



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante

Dr. Angara Zambrano A.

Instituto de Bioquímica y

Microbiología

Facultad de Ciencias

**–ESTUDIO DEL EFECTO DEL DAÑO AL ADN SOBRE
GENES DE PLASTICIDAD SINÁPTICA Y POSIBLES
MECANISMOS ASOCIADOS”**

Tesis de Grado presentada como parte
de los requisitos para optar al grado de
Licenciado en Bioquímica y Título
Profesional de *Bioquímico*

JOHANA SOLANGE SPIES MALDONADO

VALDIVIA – CHILE

2015

Le dedico éste logro a mi madre y hermano, quienes han sido mi fortaleza y la luz que ilumina mi camino frente a todas las metas que me he propuesto a lo largo de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis fue desarrollada en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Bioquímica y Microbiología (Universidad Austral de Chile, Valdivia). La realización de éste trabajo fue llevada a cabo gracias al financiamiento otorgado por los Proyectos FONDECYT 1141067 y FONDECYT 11130308.

Agradezco principalmente a mi tutora, la Dra Angara Zambrano quien me permitió formar parte de su laboratorio desviándome de su línea de investigación y entregándome apoyo constantemente para el desarrollo de mi proyecto. Muchas gracias por la alegría, energía y cariño entregados cada día. También agradecer por la grata compañía a todas mis compañeras de laboratorio, las “Angarita’s Lab”, Constanza Cárcamo, Gabriela Vargas y Paola Jara, con quienes compartimos todos nuestros altos y bajos a lo largo de nuestras tesis.

Un agradecimiento especial a la Sra Rosa María Carrasco, más conocida como “tia Rosita”, una excelente persona, que nunca se hizo problemas cuando uno le solicitaba favores, eficiente, siempre alegre y dispuesta a ayudar; quien me acompañó siempre, dando consejos y subiendo el ánimo.

No puedo dejar de mencionar a mis amigos y compañeros, quienes me han apoyado y entregado ánimo para seguir adelante las veces que los he necesitado; Cynthia Tapia, Claudia Gatica, Camila Martínez, Consuelo Solis, Carolina Hernández, Catalina Campos, Marjorie Araya y Camila Blaña.

Gracias a todas las personas que han formado parte de mi preparación académica, profesores, secretarias y funcionarios de la biblioteca, la cual fue mi hogar durante 5 años. Finalmente, agradecer a todas aquellas personas que siempre me entregaron buenas vibras, aunque sea con una sonrisa.

ÍNDICE GENERAL

	Página
1. RESUMEN	1
1.1 SUMMARY	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 PROPUESTA DE LA INVESTIGACIÓN	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1 REACTIVOS Y CULTIVO CELULAR	22
3.2 ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR	22
3.3 ACTIVACIÓN DE MECANISMOS DE RESPUESTA DE DAÑO AL ADN Y LOCALIZACIÓN DE CRTCS	22
3.4 ELECTROFORESIS E INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOTTING	23
3.5 EXTRACCIÓN DE ARN, RT-PCR Y q-PCR	23
3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	24
4. RESULTADOS	26
4.1 LA EXPOSICIÓN A ESTRÉS GENOTÓXICO DE CÉLULAS N2a	26

ALTERA LA VIABILIDAD CELULAR E INDUCE ACTIVACIÓN DE p-ATM	
4.2 ESTANDARIZACIÓN DE PARTIDORES PARA qPCR	32
4.3 LA EXPRESIÓN DE GENES DE PLASTICIDAD SE VE ALTERADA FRENTE A TRATAMIENTOS CON ETOPÓSIDO.	37
4.4 ETOPÓSIDO ALTERA LA LOCALIZACIÓN DE CRTC1 Y CRTC2 EN LA CÉLULA	39
5. DISCUSIÓN	41
6. BIBLIOGRAFÍA	48

INDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1: Los DSBs promueven la diferenciación en precursores de linfocitos B y células madres neurales (NSC)	6
FIGURA 2: Esquema del mecanismo de DDR frente a DSBs	7
FIGURA 3: Regulación transcripcional de Arc, transporte y acoplamiento.	14
FIGURA 4: Mecanismo de activación de CREB.	16
FIGURA 5: Regulación de la activación de CREB y sus genes blancos	18
FIGURA 6: Concentraciones crecientes de Etopósido afectan la viabilidad celular en células N2a	27
FIGURA 7: Etopósido induce activación de p-ATM en células N2a	31
FIGURA 8: Estandarización de partidores de Ciclofilina utilizados en qPCR	33
FIGURA 9: Estandarización de partidores de Arc utilizados en qPCR	34
FIGURA 10: Estandarización de partidores de BDNF utilizados en qPCR	35
FIGURA 11: Etopósido 20 μ M induce el aumento de expresión de genes de plasticidad en células N2a	38
FIGURA 12: Etopósido altera la localización de CRT1 y CRT2 en células N2a	40

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla I: Resumen de los partidores utilizados en qPCR	25
Tabla II: Viabilidad celular frente a tratamientos con etopósido en células N2a.	29

LISTA DE ABREVIATURAS

AD	: Enfermedad de Alzheimer
ADNmt	: ADN mitocondrial
AMPAR	: Receptor de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
ATM	: Ataxia telangiectasia mutada
BDNF	: Factor neurotrófico derivado del cerebro
BSA	: Albúmina sérica de bovino
CBP	: proteína de unión a CREB
CRE	: Elementos de respuesta a AMPc
CREB	: Proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc
CRTC	: Coactivadores transcripcionales regulados por CREB
CSR	: Recombinación de cambio de clase
DDR	: Respuesta al daño del ADN
DMEM	: Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	: Dimetilsulfóxido
DSB	: Quiebre de doble hebra de ADN
EDTA	: Ácido etilendiaminotetracético
E-LTP	: Potenciación a largo plazo temprana
EROs	: Especies reactivas de oxígeno
ETO	: Etopósido
FSK	: Forskolina
GPCRs	: Receptores acoplados a proteína G
HD	: Enfermedad de Huntington

HEPES	: [N-(2-hidroxietil) piperazina-N`-(2-ácido etansulfónico)]
HFS	: Estimulación aferente de alta frecuencia
LDP	: Depresión a largo plazo
L-LTP	: Potenciación a largo plazo tardía
LTP	: Potenciación a largo plazo
mRNP	: Ribonucleoproteína mensajera o ribonucleoproteína de transporte
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio
NSCs	: Células madres neurales
PBS	: Tampón fosfato salino
PD	: Enfermedad de Parkinson
PTMs	: Modificaciones post- traduccionales
qPCR	: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RT-PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
SDS-PAGE	: Electroforesis en gel de poliacrilamida en condición desnaturalante
SHM	: Hipermutación somática
Tm	: Temperatura de fusión
Wt	: Wild type (de tipo salvaje)

