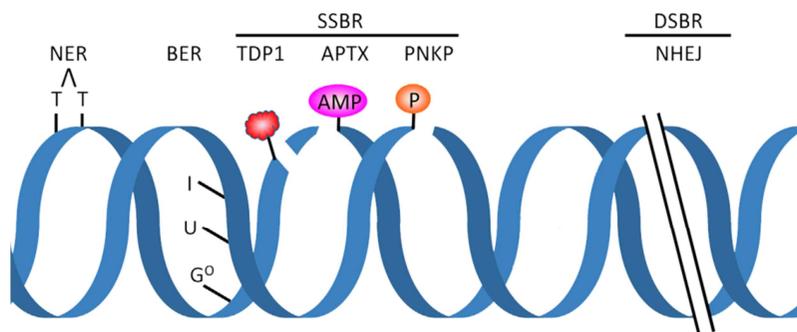


Figura 3: Daño en el DNA y mecanismos de reparación en neuronas. La imagen muestra diferentes lesiones inducidas por estrés oxidativo y la ruta de reparación de elección para cada caso. Modificado de (Iyama & Wilson 2013).

1.4.1. Reparación por escisión de nucleótidos

La reparación por escisión de nucleótidos (NER, *Nucleotide Excision Repair*) resuelve modificaciones de bases que distorsionan la estructura helicoidal natural del DNA, impidiendo la transcripción. Estas lesiones, denominadas “voluminosas”, pueden ser causadas por ROS o por productos secundarios de la peroxidación de lípidos (Iyama & Wilson 2013), aunque su origen más común son los mutágenos exógenos.

1.4.2. Reparación por escisión de bases

La reparación por escisión de bases (BER, *Base Excision Repair*) elimina las lesiones más comunes tras el estrés oxidativo agudo, como las bases modificadas, desaminaciones, sitios AP y roturas de cadena simple (SSBs). Este mecanismo se inicia con el reconocimiento y eliminación de la base mutada por DNA glicosidasas, que suprimen la base dañada o inadecuada

produciendo un sitio AP. A continuación, una endonucleasa (APE-1) introduce un corte en la hebra para eliminar el sitio AP provocando un SSBs. Los extremos de los SSBs tienen diferente naturaleza dependiendo de su origen. Por ello, enzimas como la fosfatasa-quinasa PNKP, la fosfodiesterasa TDP1 y la Aprataxina (APTX) trabajan para generar extremos 3' y 5' adecuados para que las DNA polimerasas y ligasas rellenen y cierren la muesca generada (Li *et al.* 2011). Defectos en BER se han ligado con un incremento en la susceptibilidad a la isquemia debido al estrés oxidativo agudo (Ghosh *et al.* 2015; Liu *et al.* 2011). Dentro de los mecanismos de reparación por escisión de bases puede incluirse la reparación de SSB, ya que estas roturas pueden generarse por acción de $\cdot\text{OH}$ o como parte del proceso de reparación BER (Iyama & Wilson 2013).

1.4.3. Reparación de roturas de doble cadena

Las roturas de doble cadena (DSBs) aun siendo poco frecuentes, son las lesiones más tóxicas y mutagénicas. De hecho, en un número muy bajo pueden ser letales para la célula (Mladenov & Iliakis 2011). Las células de mamífero presentan dos posibles vías de reparación de DSBs, la recombinación homóloga (HR, *Homologous Recombination*) y la unión de extremos no homólogos (NHEJ, *Non-Homologous End Joining*) (Maynard *et al.* 2015). Sin embargo, las neuronas son células postmitóticas y carecen de cromátidas hermanas, por lo que la reparación de DSBs se lleva a cabo únicamente por NHEJ. Se ha descrito que esta vía está activada tras la isquemia (Kim *et al.* 2001; Meng *et al.* 2009) y que niveles reducidos de proteínas de esta ruta incrementan la fragmentación del DNA, lo que pone de manifiesto la importancia de la reparación no homóloga en la supervivencia neuronal tras la isquemia (Sugawara *et al.* 2001), aunque su impacto en esta patología está aún sin establecer. Debido a su complejidad y a la importancia de esta vía en la presente memoria, a continuación se resume el proceso de señalización del daño en el DNA y el mecanismo de reparación de DSBs en neuronas.

1.4.3.1. Señalización del daño en el DNA

Las células de mamífero han desarrollado un complejo mecanismo de señalización para detectar y marcar los sitios de lesiones en el DNA, activando así la maquinaria de reparación para asegurar el mantenimiento de la homeostasis celular. En esta cascada de transducción de señales juegan

un papel importante las serina/treonina quinasas PIKKs (*Phosphatidylinositol-3-kinase-related kinases*). Dentro de esta amplia familia, al menos dos de sus miembros se consideran esenciales para la respuesta a las DSBs: ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) y DNA-PKcs (*DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit*) (Bohgaki *et al.* 2010).

Los sitios DSBs son reconocidos por el complejo MRN, formado por tres proteínas: MRE11 (*Meiotic Recombination 11*), Rad50 y NBS1 (*Nijmegen Breakage Syndrome 1*) (Cao *et al.* 2016). Este heterotrímero de proteínas interacciona con la serina/treonina kinasa ATM, reclutándola en los sitios de daño y favoreciendo su activación por autofosforilación en el residuo Ser1893 (Bakkenist & Kastan 2003). La proteína ATM activa una serie de sustratos, entre los que destacan la histona H2AX, una variante de la histona H2A, y la proteína MDC1 (*Mediator of DNA damage checkpoint protein 1*). La fosforilación de la histona H2AX en el residuo Ser139 (γ H2AX) es un conocido marcador de DSBs ampliamente utilizado (Kuo and Yang 2008). La activación de MDC1 por parte de ATM permite su interacción con las E3 ubiquitina ligasas RNF8 y RNF168 y, por tanto, su reclutamiento en los sitios de daño. Las histonas H2AX y H2A ubiquitinadas flanquean los sitios de daño, permitiendo el reclutamiento de la proteína 53BP1 (*p53 Binding Protein*) (Bohgaki *et al.* 2010) (**Figura 4**). La proteína 53BP1 carece de actividad enzimática aparente, pero es imprescindible para la reparación de DSBs al interactuar con diversos elementos de respuesta al daño. Además, 53BP1 es determinante en la decisión de la vía de reparación, protegiendo los extremos libres de DNA de una resección inadecuada y favoreciendo la reparación por NHEJ (Panier & Boulton 2013).

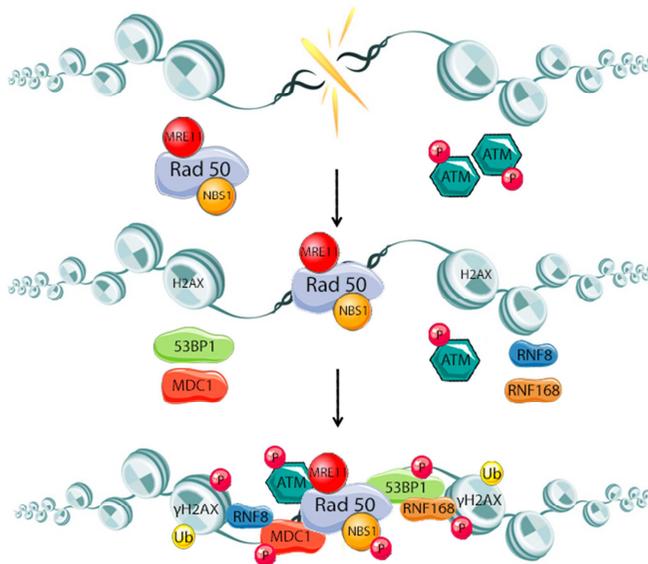


Figura 4. Señalización de las roturas de doble cadena. La figura esquematiza la cascada de señalización de las dobles lesiones para poder ser reconocidas posteriormente por los mecanismos de reparación.

1.4.3.2. Reparación de DSBs en neuronas

La capacidad de reparación del DNA puede afectar a la susceptibilidad de las neuronas al estrés isquémico, lo que hace que la supervivencia de las mismas dependa de un proceso de reparación efectivo. Se puede hablar de tres pasos secuenciales en la reparación por la ruta NHEJ (**Figura 5**).

Reconocimiento de los extremos libres. Los dos extremos resultantes de la lesión, señalizados como se indica en el apartado anterior, son reconocidos directamente por el heterodímero Ku, formado por las proteínas Ku70 y Ku80. Su unión promueve el reclutamiento de DNA-PKcs (Downs & Jackson 2004). El complejo multiproteico formado facilita la estabilización y alineamiento de los extremos resultantes del doble corte. Cuando dos DNA-PKcs de dos extremos alineados interaccionan, se activan por autofosforilación (Chan *et al.* 2002).

Procesamiento de los extremos. Dependiendo de la complejidad de los extremos generados, se reclutarán factores para la modificación de los mismos. Cuando los extremos generados no son compatibles, la DNA-PKcs activa Artemis, una endonucleasa que elimina tanto extremos salientes en 3'

como en 5', con el fin de exponer secuencias que presentan micro-homología compatibles para la ligación (Pannunzio et al. 2014). Una vez generados los extremos, y antes de su ligación, Ku recluta en los sitios de corte al complejo enzimático XRCC4-ligase IV (LIG4), que interacciona con la proteína PNKP (Aceytuno et al. 2017). Esta fosfatasa elimina los posibles grupos fosfato que puedan existir en los extremos 3' o bien los añade en el residuo 5' permitiendo el posterior enlace fosfodiéster. Tras el alineamiento de las regiones micro-homólogas pueden quedar ciertos vacíos o segmentos huecos de nucleótidos que son rellenados por las polimerasas μ u γ (Williams et al. 2014).

Ligamiento. Finalmente, el complejo XRCC4-LIG4 con la estimulación del factor XLF (*XRCC4-like factor*) une los extremos (Iyama & Wilson 2013).

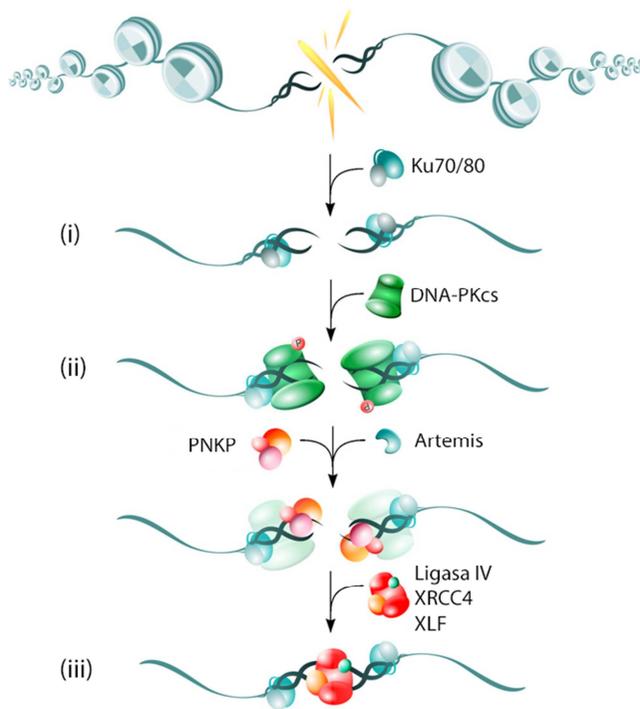


Figura 5: Mecanismo canónico de reparación no homóloga. Se resumen los principales factores que intervienen en la restauración de la integridad genómica. Modificado de (Mladenov & Iliakis 2011).

1.5. INFLUENCIA GENÉTICA EN EL ICTUS

El ictus es una enfermedad compleja en cuya patogenia intervienen numerosos factores, entre los que se incluye la herencia. Se estima que alrededor del 38% de los ictus se deben a factores de riesgo heredados, aunque el porcentaje varía dependiendo de los subtipos de ictus (Bevan et al. 2012). Las variaciones genéticas que afectan al riesgo de la enfermedad no son las únicas con interés clínico; han de considerarse además la farmacogenética y la influencia de la variabilidad genética en el pronóstico del ictus (Gomez-Sanchez *et al.* 2011; Almeida 2013; Rodríguez *et al.* 2017).

La variabilidad genética es la base de la selección natural, luego no es de extrañar que la variabilidad genética interindividual esté relacionada con la susceptibilidad de los humanos a ciertas enfermedades. Dentro de las variaciones genómicas, la forma más común es el polimorfismo de nucleótido único (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*). Se calcula que de los 6.000 millones de bases que forman nuestro genoma, alrededor de 78 millones son SNPs (Lindgren 2014). En este contexto los análisis de genoma completo o GWAS (*Genome wide association*) resultan de gran utilidad, ya que permiten estudiar al mismo tiempo las frecuencias de un gran número de SNPs en relación a una cierta enfermedad.

1.5.1. Variabilidad genética y riesgo de ictus

La implicación del componente genético en el ictus puede explicarse, en parte, por las causas genéticas asociadas a ciertas patologías descritas como factores de riesgo en el ictus que, por consiguiente, también lo serán para la enfermedad cerebrovascular en sí.

Entre los marcadores genéticos que relacionan los factores de riesgo modificables con el ictus isquémico destacan aquellos que influyen en la fibrilación auricular, la hipertensión, la enfermedad isquémica del corazón y la presencia de lesiones en la materia blanca (Boehme *et al.* 2017). Análisis tipo GWAS realizados en los últimos años han obtenido relevantes resultados en este sentido (Traylor et al. 2012).

1.5.2. Farmacogenética e ictus

La farmacogenética estudia cómo ciertas variaciones genéticas interindividuales pueden afectar a la respuesta y seguridad del uso de un fármaco. Este tipo de estudios son muy interesantes, pues permiten

seleccionar a los pacientes antes de someterlos a un determinado tratamiento favoreciendo su recuperación funcional. En este sentido, un estudio reciente relaciona ciertos SNPs con el riesgo de transformación hemorrágica debida al tratamiento con el trombolítico t-PA (del Río-Espínola et al. 2012). Además de en la seguridad, la variabilidad genética también puede influir en la respuesta al tratamiento, por ejemplo, modificando la función de las enzimas necesarias para metabolizar el medicamento, como ocurre en el caso del anticoagulante warfarina (Perera et al. 2013) y del antiagregante clopidogrel (Chan et al. 2014).

1.5.3. Variabilidad genética y pronóstico funcional tras el ictus

Actualmente la predicción del pronóstico funcional tras un ictus es inexacta y puede variar ampliamente entre pacientes con características clínicas y de neuroimagen similares. Esto no sólo dificulta la planificación de los objetivos de rehabilitación, sino que confiere un papel fundamental a la diversidad genética interindividual. Sin embargo, hasta el momento son pocos los estudios que relacionan dicha diversidad con la dependencia funcional a medio y largo plazo (Almeida, 2013).

La recuperación funcional de los pacientes tras un ictus está condicionada por diferentes factores, como puede ser la edad, el sexo o el propio volumen de lesión. Este último está íntimamente relacionado con la muerte neuronal y resulta muy interesante desde el punto de vista genético. Se han descrito SNPs en genes que codifican proteínas apoptóticas que podrían ser de gran interés en el diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas e ictus (Almeida 2013). En este contexto, nuestro grupo ha demostrado que el polimorfismo *Arg72Pro* del gen *Tp53* (rs1042522) regula la susceptibilidad de las neuronas a la apoptosis causada por la isquemia influyendo en el pronóstico de los pacientes de ictus (Gomez-Sanchez et al. 2011). Este mismo polimorfismo *Arg72Pro* se ha vinculado recientemente con la supervivencia de las células endoteliales del cerebro, de modo que se encuentra también asociado a la plasticidad vascular y reparación cerebral en pacientes de ictus hemorrágico (Rodríguez et al. 2017).

El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, *Brain-Derived Neurotrophic Factor*) está involucrado en la modulación de la supervivencia neuronal, en la plasticidad sináptica y en la angiogénesis, entre otros procesos. Estudios de asociación revelaron que el polimorfismo de BDNF

Val66Met (rs6265) está vinculado con una mejora en la recuperación a largo plazo, aunque en la respuesta temprana parece tener un efecto contrario (Qin et al. 2014). En relación a la plasticidad neuronal tras un daño cerebral, el SNP rs7136446 del gen IGF1 (*Insuline-like growth factor 1*) también se ha asociado con una recuperación neurológica favorable a largo plazo (Aberg et al. 2013).

Una parte importante de la patología del ictus isquémico está mediada por los factores de inflamación. Se han encontrado polimorfismos en genes que median en los procesos de inflamación y que tienen relevancia funcional independientemente de los factores de riesgo o la importancia de la lesión. Destacan los SNPs rs5275 y rs20417 de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) (Maguire et al. 2011), rs1130864 en el gen de la proteína C reactiva (Guo et al. 2014), el haplotipo Asp299Gly y Thr399Ile del gen del receptor TLR4 (Weinstein et al. 2014) o la variación 1082G>A (rs1800896) en el gen interleuquina 10 (Marousi et al. 2011).

Como se ha mencionado anteriormente, la recanalización del flujo sanguíneo es determinante para la recuperación de las funciones neurológicas tras la isquemia, por lo que fenómenos de agregación plaquetaria y trombogénesis podrían dificultar el proceso de reparación. Por ello no es de extrañar que SNPs en genes que modulan estos procesos sean funcionales en términos de recuperación a largo plazo. En esta línea destacan G894T (rs1799983) del gen de la óxido nítrico sintasa endotelial, eNOS (Ellul et al. 2011) o el SNP rs5919 en la glicoproteína IIIa, GPIIIa (Maguire et al. 2011).

Hasta la fecha, la mayor parte de los análisis genéticos realizados son estudios de asociación con el riesgo a padecer un ictus. Son necesarios más estudios genéticos de dependencia funcional que aporten luz sobre nuevas dianas moleculares terapéuticas y su implicación en la mejora de la recuperación de los pacientes de ictus isquémico.

2. WRAP53

2.1. EL GEN *Wrap53*

Wrap53 debe su nombre a las siglas en inglés de **WD40-encoding RNA antisense to p53**, que describen su papel dual, ya que este gen codifica una proteína rica en repeticiones WD40 y un transcrito antisentido que regula postranscripcionalmente al gen supresor de tumores *p53*.

En humanos, el gen *Wrap53* se encuentra en el cromosoma 17p13.1, ocupando 17.432 bases de la hebra con orientación positiva y solapando de manera antisentido con el gen *p53* en la región 5' de ambos (www.genecards.org). *Wrap53* es un gen de reciente descubrimiento del que se conocen hasta 17 variantes alternativas de *splicing* (corte y empalme), sintetizadas desde 3 sitios de inicio de la transcripción diferentes 1 α , 1 β y 1 γ (Mahmoudi *et al.* 2009) (**Figura 6**).

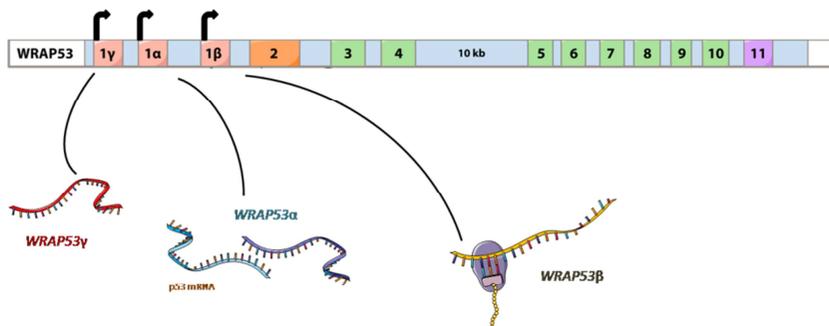


Figura 6. El gen *Wrap53* humano. El esquema muestra los diferentes exones de inicio (1 α , 1 β y 1 γ) de *Wrap53* y los diferentes transcritos generados. Modificado de (Henriksson & Farnebo 2015).

- El transcrito **WRAP53 γ** se origina más aguas arriba (**Figura 6**), en una región complementaria al primer intrón del gen *p53* que origina el transcrito Hp53int1 (Reisman *et al.* 1988). Hasta la fecha no hay datos referentes a la funcionalidad de estos dos transcritos de *Wrap53* y *p53*, respectivamente.

- Si la transcripción comienza en el exón 1 α (**Figura 6**) se genera **WRAP53 α** , un transcrito natural antisentido (NAT, *Natural Antisense Transcript*) de *p53* (Mahmoudi *et al.* 2009). Los NATs son RNA endógenos que presentan secuencias complementarias a transcritos sentido de función conocida. Estas moléculas fueron inicialmente descritas en procariotas,

donde regulan la maquinaria de expresión génica (Wagner and Simons 1994). Los RNA antisentido pueden modular la expresión del transcrito sentido de la hebra de DNA complementaria (*cis*-NATs), o actuar sobre genes en otros loci (*trans*-NATs) (Khorkova *et al.* 2014; Wight & Werner 2013). En mamíferos hasta un 70% de los genes presentan elementos antisentido (Katayama *et al.* 2005), si bien es cierto que sólo se ha establecido el papel biológico de algunos de ellos (Faghihi *et al.* 2008; Lee *et al.* 1999; Sleutels *et al.* 2002). En el caso de *WRAP53 α* , se ha descrito que este *cis*-NAT regula la estabilidad del RNA mensajero (mRNA) de *p53* y, por consiguiente, la expresión de la proteína supresora de tumores. Para ello, *WRAP53 α* interacciona directamente con la región no traducida 5'-UTR del mRNA modulando de este modo los niveles endógenos de *p53* (Farnebo 2009). Esta interacción parece ser necesaria para regular los niveles basales de la proteína, tanto en condiciones normales como en situaciones de estrés, donde una sobreexpresión de *WRAP53 α* conduce a una mayor expresión de *p53* (Mahmoudi *et al.* 2009). *WRAP53 α* tiene, por tanto, un impacto directo en la respuesta al daño mediada por *p53*.

- ***WRAP53 β*** es el transcrito que se genera desde el exón más aguas abajo (Figura 6). Es el más abundante y codifica una proteína de la familia *WD40* como se detallará a continuación. La proteína *WRAP53 β* , también conocida como *WRAP53*, *TCAB1* o *WDR79*, media la interacción con otras proteínas o con moléculas de RNA, dirigiéndolos hacia los orgánulos nucleares conocidos como Cuerpos de Cajal, hacia los telómeros o bien hacia los sitios de daño en el DNA. Su desregulación se ha visto relacionada con procesos de carcinogénesis, envejecimiento y neurodegeneración (Henriksson & Farnebo 2015).

En ratón cabe mencionar que, hasta el momento, no existen evidencias del solapamiento con el gen *p53*. Por lo tanto, lo anteriormente descrito sería exclusivo de humanos. El gen *Wrap53* murino sí codifica la proteína *WRAP53*, que presenta una elevada homología con la variante humana (77% identidad), siendo el dominio funcional *WD40* altamente conservado entre ambas especies (92% homología).

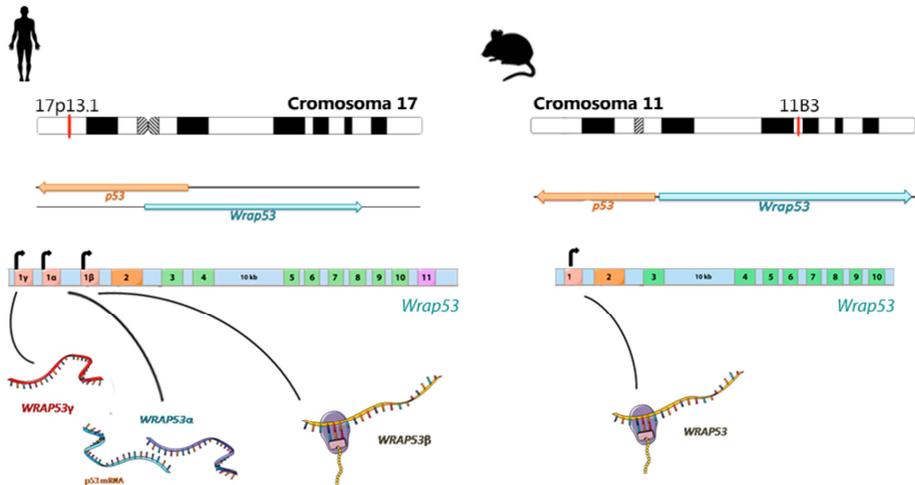


Figura 7. Comparación del gen *Wrap53* en humano y en ratón. El esquema muestra la localización del gen *Wrap53* así como los diferentes transcritos generados en humano y en ratón.

2.2. LA PROTEÍNA WRAP53

2.2.1. Estructura y localización de WRAP53

WRAP53 pertenece a una familia de proteínas muy relacionadas estructuralmente que contienen el dominio WD40, consistente en repeticiones de un motivo estructural corto, de unos 40 aminoácidos, que frecuentemente termina en el dipéptido triptófano-aspartato (WD). Así, la proteína WRAP53 contiene un dominio *N*-terminal rico en prolina, seguido de una región susceptible de fosforilización rica en residuos serina. Tras ello se encuentra el dominio WD40, que le confiere función biológica y un dominio rico en glicina en el extremo *C*-terminal.

Un dominio WD40 canónico está constituido por 7 hojas beta que se posicionan sobre un eje central formando una hélice. La exposición de los residuos de la superficie la hélice permite el reconocimiento e interacción con otras moléculas (Smith *et al.* 1999; Xu & Min 2011). De este modo, el dominio WD40 participa en interacciones proteína-proteína o proteína-RNA (Kruusvee *et al.* 2017; Lau *et al.* 2009) y, por tanto, interviene en muchos procesos celulares. Se cree que estos dominios funcionan como plataformas para la formación de macromoléculas, pero hasta el momento no se ha descrito que los dominios WD40 presenten actividad enzimática. No obstante, las proteínas de la familia WD40 son muy abundantes en

eucariotas. Se estima que el 1% del proteoma humano está conformado por proteínas de este tipo (Zou et al. 2016).

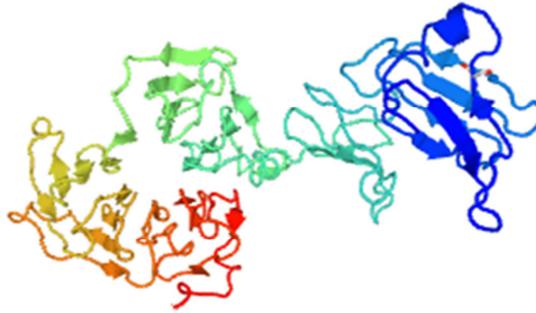


Figura 8. Estructura parcial de la proteína humana WRAP53. Dominio WD40 típico con 7 hojas beta formando una hélice (www.uniprot.org).

WRAP53 es una proteína muy conservada evolutivamente, cuenta con homólogos en vertebrados, invertebrados, plantas y levaduras (Tycowski *et al.* 2009; Zhong *et al.* 2011). Tiene una distribución ubicua localizándose tanto en el citosol como en el nucleoplasma. La localización subcelular diferenciada de WRAP53 parece ser determinante en su actividad biológica (Henriksson & Farnebo 2015). De hecho, recientemente se ha descrito que la presencia de WRAP53 en el núcleo determinaría la recuperación y supervivencia de los pacientes de cáncer de pecho, cuello y cabeza (Garvin *et al.* 2015; Silwal-Pandit *et al.* 2015).

2.2.2. Funciones de WRAP53

Las funciones hasta ahora atribuidas a WRAP53 se deben a su interacción con otras proteínas o con moléculas de RNA por medio del dominio WD40. Se puede considerar a WRAP53 como un “taxi” que dirige moléculas a diferentes localizaciones celulares, y su función biológica puede diferenciarse dependiendo del destino y de los “pasajeros” que transporta.

2.2.2.1. Mantenimiento de los Cuerpos de Cajal

Los Cuerpos de Cajal (CB, *Cajal Bodies*) son unos organelos nucleares esféricos de entre 0,2 y 2 μm que fueron identificados y descritos por Santiago Ramón y Cajal a principios del siglo XX como cuerpos accesorios del nucléolo (Cajal 1903) (**Figura 9**). Los CB son elementos dinámicos cuyo

número y tamaño varía dependiendo del tipo celular, momento del ciclo y actividad transcripcional (Lafarga et al. 2016). Los CB se consideran lugares de modificación de RNAs, de maduración y ensamblaje de ribonucleoproteínas (RNP) y sitios de formación del espliceosoma (Staněk 2016). En ellos se centra la transcripción y procesamiento del mRNA de histonas, el ensamblaje de la RNA polimerasa y se les atribuye el ensamblaje y maduración de la telomerasa (Schmidt & Cech 2015). Debido a la importancia de estas funciones, defectos en el mantenimiento de los CB suponen alteraciones en la proliferación celular y en el *splicing* alternativo. Si bien los CB no son esenciales para estos procesos, se considera que aumentan su eficiencia al concentrar los elementos necesarios en el mismo compartimento subcelular.

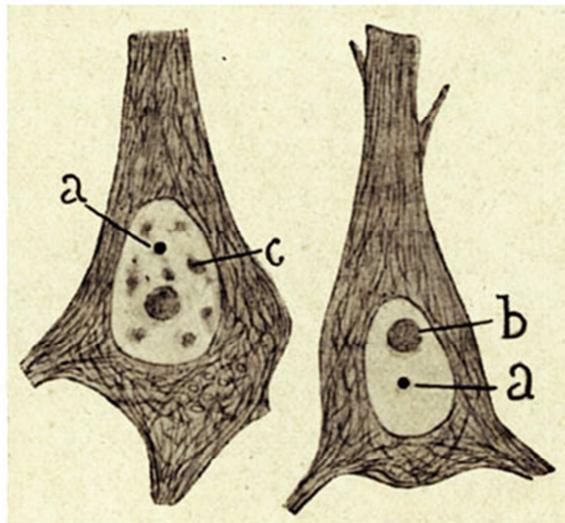


Figura 9. Dibujo original de Ramón y Cajal de organelos nucleares. Se muestran dos neuronas piramidales de corteza humana. En en sus núcleos se observan (a) el cuerpo de Cajal, (b) el nucléolo y (c) gránulos de cromatina. Publicado por Cajal en 1910.

La proteína WRAP53 desempeña una función principal en la formación y en el mantenimiento de los CB. El silenciamiento de WRAP53 conlleva a la desorganización de los CB y previene su síntesis de nuevo (Mahmoudi et al. 2010). Además, WRAP53 se encarga del tráfico de ciertos factores hasta este orgánulo nuclear, como sucede con RNPs (ribonucleoproteínas) como la telomerasa y el complejo SMN (*Survival of Motor Neuron*) (Venteicher &

Artandi 2009). Mutaciones en WRAP53 se asocian a enfermedades neurodegenerativas, ya que suponen defectos en el transporte de SMN. Esto causa atrofia muscular espinal y neurodegeneración motora (Mahmoudi et al. 2010).

2.2.2.2. Biogénesis de ribonucleoproteínas

Los snRNPs (*small nuclear Ribo-Nucleo Proteins*) son complejos RNA-proteína que forman parte del espliceosoma, responsable del mecanismo de corte y empalme de los mRNA en eucariotas. La maduración de los RNAs no codificantes asociados a snRNPs es un proceso esencial para su incorporación al complejo del espliceosoma (Jády et al. 2003). En concreto, los scaRNAs (pequeños RNAs específicas de Cuerpos de Cajal) juegan un papel primordial introduciendo modificaciones postranscripcionales en el RNA de las snRNPs. WRAP53 es un elemento principal en la localización y el procesamiento de los snRNPs, ya que condiciona la localización sub-celular de todos los scaRNAs (Tycowski *et al.* 2009). WRAP53, mediante su dominio WD40, reconoce y se une a una secuencia de localización de cuatro nucleótidos llamada caja CAB, presente en todos los scaRNAs (Richard et al. 2003), dirigiéndolos a los CB, donde se concentran gran cantidad de snRNPs y se propicia el entorno químico adecuado para su maduración.

2.2.2.3. Síntesis de telómeros

La telomerasa es una holoenzima de naturaleza ribonucleoproteica que cataliza la adición de repeticiones de nucleótidos (TTAGGG) no codificantes en los extremos de los cromosomas lineales o telómeros (Sauerwald et al. 2013).

La telomerasa humana activa cuenta con 3 subunidades esenciales: TERT, TERC y disquerina. TERT es la transcriptasa reversa que cataliza la inserción de nucleótidos dictado por TERC, la plantilla de RNA. Para la correcta función de la enzima es necesaria la proteína de unión al RNA disquerina. Aunque estos componentes se consideran fundamentales para la telomerasa, existen otros factores de ensamblaje que influyen en la eficiencia de la actividad de la enzima, como son NAF1, pontina, reptina, NOP10, GAR1, NHP2 (Nandakumar & Cech 2013).

Recientemente se ha observado que WRAP53 tiene capacidad de unirse directamente a los componentes esenciales de la telomerasa, y su presencia

es necesaria para la localización de la holoenzima en los CB y en los telómeros durante la fase S (Jády *et al.* 2006; Tomlinson *et al.* 2006; Venteicher *et al.* 2009; Venteicher & Artandi 2009). Aunque se cree que los CB no son esenciales para la elongación de telómeros (Chen *et al.* 2015), sí lo es la proteína WRAP53, que juega un papel esencial en la homeostasis de los mismos.

2.2.2.4. Reparación de roturas de doble cadena en el DNA

La participación de WRAP53 en la reparación del DNA también ha sido descrita recientemente en células tumorales (Henriksson *et al.* 2014). Como se ha comentado, uno de los eventos más tempranos en la cascada de señalización de las DSBs es la fosforilación de γ H2AX dependiente de ATM. Tras un daño en el DNA, la quinasa ATM también es capaz de fosforilar a WRAP53 en el residuo Ser64 (Coucoravas *et al.* 2016). La proteína WRAP53 fosforilada dirige el complejo MDC1-RNF8 hacia los sitios de daño mediante interacción con la histona γ H2AX (Rassoolzadeh *et al.* 2015). Se favorece así la ubiquitinación de la cromatina flanqueante por parte de la E3 ubiquitina ligasa RNF8, promoviendo la unión eficiente de los factores de reparación 53BP1, BRCA1 y Rad51 (Henriksson *et al.* 2014) (**Figura 10**).

WRAP53 es, por tanto, necesaria para la ubiquitinación eficiente de la cromatina dañada, un aspecto importante en la señalización del daño en el DNA y, por consiguiente, es un factor clave en la reparación del DNA tanto por HR como NHEJ. De hecho, en células con capacidad replicativa, la reducción de WRAP53 inhibe las vías de reparación homóloga y no homóloga, se acumulan DSBs que conducen a la parada del ciclo celular (Henriksson *et al.* 2014). En concordancia, la sobreexpresión exógena de esta proteína aumenta la supervivencia de las células tras un daño, al favorecer ambas rutas de reparación del DNA (Rassoolzadeh *et al.* 2016).

El papel de WRAP53 en reparación, junto con su función en la elongación de telómeros, justifica la implicación de la proteína en el desarrollo de cáncer. Se han encontrado niveles muy elevados de WRAP53 en gran número de líneas celulares cancerígenas de diferente origen. Además, la sobreexpresión de la proteína promueve la transformación celular (Mahmoudi *et al.* 2011; Sun *et al.* 2014). Cabe destacar el hecho de que mutaciones concretas en WRAP53 causan el síndrome de disqueratosis congénita o DC (Zhong *et al.* 2011). La DC es un síndrome hereditario

multisistémico caracterizado por anomalías en las mucosas, por fallo de la médula ósea y por la predisposición de los pacientes a padecer cáncer. (Dokal 2011; Gramatges et al. 2013).

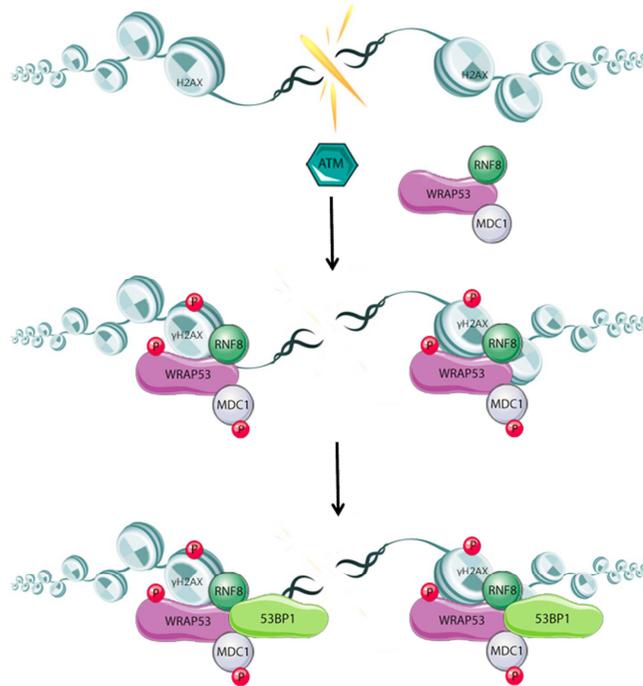


Figura 10. Esquema representativo del papel de WRAP53 en la señalización y reparación del daño en el DNA. Modificado de (Cocoravas et al. 2016).

Los estudios que describen el papel de WRAP53 en reparación han sido realizados en células proliferativas. Sin embargo, se desconoce la relevancia de WRAP53 en respuesta al daño en células postmitóticas, dónde la ausencia de capacidad de replicación hace esenciales los mecanismos de reparación celular que garantizan la funcionalidad del tejido y la supervivencia del organismo.

2.2.3. Variantes polimórficas de *Wrap53*

Los polimorfismos de base única o SNPs constituyen una herramienta eficaz para determinar la susceptibilidad natural de los humanos a ciertas enfermedades (Gomez-Sanchez et al. 2011; Rodríguez et al. 2017).

Se han encontrado diferentes SNPs a lo largo del gen *Wrap53*, siendo dos de ellos (SNPsrs2287498 y rs2287499) especialmente interesantes por su

vinculación a la predisposición y determinación de la prognosis de ciertos tipos de cáncer (Schildkraut et al. 2009). El SNP rs2287498, en el segundo exón del gen, supone un cambio de la base citosina presente en la variante ancestral (TTC), por una timina (TTT). Esta sustitución de bases en el codón 150 no origina un cambio del aminoácido codificado, que se mantiene en fenilalanina (F150F). Sin embargo, el SNP rs2287499, localizado en el exón 1, sí trae consigo un cambio de aminoácido. En este caso, el alelo ancestral citosina (CGG) es sustituido por una guanina (GGG), de modo que el codón 68 pasa de codificar una arginina a codificar una glicina (R68G). En estudios clínicos de asociación ambos SNPs se han encontrado estrechamente ligados entre sí y asociados al riesgo a padecer cáncer epitelial ovárico y cáncer de pecho ER negativo, en poblaciones de mujeres blancas no hispánicas (García-Closas et al. 2007; Mørkred et al. 2013; Schildkraut et al. 2009). Además, la variante polimórfica rs2287499 se ha visto asociada a la diferente respuesta a la hemotoxicidad debida al benceno causada por errores en los mecanismos de reparación de daño en DNA (Lan et al. 2009).

A la vista de estas publicaciones se asume que los SNPs rs2287498 y rs2287499 tienen importancia biológica, sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales estos polimorfismos modulan la función de WRAP53 son aún desconocidos. El SNP rs2287499 (R68G) se localiza próximo a un sitio de fosforilación (Ser64), esencial en el reclutamiento de WRAP53 hacia los sitios de daño (Coccoravas et al. 2016). El polimorfismo rs2287499 podría estar condicionando la función de WRAP53 en la reparación de DNA al alterar la configuración estructural de esta zona de fosforilación. Además, parece existir un ligamiento hereditario entre rs2287498 y rs2287499 que podría explicar la función del SNPs silente rs2287498. Hasta la fecha no existen datos de la implicación de estos polimorfismos en enfermedades neurodegenerativas ni cerebrovasculares, en las que la reparación del DNA desempeña un papel destacado. Se precisan más estudios para esclarecer la influencia de la variabilidad genética sobre la reparación del DNA y supervivencia neuronal.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

El estado neurológico funcional tras un ictus viene determinado por el balance entre el daño y la reparación del tejido infartado. Así, durante la fase aguda del ictus se activan mecanismos endógenos de recuperación de las células afectadas, especialmente las neuronas, entre los que está la reparación de su material genético con objeto de reducir en lo posible los procesos de muerte celular. El estudio de los mecanismos moleculares implicados en la supervivencia neuronal tras una isquemia es, por tanto, esencial para el diseño de estrategias encaminadas a proteger a las neuronas del daño isquémico. En este sentido, WRAP53 es una proteína que participa en la supervivencia de células tumorales, así como en la reparación de su material genético. Con estos antecedentes, y teniendo en cuenta la vinculación del gen *Wrap53* con p53, de gran relevancia en la muerte neuronal debida a la isquemia, consideramos que WRAP53 podría ser una firme candidata a desempeñar una función esencial en la regulación del balance entre los procesos de neurodegeneración y neurorreparación tras la isquemia cerebral, postulándose como una posible diana molecular para posibles terapias neuroprotectoras.

Además, se han descrito sitios polimórficos en el gen *Wrap53* asociados con la susceptibilidad a ciertos tipos de cánceres. Este hecho nos lleva a pensar que estos SNPs también podrían estar relacionados con la capacidad de reparación del tejido infartado y, por tanto, resultar útiles para predecir el pronóstico de pacientes hospitalizados tras un ictus. De ser así, el estudio de *Wrap53* podría ser crucial para el desarrollo de biomarcadores genéticos del estado funcional de pacientes que han sufrido un ictus isquémico.

2. OBJETIVOS

A la vista de los antecedentes descritos, y teniendo presente nuestra hipótesis de trabajo, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Investigar la implicación del gen *Wrap53* en la isquemia cerebral y, en particular, su función en neuronas corticales tras la isquemia.
2. Caracterizar el papel de la proteína WRAP53 en la supervivencia neuronal tras la isquemia
3. Estudiar el impacto de las variantes polimórficas de *Wrap53* en el pronóstico funcional de los pacientes de ictus.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CULTIVOS CELULARES

1.1. CULTIVO PRIMARIO DE NEURONAS

1.1.1. Especie ensayada y condiciones del animalario

Para la realización del cultivo primario de neuronas corticales empleamos embriones de ratón (*Mus musculus*, L.1758) de la cepa C57BL/6 de 14,5 días de gestación. Las hembras gestantes se criaron en el Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca.

Los animales se mantuvieron en jaulas individuales bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (fase de luz de 8:00 a 20:00). La humedad relativa se mantuvo entre el 45-65% y la temperatura se controló entre los 20-25°C. La alimentación de los animales fue *ad libitum*, con una dieta sólida estándar (17% proteínas, 3% lípidos, 58,7% glúcidos, 4,3% celulosa, 5% minerales y 12% humedad) y con acceso libre al agua de bebida.

El periodo gestacional, establecido en 19,5 días para el ratón, se controló limitándose a una noche el tiempo de cohabitación de las hembras con los machos. A las 9:00 horas de la mañana siguiente, se separaron aquellas hembras que presentaban tapón vaginal, indicador de la copulación, considerándose este día como el primero de la etapa gestacional.

Todos los procedimientos con animales cumplen la Recomendación 2007/526/CE, de 18 de junio de 2007, de la Comisión Europea relativa al alojamiento y al cuidado de animales, así como la legislación española vigente (RD 53/2013), de 1 de febrero de 2013, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos. Además, todos los protocolos de la presente Tesis que implican manipulación de animales vivos, han sido aprobados por el Comité de Bioética del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca.

1.1.2. Cultivo primario de neuronas corticales

Para la realización del cultivo de neuronas corticales se emplearon embriones de 14,5 días de gestación (Gómez-Sánchez *et al*, 2011; Delgado-Esteban *et al*, 2013). Las hembras gestantes se sacrificaron por dislocación cervical, tras lo que se procedió a la histerectomía y extracción de los

embriones. A partir de este punto se trabajó en cabina de flujo laminar (TC48, Gelaire Flow Laboratories, Virginia, EEUU). Con ayuda de unas microtijeras, pinzas de cirugía y un papel estéril impregnado de etanol al 70% se retiró el cráneo y se procedió a la extracción del cerebro, obviando cerebelo y bulbos. Se colocaron los hemisferios corticales en una placa de cultivos con solución de disgregación (NaCl 116 mM; KCl 5,4 mM; NaH₂PO₄ 1,01 mM; MgSO₄ 1,5 mM; NaHCO₃ 26 mM; D-glucosa 4mM; rojo fenol 10 mg/l; con albúmina fracción V al 0,3% p/v y DNAsa tipo I20µg/ml pH7,1) y se diseccionó el tejido con un bisturí. Los cortes de tejido se pasaron a un tubo de 50 ml (BD Falcon™, Becton Dickinson Biosciences, Massachusetts, EEUU) dónde se dejaron sedimentar durante 4 minutos. Se aspiró el sobrenadante y se incubó el sedimento en un baño termostatizado durante 10 minutos a 37°C en una solución de tripsinización (solución de disgregación suplementada con tripsina al 0.025%p/v) agitándola suavemente a intervalos de 3 minutos para facilitar la digestión enzimática. La tripsinización se detuvo añadiendo suero fetal de ternera (SF; Roche, Roche Applied Science, Barcelona, España) a una concentración final del 10% (v/v). La suspensión celular se centrifugó durante 5 minutos a 500 x g para eliminar el sobrenadante. El sedimento se resuspendió suavemente en solución de disgregación, con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio siliconada para evitar la rotura celular. Tras un periodo de sedimentación de 4 minutos se recogió el sobrenadante, que contenía células individualizadas, y se depositó en un tubo de 50 ml. El proceso de resuspensión se repitió con el sedimento de tejido resultante a fin de aumentar el rendimiento del cultivo. Se combinaron las soluciones de células disociadas obtenidas y se centrifugaron 5 minutos a 500 xg.

Las células sedimentadas se resuspendieron cuidadosamente en un volumen conocido de Neurobasal (NB), medio de cultivo específico para el crecimiento neuronal, suplementado con B27 al 2% y glutamina 2 mM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, California, EEUU) y antibiótico: penicilina G 100 U/l; estreptomycin 100 µg/l; anfotericina B 0,25 µg/l (Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU). Se realizó el conteo de las células viables tras la tinción de la suspensión celular con azul de tripano (suspensión celular 10 µl; medio de cultivo 30 µl; azul de tripano 40 µl) empleando una cámara cuenta glóbulos de Neubauer (Zeiss, Oberkochen, Alemania) y un microscopio de contraste de fases Olympus CK30 (Olympus®, Tokyo, Japón).

Las células se sembraron a una densidad de $1,8 \times 10^5$ células/cm² en placas de poliestireno (Nunclon™, ThermoScientific, Thermo Fischer Scientific, California, EEUU) previamente tratadas con poli-D-lisina 10 µg/ml (PDL, Sigma). Las células se mantuvieron en un incubador (Forma 310, Thermo Scientific, Barcelona, España) termostatzado a 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO₂. Al tercer y sexto día de cultivo, la mitad del medio se reemplazó por medio de cultivo fresco. Las células se utilizaron en el día 8-10 de cultivo, momento en que se sabe expresan receptores sinápticos funcionales (Almeida *et al.* 2002; Lesuisse & Martin 2002)

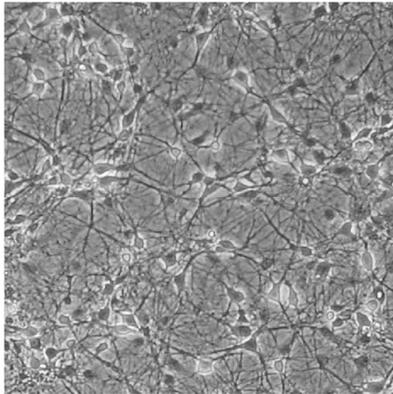


Figura 11: Neuronas corticales en cultivo primario. Microfotografía de contraste de fases de neuronas primarias corticales de ratón.

1.2. LINEAS CELULARES

1.2.1. HEK293T

La línea celular HEK293T procedente de riñón embrionario humano se cultivó en DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*; Sigma) suplementado con SF a una concentración final del 10% (v/v). Para su mantenimiento las células se subcultivaron a una proporción 1:3 cada 2 ó 3 días. Para experimentos de sobreexpresión de plásmidos, las células se resembraron en placas de poliestireno recubiertas con PDL a una densidad de 10^5 células/cm².

1.2.2. SH-SY5Y

La línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y procede de médula ósea y tiene morfología epitelial. Sin embargo, con un tratamiento de ácido retinoico (AR) y Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF) puede diferenciarse a células similares a neuronas (Encinas *et al.* 2000; Almeida *et al.* 2005).

Para el mantenimiento de las células en condiciones replicativas se dejaron crecer hasta confluencia en frascos de 175cm² (Corning, Nueva York, EEUU) subcultivándose a un ratio 1:3 cada 2 ó 3 días. Para su diferenciación se sembraron a una densidad de 10⁴ células/cm² en placas de poliestireno previamente recubiertas de colágeno tipo I (BD) 100µg/ml en ácido acético 0,1 N y se mantuvieron en DMEM suplementado con SF inactivado por calor (55°C durante 30 minutos) al 10% v/v. El día siguiente a la siembra se añadió AR (Sigma) a una concentración final de 10 µM. Tras 5 días en presencia de AR se lavaron las placas tres veces con DMEM y se incubaron con BDNF 50 ng/ml (PeproTechInc, Rocky Hill New Jersey, EEUU) durante tres días en ausencia de suero. Al noveno día de cultivo se retiró el medio con BDNF y se mantuvieron durante dos días en DMEM sin suero ni BDNF a fin de evitar el efecto neuroprotector de ambos compuestos. Este protocolo de uso secuencial de AR y BDNF es crucial para la diferenciación del cultivo a células con fenotipo neuronal caracterizadas por el crecimiento de neuritas (Cuende *et al.* 2008).

2. MODELO DE ISQUEMIA EXPERIMENTAL *IN VITRO*

El protocolo de isquemia experimental consiste en privar a las células del oxígeno y la glucosa presentes en el medio durante un tiempo determinado para, posteriormente, reoxigenarlas en un medio de cultivo completo, asemejando así un proceso de reperfusión (Almeida *et al.* 2002; Gómez-Sánchez *et al.* 2011)

Para ello, el medio de cultivo se sustituyó por *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS: NaCl 134,2 mM; KCl 5,26 mM; KH₂PO₄ 0,43 mM; NaHCO₃ 4,09 mM; Na₂HPO₄·2H₂O 0,33 mM; HEPES 20 mM; CaCl₂·2H₂O 4 mM; pH 7,4) y se incubaron las células a 37°C en ausencia de oxígeno (N₂95%/CO₂5%, O₂<1%) durante 90 minutos, 3 ó 6 horas. Tras ese tiempo se retiró el medio de isquemia y se mantuvieron las células en NB sin B27 para la reoxigenación en

atmósfera estándar de cultivo (aire 95%/CO₂5%, O₂ 21%). Esta condición, que permite modelizar aspectos metabólicos de la isquemia *in vitro*, será la denominada OGD (*Oxygen and Glucose Deprivation*).

Paralelamente, se llevó a cabo la condición control o normoxia (NMX) del mismo cultivo primario de neuronas. En este caso las células se cultivaron en medio HBSS con glucosa 5,5 mM y en atmósfera estándar de cultivo (aire 95%/CO₂ 5%, O₂ 21%) durante los mismos tiempos que la condición OGD. Se procedió a la reoxigenación del mismo modo en ambas condiciones (**Figura 12**)



Figura 12. Protocolo de isquemia experimental *in vitro*. Esquema de las etapas del procedimiento del protocolo de privación de oxígeno y glucosa.

3. TRANSFECCIONES CELULARES

3.1. TRANSFECCIONES CON PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN

Para la amplificación de *Wrap53* se emplearon plásmidos del tipo pEGFP-C1, optimizados para la transfección de células de mamíferos. Dichos plásmidos se caracterizan por conseguir una alta expresión de la proteína clonada fusionada a la región C-terminal de la proteína verde fluorescente mejorada (GFP) (**Figura 13**) De este modo se puede seguir la localización de la proteína en la célula, valorar la eficiencia de la transfección mediante microscopía o seleccionar las células transfectadas en el análisis por citometría de flujo. Para obtener un mayor número de copias de estos vectores plasmídicos se llevó a cabo la transformación de bacterias competentes *Escherichia coli* cepa DH5 α mediante choque térmico. La extracción y purificación de los plásmidos se realizó empleando el kit comercial *Wizard Plus MIDIprep* (Promega, Wisconsin, EEUU) según las indicaciones del fabricante.

Las neuronas se transfectaron 24 horas antes de su uso. Para ello se trataron con el reactivo catiónico *Lipofectamina LTX Plus Reagent™* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, California, EEUU) y con el plásmido de interés a una concentración final de $1,5 \mu\text{g}/10^6$ células. Las células tratadas con el plásmido pWRAP53 se co-transfectaron a su vez con plásmido control vacío (pGFP) en proporción 1:3 para conseguir una sobreexpresión controlada de la proteína (Veas-Pérez de Tudela, *et al.* 2015, 2016)

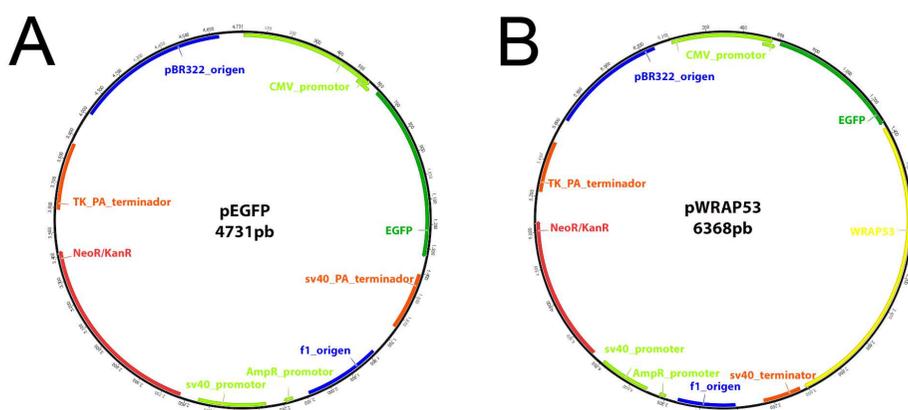


Figura 13. Plásmidos empleados en las transfecciones celulares. Esquema de la construcción de los dos plásmidos empleados en los experimentos de sobreexpresión. (A) pGFP, (B) pWRAP53.

La transfección se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante, la Lipofectamina® se diluyó con el medio Opti-MEM® (Gibco) y, paralelamente, se realizaron diluciones tanto del plásmido control como del plásmido de expresión ectópica de *Wrap53*. Ambas soluciones se mezclaron en proporción 1:1 y se incubaron 5 minutos para facilitar la formación de los liposomas que contendrán en su interior el DNA plasmídico. Finalmente, el complejo plásmido - Lipofectamina® se añadió gota a gota al cultivo. La expresión se verificó mediante transferencia tipo Western.

3.2. SILENCIAMIENTOS MEDIANTE siRNA

Para reducir la expresión específica de proteínas se emplearon siRNAs (RNA pequeño de interferencia). Los siRNA contra el mRNA de *Wrap53* fueron diseñados frente a diferentes exones de la secuencia del gen. Se

utilizaron individualmente o en combinación con el fin de inhibir la expresión de todas las variantes de *splicing* (corte y empalme) descritas y referenciadas del gen murino (**Figura 14**). Para el diseño de los mismos se recurrió a la herramienta *GeneAssist™ Custom siRNA Builder* de Thermo Fisher Scientific, donde se adquirieron los oligonucleótidos. Los siRNA utilizados están recogidos en la **Tabla 1**.

Tabla 1. siRNAs empleados en los experimentos de silenciamiento			
siRNA	Diana	Secuencia 5'-3'	Condiciones
siWrap53#1	<i>Wrap53</i> exón 8	GCAUCUACUUUGAUCUGGA	9 nM 48 horas
siWrap53#2	<i>Wrap53</i> exón 2	GGACCUACAGCUUCUCGCA	9 nM 48 horas
siControl	Control negativo No 1 <i>Silencer™ Select</i> . No posee similitud significativa con secuencias genéticas de ratón o humanas		9nM 48 horas

Los siRNA se introdujeron en las neuronas mediante lipotransfección utilizando el reactivo catiónico *Lipofectamina RNAiMAX™* (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para ello, 48 horas antes de la utilización del cultivo, la Lipofectamina® se diluyó con el medio Opti-MEM® (Gibco). A su vez se realizaron diluciones tanto del siRNA diana como del siRNA control en Opti-MEM®. Ambas soluciones se mezclaron en proporción 1:1 y se incubaron 5 minutos para facilitar la formación de las liposomas que contendrán en su interior el siRNA. Finalmente, el complejo siRNA-Lipofectamina® se añadió gota a gota al cultivo. La concentración final del siRNA fue de 9 nM. (Jiménez-Blasco *et al.* 2015). Los silenciamientos se verificaron mediante reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (rt-qPCR) y transferencia tipo Western.

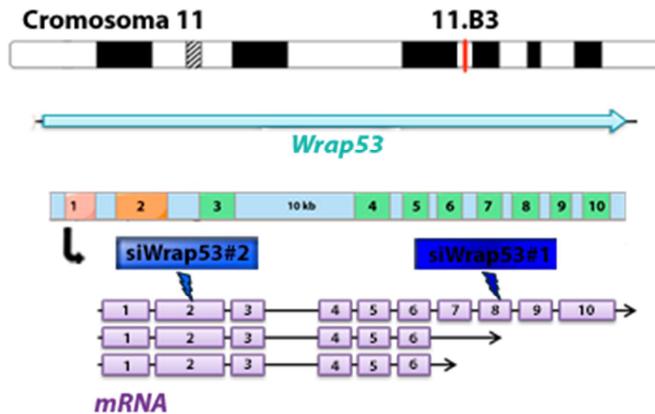


Figura 14. Localización de los siRNA diseñados para el silenciamiento de *Wrap53*. El esquema muestra las variantes de transcritos referenciadas para el gen *Wrap53* murino, así como los exones hacia los que van dirigidos los siRNA diseñados.

4. TRATAMIENTOS CELULARES

4.1. INDUCCIÓN DE DAÑO EN EL DNA

Las neuronas en cultivo primario se trataron con camptotecina (CPT) a fin de producir roturas de doble cadena en el DNA mediante la inhibición de la Topoisomerasa I (Pommier 2006). Para ello se añadió directamente sobre el cultivo una solución de camptotecina (Sigma) en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) a una concentración final de 1 μM ó 10 μM , y se dejó actuar 8 horas antes de la recogida de extracto proteico. Los controles fueron tratados durante el mismo tiempo con el mismo volumen de DMSO (1 μl por cada ml de medio).

4.2. MODULACIÓN DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL POR NITROSILACIÓN

Las neuronas en cultivo primario se trataron con el donador mitocondrial de óxido nítrico mitoSNO (*mitochondria-targeted S-nitrosothiol*) durante el protocolo de isquemia experimental *in vitro*. Con ello se pretende disminuir de manera reversible la actividad del complejo I de la cadena transportadora de electrones, reduciendo así la producción inicial de especies reactivas de oxígeno que sigue al proceso de reoxigenación (Methner *et al.* 2014). Las células se mantuvieron con la sonda mitoSNO a una concentración 1 μM , en

oscuridad, durante las 3 horas de OGD. Como control, neuronas en las mismas condiciones de isquemia se trataron con la sonda SNAP (*S-nitroso-N-acetylpenicillamine*) que no localiza en la mitocondria (Chouchani *et al.* 2013). Ambos compuestos fueron facilitados por el profesor Dr. Michael Murphy de la Universidad de Cambridge.

5. DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

5.1. DETERMINACIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO

La producción del anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) mitocondrial se determinó utilizando la sonda MitoSOX[®] (Molecular Probes[™], Invitrogen, Oregón, EEUU), que consiste en un derivado catiónico del dihidroetidio unido a un radical trifenilfosfonio (Quintana-Cabrera *et al.* 2012; Lopez-Fabuel *et al.* 2016). La sonda es permeable en células vivas y es rápidamente dirigida a la mitocondria debido a su carga positiva, donde puede ser oxidada por $O_2^{\bullet-}$ y formar 2-hidroxi-5-(trifenilfosfonio) hexiletidio (**Figura 15**) Este compuesto puede ser detectado de manera específica en el orgánulo ($\lambda_{exc} \sim 510$ nm; $\lambda_{em} \sim 580$ nm) (Mukhopadhyay *et al.* 2007). Para registrar MitoSOX[®] por citometría de flujo, las células se lavaron con tampón fosfato salino (PBS: NaCl 136 mM; KCl 2,7 mM; $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 7,8 mM; KH_2PO_4 1,7 mM; pH 7,4) y se incubaron en presencia de 2 μ M de MitoSOX[®] en tampón HBSS durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, las células se tripsinizaron, se centrifugaron (5 min a 500 x g) y se resuspendieron en PBS. En el análisis citométrico se utilizaron 50.000 eventos por triplicado por condición. La señal de la sonda MitoSOX[®] se analizó en el canal FL4 de un citómetro de flujo FACScalibur (BD Biosciences, Nueva Jersey, EEUU), equipado con un haz láser de argón de 15mW sintonizando a 510nm. Se utilizaron los programas *CellQuest™* para adquisición de eventos y *Paint-A-Gate™ PRO* para el análisis de los mismos (BD Biosciences). Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias.

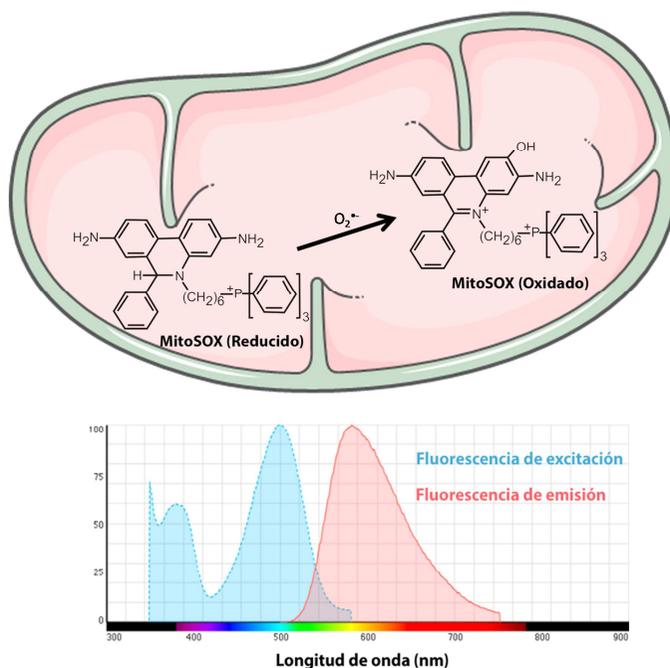


Figura 15. Detección de $O_2^{\bullet-}$ por MitoSOX®. En la mitocondria, la oxidación de la sonda MitoSOX® da lugar a un derivado fluorescente que permite la detección de $O_2^{\bullet-}$ de manera específica en el orgánulo.

5.2. DETERMINACIÓN DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

La determinación de la producción de H_2O_2 se realizó utilizando la sonda luminiscente Amplex Red™ (Invitrogen) (Quintana-Cabrera *et al.* 2012; López-Fabuel *et al.*, 2016). En presencia de la peroxidasa de rábano, la sonda (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxacina) reacciona estequiométricamente (1:1) con el H_2O_2 originando resorufina, un compuesto oxidado fluorescente (λ_{exc} ~571 nm; λ_{em} ~585 nm) que puede ser detectado espectrofluorométricamente (**Figura 16**).

Para llevar a cabo la medida se incubaron las células con el reactivo Amplex Red™ 100 μ M en tampón *Krebs Ringer Phosphate Glucose* (KRPBG: NaCl 145 mM; Na_2HPO_4 5,7 mM; KCl 4,86 mM; $CaCl_2$ 0,54 mM; $MgSO_4$ 1,22 mM; glucosa 5,5 mM; pH 7,35), en presencia de peroxidasa de rábano (0,1 U/ml) durante 1 hora a 37°C. Cada 20 minutos se anotó la luminiscencia emitida a una longitud de onda de 604 nm, siendo la longitud de excitación de 538 nm, mediante un espectrofluorímetro Varioskan Flash (ThermoScientific, Vantaa, Finlandia). Para calcular la velocidad de

producción de H_2O_2 , las pendientes obtenidas se normalizaron por la concentración de proteínas en cada condición. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias, *fold* o número de veces de expresión con respecto a la condición control.