1. RESUMEN

El daño al DNA es un tipo de estrés celular que ha sido implicado en el desarrollo de muchos desórdenes neurológicos, dentro de los más conocidos, la enfermedad de Huntington, Parkinson y Alzheimer. Se ha establecido una estrecha relación entre los síntomas de éstas enfermedades y la deficiencia de los mecanismos de reparación de daño al ADN. La respuesta al daño del ADN (DDR) regula varias cascadas de señalización celular, regulando la activación de factores de transcripción como CREB y sus co-activadores en varios modelos celulares; sin embargo, a nivel neuronal aún es ambiguo. CREB se encuentra íntimamente relacionado con procesos de neurodesarrollo, plasticidad neuronal y neuroprotección, y su desregulación se ha asociado a enfermedades con desórdenes cognitivos. Este factor de transcripción es regulado mediante muchas vías, entre las que destaca la asociación con sus co-activadores CRTCs. CRTC1 es el más abundante en cerebro y por lo tanto el más estudiado. La expresión de genes de plasticidad sináptica requiere de CRTC1, siendo crítica su expresión en varios aspectos de función cerebral. El gen de plasticidad BDNF, modula la formación de memoria y potenciación a largo plazo (LTP), mecanismo relevante para la eficaz actividad sináptica. En neuronas, CRTC2 se expresa en menor proporción que CRTC1, por lo que no ha sido bien estudiado. En estudios recientes se evidencia que, si bien la abundancia de CRTC2 es baja en neuronas, su actividad no es menor respecto a CRTC1. A pesar de que está determinado que en enfermedades neurodegenerativas se presenta una disfunción progresiva, en su mayoría, consecuencia de acumulación de daños, aún no se establece a ciencia cierta la relación entre el daño al ADN y la expresión de genes de plasticidad. Nuestros resultados muestran que en células N2a, el tratamiento con etopósido 20 μ M activa los mecanismos de DDR, lo que se ve reflejado en un aumento en la fosforilación de ATM. Interesantemente, este tratamiento induce un incremento de la expresión de BDNF luego de 1 hora de exposición. Se observó además, una modificación de la localización de los CRTCs en la célula en el mismo periodo de tiempo, sugiriendo que la generación de DSBs desencadena la modulación de los patrones de expresión de genes de plasticidad, posiblemente mediado por CRTCs. Será interesante profundizar en un futuro sobre los posibles mecanismos moleculares involucrados en la expresión de estos genes en respuesta a daño, principalmente en modelos neurodegenerativos.

1.1 ABSTRACT

DNA damage is a type of cellular stress and damage that has been implicated in the development of many neurological disorders, such as Huntington disease, Parkinson disease and Alzheimer disease. It also has demonstrated a close relationship between symptoms of named diseases with inadequate mechanisms to repair DNA damage. DNA damage response (DDR) regulates various cell signaling cascades, highlighting the regulation of transcription factors such as CREB and its co-activators in several cellular models. However, at neuronal level is still unclear. CREB is closely related to neurodevelopmental processes, neuronal plasticity, neuroprotection; and its deregulation has been associated with several cognitive disorders. In this way, CREB is regulated by many routes. Its most evident association with CRTCs co-activators. CRTC1 is the most abundant in the brain, therefore, the most studied. Gene expression of neuronal plasticity requires CRTC1, which sets its expression as critical in several aspects of brain function. BDNF is a gene involved in the formation of memory and long-term potentiation (LTP), a relevant mechanism to effective synaptic activity. In neurons, CRTC2 is expressed by less than CRTC1. Meanwhile it has been determined that a progressive dysfunction is present in neurodegenerative diseases, mostly due to accumulation of damage, the direct link between DNA damage and gene expression plasticity has not yet been established with certainty. Our results show that in N2a cells, treatment with 20 μ M etoposide active DDR mechanisms, which is reflected in increased phosphorylation of ATM. Interestingly, this treatment induces increased expression of BDNF after 1 hour exposure. It was also observed a modification of CRTCs localization in the cell at the same time period, suggesting that DSBs generating triggers the modulation of gene expression patterns of plasticity, possibly mediated by CRTCs. It will be interesting to deepen in the future on the possible molecular mechanisms involved in the expression of these genes in response to damage, especially in neurodegenerative models.

2. INTRODUCCIÓN

La molécula de ADN se encuentra constantemente expuesta a una gran variedad de lesiones, por lo cual la célula, con el objetivo de mantener la estabilidad genómica, se encuentra preparada para responder a daños mediante la activación de los puntos de control para el arresto del ciclo celular y mecanismos de reparación. Las lesiones en el ADN inducen la activación de la “respuesta al daño de ADN” (DDR, del inglés DNA Damage Response), la cual, es una vía de traducción de señales que tiene la capacidad de sensor daño al ADN y estrés de replicación para finalmente activar una respuesta que entregue protección para la célula y así, disminuir riesgos posteriores debido a su acumulación. Es importante que las lesiones al ADN sean rápidamente reconocidas por éste mecanismo para así mantener la integridad del genoma. (Ciccía & Elledge, 2010; Jalal *et al*, 2011)