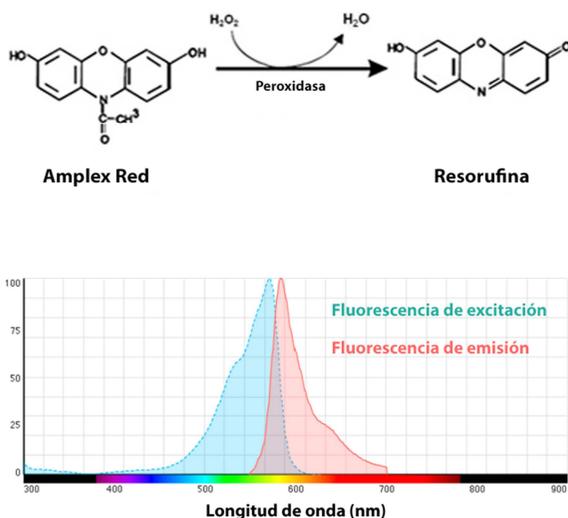


Figura 16. Detección de H_2O_2 por Amplex Red. La sonda Amplex Red se oxida por H_2O_2 en presencia de la peroxidasa, dando lugar a un compuesto, la resorufina, detectable fluorométricamente.

6. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL POR CITOMETRÍA DE FLUJO

La evaluación del potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) se realizó mediante citometría de flujo, siguiendo las instrucciones del sistema comercial *MitoProbe™ DilC₁(5) Assay Kit for Flow Citometry* (Molecular Probes, Invitrogen, Oregón, EEUU). La sonda DilC₁(5) (1,1',3,3',3',3'-hexametilindolcarbocianina), debido a su carácter catiónico, se acumula en las mitocondrias polarizadas. La intensidad de la tinción con DilC₁(5) disminuye cuando las células se someten a condiciones o agentes que alteran el potencial mitocondrial, por lo que la intensidad de fluorescencia es directamente proporcional al $\Delta\Psi_m$.

Las células se incubaron en PBS con la sonda DilC₁(5) 50 nM, durante 30 minutos a 37°C en un baño con agitación suave y protegidas de la luz. Tras la incubación, el exceso de sonda fue eliminado mediante centrifugación a 500

x g durante 5 minutos y las células teñidas fueron resuspendidas de nuevo en PBS.

Se evaluaron 50.000 eventos por triplicado y por condición. El potencial determinado se expresó en tanto por ciento. Para establecer el valor basal de $\Delta\Psi_m$ (0%) se incubaron las mismas células ya analizadas con el desacoplante mitocondrial cianuro de carbonilo 3-clorofenilhidrazona (CCCP) 10 μM durante 15 minutos y se anotó de nuevo el valor de la intensidad de fluorescencia. La señal de la sonda DiIC₁(5) se analizó en el canal FL4 del citómetro de flujo FACScalibur (BD Biosciences), equipado con un haz láser de argón de 15mW sintonizando a 488 nm, utilizando los programas *CellQuest™* para adquisición de eventos y *Paint-A-Gate™ PRO* para el análisis de los mismos (BD Biosciences) (Gómez-Sánchez *et al.*, 2011; Veas-Pérez de Tudela *et al.* 2015).

7. DETERMINACIÓN DE LA APOPTOSIS NEURONAL POR CITOMETRÍA DE FLUJO

La muerte celular por apoptosis se determinó mediante citometría de flujo tras la tinción de las células con anexina V conjugada con alofocianina (Anexina V-APC, Immunostep, Salamanca, España) y 7-amino-actinomicina D (7-AAD) (BD Bioscience). El método se basa en la detección de la fosfatidilserina, un fosfolípido presente en la membrana plasmática, que en células apoptóticas se transloca de la hemimembrana interna a la externa. La anexina V es una proteína anticoagulante vascular que posee una gran afinidad por la fosfatidilserina. Por ello, unida a un fluorocromo adecuado, permite la identificación de las células apoptóticas tras su unión a dicho fosfolípido localizado en la superficie celular. Sin embargo, la anexina V también es capaz de unirse a la fosfatidilserina en el interior de las células necróticas que han perdido su integridad de membrana. Para evitar falsos positivos, además de anexina V – APC se utilizó 7-AAD, un colorante impermeable a la membrana plasmática que se une específicamente al DNA de las células necróticas. De este modo, sólo aquellas células inmunorreactivas para la anexina V, que mostraron ser negativas para el 7-AAD, se consideraron apoptóticas (Gómez-Sánchez *et al.* 2011; Delgado-Esteban *et al.* 2013).

Las neuronas se recolectaron, se resuspendieron en *Binding Buffer* (BB: HEPES 10 mM; NaCl 140 mM; CaCl₂ 2,5 mM; pH7,4) y se incubaron con Anexina V-APC (3µl/10⁶células) y 7-AAD (1µl/10⁶células) durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras la incubación, se añadió BB suficiente para conseguir una concentración de aproximadamente 10⁶ células/ml.

Se recogieron 50.000 eventos por cada triplicado de cada condición. Las señales de la anexina V y del 7-AAD se analizaron en los canales FL4 y FL3 respectivamente de un citómetro de flujo FACScalibur (BD Biosciences), equipado con un haz láser de argón de 15mW sintonizando a 488 nm, utilizando los programas *CellQuest™* para adquisición de eventos y *Paint-A-Gate™ PRO* para el análisis de los mismos (BD Biosciences). Los resultados se expresaron como porcentaje de neuronas apoptóticas (anexina V-APC⁺/7AAD⁻). En los experimentos de transfección la cuantificación de la apoptosis se realizó en la población de neuronas transfectadas, identificadas mediante la expresión de GFP en el canal FL2 (neuronas GFP⁺). En este caso se recogieron hasta 500.000 eventos por triplicado de cada condición experimental.

8. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE ANÁLISIS DE TRANSFERENCIA TIPO WESTERN BLOT

8.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

8.1.1. Extracción de proteínas totales

Para obtener el extracto proteico total se lavaron las células con PBS a 4°C y se lisaron con tampón de lisis NP-40 1% (1% nonidet NP40, EDTA di-K 0,5 M, Tris 1 M pH 8,0; NaCl 5 M, 10% glicerol) suplementado con inhibidores de fosfatasa (Na₃VO₄ 1mM; NaF 10mM) y de proteasas (fluoruro de fenilmetilsulfonilo 100µM; aprotinina 50 µg/ml; leupeptina 50 µg/ml; pepstatina 50 µg/ml; anti-papaína 50 µg/ml; amastatina 50 µg/ml; bestatina 50 µg/ml y el inhibidor de tripsina soybean 10 µg/ml). Los extractos se mantuvieron al menos 10 minutos en hielo, 20 minutos en agitación a 4°C en un orbital vertical y finalmente se centrifugaron a 13.000 x *g* durante 10

minutos. De esta manera se decantaron los restos celulares y se recogió el sobrenadante con las proteínas celulares en un tubo limpio para su congelación a -80°C hasta la determinación de la concentración de proteínas.

8.1.2. Fraccionamiento subcelular de proteínas

Con objeto de aislar las fracciones nucleares y citosólica de las neuronas en diferentes condiciones, se llevó a cabo un protocolo de fraccionamiento diferencial (**Figura 17**). Se utilizaron preferentemente neuronas sembradas en placas de al menos 60 cm^2 . Tras lavar las placas con PBS suplementado con MgCl_2 1 mM a 4°C se desprendieron las neuronas mediante raspado en tampón de citosoles (HEPES 10 mM pH7,9; MgCl_2 1,5 mM, KCl 10 mM, EDTA 1 mM, NP40 0.1% y sacarosa 300 mM). La muestra se resuspendió con micropipeta y se dejó reposar en hielo al menos 30 minutos, tiempo tras el cual se comprobó al microscopio de contraste de fases la rotura de las membranas plasmáticas manteniendo los núcleos intactos. La mezcla se centrifugó a $800 \times g$ a 4°C durante 10 minutos a fin de separar el contenido citosólico (sobrenadante) en un tubo eppendorf limpio, dónde se hirvió durante 5 minutos. El extracto de proteínas citosólicas se congeló a -80°C .

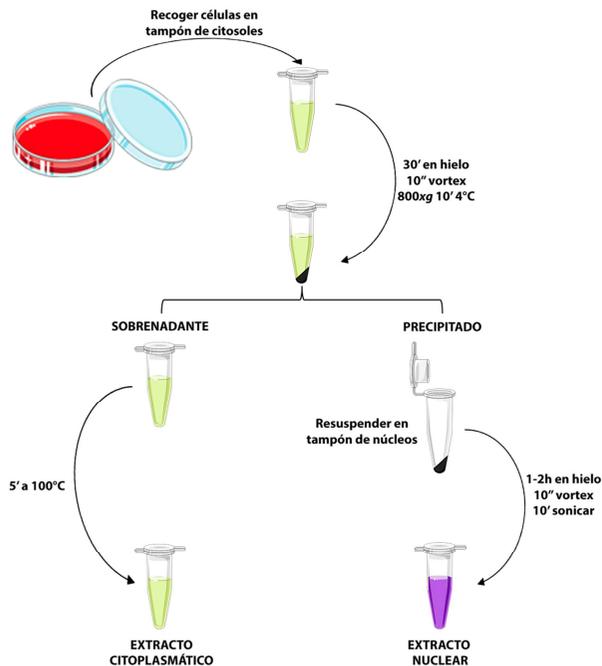


Figura 17. Protocolo de fraccionamiento subcelular. El esquema muestra las diferentes fases del protocolo de fraccionamiento para la obtención del extracto citoplásmico y nuclear aislados.

El pellet resultante se resuspendió en tampón de núcleos (HEPES 50 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, KCl 10 mM, EDTA 1 mM, NP40 1%) con ayuda de una micropipeta y se mantuvo durante 1 hora en hielo. La suspensión se hirvió durante 5 minutos y se sonicó durante otros 10 minutos con el objetivo de disgregar la envuelta nuclear. La fracción nuclear se mantuvo a $-80^\circ C$ junto con la fracción citosólica hasta su utilización (Veas-Pérez de Tudela *et al.* 2015)

8.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de los extractos proteicos se determinó mediante el ensayo del ácido bicinónico (BCA; Pierce™, ThermoScientific, Illinois, EEUU). Dicho método colorimétrico se basa en la reducción del Cu^{+2} en presencia de proteínas y medio alcalino (reacción de Biuret). El catión Cu^{+1} generado reacciona con el BCA dando lugar a un producto de color púrpura

que absorbe de manera lineal a 562 nm. La absorbancia se midió espectrofotométricamente en un lector de placas Multiskan Ascent (Thermo Fischer). Se utilizó la albúmina sérica bovina (BSA) como estándar para el cálculo de la recta patrón. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

8.3. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN SDS-PAGE

Los extractos celulares se sometieron a electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE: electroforesis de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico) para poder estudiar su composición proteica.

Se utilizaron geles discontinuos que presentan (i) en la parte superior un gel concentrador de la banda o “*stacking*” con un porcentaje constante de acrilamida (acrilamida:bisacrilamida 29:1 (Bio-Rad Laboratories, California, EEUU) al 3% en Tris-HCl 1 M pH 6,8 con SDS 10%; persulfato amónico (PSA) 10%; TEMED (*N,N,N,N'*-tetrametilendiamina 0,1%) y (ii) en la parte inferior un gel separador o “*running*” en el que tiene lugar la separación de los componentes y que presenta distintos porcentajes de acrilamida en función del rango de separación de pesos moleculares deseado (acrilamida:bisacrilamida 29:1 al 8, 10, 12 ó 15% en Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 con SDS 10%, PSA 10% y TEMED 0,08%). El extracto proteico, de 10 a 50 µg, se resuspendió en tampón de carga (β -mercaptoetanol 4% v/v, SDS 8% p/v, azul de bromofenol 0.02% p/v, glicerol 4% v/v y Tris-base 250 mM) en un volumen correspondiente a la cuarta parte del volumen final. Las muestras se hirvieron durante 5 minutos a 100°C, y se centrifugaron a 13.000 x *g* durante 5 minutos a 4°C. Para identificar los pesos moleculares de las proteínas en estudio se utilizó un marcador de peso molecular (*Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder*, ThermoScientific) que se cargó en el gel junto a las muestras.

Las proteínas se separaron utilizando un sistema de electroforesis vertical (*MiniProtean-3®*, Bio-Rad) y tampón de electroforesis (Tris 25 mM; glicina 200 mM y SDS al 0,1% p/v, pH 8,3). Una vez finalizada la electroforesis, los geles se sometieron a electrotransferencia e inmunodetección mediante la técnica de Western Blot.

8.4. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

Las proteínas previamente separadas en geles SDS-PAGE se transfirieron electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa (Hybond®, Amersham Biosciences, Nueva Jersey, EEUU) utilizando el sistema *Mini-Transblot* (Bio-Rad) y tampón de transferencia (Tris 25 mM; glicina 192 mM y metanol al 20% v/v, pH 8,3). Con el objetivo de evitar las uniones inespecíficas de anticuerpos, se bloquearon las membranas durante 1 hora con leche desnatada (Sveltesse, Nestle) al 5% p/v en TTBS (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, Tween-20 al 0,1% v/v; pH 7,5) a temperatura ambiente. A continuación se incubaron las membranas a 4°C durante toda la noche en una solución de BSA o leche al 2% p/v en TTBS que contiene el anticuerpo primario deseado (**Tabla 2**). Como control de carga se utilizó anti-GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato deshidrogenasa) para extractos totales y fracción citosólica, y anti-Lámina B para la fracción nuclear. Al día siguiente las membranas se lavaron 3 veces durante 5 minutos con TTBS para retirar el exceso de anticuerpo primario y seguidamente se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con la peroxidasa de rábano, en TTBS con leche al 2% durante una hora a temperatura ambiente. Tras 3 lavados en TTBS se realizó un último lavado en TBS (TTBS sin Tween-20) ya que el Tween puede interferir con algunos reveladores. Por último se incubaron las membranas, según la proteína a detectar, con los reactivos de quimioluminiscencia *Super Signal™ West Dura Extended Duration Substrate* (ThermoScientific), *Western Blottin Luminol Reagent* (Santa Cruz Biotechnology, Texas, EEUU) ó *Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate* (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Finalmente las membranas se expusieron a una película de auto-radiografía (Fuji Medical X-Ray Film, Fujifilm) para detectar la señal.

Se realizaron triplicados biológicamente independientes de cada experimento. Las cuantificaciones se llevaron a cabo con el software *ImageJ64*, normalizando cada condición con su control de carga. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias de cantidad de proteína respecto a la condición control de cada experimento.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en los estudios de expresión proteica por transferencia tipo western

Anticuerpo	Especie	Dilución	Referencia	Casa comercial
Anticuerpos primarios				
WRAP53	Conejo	1/500	Orb2180	Biorbyt
WRAP53	Conejo	1/500	Bs-8163R	Bioss Antibodies
Caspasa 3 activa	Conejo	1/1000	96615	Cell Signalling
γH2AX	Ratón	1/500	05-636	Millipore
Lamina B	Ratón	1/100	Sc-374015	Santa Cruz
GAPDH	Ratón	1/10.000	4300	Ambion
Anticuerpos Secundarios				
Anti-ratón	Cabra	1/10.000	170-6516	BioRad
Anti-conejo	Cabra	1/10.000	Sc-2030	Santa Cruz

8.5 “STRIPPING” DE MEMBRANAS DE NITROCELULOSA

La técnica de “*stripping*” o lavado permite reutilizar las membranas de nitrocelulosa para incubarlas de nuevo con un anticuerpo primario distinto al inicial y poder así inmunodetectar otras proteínas. Para ello, se incubaron las membranas en el tampón *Restore Western Blot Stripping Buffer* (Thermo Scientific) durante 15 minutos. Posteriormente, se lavaron 3 veces con TTBS a temperatura ambiente y se bloqueó de nuevo con leche al 5% (p/v). Para la incubación de los anticuerpos y el revelado se procede como se ha detallado en la sección anterior.

9. INMUNOCITOQUÍMICA Y MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Para los ensayos de inmunocitoquímica, las neuronas se cultivaron sobre cubreobjetos de cristal previamente esterilizados a fuego y tratados con una solución de poli-L-ornitina 15 µg/ml (Sigma) y fibronectina 1 µg/ml (Sigma).

A los 8 días de cultivo y tras los tratamientos pertinentes, las neuronas se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% (v/v) en PBS durante 20 minutos. Posteriormente, se incubaron con glicina 0,1 M en PBS durante 20 minutos y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,25% (v/v) en PBS

durante 5 minutos. A continuación, se incubaron en la solución de bloqueo (Triton X-100 al 0,1% v/v y suero de cabra al 10% v/v en PBS) a temperatura ambiente durante 1 hora. Se prepararon las mezclas de los anticuerpos (**Tabla 3**) en la solución de incubación (suero de cabra al 5% en PBS) y se mantuvieron con las muestras toda la noche a 4°C en agitación suave. Al día siguiente se lavaron con PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con los fluoróforos Cy2, Cy3 o Cy5 a una dilución 1/500 (Jackson Immuno Research, Pennsylvania, EEUU) en solución de incubación, durante 1 hora a temperatura ambiente, en oscuridad y en agitación suave. Finalmente, se retiró el exceso de anticuerpo mediante lavados de PBS y se incubaron 10 minutos con los marcadores nucleares DAPI 30 µM (Sigma) o TO-PRO®-3 30 µM (Molecular Probes).

Tabla 3. Anticuerpos y sondas nucleares utilizados en inmunocitoquímica

Anticuerpo	Especie	Dilución	Referencia	Casa Comercial
Anticuerpos primarios				
WRAP53	Conejo	1/200	Orb2180	Biorbyt
MAP2	Ratón	1/300	M#1406	Sigma
γH2AX	Ratón	1/250	05-636	Millipore
53BP1	Conejo	1/1000	NB-100-304	NovusBio
Anticuerpos secundarios				
Cy2	Ratón	1/500	115.225.003	Jackson
Cy2	Conejo	1/500	111.225.003	Jackson
Cy3	Ratón	1/500	111.165.003	Jackson
Cy3	Conejo	1/500	111.175.003	Jackson
DyLight 405	Ratón	1/500	111.475.003	Jackson
Sondas nucleares				
DAPI		30µM	D#9542	Sigma
TO-PRO-3		30µM	T3605	Mol Probes

Los cubreobjetos se lavaron de nuevo con PBS, tras lo cual se montaron sobre portaobjetos utilizando el reactivo *Slow Fade Antifade*® (Molecular Probes) para evitar la pérdida de fluorescencia. La visualización y adquisición de microfotografías confocales se llevó a cabo utilizando un microscopio Leica TSC-SL (Leica Microsystems, Mannheim, Alemania) y un *spinning disk Roper Scientific* con microscopio Olympus IX81 (Olympus®, Tokyo, Japón). Se utilizó además un microscopio invertido de epifluorescencia Nikon Eclipse Ti-E (Nikon, Tokyo, Japón). Las imágenes se procesaron con el software *ImageJ64* y *Adobe Photoshop CC 2014*.

10. OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DEL RNA

10.1. EXTRACCIÓN DEL RNA TOTAL

La extracción de RNA se llevó a cabo con el kit comercial *Genelute™ Mammalian Total RNA Kit* (Sigma) según las instrucciones del fabricante.

A los 9 días de cultivo, las neuronas se lisaron con una mezcla de β -mercaptoetanol:solución de lisis (*Lysis Solution*, Sigma-Aldrich) en proporción 1:100 (v/v). Con el objeto de evitar la degradación del RNA de las muestras, los raspadores se trataron con solución *RNase away* (Sigma) y agua DEPC (di-etil piro-carbonato) previo al raspado de las placas. Los lisados se purificaron por medio de un protocolo basado en columnas de afinidad de sílice y elución en agua libre de nucleasas con el fin de obtener el RNA total de los extractos celulares. Para eliminar la posible contaminación con DNA genómico la muestra se trató con 100 U de DNasa I (DNase I, RNase-free, Roche) en un tampón Tris-HCl 400 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 60 mM y CaCl₂ 10 mM; pH 7,9 durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Se midió la concentración del RNA purificado con un espectrofotómetro UV-Vis Nanodrop 2000 (Thermo Fisher). El ratio de absorbancia de 260 frente a 280 nm (A₂₆₀ / A₂₈₀), que determina la pureza del RNA, fue de entre 1,8 - 2. La elución de RNA se congeló a -80°C hasta su uso.

10.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA A TIEMPO REAL

Mediante esta técnica analizamos la expresión diferencial de genes que cuantificamos de forma relativa respecto a un control interno de expresión constante (*housekeeping*).

En la PCR a tiempo real los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea, gracias a la emisión de fluorescencia por parte de un fluorocromo (*SYBR Green*), que se intercala entre las hebras de DNA bicatenario, de modo que la fluorescencia es proporcional a la cantidad de producto de PCR amplificado (amplicón).

Antes de analizar la expresión de los diferentes genes, se puso a punto la concentración de cada oligonucleótido empleado como cebador (*primer*) y se calcularon las eficiencias de amplificación de los *primers* diseñados con los

software *Geneious* (Versión *pro-Trial*, Biomatters Limited, Auckland, Nueva Zelanda) y *Amplifix* (Universidad de Marsella, Marsella, Francia). Se consideraron óptimas las eficiencias comprendidas entre el 85 y el 115% (*Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR*, AppliedBiosystems). La obtención de las eficiencias de cada *primer* es necesaria para poder comparar la expresión de los diferentes genes mediante el Método Comparativo de C_t ($\Delta\Delta C_t$). Las condiciones en las que se emplearon los distintos oligonucleótidos se resumen en la **Tabla 4**.

Para la cuantificación de expresión de los genes de estudio, se utilizó el kit comercial *Power SYBR® Green RNA-to-Ct™ 1-Step Kit* (Applied Biosystems, California, EE.UU.), que permite acoplar la retrotranscripción y la amplificación en un único paso. Se partió de 100 ng de RNA y el volumen final por reacción fue de 20 μ l. Todas las reacciones se realizaron por triplicado utilizando el termociclador *Mastercycler®ep Realplex* (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).

Tabla 4. Características y condiciones experimentales de los cebadores empleados en rt-qPCR

Diana	Especie	Secuencia 5'-3'	Conc. (μ M)	Eficiencia (%)
Wrap53	Humano	F:CGGAGCCCAGCAGCTACC R:TGTGCCAGGAGCCTCGCA	0,3	120
Wrap53	Ratón	F:AGCCCGAAAGGATGCTGAA R:ACCGCTCGGGTCCAGATCAA	0,3	115
p53	Humano	F:TCATCTTCTGTCCCTTCCCA R:GGGAGTACGTGCAAGTCAC	0,3	95
p53	Ratón	Comercial (BioRad)	-	-
GAPDH	Ratón/ Humano	F:TCAGCAATGCCTCCTGCACC R:GCATGGACTGTGGTCATGA	0,3	108 R 92 H

El perfil de cada reacción fue el siguiente: un ciclo de 30 minutos a 48°C (etapa de retrotranscripción), un ciclo de 10 minutos a 95°C (activación de la enzima DNA polimerasa), 40 ciclos de 15 segundos a 95°C (desnaturalización) y 1 minuto a 60°C (anillamiento y elongación)(**Figura 18**).

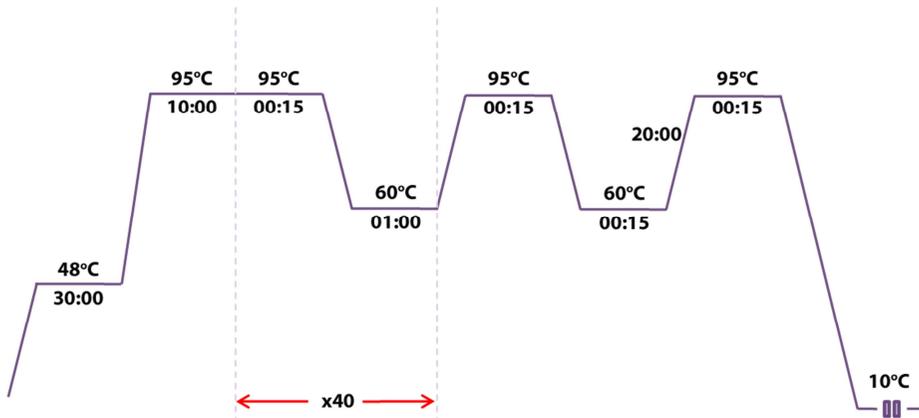


Figura 18. Esquema de rt-qPCR. Perfil de la carrera de rt-qPCR donde se especifica la temperatura, tiempo y número de ciclos de cada etapa.

El valor que se obtuvo por cada reacción fue el C_t (*threshold cycle*, ciclo umbral) o ciclo en el que la fluorescencia emitida por el *SYBR Green* es detectable dentro de la fase lineal. Se obtiene así el C_t para cada uno de los genes de estudio y para el housekeeping (*Gapdh*). El incremento de C_t (ΔC_t) es la diferencia entre el C_t de cada gen y el C_t de la *Gapdh*.

El Método Comparativo de C_t relaciona el número de copias entre las distintas condiciones, que se obtiene al final de una reacción optimizada empleando la fórmula (Bustin *et al.* 2009):

$$2^{-\Delta\Delta C_t}$$

$$2^{-[(C_{tmuestra} - C_{tGAPDH}) - (C_{tcalibrador} - C_{tGAPDH})]}$$

Consideramos como calibrador la condición sobre la que se compara la expresión y sobre la que se relativiza los resultados dándole el valor de 1. Niveles de expresión igual a 1 indican que la muestra problema presenta la misma expresión de un determinado gen que el control. Niveles >1 indican que hay un incremento de expresión con respecto al control, y niveles <1 indican que la expresión disminuye con respecto al control.

Los resultados se mostraron en unidades arbitrarias de expresión, *fold* o número de veces de expresión entre la muestra problema y un calibrador o control.

11. MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL *IN VIVO*

El modelo de isquemia-reperusión cerebral de elección fue el de oclusión intraluminal transitoria de la arteria cerebral media. Este procedimiento quirúrgico, desarrollado por Koizumi (Koizumi *et al.* 1986) y modificado por Longa (Longa *et al.* 1989), consiste en la inserción intraluminal de un filamento hasta el origen de la arteria cerebral media (ACM). El filamento se retira tras el tiempo deseado, provocando así una isquemia transitoria en el territorio de la arteria cerebral media seguido por la restauración de la circulación sanguínea.

En pacientes de ictus isquémico, la arteria cerebral media está comúnmente afectada, extendiéndose el daño en el tejido desde la región del estriado hasta la corteza. Es por ello que este modelo es el más ampliamente utilizado en investigación preclínica. Además, la inducción de la reperusión mediante esta técnica es similar a la del uso de fármacos trombolíticos o trombectomía mecánica en la práctica clínica (Shahjouei *et al.* 2016).

En este procedimiento se utilizaron ratones macho C57BL/6J. Estos se anestesiaron con sevoflurano al 2,5% en una mezcla de oxígeno (30%) y nitrógeno (70%) mediante una máscara facial. Durante todo el procedimiento se monitorizó la temperatura del animal a través de una sonda rectal con el fin de mantener una temperatura constante durante todo el proceso (36-37°C) para lo que se utilizó una fuente de calor externa. En primer lugar, tras colocar al animal en posición prona se realizó una incisión vertical de 0,5 cm en la piel en la línea media de la cabeza, exponiendo el cráneo subyacente. Para monitorizar el flujo sanguíneo cerebral en la región de la ACM que sería ocluida, se fijó en el cráneo (1 mm posterior y 5 mm lateral a bregma) un filamento de fibra óptica conectado a un monitor *Láser-Doppler Moor VMS-LDF* (Moor Instruments, Axminster, Reino Unido).

A continuación, se colocó el animal en posición supina y se realizó una incisión vertical de 1 cm entre el manubrio del esternón y la mandíbula. Tras disecar las estructuras subyacentes, se aisló la arteria carótida común (ACC) y se anudó con un lazo de sutura temporal, posteriormente se disecó la arteria carótida externa (ACE) y se anudó lo más lejos posible de la ramificación con la común. Para evitar sangrados se cauterizaron

ramificaciones de la carótida externa, como la arteria occipital y la superior tiroidea. La arteria carótida interna (ACI) se ligó temporalmente mediante un lazo de sutura, tras lo que se realizó un corte parcial con microtijeras en la ACE, por donde se introdujo un monofilamento de nylon recubierto de silicona (Doccol Corporation, Massachusetts, EEUU). Con ayuda de unos fórceps el filamento fue conducido cuidadosamente por el interior de la ACI hacia la ACM, hasta que el avance del filamento ofrece una ligera resistencia (**Figura 19**). En ese punto se comprobó que el flujo sanguíneo descendía un 80% aproximadamente respecto al flujo basal. Tras 45 minutos de isquemia se retiró el filamento y las ligaduras temporales permitiendo la reperfusión, que fue monitorizada mediante Laser-Doppler. Se procedió entonces a suturar las incisiones realizadas.

Para compensar la pérdida de fluidos durante el procedimiento se administró 0,5 ml de suero salino atemperado. Como analgésico se administró buprenorfina 0,05 mg/kg subcutánea inmediatamente antes de comenzar el procedimiento, a las 6 horas tras finalizar y cada 12 horas durante los dos primeros días. Los animales se sacrificaron tras un periodo de reperfusión de 1 ó 2,5 días posterior a la oclusión.

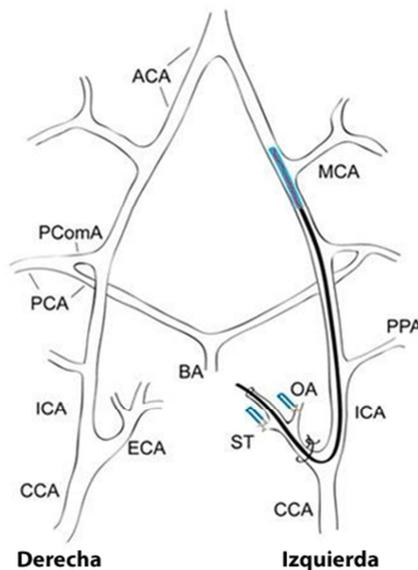


Figura 19: Esquema de la isquemia focal in vivo. Se especifican las arterias suturadas y el recorrido del filamento hasta la arteria cerebral media. ACA, arteria cerebral anterior; BA, arteria basilar; CCA, arteria carótida común; ECA, arteria

carótida externa; ICA, arteria carótida interna; MCA, arteria cerebral media; OA, arteria occipital; PCA, arteria cerebral posterior; PComA, arteria comunicante posterior; PPA, arteria pterigopalatina; ST, arteria tiroidea superior. Modificado de (Matter, 2014).

12. ESTUDIO CLÍNICO

Se ha realizado un estudio prospectivo observacional en pacientes con infarto cerebral ingresados en el Hospital Universitario de Salamanca y el Hospital Clínico Universitario de Valladolid entre 2011-2015. Dicho estudio se enmarca en el contexto de colaboración propiciado por la Red de Investigación Cooperativa Neurovascular (INVICTUS), integrada por 22 grupos de diferentes comunidades del Estado y financiada por el Instituto de Salud Carlos III.

12.1 POBLACIÓN DE PACIENTES

Se reclutó una cohorte hospitalaria de pacientes ingresados por infarto cerebral en los Hospitales de Salamanca y Valladolid.

Los datos de los pacientes se recogieron de forma prospectiva y se incluyeron en una base de datos. La información recogida incluía datos demográficos, factores de riesgo vascular, datos de presentación clínica, magnitud del daño neurológico (recogido mediante la escala de ictus del National Institute of Health: NIHSS)(Wityk *et al.* 1994) , y situación funcional a los 3 meses. La etiología de los infartos se asignó de acuerdo a las categorías de la clasificación TOAST (Adams *et al.* 1993)

El criterio de inclusión en la muestra fue el de pacientes consecutivos, previamente independientes, que ingresaron en el Servicio de Neurología por un infarto cerebral, de menos de 24 horas desde el inicio de los síntomas (o desde el inicio del sueño, en aquellos de presentación al despertar) y una puntuación en la escala NIHSS > a 4.

Se excluyeron 20 pacientes con incapacidad funcional previa (Rankin modificado >2), 10 pacientes con enfermedad sistémica grave. Dos pacientes rehusaron participar. Al final, se incluyeron en la cohorte un total de 116 pacientes.

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca y del Hospital Clínico Universitario de Valladolid y se solicitó consentimiento informado a los pacientes o sus familiares.

12.2 VARIABLES CLÍNICAS

A los pacientes se les ingresó en la Unidad de Ictus en la fase aguda del infarto cerebral, su manejo diagnóstico y terapéutico se ajustó a las guías *ad hoc* publicadas por el Grupo de Enfermedades Cerebrovasculares de la Sociedad Española de Neurología (Alonso de Leciñana *et al.* 2014).

Los grupos etiológicos para los infartos fueron: aterotrombótico, cardioembólico, lacunar, otras causas infrecuentes e indeterminado.

La cuantificación del defecto neurológico mediante la NIHSS realizó por neurólogos con certificación acreditativa de dicha formación.

La variable dependiente principal fue la situación funcional de los pacientes a los 3 meses tras el infarto cerebral, cuantificada mediante la escala de Rankin modificada (Rankin-m, Tabla 2) (Banks & Marotta 2007). Se categorizó considerando mal pronóstico aquellos con puntuaciones >2 y buen pronóstico si la puntuación fue ≤2.

Tabla 5. Escala de Rankin modificada (Rankin-m).

Rankin-m	Grado de discapacidad	Características
0	Sin síntomas	
1	Sin incapacidad importante	Capaz de realizar sus actividades y obligaciones habituales.
2	Incapacidad leve	Incapaz de realizar algunas de sus actividades previas, pero capaz de velar por sus intereses y asuntos sin ayuda.
3	Incapacidad moderada	Síntomas que restringen significativamente su estilo de vida o impiden su subsistencia totalmente autónoma.
4	Incapacidad moderadamente severa	Síntomas que impiden claramente su subsistencia independiente aunque sin necesidad de atención continua.
5	Incapacidad severa	Totalmente dependiente, necesitando asistencia constante día y noche
6	Muerte	

Modificado de (Banks & Marotta 2007)

12.3 GENOTIPADO DE LOS POLIMORFISMOS rs2287498 Y rs2287499 DE *Wrap53*

El estudio de los polimorfismos de base única (SNP) de *Wrap53* rs2287498 y rs2287499 se realizó mediante amplificación por PCR de un fragmento de 742 pares de bases y posterior secuenciación.

Las muestras de DNA extraído de la sangre de los pacientes se amplificaron en un termociclador automático *Mastercycler® epgradients* (Eppendorf). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 10 µl que contenían entre 50 y 200 ng de DNA genómico, 10 pmol de cada oligonucleótido cebador (**Tabla 6**) y una mezcla *Master Mix* optimizada (DNA AmpliTools Master Mix, BioTools, Madrid, España) que incluye la DNA polimerasa, los desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), el tampón de reacción con MgCl₂ y otros estabilizantes necesarios para la amplificación del DNA.

Tabla 6. Características y condiciones experimentales de los cebadores empleados para la identificación genotípica de pacientes

Nombre	Secuencia 5'-3'	Concentración (µM)
Wrap53_1alpha_F	CAACCGTTAGCTCCGGACTGCTG	0,4
Wrap53_Ex2_R	GTGGAGTCTGGGGAGATGAA	0,4

Las condiciones experimentales empleadas fueron las siguientes: un ciclo de 8 minutos a 95°C, 35 ciclos compuestos por un minuto a 95°C, un minuto a 65°C y 1 minuto a 72°C y un último ciclo de 7 minutos a 72°C, recogidas en la **Figura 20**.

Tras la amplificación se purificaron las muestras con el paquete comercial *USB® PCR Product Pre-Sequencing Kit* (Affymetrix, Ohio, EEUU) según las instrucciones del fabricante. Esta mezcla de dos enzimas hidrolíticas elimina los posibles restos de DNA monocatenario resultado de la PCR así como los dNTPs remanentes que pudieran interferir con los procesos de secuenciación.

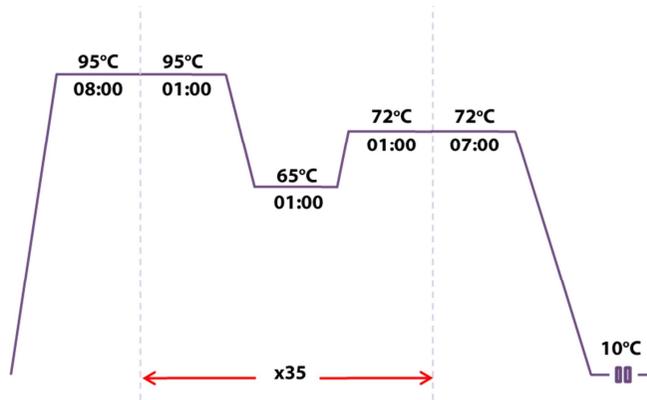


Figura 20. Esquema de PCR. La imagen muestra el perfil de la carrera de PCR empleada para identificar los genotipos de *Wrap53*, donde se especifica la temperatura, tiempo y número de ciclos de cada etapa.

Se preparó una mezcla de 30 ng de DNA de cada muestra junto con 3 pmol de oligonucleótido cebador *Wrap531alpha_F* y por último se enviaron al servicio de secuenciación de la Universidad de Salamanca. Los resultados se analizaron con el programa *Geneious* (BiomattersLimited).

El genotipado se realizó sin conocer la situación clínica de los pacientes.

13. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Todas las determinaciones en neuronas en cultivo se realizaron, al menos, en tres réplicas biológicas. Los valores se expresaron como medias \pm S.E.M. (error estándar de la media) de, al menos, tres experimentos independientes. La significatividad se determinó mediante análisis de la varianza (ANOVA), seguido del test de *Bonferroni* (para comparaciones múltiples) o el test de la *t de Student* (para comparaciones entre dos únicos grupos de valores). En todos los casos, un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. El análisis estadístico se realizó con ayuda del software *SPSS Statistics v23* (IBM, Nueva York, EEUU).

RESULTADOS

1. IMPLICACIÓN DE *Wrap53* EN LA ISQUEMIA NEURONAL

1.1. LA ISQUEMIA EXPERIMENTAL NO MODIFICA LA EXPRESIÓN DE LOS TRANSCRITOS *WRAP53α* Y *p53* EN CÉLULAS SH-SY5Y DIFERENCIADAS

Hasta el momento, no existen evidencias que vinculen al gen *Wrap53* con los procesos isquémicos. Sin embargo, se sabe que *p53* tiene un papel fundamental en patologías de esta naturaleza (Filichia *et al.* 2015; Gomez-Sanchez *et al.* 2011; Morrison & Kinoshita 2000). Uno de los transcritos de *Wrap53* da lugar al RNA antisentido *WRAP53α*, capaz de regular los niveles de expresión del gen *p53* en condiciones normales y en situaciones de daño celular producido por radiación ionizante o tratamientos genotóxicos (Mahmoudi *et al.* 2009). Por tanto, *WRAP53α* podría estar mediando, de algún modo, la estabilización de *p53* inducida por la isquemia. En primer lugar, y dado que *WRAP53α* es específico de humanos (**Figura 7** de la introducción), el estudio se realizó en la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y. Para ello, se llevó a cabo su diferenciación a células con fenotipo neuronal (Almeida *et al.* 2005) mediante incubación con ácido retinoico y, posteriormente, con BDNF, y se estudiaron los cambios morfológicos acontecidos en las células SH-SY5Y durante el proceso de diferenciación. Mediante microscopía óptica de contraste de fases observamos que el tratamiento secuencial con AR (10 μ M) y BDNF (50 ng/ml) condujo al alargamiento de las neuritas y a la agrupación de los cuerpos celulares (**Figura 21**), promoviendo así su diferenciación a células con características comparables a neuronas, como ya hemos descrito anteriormente (Almeida *et al.* 2005; Cuende *et al.* 2008).

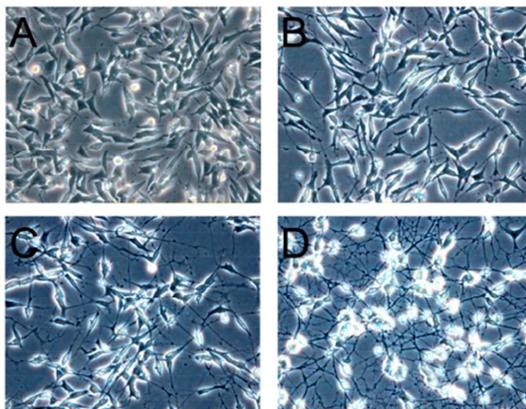
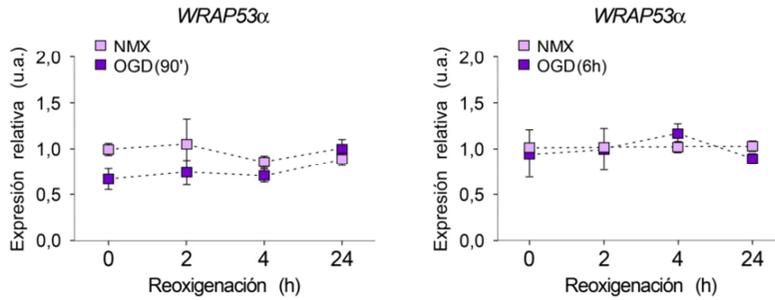


Figura 21. Caracterización de la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y y su diferenciación en células con fenotipo neural. Las imágenes de microscopía de contraste de fases muestran células SH-SY5Y en diferentes puntos del proceso de diferenciación, (A) células en división, (B) 2 días con AR, (C) 5 días con AR, (D) 5 días con AR y 2 días con BDNF.

Una vez diferenciadas, las células SH-SY5Y se sometieron a un protocolo de isquemia experimental *in vitro*, puesto apunto en nuestro laboratorio (Almeida *et al.* 2002). Las células se incubaron durante 90 minutos (tiempo corto) ó 6 horas (tiempo largo) en ausencia de oxígeno y glucosa (OGD, *Oxygen Glucose Deprivation*), seguido de una incubación en medio y condiciones estándar de cultivo durante diferentes tiempos (reoxigenación). Posteriormente, se analizó la expresión del transcrito *WRAP53α* y su efecto en la expresión del mRNA de *p53* (Figura 22). Como se observa en la Figura 22A, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de *WRAP53α* tras la isquemia a tiempo corto (90 min) o largo (6 horas), respecto a la condición control. Asimismo, los niveles de expresión de *p53* apenas variaron durante el proceso de reoxigenación (Figura 22B).

A la vista de estos resultados podemos concluir que una isquemia de 6 horas, *a priori* suficientemente severa como para causar importantes daños en células SH-SY5 diferenciadas, no induce la expresión de *WRAP53α* ni del gen supresor de tumores *p53*. Estos resultados sugieren que *WRAP53α* no estabiliza la expresión del mensajero de *p53* en células con fenotipo neuronal en respuesta a un daño isquémico y que, por otro lado, la estabilidad de *p53* que se produce tras la isquemia podría deberse exclusivamente a mecanismos post-traduccionales (Gomez-Sanchez *et al.* 2011)

A



B

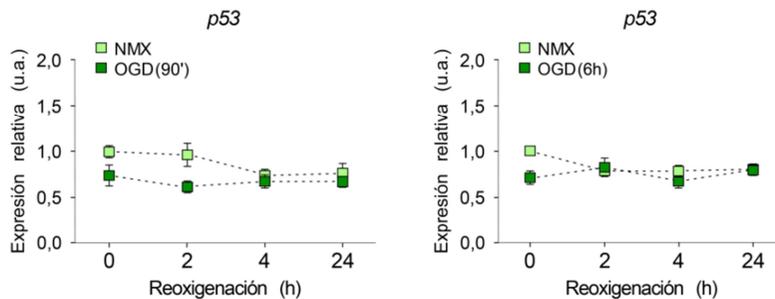


Figura 22. La isquemia experimental no activa la acumulación del transcrito WRAP53α ni del mRNA de p53 in vitro. (A) Análisis de la expresión relativa de WRAP53α y (B) p53 en células SH-SY5Y diferenciadas, mediante rt-qPCR, a diferentes tiempos de reoxygenación tras la isquemia de 90 min y 6 horas. Se utilizó GAPDH como control interno de expresión. Los resultados se expresan normalizados frente a la condición de normoxia (NMX, 0 horas de reoxygenación). Los valores se expresan como medias ± S.E.M. de 3 cultivos independientes.

1.2. LOS NIVELES DE TRANSCRITO WRAP53β AUMENTAN DE FORMA PROGRESIVA E INDEPENDIENTEMENTE DE p53 DURANTE LA REOXIGENACIÓN TRAS LA ISQUEMIA

Para continuar con el estudio de la posible función del *Wrap53* en la isquemia, y una vez descartado WRAP53α, nos centramos en WRAP53β. Para ello, empleamos cultivos primarios de neuronas corticales de ratón, un modelo perfectamente caracterizado y utilizado en el laboratorio (Delgado-Esteban *et al.* 2013). Puesto que ambas secuencias, murina y humana, de esta región del gen *Wrap53* presentan gran similitud y codifican una proteína con un alto grado de homología (77% identidad) esta aproximación es adecuada para estudiar la implicación de *Wrap53* en neuronas tras la isquemia. Para ello, las neuronas se sometieron al protocolo de isquemia *in*

in vitro (OGD) con diferentes tiempos de incubación en ausencia de glucosa y oxígeno, un tiempo corto de 90 min y uno largo de 3 horas (Almeida *et al.* 2002). Seguidamente, se analizaron los niveles de mRNA durante el proceso de reoxigenación mediante rt-qPCR (**Figura 23**).

Como se observa en la **Figura 23A**, una isquemia leve de 90 min no parece ser suficiente para inducir la transcripción de *Wrap53* en neuronas corticales. Sin embargo, cuando sometimos a las neuronas a una OGD más severa (3 horas) observamos una activación de la transcripción desde las 4 horas de reoxigenación para alcanzar un máximo de expresión de *WRAP53β* a las 8 horas tras la isquemia (**Figura 23B**).

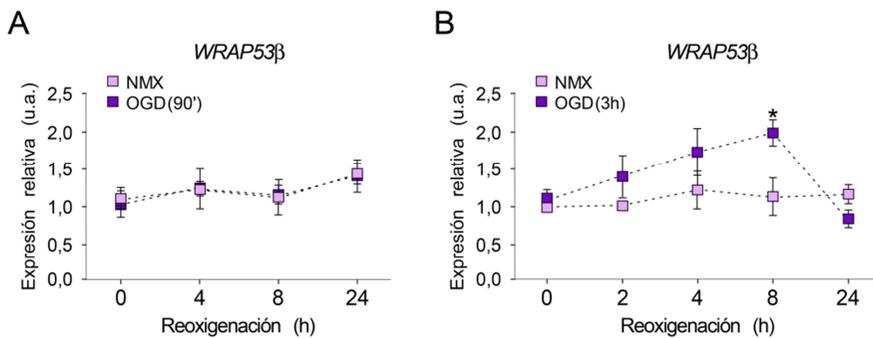


Figura 23. Efecto de la isquemia experimental *in vitro* en los niveles de *WRAP53β* en neuronas. Análisis de la expresión relativa de *WRAP53β* en neuronas corticales de ratón mediante rt-qPCR a diferentes tiempos de reoxigenación tras (A) una isquemia de 90 min ó (B) 3 horas. Se empleó GAPDH como control interno de expresión. Los resultados se expresan normalizados frente a normoxia (NMX). Los valores se expresan como medias \pm S.E.M. de 3 cultivos independientes.

Como se ha comentado anteriormente, en el genoma de ratón no se ha descrito solapamiento de los genes *Wrap53* y *p53*. Por tanto, este modelo nos permitiría estudiar específicamente la función de la proteína WRAP53. Para descartar cualquier función estabilizadora del mRNA de *p53* mediada por el modelo de isquemia experimental (OGD) en neuronas corticales de ratón, también se analizó mediante rt-qPCR la expresión de *p53* tras una OGD de 3 horas. Verificamos que tras la OGD y posterior reoxigenación, la expresión de *p53* no se modificó (**Figura 24**), de manera que el incremento de *WRAP53β* observado durante la fase de reoxigenación (**Figura 23**) sería independiente de *p53* y podría traducirse en un aumento de la proteína WRAP53 durante la isquemia.

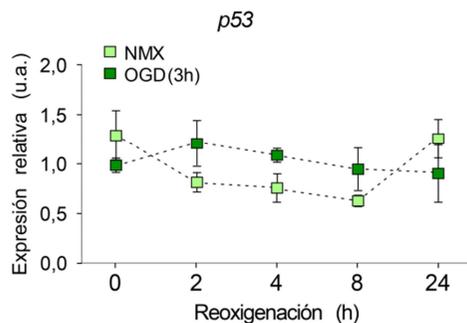


Figura 24. Los niveles de mRNA de p53 permanecen estables tras 3 horas de isquemia experimental in vitro en neuronas. Análisis de la expresión relativa de p53 en neuronas corticales, mediante rt-qPCR, a diferentes tiempos de reoxigenación, hasta 24 horas tras una isquemia experimental (OGD) de 3 horas. Se empleó GAPDH como control interno de expresión. Los resultados se expresan normalizados frente a normoxia (NMX). Los valores se expresan como medias \pm S.E.M. de 3 cultivos independientes.

2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA WRAP53 EN NEURONAS SOMETIDAS A ISQUEMIA EXPERIMENTAL

2.1 LA ISQUEMIA INDUCE LA ACUMULACIÓN DE LA PROTEÍNA WRAP53 DURANTE LA FASE DE REOXIGENACIÓN IN VITRO

Para analizar la función de la proteína WRAP53 en isquemia, realizamos el mismo protocolo de OGD experimental (90 min y 3 horas) en neuronas corticales de ratón tomando muestras a distintos tiempos de reoxigenación, hasta 24 horas tras la isquemia. No observamos cambios en los niveles de la proteína WRAP53 tras una isquemia de 90 min (**Figura 25A**). Sin embargo, pudimos confirmar que el aumento en la expresión del gen se correspondía con una acumulación progresiva de la proteína WRAP53, siendo dicho aumento estadísticamente significativo comparado con la condición de normoxia (**Figura 25B**).

Estos resultados demuestran que la isquemia provoca la acumulación de WRAP53 en neuronas corticales *in vitro*.

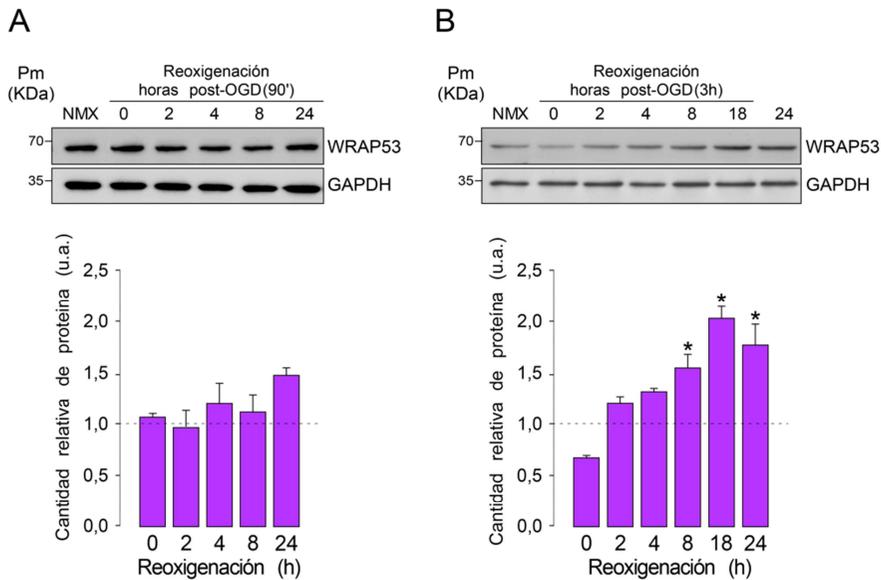


Figura 25. Efecto de la isquemia experimental en los niveles de proteína WRAP53 *in vitro*. Se muestra una imagen representativa del estudio de la abundancia relativa de WRAP53 por transferencia tipo Western a diferentes tiempos de reoxigenación tras (A) una OGD de 90 min ó (B) 3 horas. La cuantificación se normalizó frente normoxia (NMX, línea discontinua). Se utilizó GAPDH como control de carga. Los valores se expresan como medias \pm S.E.M. de 3 cultivos independientes.* $p < 0,05$ vs NMX (ANOVA, *pos-hoc* Bonferroni).

2.2. EL DAÑO EN EL DNA MEDIADO POR LOS RADICALES LIBRES DE OXÍGENO GENERADOS TRAS LA ISQUEMIA PROMUEVE LA MUERTE NEURONAL

Está documentado que el estrés oxidativo que sufren las células tras la isquemia produce lesiones en el DNA de las neuronas (Huttner et al. 2014) que inducen la fosforilación de la histona H2AX localizada en los sitios de DSB. Se estima que la cantidad de histona H2AX fosforilada (γ H2AX) está directamente relacionada con el número de DSBs, de modo que la presencia de γ H2AX es un marcador de daño en el DNA ampliamente aceptado (Delgado-Esteban et al. 2013). Mediante inmunofluorescencia confirmamos la acumulación de γ H2AX en neuronas isquémicas y, por tanto, el daño en el DNA a las 8 h de reoxigenación tras una isquemia de 3 h, coincidiendo con el

punto de máxima expresión de WRAP53 (**Figura 26A**). Además, analizamos la producción de H_2O_2 durante la reoxigenación para reafirmar la implicación del estrés oxidativo en el proceso fisiopatológico de nuestro modelo experimental. Como se aprecia en la **Figura 26B**, la producción de H_2O_2 en neuronas sometidas a isquemia es significativamente más elevada que en neuronas cultivadas en normoxia, aumentando casi un 50% respecto a la condición control.

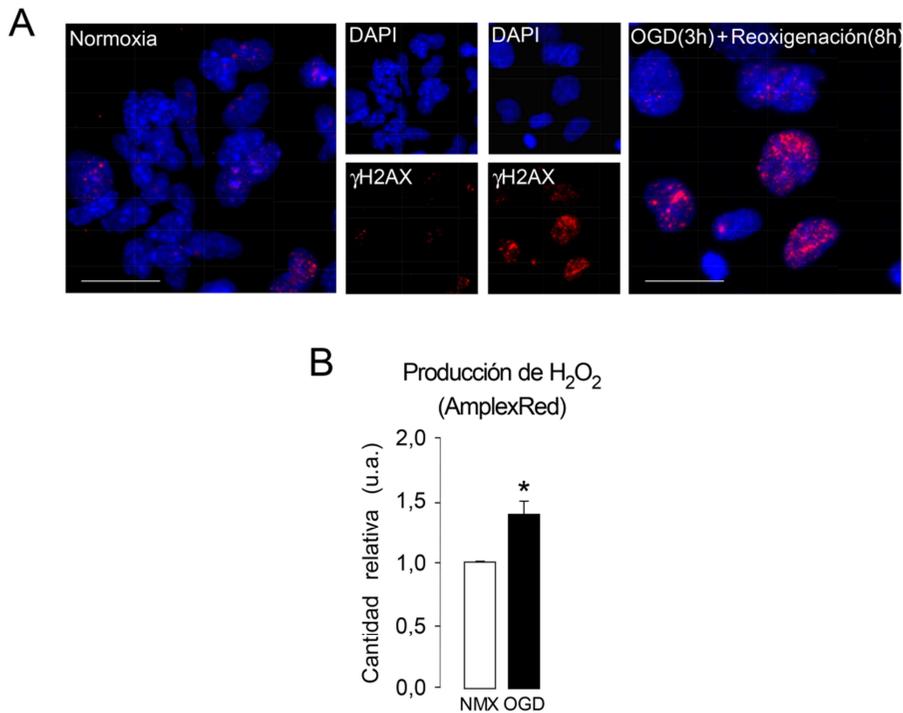


Figura 26. El aumento de ROS tras la isquemia experimental in vitro induce roturas de doble cadena en el DNA. (A) La imagen de microscopía de fluorescencia muestra la fosforilación de la histona H2AX (rojo) y los núcleos de las neuronas marcados con DAPI (azul) a las 8 horas tras la isquemia experimental (OGD). (B) La producción de H_2O_2 (pmol/h· μ g proteína) se midió con la sonda Amplex™Red. Los resultados se normalizaron frente a la producción de H_2O_2 en la condición de normoxia (NMX) y se expresaron en unidades arbitrarias. Los valores se expresan como la media de 3 cultivos independientes \pm S.E.M. * $p < 0,05$ vs NMX (Prueba t de Student). Barra = 25 μ m.

Como se ha descrito, los radicales libres producidos durante la reoxigenación interactúan con el DNA y provocan lesiones en el mismo. El daño prolongado en el DNA no es compatible con la viabilidad celular y concluirá con la muerte celular programada. Mediante el estudio de la actividad de la caspasa-3, observamos que esta proteasa efectora de la apoptosis aumenta en neuronas isquémicas cuyo material genético está dañado (**Figura 27**). Si bien la fosforilación de H2AX es anterior, el patrón observado en ambas proteínas es muy similar (**Figura 27**) y coincide con la acumulación de WRAP53 durante la reoxigenación (**Figura 25B**), lo que sugiere que ambos procesos podrían estar relacionados, como se ha descrito en células proliferativas (Henriksson & Farnebo 2015).

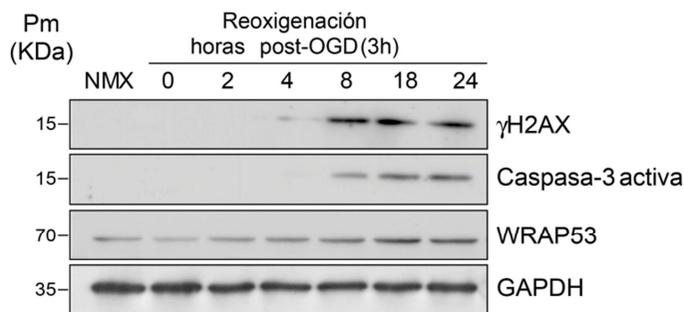


Figura 27. Activación de proteínas de daño y muerte neuronal durante la reoxigenación tras la isquemia experimental. Imagen representativa del análisis de expresión por transferencia tipo Western de las proteínas γ H2AX, caspasa-3 activa y WRAP53, a diferentes tiempos de reoxigenación tras una isquemia experimental (OGD) de 3h. Se utilizó GAPDH como control de carga.

Para investigar si el aumento de WRAP53 y de los marcadores de daño descritos tiene lugar *in vivo* se realizaron isquemias experimentales en ratones C57BL/6J mediante la oclusión transitoria de la arteria cerebral media. El análisis de la expresión de proteínas muestra un incremento en la abundancia de WRAP53 en la zona peri-infarto a los 2,5 días tras la isquemia *in vivo* (**Figura 28**). El aumento de WRAP53 no se limita al hemisferio infartado, siendo la respuesta detectable en ambos hemisferios cerebrales, este hecho puede deberse a la conexión entre ambos hemisferios. Se ha demostrado que el daño isquémico en un hemisferio puede generar respuestas de recuperación en el lado contralateral (Buga *et al.* 2008), aunque los mecanismos aún no están claros. La presencia de daño en el DNA, evidenciada por γ H2AX, está vinculada a la zona de peri-infarto del

hemisferio dañado exclusivamente y es más evidente un día después de la oclusión, lo que puede relacionarse con una resolución de esas dobles roturas en el DNA a los 2,5 días de reperusión.

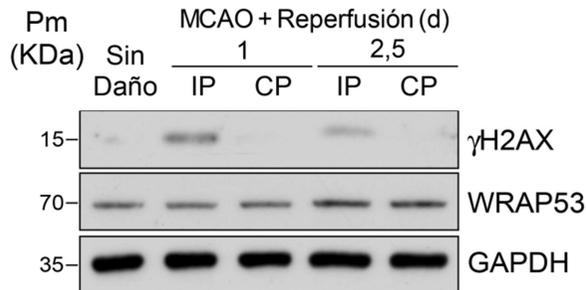


Figura 28. La isquemia experimental in vivo promueve la acumulación de WRAP53 y γ H2AX (A) Imagen representativa del análisis de expresión proteico mediante transferencia tipo Western tras la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO). Se estudiaron las proteínas WRAP53, γ H2AX y GAPDH como control de carga. (IP, zona perinfarto ipsilateral; CP, zona perinfarto contralateral).

2.3. WRAP53 SE TRANSPORTA Y ACUMULA EN EL NÚCLEO EN RESPUESTA A LA ISQUEMIA EXPERIMENTAL *IN VITRO*

Para identificar la posible implicación de WRAP53 en fenómenos de reparación de DNA en neuronas tras la isquemia decidimos, en primer lugar, analizar la localización subcelular de la proteína, ya que es fundamental que esta migre al núcleo de las células dañadas para desempeñar su función reparadora (Coucoravas *et al.* 2016; Henriksson *et al.* 2014). Para ello, se realizaron series de microfotografías de cultivos primarios de neuronas sometidas a isquemia y posterior reoxigenación *in vitro* (**Figura 29**). La proyección de las imágenes confocales tomadas en el eje Z permitió verificar el cambio de localización de la proteína WRAP53 tras una OGD de 3 horas (**Figura 29A**) Observamos cómo la proteína se localiza por el soma y las dendritas en la condición de normoxia, con tendencia a acumularse en la región perinuclear, mientras que la isquemia induce el transporte y acumulación de WRAP53 en el núcleo de las neuronas (**Figura 29B**). Estos resultados demuestran que la isquemia induce la acumulación de WRAP53 en las neuronas, lo que es compatible con una posible función de la proteína en los procesos de reparación del DNA tras un daño isquémico.

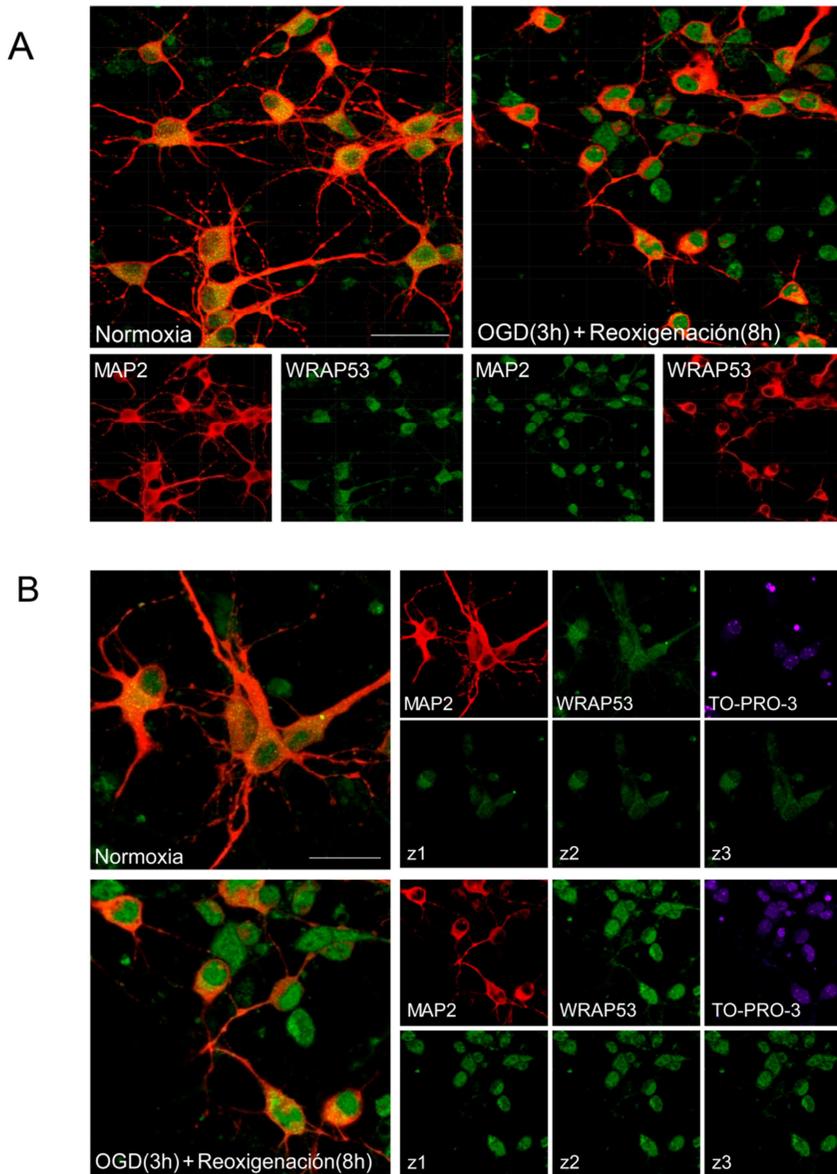


Figura 29. La isquemia experimental promueve la acumulación nuclear de WRAP53 en neuronas *in vitro*. Se muestran imágenes representativas de microscopía confocal de neuronas tras tinción con el marcador neuronal MAP2 (*Microtubule Associated Protein 2*, rojo), WRAP53 (verde) y el marcador nuclear TO-PRO-3 (magenta). (A) Imágenes de las proyecciones máximas en condiciones control (NMX, normoxia) y a las 8 horas de reoxigenación tras la isquemia experimental (OGD de 3 horas). Barra = 50 μ m. (B) Se muestran proyecciones máximas de MAP2,

WRAP53 y TO-PRO-3 por separado y 3 imágenes individuales (z1, z2, z3) de la serie de WRAP53 en NMX y OGD. Barra = 25 μ m.