Los mecanismos de DDR están conformados diversas vías de señalización; existen 3 quinasas importantes en éste mecanismo, la quinasa dependiente de ADN (DNA-PKcs), ATM (ataxia telangiectasia mutada) y ATR (ataxia telangiectasia y Rad3 relacionada). Las tres se encargan de sensor daño mediante interacción proteína-proteína, siendo reclutadas en el sitio de la lesión. DNA-PKcs y ATM responden directamente a daños en la doble hebra y ATR se encuentra involucrada en el amplio espectro de las lesiones al ADN. (Sirbu & Cortez, 2014)

Los mecanismos de reparación del ADN son procesos altamente conservados en la célula, la vía DDR tiene 5 principales pasos bien definidos: inicialmente el “reconocimiento”, proceso clave para la célula, debido a que necesita tener los mecanismos para detectar la amplia variedad de lesiones existentes. Seguido por el “reclutamiento de proteínas de puntos de control y de reparación”, el cual consiste principalmente en el reclutamiento de proteínas de reconocimiento

en el sitio de la lesión. Luego, el “procesamiento” en el cual se inicia la respuesta de daño al ADN; y la “activación de los puntos de control”, que ocurre inmediatamente después del reclutamiento de las proteínas involucradas en los puntos de control. Finalmente, se lleva a cabo el proceso de “reparación”, el cual consiste en dos tipos de reparaciones; uno se dirige a quiebres en una hebra de ADN (SSB, del inglés single-strand breaks) y el otro a quiebres de la doble hebra de ADN (DSBs, del inglés double-strand breaks). Para los SSBs se realiza la escisión de la lesión y posteriormente una re-síntesis del ADN dañado. Por otra parte, el mecanismo de reparación de daños a la doble hebra involucra reparación por recombinación homóloga (HR, del inglés homologous recombination) y por recombinación no homóloga (NHEJ, del inglés non-homologous end joining). (Barnum & O’Connell, 2015; Jackson & Bartek, 2009)

Los DSBs son considerados dentro de las lesiones más citotóxicas y catastróficas para la célula, por lo tanto, son una gran amenaza para la estabilidad genómica de las células dañadas. (Stracker *et al*, 2013). Una deficiencia en la reparación podría desencadenar en la pérdida de grandes porciones de material genético y resultar en la transformación, e incluso muerte celular. (Barnum & O’Connell, 2015) Se ha asociado este tipo de lesiones a una gran variedad de enfermedades, ya sea en el desarrollo de cáncer, enfermedades neurológicas e inmunológicas, entre otros (Frappart & McKinnon, 2008; Canugovi *et al*, 2013).

También se encuentran relacionados a procesos naturales para la célula, tales como, el desarrollo y función del sistema inmune adaptativo en vertebrados, el cual requiere una inducción programada y subsecuente reparación de DSBs durante el rearreglo del gen del receptor de antígeno. Durante la diferenciación de células B, ocurre la recombinación V (variable), D (diversidad) y J (unión) que ocurre durante el evento de diversificación de anticuerpos y meiosis

en sistemas eucarióticos para generar una elevada variedad genética dentro de los gametos. Luego de ello, las células B inmaduras emigran de la médula ósea e ingresan a la circulación dirigiéndose a tejidos linfoides en el cuerpo, generando el centro germinal (GC, germinal center), donde ocurre la recombinación de cambio de clase (CSR, del inglés class switch recombination) e hipermutación somática (SHM, del inglés somatic hypermutation). En el GC, los DSBs permiten la expresión de anticuerpos de alta afinidad o diferentes isotipos producidos por las células plasmáticas. Interesantemente, en células neuronales los DSBs también cumplen un rol en diferenciación, según Sherman y colaboradores (2011), se ha sugerido asociación entre la señalización de DDR mediado por p53 y la diferenciación de células madres (NSC) o precursores neuronales. (Iyama & Wilson III, 2013; Sherman *et al*, 2011) (**Figura 1**)