Cabe destacar que este cambio de localización de citosol a núcleo no se observó cuando se realizaron isquemias experimentales breves de 90 min (**Figura 30**), en las que tampoco habíamos podido evidenciar un aumento significativo de la proteína (**Figura 25A**), lo que demuestra que WRAP53 podría desempeñar una función relevante en las isquemia más severas, en las que el daño en el DNA neuronal desempeña un importante papel en la supervivencia neuronal (Huttner *et al.* 2014; Karanjawala *et al.* 2002; Kim *et al.* 2001).

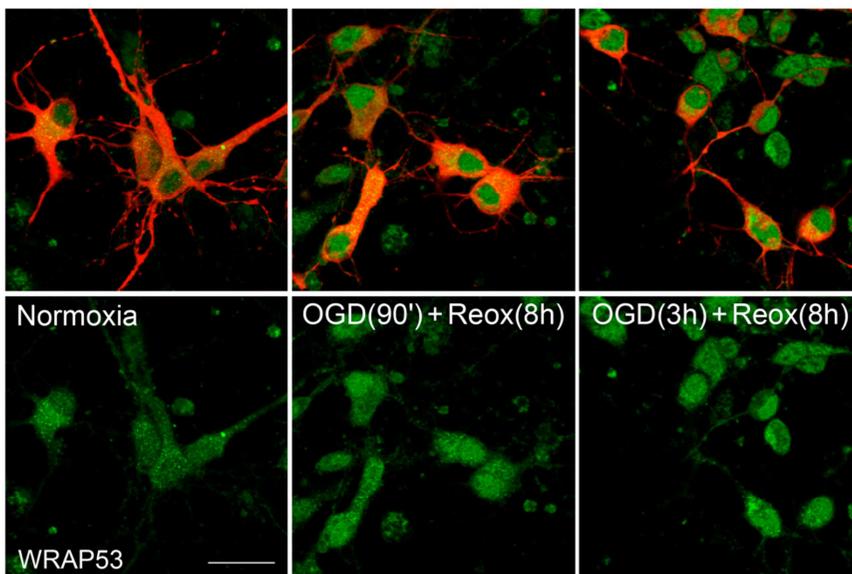


Figura 30. La isquemia experimental leve (90 min) no afecta a la localización subcelular de WRAP53 neuronas *in vitro*. Imágenes representativas de microscopia confocal del cultivo de neuronas tras tinción con el marcador neuronal MAP2 (rojo) y WRAP53 (verde) en condiciones control (NMX, normoxia) y a las 8 horas de reoxigenación tras la isquemia experimental (OGD) de 90 min y 3 horas. Barra = 25 μ m.

El cambio de localización se confirmó mediante el análisis de los niveles de WRAP53 en extractos citosólicos y nucleares de neuronas tras la isquemia experimental *in vitro* neuronales. Así, las neuronas se sometieron a OGD y posterior reoxigenación y se realizaron fraccionamientos subcelulares mediante centrifugación diferencial. Como muestra la **Figura 31**, el incremento de la proteína WRAP53 en el núcleo tras una isquemia

experimental de 3 horas se observó ya desde las 4 horas tras la misma y a se mantuvo a las 8 horas de reoxigenación. Este aumento va acompañado de un descenso de la proteína en el citosol, lo que demuestra la translocación de la proteína desde el compartimento citosólico al núcleo de la neurona. Por tanto, nuestros resultados demuestran que la isquemia induce la acumulación nuclear de WRAP53, donde podría desempeñar su función en la reparación del DNA y, en consecuencia, la supervivencia neuronal.

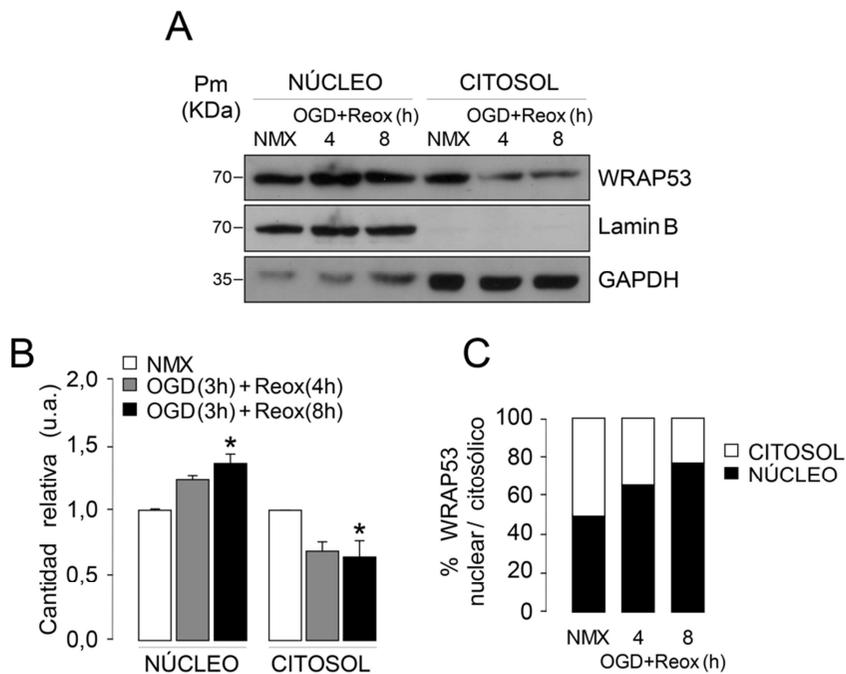


Figura 31. La isquemia experimental provoca el transporte de WRAP53 del citosol al núcleo de las neuronas in vitro. (A) Imagen representativa del análisis proteico por transferencia tipo Western con inmunodetección de WRAP53 en núcleo y citosol. Se empleó GAPDH como control de la fracción citosólica y Lámina B como control de la fracción nuclear. (B) Se cuantificó la abundancia de WRAP53 en cada compartimento celular respecto a la normoxia. (C) Distribución de WRAP53 en los compartimentos subcelulares expresado en %. Los datos se expresan con medias \pm S.E.M. procedentes de 3 cultivos independiente. * $p > 0,05$ vs NMX (ANOVA, *post-hoc* Bonferroni).

3. FUNCIÓN DE WRAP53 EN LA SUPERVIVENCIA NEURONAL DESPUÉS DE LA ISQUEMIA.

Hasta el momento, nuestros resultados han demostrado que la isquemia experimental induce daño en el DNA, que ocurre antes de la activación de caspasa-3, y la acumulación de WRAP53 en el núcleo de las neuronas, lo que sugiere que esta proteína podría desempeñar una importante función en la cascada isquémica que culmina en la muerte neuronal.

3.1. WRAP53 MODULA LA SUSCEPTIBILIDAD DE LAS NEURONAS A LA APOPTOSIS INDUCIDA POR LA ISQUEMIA.

Para dilucidar la función de WRAP53 en el proceso isquémico en las neuronas, utilizamos dos aproximaciones experimentales. Por un lado, reducimos específicamente la expresión de WRAP53 en las neuronas, mediante transfecciones con siRNA, y, por otro lado, expresamos exógenamente la proteína, mediante la transfección con un plásmido que expresa WRAP53 fusionada con GFP, lo que permite su visualización en los cultivos neuronales.

Como hemos indicado, la expresión de WRAP53 se redujo en las neuronas mediante el silenciamiento por RNA de interferencia (siRNA, *small interfering RNA*). Para un diseño preciso de los siRNA, se realizó una búsqueda de las variantes de transcripción del gen *Wrap53* murino referenciadas hasta el momento y se encontró que sólo una de ellas genera una proteína con características funcionales (analizado con la herramienta ProtParam de ExPASy). Consecuentemente, se diseñaron dos siRNA: el primero dirigido contra el exón 10, exclusivo en el transcrito que codifica la proteína funcional (siWrap53#1); el segundo siRNA se diseñó de manera complementaria al exón 2, común en todas las variantes de splicing (siWrap53#2) (**Figura 14**, de Materiales y Métodos). Como se observa en la **Figura 32A**, la transfección de las neuronas con siWrap53#2 resultó ser más eficiente que el siWrap53#1, consiguiendo un 50% del silenciamiento del gen. Por tanto, se estableció como protocolo de silenciamiento el tratamiento con siWrap53#2 (en adelante siWrap53) al menos 48 horas antes de la isquemia y la toma de muestras. En estas condiciones también corroboramos que el silenciamiento del gen conllevaba una reducción del 50% en los niveles de proteína WRAP53 (**Figura 32B**).

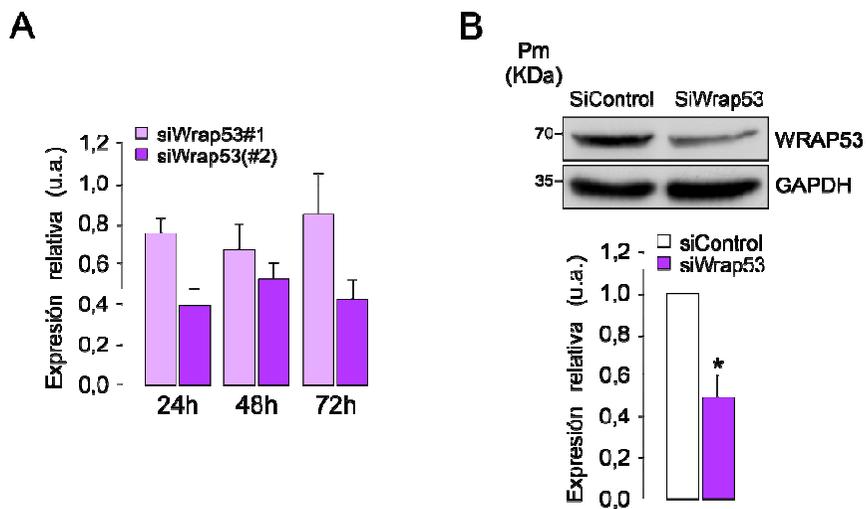


Figura 32. Transfección de las neuronas con siRNA contra *Wrap53* (*siWrap53*). (A) Análisis mediante rt-qPCR de la expresión de *Wrap53* en neuronas transfectadas durante 24, 48 ó 72 horas con *siWrap53*#1 o *siWrap53*#2. Los valores se expresan en número de veces de expresión respecto a *siControl* (neuronas transfectadas con *Silencer Select Negative Control*, Ambion). (B) Imagen representativa del análisis por transferencia tipo Western del silenciamiento de WRAP53. Se utilizó GAPDH como control de carga. Los valores son medias \pm S.E.M. de 3 cultivos independientes. * $p > 0,05$ vs *siControl* (Prueba *t* de Student).

Mediante este modelo, nuestro siguiente paso fue analizar el efecto de la ausencia de WRAP53 en el daño en el DNA en neuronas. La **Figura 33A** muestra que el silenciamiento de WRAP53 no sólo produce una mayor acumulación de γ H2AX, lo que significa no sólo un mayor número de DSBs tras la isquemia experimental, sino que además hace que el daño en el DNA se detecte antes, ya desde las 2 horas de reoxigenación. Posteriormente, estudiamos el impacto del silenciamiento de WRAP53 sobre la susceptibilidad de las neuronas a la isquemia. Así, observamos que además de aumentar la fosforilización de H2AX en ausencia de WRAP53, esta se corresponde con un incremento en la activación de la caspasa-3, lo que se traduce en una mayor muerte celular tras la isquemia (**Figura 33A**). Para confirmar estos resultados, se llevó a cabo un estudio mediante citometría de flujo. Como se observa en la **Figura 33B**, el silenciamiento de WRAP53 en neuronas sometidas a isquemia y posterior reoxigenación incrementó de forma significativa la apoptosis desde las 4 horas respecto a las neuronas tratadas con el *siControl*. Por tanto, nuestros resultados demuestran que las neuronas con niveles reducidos de WRAP53 presentan un daño mayor en el

DNA lo que se traduce en una mayor vulnerabilidad a la muerte por apoptosis causada por la isquemia.

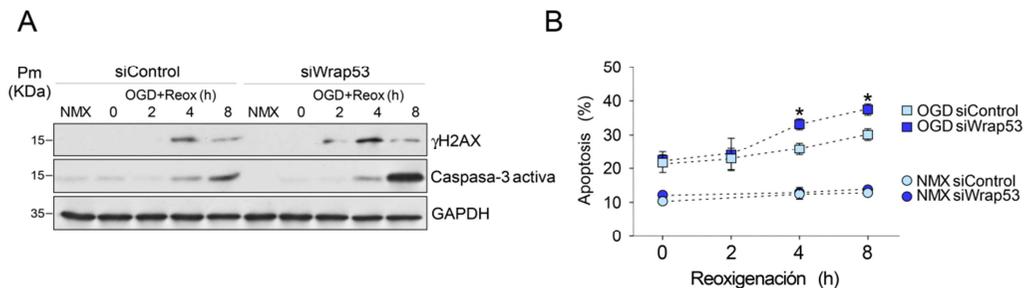


Figura 33. El silenciamiento de WRAP53 (siWrap53) condiciona la susceptibilidad de las neuronas al daño en el DNA y apoptosis neuronal. (A) Se realizaron análisis de transferencia tipo Western de los niveles de expresión de γ H2AX y caspasa-3 activa. Se utilizó la GAPDH como control de carga. (B) Análisis de la apoptosis mediante citometría de flujo, los resultados se expresan en % de neuronas apoptóticas ($AnnV^+/7AAD^-$). Los datos son medias \pm S.E.M. de 3 cultivos independientes. * $p > 0,05$ vs OGD siControl (ANOVA, *post-hoc* Bonferroni).

Para confirmar estos resultados, realizamos la segunda aproximación experimental, es decir, se expresó de manera ectópica WRAP53 en las neuronas y se sometieron a la isquemia experimental *in vitro* (OGD). Para ello, utilizamos un plásmido comercial de expresión de la variante humana de WRAP53 fusionada con la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés *Green Fluorescent Protein*), lo que nos permitía detectar su localización subcelular. Como control utilizamos el plásmido “vacío” que expresa únicamente GFP. En primer lugar, comprobamos la correcta expresión de la proteína en las células 293T transfectadas mediante transferencia tipo Western Blot (**Figura 34A**) y analizamos la localización subcelular de la proteína fusionada WRAP53-GFP en neuronas mediante inmunofluorescencia (**Figura 34B**). Así, la proteína WRAP53 se localiza fundamentalmente en el citosol en las neuronas en condiciones de normoxia, mientras que esa localización es principalmente nuclear tras la isquemia. Por tanto, confirmamos que la isquemia induce la translocación de la proteína del citosol al núcleo. Es más, la fusión con GFP no interfiere en dicha translocación ya que WRAP53-GFP mantiene la capacidad de translocación al núcleo después de una isquemia.

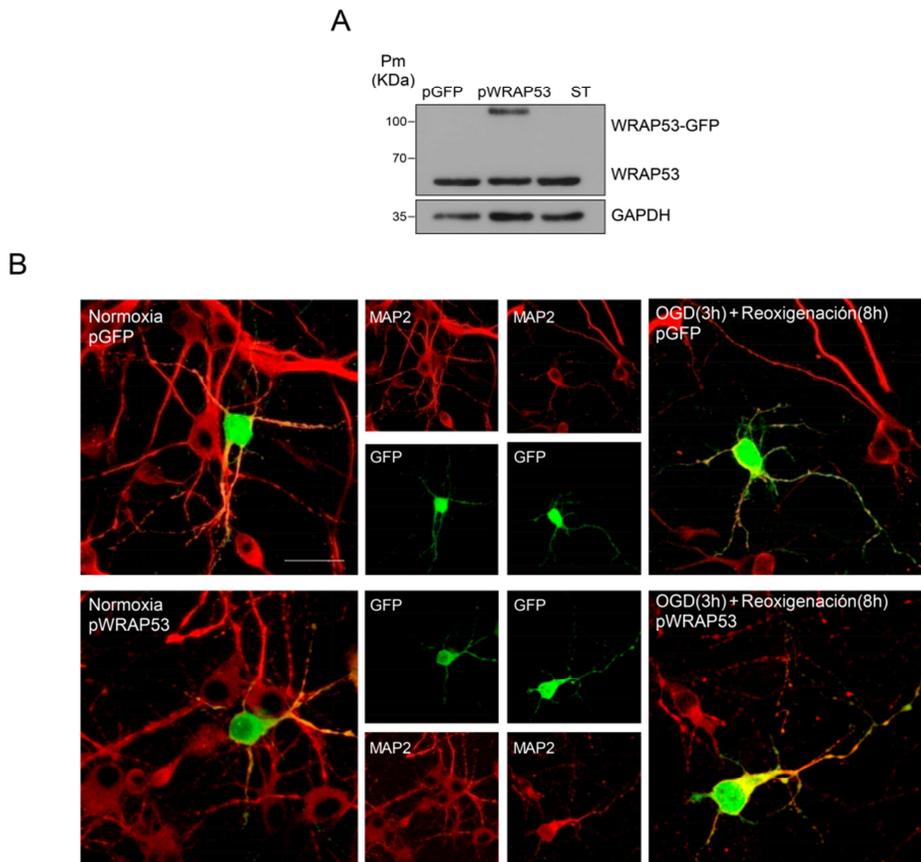


Figura 34. Análisis de la expresión ectópica de WRAP53. (A) Análisis por transferencia tipo Western de la expresión de WRAP53 en células 293T transfectadas con los vectores de sobreexpresión control (pGFP) y de sobreexpresión de WRAP53 β (pWRAP53). Se utilizó GAPDH como control de carga. (B) Imágenes de microscopía confocal de neuronas transfectadas con los plásmidos que expresan WRAP53-GFP (pWRAP53-GFP) o GFP (pGFP) en condiciones de Normoxia y OGD (fluorescencia verde). Se utilizó MAP-2 como marcador neuronal (rojo). Barra =25 μ m.

Lo siguiente que hicimos fue analizar el efecto de la expresión ectópica de WRAP53 sobre la supervivencia neuronal tras la isquemia. El aumento de los niveles de expresión de WRAP53 (**Figura 34A**) disminuyó la apoptosis neuronal ya desde las 4 horas tras la isquemia experimental (OGD), mejorando así la supervivencia del cultivo (**Figura 35**).

Por tanto, estos resultados demuestran que la proteína WRAP53 condiciona la susceptibilidad de las neuronas al proceso isquémico, probablemente a través de su función en la reparación de las roturas del DNA ocasionadas por la isquemia. Así, la acumulación y translocación de la proteína al núcleo que provoca la isquemia en las neuronas parece estar encaminada a la reparación del DNA dañado, actuando así como una molécula neuroprotectora en la cascada isquémica.

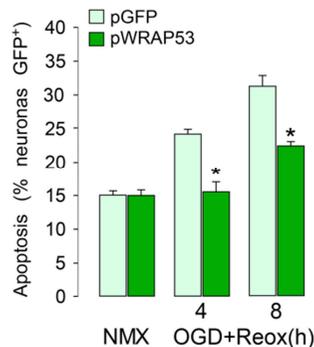


Figura 35. La expresión ectópica de WRAP53 promueve la supervivencia neuronal tras la isquemia in vitro. La apoptosis en neuronas transfectadas se analizó mediante citometría de flujo y se expresó en % de neuronas apoptóticas GFP⁺, que expresaban WRAP53-GFP. A fin de mantener una expresión controlada de WRAP53 e impedir los efectos negativos de dicha expresión en las neuronas, se realizó una co-transfección del plásmido pWRAP53 con pGFP en proporción 1:3. Los datos representados se expresan como media ± S.E.M. de 3 cultivos independientes. *p>0,05 vs OGD pGFP (ANOVA, *pos-hoc* Bonferroni).

3.2. WRAP53 PROMUEVE LA REPARACIÓN DEL DNA DAÑADO FAVORECIENDO LA SUPERVIVENCIA NEURONAL DESPUÉS DE LA ISQUEMIA

De acuerdo con los resultados hasta ahora obtenidos, hemos demostrado que WRAP53 condiciona la susceptibilidad de las neuronas a la isquemia. Sin embargo, aunque hemos establecido que el silenciamiento de WRAP53 sí condiciona una mayor acumulación de daño en el DNA y un aumento en la apoptosis, no hay evidencias de su intervención directa en la generación del daño que compromete la integridad genética, y con él la viabilidad neuronal. Por todo ello, nos planteamos estudiar si el aumento en los niveles de WRAP53 inducido por la isquemia estaba vinculado a una respuesta neuronal

para la reparación del daño en el DNA causado por el insulto isquémico. Con este fin, se modularon los niveles de WRAP53 en las neuronas, mediante transfecciones con siRNA o el plásmido pWRAP53-GFP para disminuir o aumentar los niveles endógenos de WRAP53, respectivamente (**Figura 36 y 37**) y se analizó la capacidad de las mismas a reparar el DNA tras la isquemia experimental. Para ello, se analizó la formación de focos de reparación tras una OGD de 3 horas mediante inmunodetección del marcaje γ H2AX (marcador de daño en DNA) y su co-localización con 53BP1, factor esencial en reparación que es reclutado a los sitios de daño donde forma focos nucleares y, por tanto, indica reparación del DNA dañado (Pederiva *et al.* 2016; Romero *et al.* 2016). Como se observa en la **Figura 36A**, el silenciamiento de WRAP53 (siWRAP53) previene la formación de focos de 53BP1 en neuronas sometidas a isquemia (OGD), respecto a las células tratadas con el siControl, lo que indica una disminución en la capacidad de reparación del DNA. Para cuantificar estas diferencias en reparación se calculó el porcentaje de células que presentaban focos de 53BP1 respecto al total de células (**Figura 36B**).

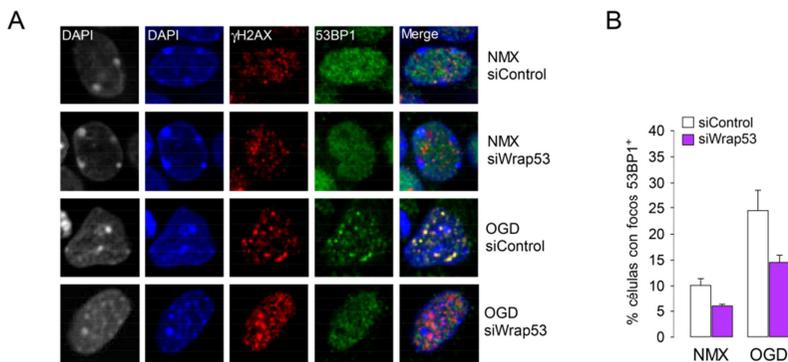


Figura 36. El silenciamiento de WRAP53 (siWrap53) previene la formación de focos de reparación del DNA tras la isquemia en neuronas in vitro. (A) Imágenes de microscopía confocal que muestran la formación de focos de reparación (amarillo) detectados mediante el solapamiento de la señal de 53BP1 (verde) y de γ H2AX (rojo). Se utilizó DAPI (azul) como marcador nuclear. (B) Las cuantificaciones se realizaron en 10 planos procedentes de 2 cultivos diferentes, para cada condición. Se contó el número de neuronas totales y neuronas con presencia de focos de 53BP1. Los datos se muestran como medias \pm S.E.M. de 2 cultivos independientes.

En condiciones basales, el propio metabolismo neuronal produce roturas en el DNA que han de ser reparadas (Suberbielle *et al.* 2013). Por ello, pensamos que la expresión ectópica de WRAP53 en neuronas podría tener

cierta repercusión en los fenómenos de reparación, incluso en la condición de normoxia, confirmando así que WRAP53 es importante para la reparación del daño en el DNA en neuronas, como se ha descrito en células tumorales (Coucouravas *et al.* 2016; Henriksson *et al.* 2014). Para ello, se llevó a cabo la transfección de neuronas en cultivo con el plásmido control (pGFP) o plásmido de expresión pWRAP53-GFP y se realizó la co-inmunodetección de γ H2AX y 53BP1. Los resultados recogidos en la **Figura 37A** muestran que la expresión ectópica de WRAP53 promovió la formación de focos de 53BP1 en las neuronas. De hecho, las células transfectadas con pWRAP53, que expresan mayores niveles de WRAP53, presentaron más del doble de células con focos de 53BP1 que aquellas transfectadas con el plásmido control (**Figura 37B**).

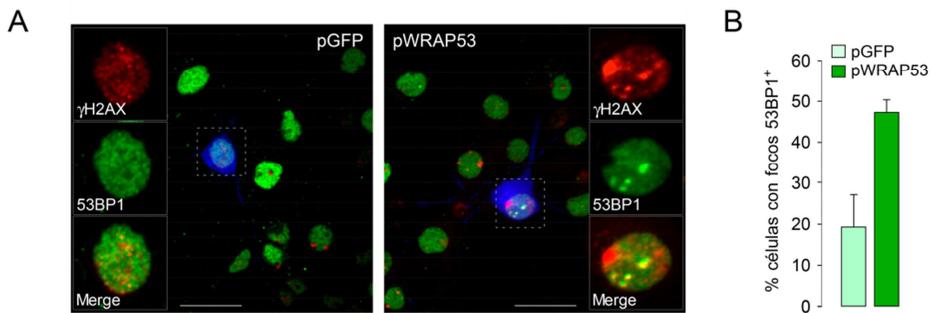


Figura 37. La expresión ectópica de WRAP53 promueve la reparación del DNA en neuronas. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal que muestran la formación de focos de reparación (amarillo), detectados mediante el solapamiento de la señal de 53BP1 (verde) y de γ H2AX (rojo). Se utilizó la señal de la GFP (azul) como marcador de las neuronas eficientemente transfectadas. (B) Las cuantificaciones se realizaron en 10 planos procedentes de 2 cultivos diferentes, para cada condición. Se contó el número total de neuronas transfectadas y neuronas GFP⁺ con presencia de focos de 53BP1. Los datos se muestran como medias \pm S.E.M. de 2 cultivos independientes.

Por tanto, podemos concluir que WRAP53 participa en la formación de focos de reparación en neuronas, lo que podría favorecer la respuesta al daño en el DNA ocasionado por la isquemia, aumentando así su probabilidad de supervivencia al daño isquémico.

3.3. LA ACUMULACIÓN DE WRAP53 EN NEURONAS TRAS LA ISQUEMIA ES SENSIBLE AL ESTRÉS OXIDATIVO

Una vez demostrado que la isquemia induce la acumulación de WRAP53, lo que, a su vez, induce una respuesta de reparación del DNA y, en consecuencia, de la supervivencia neuronal al daño isquémico, nuestro siguiente objetivo fue investigar la señal molecular responsable de dicha acumulación. De acuerdo con nuestros resultados, el silenciamiento de WRAP53 permite una detección más temprana de γ H2AX, indicando que existe un mayor daño en el DNA a tiempos más cortos de reoxigenación en neuronas con niveles bajos de la proteína (siWRAP53) que en aquellas con los niveles de WRAP53 intactos (siControl). El DNA es una importante diana molecular de los ROS, de manera que el estrés oxidativo representa la principal fuente de inestabilidad genómica (McKinnon 2013). Es más, la generación de ROS, fundamentalmente por la mitocondria, es uno de los primeros y principales factores responsables de la muerte neuronal causada por la isquemia (Almeida *et al.* 2002; Bolaños *et al.* 2009).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, quisimos analizar el papel de los ROS en la función de WRAP53 sobre la supervivencia neuronal. Para ello, cuantificamos la producción de anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) mitocondrial y el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), un indicador de la integridad y funcionalidad mitocondrial que se ve afectado negativamente por ROS (García *et al.* 2005; Lopez-Fabuel *et al.* 2016; Veas-Pérez de Tudela *et al.* 2016), mediante citometría de flujo. Nuestros resultados mostraron que la isquemia experimental (OGD) indujo la generación de ROS y la despolarización mitocondrial, como habíamos descrito previamente (Gomez-Sanchez *et al.* 2011), tanto en neuronas con WRAP53 (siControl) como en aquellas en las que silenciamos la expresión de la proteína (siWrap53). Por tanto, los niveles de WRAP53 no parece afectar la producción de $O_2^{\bullet-}$ después de una isquemia in vitro de 3 horas (**Figura 38A**). De la misma manera, no observamos cambios significativos en el potencial de membrana (**Figura 38B**).

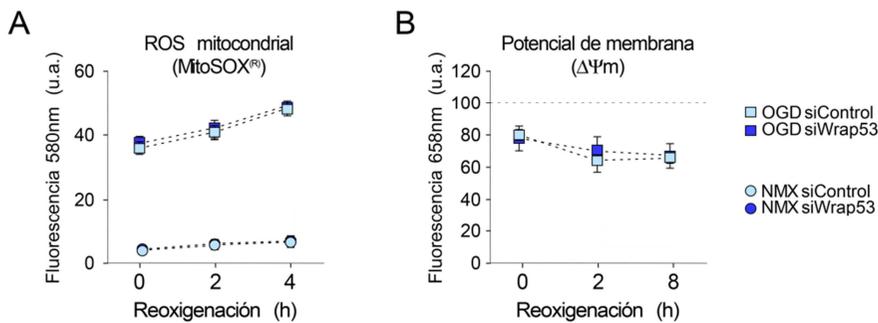


Figura 38. El silenciamiento de WRAP53 (*siWrap53*) no afecta a la producción mitocondrial de $O_2^{\bullet-}$. (A) Determinación de los niveles mitocondriales de $O_2^{\bullet-}$ mediante citometría de flujo, utilizando la sonda comercial MitoSOX[®]. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias de fluorescencia (u.a.). (B) El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) se determinó, emdiante citometría de flujo, con la sonda DiIC₁(5) y se expresó en %, normalizando frente a la condición normoxia (NMX, línea discontinua). Los datos se expresan como medias \pm S.E.M. de 3 cultivos independientes.

Aunque la pérdida de WRAP53 no condiciona la producción de $O_2^{\bullet-}$, es posible que los ROS sí estén involucradas en el proceso, mediando la propia acumulación de WRAP53.

Se sabe que los ROS generados en situaciones de isquemia-reperfusión provienen principalmente del transporte reverso de electrones (RET, del inglés *Reverse Electron Transport*) a través del complejo I de la cadena transportadora de electrones mitocondrial (Chouchani *et al.* 2016). Durante la isquemia, el complejo I permanece “inactivo” exponiendo un residuo cisteína (Cys39 de la subunidad ND3) que no está accesible en su forma activa (Gorenkova *et al.* 2013). Modificaciones covalentes por S-nitrosilación en la Cys39 bloquean el complejo I en estado inactivo de manera temporal previniendo la producción de ROS por RET en los primeros minutos de la reperfusión (Chouchani *et al.* 2013). Con estos precedentes, y a fin de estudiar la generación de DSBs y su potencial efecto en la acumulación de WRAP53, las neuronas se trataron con el agente S-nitrosilante MitoSNO, que provoca específicamente la S-nitrosilación de proteínas mitocondriales, o con SNAP, que conserva la capacidad de S-nitrosilación pero que no localiza en la mitocondria y, por tanto, no modifica la síntesis de ROS por el complejo I (Chouchani *et al.* 2013). En primer lugar, comprobamos que el tratamiento con MitoSNO reducía los niveles mitocondriales de $O_2^{\bullet-}$ producidos tras la isquemia (**Figura 39A**), respecto al efecto producido por el SNAP, lo que

demuestra que MitoSNO está ejerciendo su efecto sobre el complejo I, evitando así la formación de ROS. A continuación, estudiamos el perfil de expresión proteica de WRAP53 (**Figura 39B**). Observamos que mientras que SNAP no previno la acumulación de daño en el DNA, determinado mediante la expresión de γ H2AX, ni de WRAP53 causados por la isquemia, ambos efectos se previnieron con el tratamiento con MitoSNO. Así, el MitoSNO provoca la reducción en la producción de ROS tras la isquemia, lo que se traduce en un menor daño en el DNA y previene la acumulación de WRAP53 durante la fase posterior de reoxigenación.

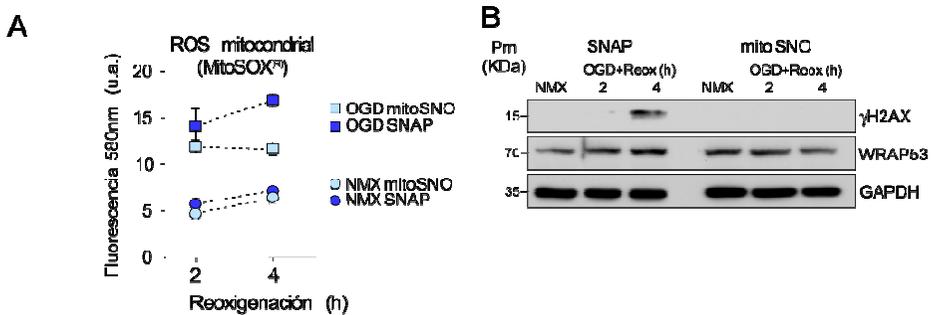


Figura 39. La reducción en la producción de ROS tras la isquemia experimental previene la acumulación de WRAP53 en neuronas in vitro. (A) Determinación de los niveles mitocondriales de $O_2^{\bullet -}$, mediante citometría de flujo, con la sonda MitoSOX[®], en neuronas tratadas con MitoSNO, de localización mitocondrial, o con SNAP, no localizable en la mitocondria. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias de fluorescencia (u.a.). (B) Análisis de los niveles de expresión de proteínas por transferencia tipo Western utilizando anticuerpos frente a γ H2AX y WRAP53. Se utilizó GAPDH como control. Los datos se expresan como medias \pm S.E.M. de 3 cultivos independientes.

A la vista de estos resultados nos planteamos si la presencia de daño en el DNA era suficiente para inducir la acumulación de WRAP53 en neuronas y si este debía ir precedido de un daño oxidativo. Para su estudio, llevamos a cabo dos aproximaciones. En primer lugar las neuronas se sometieron a la isquemia experimental (OGD, 3 horas) y, posteriormente, se reoxigenaron en un medio de cultivo suplementado con antioxidantes (suplemento B27). Así, observamos que la presencia de antioxidantes disminuye significativamente la acumulación de WRAP53 en neuronas sometidas a una isquemia (**Figura 40A**).

Por otro lado, las neuronas se trataron con el inhibidor de la topoisomerasa I, camptotecina (CPT) 1 μ M durante 8 horas, cuya función genotóxica es independiente de la generación de ROS (Pommier 2006). La **Figura 40B** muestra que el tratamiento con CTP provocó roturas en el DNA, revelado por la consiguiente acumulación de γ H2AX. Sin embargo, este tratamiento no indujo la acumulación de la proteína WRAP53.

Estos resultados demuestran que la generación de ROS, pero no las roturas en el DNA, son los responsables de la acumulación de WRAP53 que provoca la isquemia y posterior reoxigenación en las neuronas. Por tanto, podemos sugerir que los ROS generados por la mitocondria (probablemente el complejo I) tras la isquemia provoca la acumulación de WRAP53, que se transporta al núcleo, donde promueve la reparación del DNA dañado aumentando, en consecuencia, la supervivencia de las neuronas frente al daño isquémico.

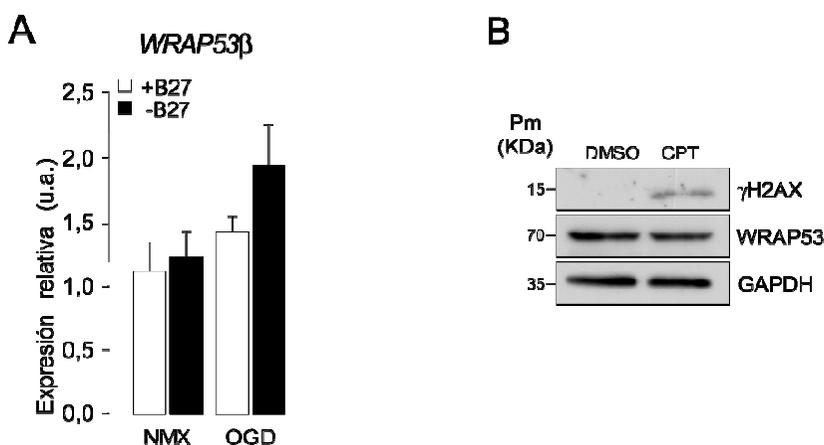


Figura 40. La acumulación de WRAP53 β es sensible a la generación de ROS. (A) Estudio de la expresión de WRAP53 β mediante rt-qPCR, tras una isquemia experimental (OGD, 3 horas) y 4 horas de reoxigenación en presencia (+B27) o ausencia de antioxidantes (-B27). Se utilizó GAPDH como control interno de expresión. Los resultados se expresan en número de veces de expresión normalizados frente NMX (0 horas). (B) Imagen representativa del análisis proteico de neuronas tratadas con camptotecina (CPT; 1 μ M, 8 horas), mediante transferencia tipo Western de WRAP53 y γ H2AX, utilizando la GAPDH como control de carga. Los datos se expresan como medias \pm S.E.M. de 3 cultivos independientes. * $p > 0,05$ vs NMX (ANOVA, *pos-hoc* Bonferroni).

4. VALOR PRONÓSTICO DE LOS POLIMORFISMOS rs2287498 y rs2289499 DE *Wrap53* EN EL ICTUS ISQUEMICO

Como hemos indicado en la Introducción, se han encontrado diferentes SNPs a lo largo del gen *Wrap53*, siendo dos de ellos (SNPsrs2287498 y rs2287499) especialmente interesantes por su vinculación a la predisposición y determinación del pronóstico de pacientes de ciertos tipos de cáncer (Schildkraut *et al.* 2009). Dado que nuestros resultados demuestran que WRAP53 modula la susceptibilidad de las neuronas al daño isquémico, la existencia de sitios polimórficos funcionales en el gen *Wrap53* podría afectar dicha función neur protectora y así afectar la predisposición genética a ciertas enfermedades o incluso determinar el pronóstico de pacientes que han sufrido un ictus, como se ha demostrado previamente en cáncer (Schildkraut *et al.* 2009). Para estudiar si efectivamente existe asociación entre los SNPs rs2287498 y rs2287499 de *Wrap53* y el pronóstico funcional de los pacientes tras un ictus isquémico, se utilizó una cohorte hospitalaria de 116 pacientes de ictus.

4.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO GENERAL DE LA COHORTE DE PACIENTES CON ICTUS ISQUÉMICO

La edad de los pacientes de la cohorte estudiada fue $77,4 \pm 10,7$ años, expresada como media \pm SD. La distribución por sexos fue de 51% varones y 49% mujeres.

La distribución de los factores de riesgo se expone en la **Tabla 7**.

En cuanto a los grupos etiológicos de los infartos, la distribución fue la siguiente: 51 (44%) cardioembólicos, 33 (29%) indeterminados, 22 (18%) aterotrombóticos, 7 (6%) lacunares y 3 (3%) otros.

Tabla 7. Distribución de los factores de riesgo en la cohorte de pacientes

Factor de riesgo	N (116)	%
Hipertensión	87	76
Hipercolesterolemia	51	44
Diabetes	30	26
Fibrilación Auricular	32	28
Cardiopatía Isquémica	18	16
Tabaquismo	13	11,3
Abuso de alcohol	4	3,5
Ictus previo	26	23

En la **Tabla 8** se puede consultar la distribución de las variables polimórficas de rs2287498 y rs2287499 de *Wrap53* en la cohorte. Como se ha mencionado en el apartado de Introducción, el SNP rs2287498 supone un cambio C>T. Así, el codón *TTC* cambia a *TTT* sin ocasionar un cambio del aminoácido fenilalanina codificado originalmente (F150F). En el SNP rs2287499, el alelo ancestral citosina (*CGG*) es sustituido por una guanina (*GGG*), de modo que el codón que codificaba una arginina, codificará una glicina (R68G). En ambos casos, la distribución de frecuencias génicas se ajusta al equilibrio de Hardy-Weinbebrg ($p>0,1$).

Además, se ha descrito que el alelo mutado ejerce un efecto dominante sobre el alelo ancestral. Esto permite agrupar los genotipos *TC* y *TT* del SNP rs2287498 en un único grupo “No *CC*”, diferenciándolos del grupo “*CC*”. Del mismo modo, los individuos *GG* y *GC* del SNP rs2287499 se agruparon como “No *CC*”, mientras que un segundo grupo incluyó a los individuos “*CC*” (**Tabla 8**).

Tabla 8. Distribución de los SNPs rs2287498 y rs228799 de *Wrap53*

<i>rs2287498</i>	N	%
CC	105	90,5
No CC (TC+TT)	11	9,5
<i>rs2287499</i>	N	%
CC	93	80,2
No CC (GC+GG)	23	19,8

La cuantificación del estado funcional a los 3 meses tras el ictus isquémico se realizó mediante la escala de Rankin modificada (Rankin-m) (Banks & Marotta, 2007) en pacientes con puntuación inicial NIHSS \geq 4. De los 116 pacientes incluidos en la cohorte, 58 (50%) presentaban mal pronóstico funcional (Rankin-m $>$ 2) a los 3 meses de sufrir el ictus, mientras que 58 (50%) se encontraban en la situación definida como buen pronóstico funcional (Rankin-m \leq 2). Un posterior subanálisis de pacientes tratados con trombolíticos indicó que, de los 33 pacientes tratados con t-PA intravenoso, 14 (42,4%) presentaban mal pronóstico funcional, mientras que 19 (57,6%) presentaban buen pronóstico funcional a los 3 meses tras el ictus isquémico.

En la **Tabla 9** se resume la distribución del estado funcional de los pacientes de la cohorte con infarto cerebral en función del Rankin-m.

Tabla 9. Distribución del estado funcional de pacientes

Rankin-m	N	%
0	26	22
1	9	8
2	23	20
3	16	14
4	11	9
5	10	9
6	21	18

4.2. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO RS2287498 CON EL PRONÓSTICO FUNCIONAL DE LOS PACIENTES DE ICTUS ISQUÉMICO

Los resultados del estado funcional de los pacientes a los 3 meses tras el ictus isquémico, recogidos en la **Figura 41** muestran una ligera asociación del genotipo No CC de ambos polimorfismos con un mejor pronóstico funcional de los pacientes, respecto al genotipo CC. Para el SNP rs2287498, la mediana de los valores en la escala de Rankin-m en los pacientes No CC fue de 2 [1,4], mientras que en los pacientes homocigotos para el alelo C fue de 3 [1,5] (**Figura 41A**). Del mismo modo, en el SNP rs2287499 observamos una mediana en pacientes No CC de 2 [1,5], que en pacientes CC se valoró en 3 [1,5] (**Figura 41B**).

Cuando se comparó la distribución de las variantes alélicas en función del buen o mal pronóstico funcional a los 3 meses, confirmamos que los individuos que portan el alelo C en homocigosis para ambos SNPs de *Wrap53* (rs2287498 y rs2287499) se asociaban con peor pronóstico. En otras palabras, en el grupo de pacientes No CC había un mayor porcentaje de pacientes con buen pronóstico funcional (Rankin-m \leq 2) (**Tabla 10**).

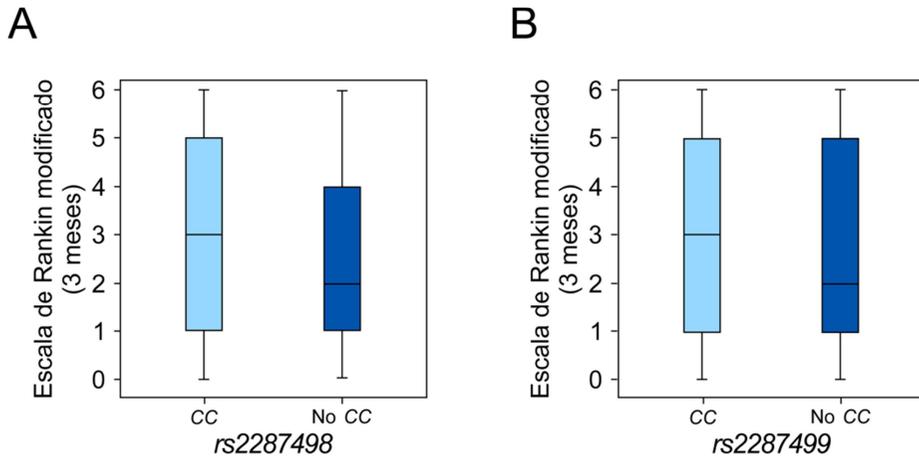


Figura 41 Asociación entre los polimorfismos rs2287498 y rs2287499 de *Wrap53* y el estado funcional de los pacientes a los 3 meses de un ictus isquémico. El estado funcional de los pacientes se cuantificó mediante la escala de Rankin modificada y se asoció con (A) el SNPs rs2287498 y (B) el SNP rs2287499. Los pacientes fueron agrupados según su genotipo en CC o No CC. Los valores se expresan como mediana [rango intercuartílico] (Prueba chi-cuadrado).

Tabla 10. Pronóstico funcional de pacientes a los 3 meses tras un ictus

	Buen pronóstico	Mal pronóstico	P
rs2287498			0,342
CC	51 (44,0%)	54 (46,6%)	
No CC	7 (6%)	4 (3,4%)	
rs2287499			0,485
CC	45 (38,8%)	48 (41,4%)	
No CC	13 (11,2%)	10 (8,6%)	

Estos resultados sugieren que ambos polimorfismos de *Wrap53* podrían modular el pronóstico funcional de los pacientes tras un ictus.

En línea con las observaciones realizadas *in vitro*, y teniendo presente la relevancia de la reperusión en la función de *Wrap53* después de la isquemia, realizamos un subanálisis de la cohorte para estudiar exclusivamente

aquellos pacientes sometidos a tratamiento trombolítico intravenoso. El análisis de 33 pacientes tratados con t-PA intravenoso nos permitió corroborar la asociación del grupo No CC del SNP rs2287498 con un mejor pronóstico funcional respecto a los pacientes con genotipo CC (**Tabla 11**).

Tabla 11. Pronóstico funcional a los 3 meses tras un ictus de pacientes tratados con t-PA

	Buen pronóstico	Mal pronóstico	P
rs2287498			0,210
CC	17 (51,5%)	14 (42,4%)	
No CC	2 (6,1%)	0 (0%)	
rs2287499			0,388
CC	17 (51,5%)	11 (33,3%)	
No CC	2 (6,1%)	3 (9,1%)	

Como se observa en la **Figura 42A** todos los individuos categorizados como No CC presentaban valores de Rankin-m \leq 2 de buen pronóstico, mientras que la mediana en pacientes homocigotos para el alelo C fue de 2, pero con valores de Rankin-m [2,5]. En el caso del SNP rs2287499, no observamos dicho efecto, ya que la mediana de Rankin-m en los pacientes No CC fue de 3 [2,6], siendo la del pacientes CC de 2 [1,4] (**Figura 42B**).

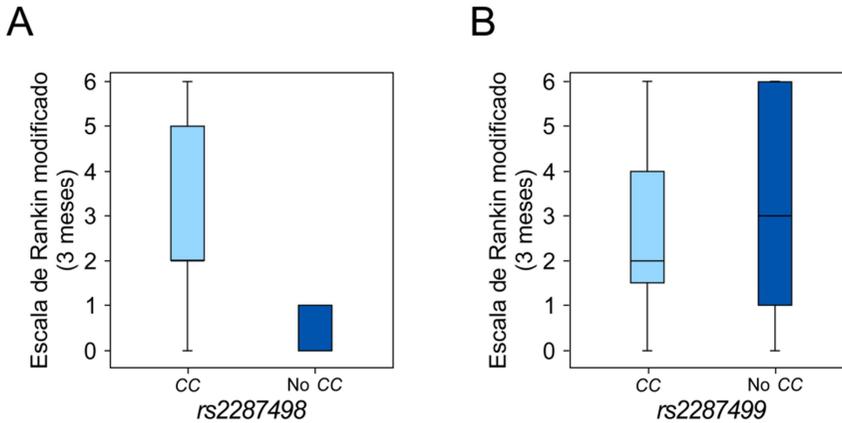


Figura 42. Asociación entre los polimorfismos rs2287498 y rs2287499 de *Wrap53* y el estado funcional a los 3 meses tras un ictus isquémico de los pacientes tratados con t-PA. El estado funcional de los pacientes se cuantificó mediante la escala de Rankin modificada y se asoció con (A) el SNPs rs2287498 y (B) el SNP rs2287499. Los pacientes fueron agrupados según su genotipo en CC o No CC. Los valores se expresan como mediana [rango intercuartílico] (Prueba chi-cuadrado).

Esto sugiere que la presencia de la mutación C>T en el SNP rs2287498 podría ser relevante para los pacientes tratados con t-PA, ya que podría determinar un mejor estado funcional a los 3 meses de haber sufrido un ictus. De ser así, podríamos describir dicho polimorfismo rs2284798 de *Wrap53* como un posible biomarcador genético de pronóstico funcional en pacientes con ictus isquémicos sometidos a tratamiento con trombolíticos.

DISCUSIÓN

El ictus es una enfermedad cerebrovascular heterogénea con multitud de factores que determinan el riesgo, la gravedad y el pronóstico o recuperación de la misma (Gómez-Sánchez *et al.* 2011; Almeida 2013; George & Steinberg 2015; Rodríguez *et al.* 2017). El conocimiento de los mecanismos moleculares que acontecen en la fisiopatología asociada al ictus es fundamental para establecer nuevas vías de actuación terapéutica que permitan paliar la pérdida neuronal y, por tanto, el déficit neurológico y motor asociado (Almeida 2013; Neuhaus *et al.* 2014; Moretti *et al.* 2015). Para estudiar dichos mecanismos moleculares implicados en la enfermedad existen diversos modelos experimentales que persiguen mimetizar el daño por isquemia-reperusión, tanto *in vitro* (Almeida *et al.* 2002) como *in vivo* (Fluri *et al.* 2015). En concreto, el modelo *in vitro* de OGD en cultivo primario de neuronas y el modelo *in vivo* de oclusión transitoria de la arteria cerebral media son los procedimientos que, salvando las diferencias, más fielmente permiten estudiar los eventos moleculares que tienen lugar en la clínica del ictus (Sommer 2017). El empleo de estas técnicas, ampliamente utilizadas en nuestro laboratorio (Almeida *et al.* 2002; Gómez-Sánchez *et al.* 2011), nos ha permitido describir una nueva función neuroprotectora de *Wrap53* en la isquemia neuronal.

Wrap53 es un gen complejo que presenta diferentes transcritos con funciones diversas. Así, el transcrito *WRAP53 α* regula la expresión de *p53* mediante interacción con su mensajero (Mahmoudi *et al.* 2009), mientras que *WRAP53 β* codifica una proteína con funciones en el mantenimiento de los Cuerpos de Cajal, la elongación de telómeros y la reparación del DNA (Mahmoudi *et al.* 2010; Venteicher & Artandi 2009; Coucoravas *et al.* 2016). Los resultados aquí descritos demuestran que, al menos en nuestras condiciones experimentales, el transcrito *WRAP53 α* no parece ser el responsable de la estabilización de *p53* en las neuronas tras la isquemia, ya que no observamos un incremento en la expresión del mensajero de *p53* sino únicamente de la proteína, lo que indica un efecto a nivel postraduccional. Aunque no podemos descartar la implicación de *WRAP53 α* en el proceso isquémico por otras vías no exploradas en el presente trabajo, hasta el momento no tenemos evidencias que demuestre un posible efecto del transcrito sobre la estabilidad de *p53* en neuronas, como se ha demostrado en células tumorales humanas sometidas a radiaciones ionizantes (Mahmoudi *et al.* 2009), fenómeno que causa un gran daño en el DNA, mayor que el causado por la isquemia.

La ausencia de un incremento en la transcripción de *p53* tras la isquemia *a priori* podría parecer contradictoria con su conocida implicación en la patología isquémica (Leker *et al.* 2004; Gomez-Sanchez *et al.* 2011). Sin embargo, nuestros resultados confirman la importancia de las modificaciones post-traduccionales en la estabilización y activación de *p53*, lo que permite a la proteína el ejercicio de sus funciones pro-apoptóticas en condiciones de estrés celular (Appella & Anderson 2001; Xu 2003; Saito *et al.* 2005; Lee *et al.* 2007). Del mismo modo, hemos descrito que isquemias más severas (3 h) inducen la expresión del transcrito *WRAP53 β* en neuronas corticales, hecho que se corresponde con la acumulación de la proteína *WRAP53* durante la reoxigenación y permite vincular, por vez primera, a *Wrap53* con la patología isquémica. Además, la estabilización de la proteína *WRAP53* dependiente de reperusión también ha sido confirmada en un modelo *in vivo* de oclusión transitoria de la arteria cerebral media, otorgando una relevancia traslacional a nuestro estudio y la posibilidad de ampliar el conocimiento de la proteína en el modelo animal.

Está descrito que el desequilibrio oxidativo ligado al daño por isquemia-reperusión es uno de los principales desencadenantes de la muerte neuronal, ya que activa cascadas de señalización implicadas en procesos de apoptosis y necrosis (Almeida *et al.* 2001; Almeida *et al.* 2002, Bolaños *et al.* 2002, Bolaños *et al.* 2009), además de producir lesiones en proteínas, lípidos y DNA que contribuyen a la neurodegeneración (Lee *et al.* 2012; Lehotský *et al.* 2004; Dizdaroglu & Jaruga 2012). Durante la caracterización de *WRAP53* en nuestro modelo experimental hemos confirmado que la isquemia experimental *in vitro* mimetiza los eventos fisiopatológicos aquí enumerados. La sobreproducción de ROS lleva consigo una acumulación de proteínas de daño en el DNA (γ H2AX) y muerte neuronal (caspasa-3-activa) que tienen lugar en la misma línea temporal que la acumulación de *WRAP53*, lo que nos lleva a sospechar que *WRAP53* está vinculado, de alguna manera, con estos fenómenos. Esto ha de ir ligado a una distribución diferencial de la proteína en los distintos compartimentos celulares, ya que la correcta localización subcelular de las proteínas es crucial para su función biológica, pues aporta el contexto fisiológico adecuado para ello (Hung & Link 2011). De hecho, una misma proteína puede presentar diferentes funciones en diferentes compartimentos celulares. Además, se sabe que la localización aberrante de proteínas puede estar asociada a enfermedades metabólicas (Da Costa *et al.* 2003), neurodegenerativas (Hoover *et al.* 2010) y a la progresión de tumores

(Fabbro & Henderson 2003). En el presente trabajo demostramos, por primera vez, el transporte nuclear de WRAP53 en respuesta a un accidente isquémico. Este cambio en la distribución espacial no es única y exclusivamente dependiente de la acumulación de la proteína, pues la sobreexpresión exógena de WRAP53 no induce por sí misma la migración nuclear, sino que precisa del estímulo isquémico para producirse. Estos resultados están en consonancia con lo observado por Hedström y colaboradores, que demuestran que el tratamiento con radiación ionizante, estímulo genotóxico que no interfiere directamente con el metabolismo de oxígeno, no induce su acumulación nuclear (Hedström *et al.* 2015).

Otras publicaciones recientes han aportado una significación clínica a la diferente distribución de WRAP53 relacionándolo con el pronóstico de pacientes de cáncer. Estos trabajos vinculan la localización nuclear de WRAP53 con una mayor supervivencia y respuesta a la radioterapia de pacientes de cáncer de cuello y cabeza (Garvin *et al.* 2015), de cáncer de pecho (Silwal-Pandit *et al.* 2015), de ovarios (Hedström *et al.* 2015) y de pacientes de tumores laríngeos (Tiefenbock-Hansson *et al.* 2017). No se ha descrito el mecanismo molecular que explique esta relación funcional de WRAP53 con la localización, pero sí se ha propuesto que el mantenimiento de la estabilidad genómica y la disfunción telomérica son posibles mediadores en la agresividad de los tumores (Tiefenbock-Hansson *et al.* 2017). Del mismo modo, el mecanismo que rige el transporte de WRAP53 entre los diferentes compartimentos subcelulares es aún objeto de estudio.

El correcto plegamiento de la proteína, mediado por la chaperona TRiC, es necesario para su acumulación y el correcto desarrollo de las funciones nucleares de WRAP53 (Freund *et al.* 2014). Sin embargo, se desconoce el mecanismo molecular que subyace a la translocación nuclear y los factores que median dicho proceso. Futuros estudios que desvelen el mecanismo de transporte de WRAP53 sin duda permitirán una mayor comprensión de su función biológica y de los procesos celulares en los que participa.

La localización nuclear de WRAP53 y su vinculación con el daño en el DNA pone de manifiesto su posible implicación en la muerte neuronal. Nuestros resultados demuestran la importancia de la proteína WRAP53 en la supervivencia neuronal a la isquemia. La ausencia de WRAP53 supone una mayor susceptibilidad a la apoptosis inducida por la isquemia, mientras que

un incremento exógeno de la proteína favorece la supervivencia de las neuronas al accidente isquémico. La resistencia de las neuronas del área de penumbra evita la progresión del tamaño de la lesión y estimula la recuperación de la función neurológica (Fernández-Gómez *et al.* 2008; Ramos-Cabrer *et al.* 2011; Liu 2012). En este contexto, WRAP53 se encuentra sobreexpresado en líneas tumorales, así como en pacientes de cáncer (Mahmoudi *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2012; Rao *et al.* 2014), en los que estaría determinando la supervivencia de las células tumorales. Sin embargo, este hecho no es comparable con lo que ocurre en células postmitóticas, como son las neuronas, en las que no hay procesos de proliferación y la telomerasa se encuentra inactiva.

En relación con la supervivencia neuronal, se observó que la ausencia de WRAP53 además de incrementar la muerte de las neuronas adelanta la formación de daño en el DNA. No tenemos evidencia de una mayor producción de ROS como consecuencia del silenciamiento de WRAP53. Por tanto WRAP53 no estaría condicionando la producción de radicales libres. Sin embargo, el estrés oxidativo sí estaría determinando la acumulación de la proteína tras la isquemia, ya que si disminuimos la principal fuente de generación de ROS durante la reoxigenación, o prevenimos su acumulación con antioxidantes, la activación de WRAP53 también disminuye. Este efecto no debe atribuirse solamente a un menor daño en el DNA *per se*, pues el uso de camptotecina como control positivo de generación de DSBs (Morris & Geller 1996; Pommier 2006) no mimetiza la acumulación de WRAP53 como ocurre con la isquemia. Por tanto, los ROS, y no las roturas en el DNA causadas por la isquemia, parecen ser los factores responsables de la acumulación de WRAP53 en las neuronas, que se transporta al núcleo para promover la reparación del DNA dañado y, en consecuencia, favorecer la supervivencia neuronal.

La supervivencia de las neuronas a la isquemia viene determinada por el balance entre el daño y los mecanismos de respuesta asociados (Liu *et al.* 2011; Ghosh *et al.* 2015; Rodríguez *et al.* 2017). No tenemos evidencia de la participación de WRAP53 en la generación de daño, sin embargo según lo observado sí que podría estar implicado en la reparación de las lesiones en el DNA provocadas por la isquemia, más concretamente en la formación de focos de 53BP1, proteína imprescindible para la vía de reparación no homóloga o NHEJ (Panier & Boulton 2013; Romero *et al.* 2016). De forma

paralela a nuestro trabajo se ha descrito la participación de WRAP53 en el proceso de señalización de dobles roturas en el DNA, permitiendo la activación de las vías de reparación por recombinación homóloga (HR) y NHEJ en células replicativas (Henriksson *et al.* 2014; Rassoolzadeh *et al.* 2015; Coucoravas *et al.* 2016). En el caso de neuronas postmitóticas, WRAP53 estaría modulando la capacidad de reparación de DSBs mediante la vía NHEJ, al ser la única activa en estas células (Iyama & Wilson 2013).

Una correcta función de la reparación por NHEJ es imprescindible para la solución de roturas que acontecen tanto en condiciones fisiológicas (Suberbielle *et al.* 2013), como en consecuencia de un estímulo apoptótico (Merlo *et al.* 2005) en neuronas postmitóticas. Aunque las DSBs son un evento dañino tardío y menos frecuente en el progreso de cascada de isquemia-reperfusión (Chen *et al.* 1997; Li *et al.* 2011; De Zio *et al.* 2012), estas lesiones en el DNA son altamente letales, luego su reparación supone un mecanismo de lucha por la supervivencia neuronal. De hecho, estudios *in vitro* de neuronas mutantes para la maquinaria de reparación por NHEJ presentan un alto grado de rotura cromosómica como consecuencia del estrés oxidativo (Karanjawala *et al.* 2002). Además, la desregulación de factores de reparación por NHEJ contribuye a la fragmentación del DNA debido al estrés oxidativo tras una isquemia focal *in vivo* (Kim *et al.* 2001). En cerebros de pacientes *post-mortem* también se han encontrado evidencias de reparación de DNA en regiones de penumbra, de modo que en isquemias agudas se observa una gran fragmentación del DNA, mientras que lesiones crónicas presentan una mayor integridad. Así, queda patente la necesidad de mantener la integridad en el DNA para la supervivencia neuronal a largo plazo (Huttner *et al.* 2014). Estos resultados concuerdan con los aquí presentados, apoyando la idea de que la reparación del DNA condicionada por WRAP53 modula la susceptibilidad de las neuronas al estrés oxidativo y, con ello, la capacidad de recuperación tras la isquemia. Asimismo pone de manifiesto su posible uso como biomarcador pronóstico en ictus.

La complejidad del proceso fisiopatológico de la isquemia cerebral dificulta la precisión en el pronóstico. En la actualidad éste se basa, fundamentalmente, en la relación de los factores clínicos con los resultados de neuroimagen (Biller *et al.* 2016). Además, la diversidad genética interindividual puede alterar la respuesta a un accidente cerebrovascular de pacientes con sintomatología clínica e imagen similares (Brouwers *et al.*

2012; Almeida 2013). Por ello, en los últimos años ha cobrado especial relevancia la caracterización de marcadores genéticos, fácilmente obtenibles, asociados al pronóstico funcional de pacientes de ictus (Miao & Liao 2014). En este sentido, nuestro grupo ha descrito recientemente que el polimorfismo *Arg72Pro* del gen humano *p53* condiciona la recuperación funcional de pacientes de ictus isquémico y hemorrágico (Gomez-Sanchez *et al.* 2011), modulando la supervivencia de las neuronas y de las células endoteliales y con ello el proceso de neuroreparación (Rodríguez *et al.* 2017). El estudio de asociación de varios polimorfismos funcionales de *Wrap53* con la recuperación funcional de pacientes que han sufrido un ictus isquémico, nos ha permitido la identificación del genotipo No CC del SNP rs2247898 como un potencial biomarcador genético de pronóstico, lo que de nuevo pone de manifiesto la posible aplicación clínica de nuestra investigación. Para confirmar la determinación de rs2247898 en el estado funcional de los pacientes de ictus y aportar más solidez al estudio, es fundamental ampliar la base de datos de la cohorte de Castilla y León con más pacientes, así como replicar el estudio de asociación en otras poblaciones.

En definitiva, el presente trabajo pretende contribuir al esclarecimiento de los mecanismos moleculares que regulan el balance entre neurodegeneración y neuroreparación tras la isquemia cerebral y la búsqueda de marcadores de recuperación funcional en pacientes que sufren ictus isquémico. En concreto, nuestros resultados describen, por primera vez, la participación de la proteína WRAP53 en respuesta a la isquemia y su función en la reparación del material genético neuronal, lo cual podría determinar la supervivencia de las neuronas al accidente isquémico. Por ello, proponemos la proteína WRAP53 como una nueva diana molecular con carácter neuroprotector. Terapias orientadas a fortalecer los mecanismos de reparación en las neuronas podrían considerarse como una estrategia para mejorar la recuperación funcional de los pacientes de ictus.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis Doctoral podemos concluir:

1. *Wrap53* participa activamente en la respuesta de las neuronas al daño isquémico. Aunque no tenemos evidencias de una mayor expresión del transcrito *WRAP53 α* , que estabilice p53 y trascienda en la fisiopatología isquémica, sí que observamos un aumento progresivo de *WRAP53 β* durante la fase de reoxigenación tras la isquemia.
2. La proteína WRAP53 se acumula y se transporta al núcleo en respuesta a la isquemia. La acumulación de WRAP53 se produce como consecuencia de la generación mitocondrial de radicales libres de oxígeno que, además, provoca daño en el DNA y la subsecuente muerte neuronal.
3. WRAP53 promueve la reparación del DNA dañado y, en consecuencia, modula la susceptibilidad de las neuronas a la apoptosis causada por la isquemia. De hecho, WRAP53 promueve la formación de focos de reparación de roturas de doble hebra en el DNA producidos como consecuencia de la isquemia, promoviendo así la recuperación y supervivencia de las neuronas a un accidente isquémico.
4. El polimorfismo rs2287498 del gen *Wrap53* muestra una asociación con el pronóstico funcional de los pacientes de ictus isquémico. La presencia del alelo *T* condiciona una menor dependencia funcional de estos pacientes a los 3 meses de haber sufrido un ictus.

Conclusión final

Los resultados recogidos en el presente trabajo demuestran que WRAP53 se acumula y se transporta al núcleo de las neuronas en respuesta a la isquemia, donde participa en la formación de focos de reparación de roturas de doble cadena en el DNA, producidas como consecuencia de la isquemia y posterior reoxigenación. Este proceso promueve una respuesta de reparación del material genético en las neuronas y, en consecuencia, su

supervivencia a la isquemia, lo que podría estar vinculado con una mejor recuperación funcional de pacientes que sufren ictus isquémico. Por ello, hemos identificado una nueva función neuroprotectora de WRAP53 frente al daño isquémico, y más concretamente en la reparación eficiente del DNA neuronal, lo que le convierte en una importante molécula diana a tener en cuenta en el establecimiento de nuevas vías de actuación terapéutica en el ictus isquémico.

BIBLIOGRAFÍA

- Aberg, N. D., S. Olsson, D. Aberg, K. Jood, T. M. Stanne, M. Nilsson, C. Blomstrand, J. Svensson, J. Isgaard, & C. Jern. 2013. "Genetic Variation at the IGF1 Locus Shows Association with Post-Stroke Outcome & to Circulating IGF1." *European Journal of Endocrinology* 169 (6): 759–65.
- Aceytuno, R. Daniel, Cortt G. Pielt, Zahra Havali-Shahriari, Ross A. Edwards, Martial Rey, Ruiqiong Ye, Fatima Javed, *et al.* 2017. "Structural & Functional Characterization of the PNKP–XRCC4–LigIV DNA Repair Complex." *Nucleic Acids Research* 45 (10): 6238–51.
- Adams, H. P., B. H. Bendixen, L. J. Kappelle, J. Biller, B. B. Love, D. L. Gordon, & E. E. Marsh. 1993. "Classification of Subtype of Acute Ischemic Stroke. Definitions for Use in a Multicenter Clinical Trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment." *Stroke* 24 (1): 35–41.
- Almeida, A., J. Almeida, J. P. Bolaños, & S. Moncada. 2001. "Different Responses of Astrocytes & Neurons to Nitric Oxide: The Role of Glycolytically Generated ATP in Astrocyte Protection." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (26): 15294–99.
- Almeida, A. & J. P. Bolaños. 2001. "A Transient Inhibition of Mitochondrial ATP Synthesis by Nitric Oxide Synthase Activation Triggered Apoptosis in Primary Cortical Neurons." *Journal of Neurochemistry* 77 (2): 676–90.
- Almeida, A. 2013. "Genetic Determinants of Neuronal Vulnerability to Apoptosis." *Cellular and Molecular Life Sciences*. 70 (1): 71–88.
- Almeida, A., J. P. Bolaños, & S. Moreno. 2005. "Cellular/Molecular Cdh1/Hct1-APC Is Essential for the Survival of Postmitotic Neurons." *Journal of Neurochemistry* 25 (36): 8115–21.
- Almeida, A., P. Ciudad, M. Delgado-Esteban, E. Fernández, P. García-Nogales & J. P. Bolaños. 2005. "Inhibition of Mitochondrial Respiration by Nitric Oxide: Its Role in Glucose Metabolism & Neuroprotection." *Journal of Neuroscience Research* 79 (1–2): 166–71.
- Almeida, A., M. Delgado-Esteban, J. P. Bolaños, & J. M. Medina. 2002. "Oxygen and Glucose Deprivation Induces Mitochondrial Dysfunction & Oxidative Stress in Neurons but Not in Astrocytes in Primary Culture." *Journal of Neurochemistry* 81 (2): 207–17.
- Almeida, A., S. Moncada & J. P. Bolaños. 2004. "Nitric Oxide Switches on Glycolysis through the AMP Protein Kinase & 6-Phosphofructo-2-Kinase Pathway." *Nature Cell Biology* 6 (1): 45–51.
- Alonso de Leciñana, M., J.A. Egido, I. Casado, M. Ribó, A. Dávalos, J. Masjuan, J.L. Caniego, *et al.* 2014. "Guía Para El Tratamiento Del Infarto Cerebral Agudo." *Neurología* 29 (2): 102–22.

- Appella, E., & C. W. Anderson. 2001. "Post-Translational Modifications and Activation of p53 by Genotoxic Stresses." *European Journal of Biochemistry* 268 (10): 2764–72.
- Araújo, I. M., B. P. Carreira, C. M. Carvalho, & A. P. Carvalho. 2010. "Calpains and Delayed Calcium Deregulation in Excitotoxicity." *Neurochemical Research* 35 (12): 1966–69.
- Atkins, C. M., & J. D. Sweatt. 1999. "Reactive Oxygen Species Mediate Activity-Dependent Neuron-Glia Signaling in Output Fibers of the Hippocampus." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 19 (17): 7241–48.
- Bakkenist, C. J., & M. M. B. Kastan. 2003. "DNA Damage Activates ATM through Intermolecular Autophosphorylation and Dimer Dissociation." *Nature* 421 (6922): 499–506.
- Banks, J. L., & C. A. Marotta. 2007. "Outcomes Validity and Reliability of the Modified Rankin Scale: Implications for Stroke Clinical Trials - A Literature Review and Synthesis." *Stroke* 38 (3): 1091–96.
- Barzilai, A., & Ken-Ichi Yamamoto. 2004. "DNA Damage Responses to Oxidative Stress." *DNA Repair* 3: 1109–15.
- Basuroy, S., S. Bhattacharya, C. W. Leffler, & H. Parfenova. 2008. "Nox4 NADPH Oxidase Mediates Oxidative Stress and Apoptosis Caused by TNF- in Cerebral Vascular Endothelial Cells." *AJP: Cell Physiology* 296 (3): C422–32.
- Bergui, M., G. Stura, D. Daniele, P. Cerrato, M. Berardino, & G. B. Bradac. 2005. "Mechanical Thrombolysis in Ischemic Stroke Attributable to Basilar Artery Occlusion as First-Line Treatment." *Stroke* 37: 145–50.
- Bevan, S., M. Traylor, P. Adib-Samii, R. Malik, N. L. M. Paul, C. Jackson, M. Farrall, et al. 2012. "Genetic Heritability of Ischemic Stroke and the Contribution of Previously Reported Candidate Gene and Genomewide Associations." *Stroke* 43 (12): 3161–67.
- Biller, J., S. Ruland, & M. J. Schneck. 2016. "Ischemic Cerebrovascular Disease." In *Bradley's Neurology in Clinical Practice. Seventh Edition*, 920–67.
- Boehme, A. K., C. Esenwa, & M. S.V. Elkind. 2017. "Stroke Risk Factors, Genetics, and Prevention." *Circulation Research* 120 (3): 472–95.
- Bohgaki, T., M. Bohgaki, & R. Hakem. 2010. "DNA Double-Str&Break Signaling and Human Disorders." *Genome Integrity* 1 (1): 15.
- Bolaños, J. P. 2016. "Bioenergetics &Redox Adaptations of Astrocytes to Neuronal Activity." *Journal of Neurochemistry* 139 (October): 115–25.

- Bolaños, J. P., A. Almeida, V. Stewart, S. Peuchen, J. M. Land, J. B. Clark, & S. J. R. Heales. 2002. "Nitric Oxide-Mediated Mitochondrial Damage in the Brain: Mechanisms and Implications for Neurodegenerative Diseases." *Journal of Neurochemistry* 68 (6): 2227–40.
- Bolaños, J. P., M. A. Moro, I. Lizasoain, & Angeles Almeida. 2009a. "Mitochondria and Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Neurological Disorders and Stroke: Therapeutic Implications." *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 (14): 1299–1315.
- Bolaños, J. P., P. Ciudad, P. García-Nogales, M. Delgado-Esteban, E. Fernández, & A. Almeida. 2004. "Regulation of Glucose Metabolism by Nitrosative Stress in Neural Cells." *Molecular Aspects of Medicine* 25 (1–2): 61–73.
- Broughton, B. R. S, D. C. Reutens, & Christopher G Sobey. 2009. "Apoptotic Mechanisms after Cerebral Ischemia." *Stroke* 40 (5): e331-9.
- Brouns, R., & P. P. De Deyn. 2009. "The Complexity of Neurobiological Processes in Acute Ischemic Stroke." *Clinical Neurology and Neurosurgery* 111 (6): 483–95..
- Brouwers, H. B., A. Biffi, A. M. Ayres, K. Schwab, L. Cortellini, J. M. Romero, N. S. Rost, *et al.* 2012. "Apolipoprotein E Genotype Predicts Hematoma Expansion in Lobar Intracerebral Hemorrhage." *Stroke* 43 (6): 1490–95.
- Buga, A.-M., M. Sascau, C. Pisoschi, J. G. Herndon, C. Kessler, & A. Popa-Wagner. 2008. "The Genomic Response of the Ipsilateral and Contralateral Cortex to Stroke in Aged Rats." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 12 (6b): 2731–53.
- Bustin, S. A., V. Benes, J. A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, *et al.* 2009. "The MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments." *Clinical Chemistry* 55 (4): 611–22.
- Cao, L-L, F Wei, Y Du, B. Song, D. Wang, C. Shen, X. Lu, *et al.* 2016. "ATM-Mediated KDM2A Phosphorylation Is Required for the DNA Damage Repair." *Oncogene* 35: 301–13.
- Caso, J. R., J. M. Pradillo, O. Hurtado, P. Lorenzo, M. A. Moro, & I. Lizasoain. 2007. "Toll-Like Receptor 4 Is Involved in Brain Damage and Inflammation After Experimental Stroke." *Circulation* 115 (12): 1599–1608.
- Caso, J. R, J. M. Pradillo, O. Hurtado, J. C. Leza, M. A. Moro, & Ignacio Lizasoain. 2008. "Toll-Like Receptor 4 Is Involved in Subacute Stress-Induced Neuroinflammation and in the Worsening of Experimental Stroke." *Stroke* 39 1314–1320.
- Chan, D. W, B. Ping-Chi Chen, S. Prithivirajsingh, A. Kurimasa, M. D. Story, J. Qin, & David J. Chen. 2002. "Autophosphorylation of the DNA-Dependent Protein

- Kinase Catalytic Subunit Is Required for Rejoining of DNA Double-Strand Breaks." *Genes and Development* 16 (18): 2333–38.
- Chan, N. C., J. W. Eikelboom, J. S. Ginsberg, M.N. Lauw, T. Vanassche, J. I. Weitz, & Jack Hirsh. 2014. "Role of Phenotypic and Genetic Testing in Managing Clopidogrel Therapy." *Blood* 124: 689-699.
- Charriaut-Marlangue, C, I Margaille, a Represa, T Popovici, M Plotkine, & Y Ben-Ari. 1996. "Apoptosis and Necrosis after Reversible Focal Ischemia: An in Situ DNA Fragmentation Analysis." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 16: 186–94.
- Chen, J., K. Jin, M. Chen, W. Pei, K. Kawaguchi, D. A. Greenberg, & R. P. Simon. 1997. "Early Detection of DNA Strand Breaks in the Brain After Transient Focal Ischemia: Implications for the Role of DNA Damage in Apoptosis and Neuronal Cell Death." *J. Neurochem* 69: 232–45.
- Chen, Y., Z. Deng, S. Jiang, Q. Hu, H. Liu, Z. Songyang, W. Ma, S. Chen, & Yong Zhao. 2015. "Human Cells Lacking Coilin and Cajal Bodies Are Proficient in Telomerase Assembly, Trafficking and Telomere Maintenance." *Nucleic Acids Research* 43(1): 385-395.
- Chouchani, E. T., V. R. Pell, A. M. James, Lorraine M. Work, Kourosh Saeb-Parsy, Christian Frezza, Thomas Krieg, & Michael P. Murphy. 2016. "A Unifying Mechanism for Mitochondrial Superoxide Production during Ischemia-Reperfusion Injury." *Cell Metabolism* 23 (2): 254–63.
- Chouchani, E. T, C. M., S. M N., A. L., V. R. P., S. Ding, A. M. James, *et al.* 2013. "Cardioprotection by S-Nitrosation of a Cysteine Switch on Mitochondrial Complex I." *Nature Medicine* 19 (6): 753–59.
- Chouchani, E. T., V. R. Pell, E. Gaude, D. Aksentijević, S. Y. Sundier, E. L. Robb, A. Logan, *et al.* 2014. "Ischaemic Accumulation of Succinate Controls Reperfusion Injury through Mitochondrial ROS." *Nature* 515 (7527): 431–35.
- Costa, L. Da, G. Tchernia, P. Gascard, A. Lo, J. Meerpohl, C. Niemeyer, J. A. Chasis, J. Fixler, & Narla Mohandas. 2003. "Nucleolar Localization of RPS19 Protein in Normal Cells and Mislocalization due to Mutations in the Nucleolar Localization Signals in 2 Diamond-Blackfan Anemia Patients: Potential Insights into Pathophysiology." *Blood* 101 (12): 5039–45.
- Coucoravas, C., S. Dhanjal, S. Henriksson, S. Böhm, & Marianne Farnebo. 2016. "Phosphorylation of the Cajal Body Protein WRAP53 β by ATM Promotes Its Involvement in the DNA Damage Response." *RNA Biology*, October, 1–10.
- Crack, P. J., & J. M. Taylor. 2005. "Reactive Oxygen Species and the Modulation of Stroke." *Free Radical Biology and Medicine* 38 (11): 1433–44.

- Cuartero, M. I., I. Ballesteros, A. Moraga, F. Nombela, J. Vivancos, J. A. Hamilton, A. L. Corbi, I. Lizasoain, & M. A. Moro. 2013. "N2 Neutrophils, Novel Players in Brain Inflammation After Stroke: Modulation by the PPAR Agonist Rosiglitazone." *Stroke* 44 (12): 3498–3508.
- Cuartero, María I., Iván Ballesteros, Ignacio Lizasoain, & María A. Moro. 2015. "Complexity of the Cell–cell Interactions in the Innate Immune Response after Cerebral Ischemia." *Brain Research* 1623 (October): 53–62.
- Cuende, J, S. Moreno, J. P. Bolaños, & A. Almeida. 2008. "Retinoic Acid Downregulates Rae1 Leading to APCCdh1 Activation and Neuroblastoma SH-SY5Y Differentiation." *Oncogene* 27 (23): 3339–44.
- Culmsee, C., C. Zhu, S. Landshamer, B. Becattini, E. Wagner, M. Pellecchia, M. Pellecchia, K. Blomgren, & N. Plesnila. 2005. "Apoptosis-Inducing Factor Triggered by poly(ADP-Ribose) Polymerase and Bid Mediates Neuronal Cell Death after Oxygen-Glucose Deprivation and Focal Cerebral Ischemia." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25 (44): 10262–72.
- Delgado-Esteban, M., I. García-Higuera, C. Maestre, S. Moreno, & Angeles Almeida. 2013. "APC/C-Cdh1 Coordinates Neurogenesis and Cortical Size during Development." *Nature Communications* 4 (December): 2879.
- Dizdaroglu, Miral, & Pawel Jaruga. 2012. "Mechanisms of Free Radical-Induced Damage to DNA." *Free Radical Research* 46 (4). Taylor and Francis: 382–419.
- Dokal, I. 2011. "Dyskeratosis Congenita." *Hematology* 2011 (1): 480–86.
- Donnan, G. A., M. Fisher, M. Macleod, & Stephen M. Davis. 2008. "Stroke." *Lancet* 371 (9624): 1612–23.
- Downs, Jessica A., & Stephen P. Jackson. 2004. "A Means to a DNA End: The Many Roles of Ku." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5 (5): 367–78.
- Dröge, Wulf. 2002. "Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function." *Physiological Reviews* 82 (1): 47-95.
- Elder, J., M. Cortes, A. Rykman, J. Hill, S. Karuppagounder, D. Edwards, & R. R Ratan. 2013. "The Epigenetics of Stroke Recovery and Rehabilitation: From Polycomb to Histone Deacetylases." *Neurotherapeutics : The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 10 (4): 808–16.
- Ellul, J., S. Markoula, S. Marousi, A. Galidi, A. P. Kyritsis, P. Papathanasopoulos, & I. Georgiou. 2011. "Association of Endothelial Nitric Oxide Synthase Polymorphism G894T with Functional Outcome in Acute Stroke Patients." *Neurological Research* 33 (8): 835–40.

- Eltzschig, H. K., & T. Eckle. 2011. "Ischemia and Reperfusion—from Mechanism to Translation." *Nature Medicine* 17 (11): 1391–1401.
- Encinas, M., M. Iglesias, Y. Liu, H. Wang, V. Cefia, C. Gallego, & X. Comella. 2000. "Sequential Treatment of SH-SY5Y Cells with Retinoic Acid and Brain-Derived Neurotrophic Factor Gives Rise to Fully Differentiated, Neurotrophic Factor - Dependent Human Neuron-Like Cells." *Journal of Neurochemistry* 75: 991–1003.
- Fabbro, M., & B. R. Henderson. 2003. "Regulation of Tumor Suppressors by Nuclear-Cytoplasmic Shuttling." *Experimental Cell Research* 282 (2): 59–69.
- Faghihi, M. A., F. Modarresi, A. M. Khalil, D. E. Wood, B. G. Sahagan, T. E. Morgan, C. E. Finch, G. St. Laurent III, P. J. Kenny, & C. Wahlestedt. 2008. "Expression of a Noncoding RNA Is Elevated in Alzheimer's Disease and Drives Rapid Feed-Forward Regulation of β -Secretase." *Nature Medicine* 14 (7): 723–30.
- Famakin, B. M. 2014. "The Immune Response to Acute Focal Cerebral Ischemia and Associated Post-Stroke Immunodepression: A Focused Review." *Aging and Disease* 5 (5). JKL International LLC: 307–26.
- Farnebo, M. 2009. "Wrap53, a Novel Regulator of p53." *Cell Cycle* 8 (15):2343–46.
- Fernandez-Fernandez, S., A. Almeida, & Juan P. Bolaños. 2012. "Antioxidant and Bioenergetic Coupling between Neurons and Astrocytes." *Biochemical Journal* 443 (1):3-11.
- Fernández-Gómez, F. J., F. Hernández, L. Argandoña, M. F. Galindo, T. Segura, & J. Jordán. 2008. "[Pharmacology of Neuroprotection in Acute Ischemic Stroke]." *Revista de Neurología* 47 (5): 253–60.
- Filichia, E., H. Shen, X. Zhou, X. Qi, K. Jin, N. Greig, B. Hoffer, & Y. Luo. 2015. "Forebrain Neuronal Specific Ablation of p53 Gene Provides Protection in a Cortical Ischemic Stroke Model." *Neuroscience* 295 (June): 1–10.
- Fluri, F., M. K. Schuhmann, & C. Kleinschnitz. 2015. "Animal Models of Ischemic Stroke and Their Application in Clinical Research." *Drug Design, Development and Therapy* 9. Dove Press: 3445–54.
- Freund, A., F. L. Zhong, A. S. Venteicher, Z. Meng, T. D. Veenstra, J. Frydman, & S. E. Artandi. 2014. "Proteostatic Control of Telomerase Function through TRiC-Mediated Folding of TCAB1." *Cell* 159 (6): 1389–1403.
- Furukawa, K., W. Fu, Y. Li, W. Witke, D. J. Kwiatkowski, & M. P. Mattson. 1997. "The Actin-Severing Protein Gelsolin Modulates Calcium Channel and NMDA Receptor Activities & Vulnerability to Excitotoxicity in Hippocampal Neurons." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 17 (21): 8178–86.

- Garcia-Closas, M., V. Kristensen, A. Langerød, Y. Qi, M. Yeager, L. Burdett, R. Welch, *et al.* 2007. "Common Genetic Variation in TP53 and Its Flanking Genes, WDR79 and ATP1B2, and Susceptibility to Breast Cancer." *International Journal of Cancer* 121 (11): 2532-2538.
- Garcia, O., A. Almeida, L. Massieu, & J. P. Bolanos. 2005. "Increased Mitochondrial Respiration Maintains the Mitochondrial Membrane Potential and Promotes Survival of Cerebellar Neurons in an Endogenous Model of Glutamate Receptor Activation." *Journal of Neurochemistry* 92 (1): 183–90.
- Gardener, H., C. B. Wright, T. Rundek, & R. L. Sacco. 2015. "Brain Health and Shared Risk Factors for Dementia and Stroke." *Nature Reviews Neurology* 11 (11): 651–57.
- Garvin, S., K. Tiefenböck, L. Farnebo, L. K. Thunell, M. Farnebo, & K. Roberg. 2015. "Nuclear Expression of WRAP53 β Is Associated with a Positive Response to Radiotherapy and Improved Overall Survival in Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma." *Oral Oncology* 51(1): 24-30.
- Gebruers, Nick. 2011. "Secondary Edema in Patients with Stroke: Actigraphic and Volumetric Evaluation." *Secondary Edema in Patients With Stroke: Actigraphic and Volumetric Evaluation*.
- George, P. M., & G. K. Steinberg. 2015. "Novel Stroke Therapeutics: Unraveling Stroke Pathophysiology and Its Impact on Clinical Treatments." *Neuron* 87 (2): 297–309.
- Ghosh, S., C. Canugovi, J. S. Yoon, D. M. Wilson, D. L. Croteau, M. P. Mattson, & V. A. Bohr. 2015. "Partial Loss of the DNA Repair Scaffolding Protein, Xrcc1, Results in Increased Brain Damage and Reduced Recovery from Ischemic Stroke in Mice." *Neurobiology of Aging* 36 (7): 2319–30.
- Gomez-Sanchez, Jose C., Maria Delgado-Esteban, Irene Rodriguez-Hernandez, T. Sobrino, N. Perez de la Ossa, S. Reverte, J. P. Bolaños, R. Gonzalez-Sarmiento, J. Castillo, & A. Almeida. 2011. "The Human *Tp53 Arg72Pro* Polymorphism Explains Different Functional Prognosis in Stroke." *The Journal of Experimental Medicine* 208 (3): 429–37.
- Gorenkova, N., E. Robinson, D. J. Grieve, & Alexander Galkin. 2013. "Conformational Change of Mitochondrial Complex I Increases ROS Sensitivity during Ischemia." *Antioxidants and Redox Signaling* 19 (13): 1459–68.
- Goyal, M., B. K. Menon, W. H. van Zwam, D. W. J. Dippel, P. J. Mitchell, A. M. Demchuk, A. Dávalos, *et al.* 2016. "Endovascular Thrombectomy after Large-Vessel Ischaemic Stroke: A Meta-Analysis of Individual Patient Data from Five Randomised Trials." *The Lancet* 387 (10029): 1723–31.
- Gramatges, M. M., A. A. B., R. K. Moyzis, J.M. Buckingham, L.S. Cram, *et al.*, T. de

- Lange, *et al.* 2013. "Short Telomeres: From Dyskeratosis Congenita to Sporadic Aplastic Anemia and Malignancy." *Translational Research : The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 162 (6): 353–63.
- Gray, S. P, & K. A. M. Jandeleit-Dahm. 2015. "The Role of NADPH Oxidase in Vascular Disease, Hypertension, Atherosclerosis and Stroke." *Current Pharmaceutical Design* 21 (41): 5933–44.
- Guo, J., L. Yu, J. Zhang, N. Chen, M. Zhou, & L. He. 2014. "CRP Gene Polymorphism Predicts Post-Stroke Functional Outcome in Han Chinese." *Acta Neurologica Scandinavica* 129 (4): 263–68.
- Hashimoto, T., K. S., H. Ohata, K. Hasumi, & K. Honda. 2014. "Altered Gene Expression in an Embolic Stroke Model after Thrombolysis with Tissue Plasminogen Activator and Stachybotrys Microspora Triprenyl Phenol-7." *Journal of Pharmacological Sciences* 125 (1): 99–106.
- Hedström, E., C. Pederiva, J. Farnebo, B. Nodin, K. Jirström, D. J. Brennan, & M. Farnebo. 2015. "Downregulation of the Cancer Susceptibility Protein WRAP53 β in Epithelial Ovarian Cancer Leads to Defective DNA Repair and Poor Clinical Outcome." *Cell Death and Disease* 6 (10): e1892.
- Hekimi, S., J. Lapointe, & Y. Wen. 2011. "Taking A 'good' look at Free Radicals in the Aging Process." *Trends in Cell Biology* 21 (10): 569–76.
- Henriksson, S., & M. Farnebo. 2015. "On the Road with WRAP53 β : Guardian of Cajal Bodies and Genome Integrity." *Frontiers in Genetics* 6: 91.
- Henriksson, S., H. Rassoolzadeh, E. Hedström, C. Coucoravas, A. Julner, M. Goldstein, G. Imreh, *et al.* 2014. "The Scaffold Protein WRAP53B Orchestrates the Ubiquitin Response Critical for DNA Double-Strand Break Repair." *Genes and Development* 28 (24): 2726–34.
- Holloway, P. M., & F. N.E. Gavins. 2016. "Modeling Ischemic Stroke In Vitro: Status Quo and Future Perspectives." *Stroke* 47 (2): 561–69.
- Hoover, B. R., M. N. Reed, J. Su, R. D. Penrod, L. A. Kotilinek, M. K. Grant, R. Pitstick, *et al.* 2010. "Tau Mislocalization to Dendritic Spines Mediates Synaptic Dysfunction Independently of Neurodegeneration." *Neuron* 68 (6): 1067–81.
- Hu, Daoying, F. Serrano, T. D. Oury, & Eric Klann. 2006. "Aging-Dependent Alterations in Synaptic Plasticity and Memory in Mice That Overexpress Extracellular Superoxide Dismutase." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26 (15): 3933–41.
- Hung, M-C., & W.Link. 2011. "Protein Localization in Disease and Therapy." *Journal of Cell Science* 124 : 3381-3292.

- Huo, Y-N, W Chen, & X-X Zheng. 2015. "ROS, MAPK/ERK and PKC Play Distinct Roles in EGF-Stimulated Human Corneal Cell Proliferation and Migration." *Cellular and Molecular Biology* 61 (7): 6–11.
- Hurtado, O., I. Lizasoain, P. Fernández-Tomé, A. Álvarez-Barrientos, J. C. Leza, P. Lorenzo, & M. A. Moro. 2002. "TACE/ADAM17–TNF- α Pathway in Rat Cortical Cultures after Exposure to Oxygen–Glucose Deprivation or Glutamate." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 22 (5): 576–85.
- Huttner, H. B., O. Bergmann, M. Salehpour, A. Rácz, J. Tatarishvili, E. Lindgren, T. Csonka, *et al.* 2014. "The Age and Genomic Integrity of Neurons after Cortical Stroke in Humans." *Nature Neuroscience* 17 (6): 801–3.
- Iyama, T., & D.M. Wilson. 2013. "DNA Repair Mechanisms in Dividing and Non-Dividing Cells." *DNA Repair* 12: 620–36.
- Jády, B.E., X. Darzacq, K. E. Tucker, A. G. Matera, E. Bertrand, & Tamás Kiss. 2003. "Modification of Sm Small Nuclear RNAs Occurs in the Nucleoplasmic Cajal Body Following Import from the Cytoplasm." *The EMBO Journal* 22 (8): 1878–1888.
- Jády, B. E., P. Richard, E. Bertrand, & T. Kiss. 2006. "Cell Cycle-Dependent Recruitment of Telomerase RNA and Cajal Bodies to Human Telomeres." *Molecular Biology of the Cell* 17 (2): 944–54.
- Ji, A.R., S. Y. Ku, M. S. Cho, Y. Y. Kim, Y. J. Kim, S. K. Oh, S. H. Kim, S. Y. Moon, & Y.M. Choi. 2010. "Reactive Oxygen Species Enhance Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Mesendodermal Lineage." *Experimental and Molecular Medicine* 42 (3):175–86.
- Jimenez-Blasco, D., P. Santofimia-Castaño, A. Gonzalez, A. Almeida, & J. P. Bolaños. 2015. "Astrocyte NMDA Receptors' Activity Sustains Neuronal Survival through a Cdk5–Nrf2 Pathway." *Cell Death and Differentiation* 22 (11): 1877–89.
- Jin, R., L. Liu, S. Zhang, A. Nanda, & Guohong Li. 2013. "Role of Inflammation and Its Mediators in Acute Ischemic Stroke." *Journal of Cardiovascular Translational Research* 6 (5): 834–51.
- Karanjawala, Z. E., N. Murphy, D. R. Hinton, C. L. Hsieh, & Michael R. Lieber. 2002. "Oxygen Metabolism Causes Chromosome Breaks and Is Associated with the Neuronal Apoptosis Observed in DNA Double-Strand Break Repair Mutants." *Current Biology* 12: 397–402.
- Katayama, S., Y. Tomaru, T. Kasukawa, K. Waki, M. Nakanishi, M. Nakamura, H. Nishida, *et al.* 2005. "Antisense Transcription in the Mammalian Transcriptome." *Science* 309 (5740): 1564-1566.
- Khatri, R., A. M. McKinney, B. Swenson, & Vallabh Janardhan. 2012. "Blood-Brain

- Barrier, Reperfusion Injury, and Hemorrhagic Transformation in Acute Ischemic Stroke." *Neurology* 79 (13 Suppl 1): S52-7.
- Khorkova, O., A. J. Myers, J. Hsiao, & C. Wahlestedt. 2014. "Natural Antisense Transcripts." *Human Molecular Genetics* 23 (R1): R54-63.
- Khoshnam, S. E., W. Winlow, M. Farzaneh, Y. Farbood, & H. F. Moghaddam. 2017. "Pathogenic Mechanisms Following Ischemic Stroke." *Neurological Sciences* 38 (7): 1167-86.
- Kim, G. W., N. Noshita, T. Sugawara, & P. H. Chan. 2001. "Early Decrease in DNA Repair Proteins, Ku70 and Ku86, and Subsequent DNA Fragmentation After Transient Focal Cerebral Ischemia in Mice." *Stroke* 32 (6): 1401-7.
- Koizumi J., Yoshida Y., Nakazawa T., O. G. 1986. "Experimental Studies of Ischemic Brain Edema. A New Experimental Model of Cerebral Embolism in Rats in Which Recirculation Can Be Introduced in the Ischemic Area." *Japanese Journal of Stroke* 8: 1-8.
- Kruusvee, V., M. J. Lyst, C. Taylor, Ž. Tarnauskaitė, A. P. Bird, & A. G. Cook. 2017. "Structure of the MeCP2-TBLR1 Complex Reveals a Molecular Basis for Rett Syndrome and Related Disorders." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (16): E3243-50.
- Kuo, L. J, & L-X. Yang. 2008. "Gamma-H2AX - a Novel Biomarker for DNA Double-Strand Breaks." *In Vivo* 22 (3): 305-9.
- Lafarga, M., O. Tapia, A. M. Romero, & M. T. Berciano. 2016. "Cajal Bodies in Neurons." *RNA Biology*, September, 1-14.
- Lai, T. Weita, S. Zhang, & Y. T. Wang. 2014. "Excitotoxicity and Stroke: Identifying Novel Targets for Neuroprotection." *Progress in Neurobiology* 115: 157-188.
- Lan, Q., L. Zhang, M. Shen, W. J. Jo, R. Vermeulen, G. Li, C. Vulpe, *et al.* 2009. "Large-Scale Evaluation of Candidate Genes Identifies Associations between DNA Repair and Genomic Maintenance and Development of Benzene Hematotoxicity." *Carcinogenesis* 30(1): 50-58.
- Lau, C-k., J. L. Bachorik, & G. Dreyfuss. 2009. "Gemin5-snRNA Interaction Reveals an RNA Binding Function for WD Repeat Domains." *Nature Structural and Molecular Biology* 16 (5): 486-91.
- Lee, J.-H., H.-S. Kim, S.-J. Lee, & K.-T. Kim. 2007. "Stabilization and Activation of p53 Induced by Cdk5 Contributes to Neuronal Cell Death." *Journal of Cell Science* 120 (13): 2259-71.
- Lee, J. T., N. Lu, P. Avner, M. Prissette, D. Arnaud, B. Courtier, C. Cecchi, *et al.* 1999. "Targeted Mutagenesis of Tsix Leads to Nonrandom X Inactivation." *Cell* 99 (1).

Elsevier: 47–57.

- Lee, W-C., H-Y. Wong, Y-Y. Chai, C-W. Shi, N. Amino, S. Kikuchi, & S-H Huang. 2012. "Lipid Peroxidation Dysregulation in Ischemic Stroke: Plasma 4-HNE as a Potential Biomarker?" *Biochemical and Biophysical Research Communications* 425(4):842-847.
- Lehotský, J., R. Murín, A. Strapková, A. Uríková, Z. Tatarková, & P. Kaplán. 2004. "Time Course of Ischemia/reperfusion-Induced Oxidative Modification of Neural Proteins in Rat Forebrain." *General Physiology and Biophysics* 23 (4): 401–15.
- Leker, R. R., M. Aharonowiz, N. H. Greig, & H. Ovadia. 2004. "The Role of p53-Induced Apoptosis in Cerebral Ischemia: Effects of the p53 Inhibitor Pifithrin α ." *Experimental Neurology* 187 (2): 478–86.
- Lesuisse, C., & L. J. Martin. 2002. "Long-Term Culture of Mouse Cortical Neurons as a Model for Neuronal Development, Aging, and Death." *Journal of Neurobiology* 51 (1): 9–23.
- Li, P., X. Hu, Y. Gan, Y. Gao, W. Liang, & Jun Chen. 2011. "Mechanistic Insight into DNA Damage and Repair in Ischemic Stroke: Exploiting the Base Excision Repair Pathway as a Model of Neuroprotection." *Antioxidants and Redox Signaling* 14 (10): 1905–18.
- Lindgren, A. 2014. "Stroke Genetics: A Review and Update." *Journal of Stroke* 16 (3): 114.
- Liu. 2012. "Neuroprotection Targeting Ischemic Penumbra and beyond for the Treatment of Ischemic Stroke." *Neurological Research*, 331–37.
- Liu, D., D. L. Croteau, N. Souza-Pinto, M. Pitta, J. Tian, C. Wu, H. Jiang, *et al.* 2011. "Evidence That OGG1 Glycosylase Protects Neurons against Oxidative DNA Damage and Cell Death under Ischemic Conditions." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 31 (2): 680–92.
- Liu, K., L. Ding, Y. Li, H. Yang, C. Zhao, Y. Lei, S. Han, *et al.* 2014. "Neuronal Necrosis Is Regulated by a Conserved Chromatin-Modifying Cascade." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (38): 13960–65.
- Liu, P. K, C. Y. Hsu, M. Dizdaroglu, R. A. Floyd, Y. W. Kow, A. Karakaya, L. E. Rabow, & J-K. Cui. 1996. "Damage, Repair, and Mutagenesis in Nuclear Genes after Mouse Forebrain Ischemia–Reperfusion." *Journal of Neuroscience* 16 (21): 6795–6806.
- Longa, E. Z., P. R. Weinstein, S. Carlson, & R. Cummins. 1989. "Reversible Middle Cerebral Artery Occlusion without Craniectomy in Rats." *Stroke* 20 (February

1989): 84–91.

- Lopez-Fabuel, I., J. Le Douce, A. Logan, A. M. James, G. Bonvento, M. P. Murphy, A. Almeida, & J. P. Bolaños. 2016. "Complex I Assembly into Supercomplexes Determines Differential Mitochondrial ROS Production in Neurons and Astrocytes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (46): 13063–68.
- Luxford, C., R. T. Dean, & M. J. Davies. 2002. "Induction of DNA Damage by Oxidised Amino Acids and Proteins." *Biogerontology* 3: 95–102.
- Maestre, C., M. Delgado-Esteban, J. C. Gomez-Sanchez, J. P. Bolaños, & A. Almeida. 2008. "Cdk5 Phosphorylates Cdh1 and Modulates Cyclin B1 Stability in Excitotoxicity." *The EMBO Journal* 27 (20): 2736–45.
- Maguire, J., A. Thakkinstian, C. Levi, L. Lincz, L. Bisset, J. Sturm, R. Scott, S. Whyte, & J. Attia. 2011. "Impact of COX-2 rs5275 and rs20417 and GPIIIa rs5918 Polymorphisms on 90-Day Ischemic Stroke Functional Outcome: A Novel Finding." *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* 20 (2): 134–44.
- Mahmoudi, S., S. Henriksson, L. Farnebo, K. Roberg, & M. Farnebo. 2011. "WRAP53 Promotes Cancer Cell Survival and Is a Potential Target for Cancer Therapy." *Cell Death and Disease* 2(1):e114.
- Mahmoudi, S., S. Henriksson, M. Corcoran, C. Méndez-Vidal, K. G. Wiman, & M. Farnebo. 2009. "Wrap53, a Natural p53 Antisense Transcript Required for p53 Induction upon DNA Damage." *Molecular Cell* 33: 462–71.
- Mahmoudi, S., S. Henriksson, I. Weibrecht, S. Smith, O. Söderberg, S. Strömblad, K. G. Wiman, & M. Farnebo. 2010. "wrap53 Is Essential for Cajal Body Formation and for Targeting the Survival of Motor Neuron Complex to Cajal Bodies." *PLoS Biology* 8(11):e1000521.
- Manzanero, S., T. Santro, & T. V. Arumugam. 2013. "Neuronal Oxidative Stress in Acute Ischemic Stroke: Sources and Contribution to Cell Injury." *Neurochemistry International* 62 (5): 712–18.
- Mar, J., J. Álvarez-Sabín, J. Oliva, V. Becerra, M.Á. Casado, M. Yébenes, N. González-Rojas, et al. 2013. "Los Costes Del Ictus En España Según Su Etiología. El Protocolo Del Estudio CONOCES." *Neurología* 28 (6). Elsevier: 332–39.
- Marousi, S., J. Ellul, A. Antonacopoulou, C. Gogos, P. Papathanasopoulos, & M. Karakantza. 2011. "Functional Polymorphisms of Interleukin 4 and Interleukin 10 May Predict Evolution and Functional Outcome of an Ischaemic Stroke." *European Journal of Neurology* 18 (4): 637–43.
- Maynard, S., E. F. Fang, M. Scheibye-Knudsen, D. L. Croteau, & V. A. Bohr. 2015. "DNA Damage, DNA Repair, Aging, and Neurodegeneration." *Cold Spring Harbor*

- McKinnon, P. J. 2013. "Maintaining Genome Stability in the Nervous System." *Nature Neuroscience* 16 (11): 1523–29.
- Mędrek, K., P. Magnowski, B. Masojć, A. Chudecka-Głaz, B. Torbe, J. Menkiszak, M. Spaczyński, J. Gronwald, J. Lubiński, & Bohdan Górski. 2013. "Association of Common WRAP 53 Variant with Ovarian Cancer Risk in the Polish Population." *Molecular Biology Reports* 40: 2145–47.
- Mehta, S. L., N. Manhas, & Ram Raghubir. 2007. "Molecular Targets in Cerebral Ischemia for Developing Novel Therapeutics." *Brain Research Reviews* 54 (1): 34–66.
- Meng, S., L. Lin, S. Lama, M. Qiao, & U. I. Tuor. 2009. "Cerebral Expression of DNA Repair Protein, Ku70, and Its Association with Cell Proliferation Following Cerebral Hypoxia-Ischemia in Neonatal Rats." *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 27 (2): 129–34.
- Merlo, D, A. M. M. Di Stasi, P. Bonini, C. Mollinari, A. Cardinale, F. Cozzolino, W. Wisden, & E Garaci. 2005. "DNA Repair in Post-Mitotic Neurons: A Gene-Trapping Strategy." *Cell Death and Differentiation* 12: 307–9.
- Methner, C., E. T. Chouchani, G. Buonincontri, V. R. Pell, S. J. Sawiak, M. P. Murphy, & T. Krieg. 2014. "Mitochondria Selective S -Nitrosation by Mitochondria-Targeted S -Nitrosothiol Protects against Post-Infarct Heart Failure in Mouse Hearts." *European Journal of Heart Failure* 16 (7): 712–17.
- Miao, Y., & J. K. Liao. 2014. "Potential Serum Biomarkers in the Pathophysiological Processes of Stroke." *Expert Review of Neurotherapeutics* 14 (2): 173–85.
- Mladenov, E., & G. Iliakis. 2011. "Induction and Repair of DNA Double Strand Breaks: The Increasing Spectrum of Non-Homologous End Joining Pathways." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 711 (1–2): 61–72.
- Moraga, A., J. M. Pradillo, M. I. Cuartero, M. Hernandez-Jimenez, M. Osés, M. A. Moro, & I. Lizasoain. 2014. "Toll-like Receptor 4 Modulates Cell Migration and Cortical Neurogenesis after Focal Cerebral Ischemia." *The FASEB Journal* 28 (11): 4710–18.
- Moretti, A., F. Ferrari, & R. F. Villa. 2015. "Neuroprotection for Ischaemic Stroke: Current Status and Challenges." *Pharmacology and Therapeutics* 146 (February): 23–34.
- Moro, M.A, A. Cárdenas, O. Hurtado, J.C. Leza, & I Lizasoain. 2004. "Role of Nitric Oxide after Brain Ischaemia." *Cell Calcium* 36 (3–4): 265–75.

- Moro, M, A. Almeida, J. Bolaños, & Ignacio Lizasoain. 2005. "Mitochondrial Respiratory Chain and Free Radical Generation in Stroke." *Free Radical Biology and Medicine* 39 (10): 1291–1304.
- Morris, E. J., & H. M. Geller. 1996. "Induction of Neuronal Apoptosis by Camptothecin, an Inhibitor of DNA Topoisomerase-I: Evidence for Cell Cycle-Independent Toxicity." *Journal of Cell Biology* 134(3): 757-770.
- Morrison, R. S., & Y Kinoshita. 2000. "The Role of p53 in Neuronal Cell Death." *Cell Death and Differentiation* 7 (10): 868–79.
- Mozaffarian, D., E. J. Benjamin, A. S. Go, D. K. Arnett, M. J. Blaha, M. Cushman, S. R. Das, et al. 2016. *Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update a Report from the American Heart Association. Circulation*. Vol. 133.
- Mukhopadhyay, P., M. Rajesh, G. Haskó, B. J. Hawkins, M. Madesh, & P. Pacher. 2007. "Simultaneous Detection of Apoptosis and Mitochondrial Superoxide Production in Live Cells by Flow Cytometry and Confocal Microscopy." *Nature Protocols* 2 (9): 2295–2301.
- Murphy, M. P. 2016. "Understanding and Preventing Mitochondrial Oxidative Damage." *Biochemical Society Transactions* 44 (5): 1219–26.
- Nagy, Z., & S. Nardai. 2017. "Cerebral Ischemia/reperfusion Injury: From Bench Space to Bedside." *Brain Research Bulletin* 134 (September): 30–37.
- Nandakumar, Jayakrishnan, & Thomas R Cech. 2013. "Finding the End: Recruitment of Telomerase to Telomeres." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 14 (2): 69–82.
- Neuhaus, A. A., T. Rabie, B. A. Sutherland, M. Papadakis, G. Hadley, R. Cai, & A. M. Buchan. 2014. "Importance of Preclinical Research in the Development of Neuroprotective Strategies for Ischemic Stroke." *JAMA Neurology* 71 (5): 634.
- Nielsen, M., K. L. Lambertsen, B. H. Clausen, M. Meldgaard, N. H. Diemer, J. Zimmer, & B. Finsen. 2009. "Nuclear Translocation of Endonuclease G in Degenerating Neurons after Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion in Mice." *Experimental Brain Research* 194 (1): 17–27.
- Niki, E. 2009. "Lipid Peroxidation: Physiological Levels and Dual Biological Effects." *Free Radical Biology and Medicine* 47 (5): 469–84.
- NINDS, The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. 1995. "Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke." *New England Journal of Medicine* 333 (24): 1581–88.
- Panier, S., & S. J. Boulton. 2013. "Double-Strand Break Repair: 53BP1 Comes into Focus." *Nature Publishing Group* 15: 7–18.

- Pannunzio, N. R., S. Li, G. Watanabe, & M. R. Lieber. 2014. "Non-Homologous End Joining Often Uses Microhomology: Implications for Alternative End Joining." *DNA Repair* 17 (May): 74–80.
- Parathath, S. R., I. Gravanis, & S. E. Tsirka. 2007. "Nitric Oxide Synthase Isoforms Undertake Unique Roles during Excitotoxicity." *Stroke* 38 (6): 1938–45.
- Pederiva, C, S. Böhm, A. Julner, & M. Farnebo. 2016. "Splicing Controls the Ubiquitin Response during DNA Double-Strand Break Repair." *Cell Death and Differentiation* 23 (10): 1648–57.
- Perera, M. A, L. H. Cavallari, N. A. Limdi, E. R. Gamazon, A. Konkashbaev, R. Daneshjou, A. Pluzhnikov, *et al.* 2013. "Genetic Variants Associated with Warfarin Dose in African-American Individuals: A Genome-Wide Association Study." *Lancet* 382 (9894): 790–96.
- Peruzzotti-Jametti, L., M. Donegá, E. Giusto, G. Mallucci, B. Marchetti, & Stefano Pluchino. 2014. "The Role of the Immune System in Central Nervous System Plasticity after Acute Injury." *Neuroscience* 283: 210–21.
- Peter, M. E. 2011. "Programmed Cell Death: Apoptosis Meets Necrosis." *Nature* 471 (7338): 310–12.
- Pommier, Y. 2006. "Topoisomerase I Inhibitors: Camptothecins and beyond." *Nature Reviews Cancer* 6: 789–802.
- Qin, L., D. Jing, S. Parauda, J. Carmel, R. R. Ratan, F. S. Lee, & S. Cho. 2014. "An Adaptive Role for BDNF Val66Met Polymorphism in Motor Recovery in Chronic Stroke." *Journal of Neuroscience* 34 (7): 2493-2502.
- Quintana-Cabrera, R., S. Fernandez-Fernandez, V. Bobo-Jimenez, J. Escobar, J. Sastre, A. Almeida, & J. P. Bolaños. 2012. "γ-Glutamylcysteine Detoxifies Reactive Oxygen Species by Acting as Glutathione Peroxidase-1 Cofactor." *Nature Communications* 3 (March): 718.
- Raichle, M. E., & D. A. Gusnard. 2002. "Appraising the Brain's Energy Budget." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (16): 10237–39.
- Raingeaud, J, S. Gupta, J. S. Rogers, M. Dickens, J. Han, R. J. Ulevitch, & R. J. Davis. 1995. "Pro-Inflammatory Cytokines and Environmental Stress Cause p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation by Dual Phosphorylation on Tyrosine and Threonine." *The Journal of Biological Chemistry* 270 (13): 7420–26.
- Ramee, S. R., R. Subramanian, R. A. Felberg, K. L. McKinley, J. S. Jenkins, T. J. Collins, R. C. Dawson, & C. J. White. 2004. "Catheter-Based Treatment for Patients With Acute Ischemic Stroke Ineligible for Intravenous Thrombolysis." *Stroke* 35 (5):

e109–11.

- Ramon y Cajal, Santiago. 1903. "Un Sencillo Método de Coloración Selectiva Del Retículo Protoplasmático Y Sus Efectos En Los Diversos Órganos Nerviosos de Vertebrados E Invertebrados." *Trab. Lab. Invest. Biol.* 2: 129–221.
- Ramos-Cabrer, P., F. Campos, T. Sobrino, & J. Castillo. 2011. "Targeting the Ischemic Penumbra." *Stroke* 42 (1, Supplement 1): S7–11.
- Rao, X., D. Huang, X. Sui, G. Liu, X. Song, J. Xie, & D. Huang. 2014. "Overexpression of WRAP53 Is Associated with Development and Progression of Esophageal Squamous Cell Carcinoma." *PloS One* 9 (3). Public Library of Science: e91670.
- Rassoolzadeh, H., S. Böhm, E. Hedström, H. Gad, T. Helleday, S. Henriksson, & M. Farnebo. 2016. "Overexpression of the Scaffold WD40 Protein WRAP53β Enhances the Repair of and Cell Survival from DNA Double-Strand Breaks." *Cell Death and Disease* 7 (6): e2267.
- Rassoolzadeh, H., C. Coucoravas, & M. Farnebo. 2015. "The Proximity Ligation Assay Reveals That at DNA Double Strand Breaks WRAP53 Associates with H2AX and Controls Interactions between RNF8 and MDC1." *Nucleus* 6 (5): 417–24.
- Reisman, D., M. Greenberg, & V. Rotter. 1988. "Human p53 Oncogene Contains One Promoter Upstream of Exon 1 and a Second, Stronger Promoter within Intron 1." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 5146–50.
- Richard, P., X. Darzacq, E. Bertrand, B. E. Jádý, C. Verheggen, & T. Kiss. 2003. "A Common Sequence Motif Determines the Cajal Body-Specific Localization of Box H/ACA scaRNAs." *The EMBO Journal* 22 (16): 4283–93.
- Río-Espínola, A., I. Fernández-Cadenas, D. Giralt, A. Quiroga, M. Gutiérrez-Agulló, M. Quintana, P. Fernández-Álvarez, *et al.* 2012. "A Predictive Clinical-Genetic Model of Tissue Plasminogen Activator Response in Acute Ischemic Stroke." *Annals of Neurology* 72 (5): 716–29.
- Rodrigo, R., R. Fernández-Gajardo, R. Gutiérrez, J. M. Matamala, R. Carrasco, A. Miranda-Merchak, & W. Feuerhake. 2013. "Oxidative Stress and Pathophysiology of Ischemic Stroke: Novel Therapeutic Opportunities." *CNS and Neurological Disorders Drug Targets* 12 (5): 698–714.
- Rodríguez-Rodríguez, P., A. Almeida, & J. P. Bolaños. 2013. "Brain Energy Metabolism in Glutamate-Receptor Activation and Excitotoxicity: Role for APC/C-Cdh1 in the Balance Glycolysis/pentose Phosphate Pathway." *Neurochemistry International* 62 (5): 750–56.
- Rodríguez, C., T. Sobrino, J. Agulla, V. Bobo-Jiménez, M. E. Ramos-Araque, J. J. Duarte, J. C. Gómez-Sánchez, J. P. Bolaños, J. Castillo, & Á. Almeida. 2017.

- "Neovascularization and Functional Recovery after Intracerebral Hemorrhage Is Conditioned by the Tp53 Arg72Pro Single-Nucleotide Polymorphism." *Cell Death and Differentiation* 24 (1): 144–54.
- Romero, A. M., A. Palanca, M. Ruiz-Soto, J. Llorca, M. P. Marín, J. Renau-Piqueras, M. T. Berciano, & Miguel Lafarga. 2016. "Chronic Alcohol Exposure Decreases 53BP1 Protein Levels Leading to a Defective DNA Repair in Cultured Primary Cortical Neurons." *Neurotoxicity Research* 29 (1): 69–79.
- Rothwell, P.M, A. Algra, Z. Chen, H. C. Diener, B. Norrving, & Z. Mehta. 2016. "Effects of Aspirin on Risk and Severity of Early Recurrent Stroke after Transient Ischaemic Attack and Ischaemic Stroke: Time-Course Analysis of Randomised Trials." *Lancet* 388 (10042): 365–75.
- Saenger, A. K, & R.H Christenson. 2009. "Stroke Biomarkers: Progress and Challenges for Diagnosis, Prognosis, Differentiation, and Treatment." *Clinical Chemistry* 56 (1): 21–33.
- Saito, A., T. Hayashi, S. Okuno, T. Nishi, & P. H. Chan. 2005. "Modulation of p53 Degradation via MDM2-Mediated Ubiquitylation and the Ubiquitin-Proteasome System during Reperfusion after Stroke: Role of Oxidative Stress." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 25 (2): 267–80.
- Sauerwald, A., S. Sandin, G. Cristofari, S. H. W. Scheres, J. Lingner, & D. Rhodes. 2013. "Structure of Active Dimeric Human Telomerase." *Nature Structural and Molecular Biology* 20 (4): 454–60.
- Schildkraut, J. M., E. L. Goode, M. A. Clyde, E. S. Iversen, P. G. Moorman, A. Berchuck, J. R. Marks, et al. 2009. "Single Nucleotide Polymorphisms in the TP53 Region and Susceptibility to Invasive Epithelial Ovarian Cancer." *Cancer Research*.
- Schmidt, J. C, & T. R. Cech. 2015. "Human Telomerase: Biogenesis, Trafficking, Recruitment, and Activation." *Genes and Development* 29 (11): 1095–1105.
- Shahjouei, S., P. Y. Cai, S. Ansari, S. Sharififar, H. Azari, S. Ganji, & R. Zand. 2016. "Middle Cerebral Artery Occlusion Model of Stroke in Rodents: A Step-by-Step Approach." *Journal of Vascular and Interventional Neurology* 8 (5): 1–8.
- Shefa, U., S. G. Yeo, M. S. Kim, I.n O. Song, J. Jung, N. Y. Jeong, & Y. Huh. 2017. "Role of Gasotransmitters in Oxidative Stresses, Neuroinflammation, and Neuronal Repair." *BioMed Research International* 2017: 1–15.
- Shirley, R., E. Ord, & L. Work. 2014. "Oxidative Stress and the Use of Antioxidants in Stroke." *Antioxidants* 3 (3): 472–501.
- Silwal-Pandit, L., H. Russnes, E. Borgen, V. Skarpeteig, H. K. M. Vollan, E. Schlichting, et al. 2015. "The Sub-Cellular Localization of WRAP53 Has Prognostic Impact in Breast Cancer." *PLoS ONE* 10 (10): e0139965.

- Siniscalchi, A., L. Gallelli, G. Malferrari, D. Pirritano, R. Serra, E. Santangelo, & G. De Sarro. 2014. "Cerebral Stroke Injury: The Role of Cytokines and Brain Inflammation." *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology* 25 (2). De Gruyter: 131–37.
- Sleutels, F., R. Zwart, & D. P. Barlow. 2002. "The Non-Coding Air RNA Is Required for Silencing Autosomal Imprinted Genes." *Nature* 415 (6873): 810–13.
- Smith, T. F., C. Gaitatzes, K. Saxena, E. J. Neer, R.J. Duronio, J.L. Gordon, M.S. Boguski, et al. 1999. "The WD Repeat: A Common Architecture for Diverse Functions." *Trends in Biochemical Sciences* 24 (5): 181–85.
- Smith, W. S., G. Sung, J. Saver, R. Budzik, G. Duckwiler, D. S. Liebeskind, H. L. Lutsep, et al. 2008. "Mechanical Thrombectomy for Acute Ischemic Stroke: Final Results of the Multi MERCI Trial." *Stroke* 39 (4): 1205–12.
- Sommer, Clemens J. 2017. "Ischemic Stroke: Experimental Models & Reality." *Acta Neuropathologica* 133 (2). Springer: 245–61. doi:10.1007/s00401-017-1667-0.
- Song, Mingke, & Shan Ping Yu. 2014. "Ionic Regulation of Cell Volume Changes and Cell Death after Ischemic Stroke." *Translational Stroke Research* 5 (1): 17–27. doi:10.1007/s12975-013-0314-x.
- Staněk, David. 2016. "Cajal Bodies and snRNPs - Friends with Benefits." *RNA Biology*, September. Taylor and Francis, 1–9. doi:10.1080/15476286.2016.1231359.
- Suberbielle, E., P. E. Sanchez, A. V. Kravitz, X. Wang, K. Ho, K. Eilertson, N. Devidze, A.C. Kreitzer, & L. Mucke. 2013. "Physiologic Brain Activity Causes DNA Double-Strand Breaks in Neurons, with Exacerbation by Amyloid- β ." *Nature Neuroscience* 16 (5): 613–21.
- Sugawara, T., N. Noshita, A. Lewén, G. W. Kim, & P. H. Chan. 2001. "Neuronal Expression of the DNA Repair Protein Ku 70 After Ischemic Preconditioning Corresponds to Tolerance to Global Cerebral Ischemia." *Stroke* 32: 2388–93.
- Sun, C., X. Luo, Y. Gou, L. Hu, K. Wang, C. Li, Z. Xiang, et al. 2014. "TCAB1: A Potential Target for Diagnosis and Therapy of Head and Neck Carcinomas" 13: 1–12.
- Sutherland, B. A., Je. Minnerup, J. S. Balami, Fr. Arba, A. M. Buchan, & C. Kleinschnitz. 2012. "Neuroprotection for Ischaemic Stroke: Translation from the Bench to the Bedside." *International Journal of Stroke* 7 (5): 407–18.
- Taylor, R. C., S. P. Cullen, & S. J. Martin. 2008. "Apoptosis: Controlled Demolition at the Cellular Level." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (3): 231–41.
- Terasaki, Y, Y. Liu, K. Hayakawa, L. D. Pham, E. H. Lo, X. Ji, & K. Arai. 2014. "Mechanisms of Neurovascular Dysfunction in Acute Ischemic Brain." *Current Medicinal Chemistry* 21 (18). NIH Public Access: 2035–42.

- Tiefenbock-Hansson, K., A. Haapaniemi, L. Farnebo, B. Palmgren, J. Tarkkanen, M. Farnebo, E. Munck-Wikland, A. Mäkitie, S. Garvin, & K. Roberg. 2017. "WRAP53b, Survivin and p16INK4a Expression as Potential Predictors of Radiotherapy/chemoradiotherapy Response in T2N0-T3N0 Glottin Laryngeal Cancer." *Oncology Reports* 38 (4): 2062–68.
- Tomlinson, R. L, T. D. Ziegler, T. Supakorndej, R. M. Terns, & M. P. Terns. 2006. "Cell Cycle-Regulated Trafficking of Human Telomerase to Telomeres." *Molecular Biology of the Cell* 17 (2). American Society for Cell Biology: 955–65..
- Traylor, M., M. Farrall, E. G. Holliday, C. Sudlow, J. C. Hopewell, Y. Cheng, M. Fornage, *et al.* 2012. "Genetic Risk Factors for Ischaemic Stroke and Its Subtypes (the METASTROKE Collaboration): A Meta-Analysis of Genome-Wide Association Studies." *The Lancet. Neurology* 11 (11): 951–62.
- Tretyakova, N. Y., A. Groehler, S. Ji, & S. Ji. 2015. "DNA-Protein Cross-Links: Formation, Structural Identities, and Biological Outcomes." *Accounts of Chemical Research* 48 (6): 1631–44.
- Tycowski, K. T., M. D. Shu, A. Kukoyi, & Joan A. Steitz. 2009. "A Conserved WD40 Protein Binds the Cajal Body Localization Signal of scaRNP Particles." *Molecular Cell* 34(1):47-57.
- Tycowski, K.T., M. D. Shu, A. Kukoyi, & J. A Steitz. 2009. "A Conserved WD40 Protein Binds the Cajal Body Localization Signal of scaRNP Particles." *Molecular Cell* 34 (1): 47–57.
- Veas-Pérez De Tudela, M., M. Delgado-Esteban, C. Maestre, V. Bobo-Jiménez, D. Jiménez-Blasco, R. Vecino, J. P. Bolaños, & A. Almeida. 2015. "Regulation of Bcl-xL–ATP Synthase Interaction by Mitochondrial Cyclin B1–Cyclin-Dependent Kinase-1 Determines Neuronal Survival." *Journal of Neuroscience* 35 (25): 9287–9301.
- Veas-Pérez de Tudela, M., C. Maestre, M. Delgado-Esteban, J. P. Bolaños, & A. Almeida. 2016. "Cdk5-Mediated Inhibition of APC/C-Cdh1 Switches on the Cyclin D1-Cdk4-pRb Pathway Causing Aberrant S-Phase Entry of Postmitotic Neurons." *Scientific Reports* 5 (1): 18180.
- Venteicher, A.S., E. B. Abreu, Z. Meng, K. E. McCann, R. M. Terns, T. D. Veenstra, M. P. Terns, & S. E. Artandi. 2009. "A Human Telomerase Holoenzyme Protein Required for Cajal Body Localization and Telomere Synthesis." *Science* 323 (5914): 644–48.
- Venteicher, A. S., & S. E. Artandi. 2009. "TCAB1: Driving Telomerase to Cajal Bodies." *Cell Cycle* 8(9): 1329-1331.
- Wagner, E. G. H., & R. W. Simons. 1994. "Antisense RNA Control in Bacteria, Phages, and Plasmids." *Annual Review of Microbiology* 48 (1): 713–42.

- Weinstein, J. R., J. Schulze, R. V. Lee, H. Phillips, D. Zierath, P. Tanzi, D. Shibata, K. C. Cain, & K. J. Becker. 2014. "Functional Polymorphisms in Toll-like Receptor 4 Are Associated with Worse Outcome in Acute Ischemic Stroke Patients." *NeuroReport* 25 (8): 1.
- Wight, M., & A. Werner. 2013. "The Functions of Natural Antisense Transcripts." *Essays In Biochemistry* 54 (May): 91–101.
- Williams, G, J. M. Hammel, S, K. Radhakrishnan, D. Ramsden, S. P. Lees-Miller, & J. A Tainer. 2014. "Structural Insights into NHEJ: Building up an Integrated Picture of the Dynamic DSB Repair Super Complex, One Component and Interaction at a Time." *DNA Repair* 17 (May): 110–20.
- Wityk, R. J., M. S. Pessin, R. F. Kaplan, & L. R. Caplan. 1994. "Serial Assessment of Acute Stroke Using the NIH Stroke Scale." *Stroke* 25 (2): 362–65.
- Woodruff, T. M, J. Thundyil, S. Tang, C. G. Sobey, S. M. Taylor, T. V. Arumugam, C. A. Molina, *et al.* 2011. "Pathophysiology, Treatment, and Animal and Cellular Models of Human Ischemic Stroke." *Molecular Neurodegeneration* 6 (1): 11.
- Xu, C., & J. Min. 2011. "Structure and Function of WD40 Domain Proteins." *Protein and Cell* 2 (3): 202–14.
- Xu, Y. 2003. "Regulation of p53 Responses by Post-Translational Modifications." *Cell Death and Differentiation* 10 (4): 400–403.
- Yan, Liang-Jun. 2014. "Protein Redox Modification as a Cellular Defense Mechanism against Tissue Ischemic Injury." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014. Hindawi: 343154.
- Yuan, J., M. Lipinski, A. Degterev, A. Mitani, K. Kataoka, N. Heintz, G.G. Poirier, *et al.* 2003. "Diversity in the Mechanisms of Neuronal Cell Death." *Neuron* 40 (2): 401–13.
- Zhang, H., D. Wang, G. Adell, & X. Sun. 2012. "WRAP53 Is an Independent Prognostic Factor in Rectal Cancer- a Study of Swedish Clinical Trial of Preoperative Radiotherapy in Rectal Cancer Patients." *BMC Cancer* 12 (July): 294.
- Zhong, F., S. A. Savage, M. Shkreli, N. Giri, L. Jessop, Timothy Myers, R. Chen, B. P. Alter, & S. E. Artandi. 2011. "Disruption of Telomerase Trafficking by TCAB1 Mutation Causes Dyskeratosis Congenita." *Genes and Development* 25: 11-16.
- Zio, D., M. Bordi, & F. Cecconi. 2012. "Oxidative DNA Damage in Neurons: Implication of Ku in Neuronal Homeostasis and Survival." *International Journal of Cell Biology* 2012: 8.
- Zou, X., X. Hu, J. Ma, T. Li, Z. Ye, & Y. Wu. 2016. "Genome-Wide Analysis of WD40 Protein Family in Human." *Scientific Reports* 6 (December): 39262.