Como se mencionó anteriormente, el actor principal dentro de este mecanismo de respuesta de daño a la doble hebra de ADN es ATM. Esta proteína es una quinasa serina/treonina de 350 kDa, perteneciente a la superfamilia de las quinasas tipo fosfatidilinositol 3 quinasa (PIKK, del inglés phosphatidylinositol 3- kinasa- like kinasa) que se encuentra como dímero inactivo, es reclutado por el complejo Mre11-Rad50-Nbs1 (complejo MRN) en el sitio del DSB, se autofosforila y separa generando dos monómeros catalíticamente activos de ATM. Luego de su activación, inicia una cascada de señalización en la cual se encarga de amplificar la señal fosforilando varios sustratos río abajo y consecuentemente, llevando las células a la reparación mediante el arresto transiente del ciclo celular, senescencia mediante un arresto estable del ciclo celular o a muerte celular por apoptosis (Korwek *et al*, 2012; Ditch & Paull, 2012) (**Figura 2**)

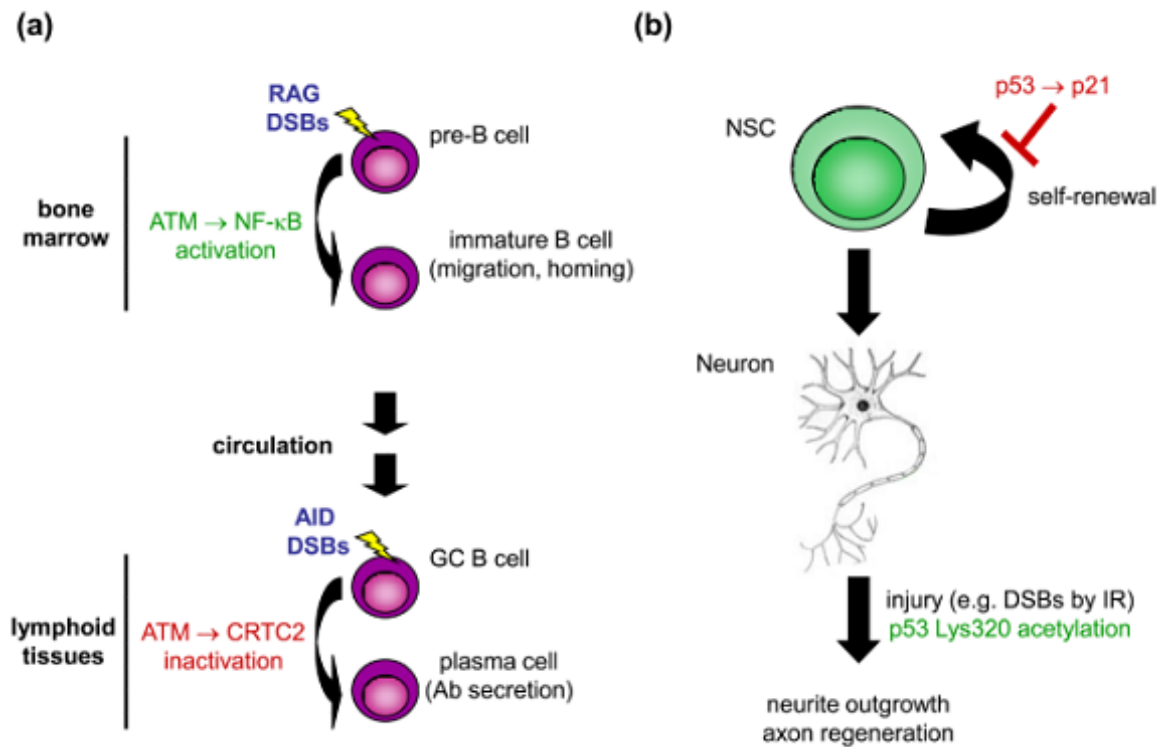


Figura 1. Los DSBs promueven la diferenciación en precursores de linfocitos B y células madres neurales (NSC) — A) Durante el desarrollo de la célula B, los DSBs de ADN generado por endonucleasas RAG en la células pre-B de la médula ósea, o por AID en las células B del centro germinal de los tejidos linfoides, lo cual activa el programa de expresión génica que promueve la diferenciación de linaje funcional, tales como migración celular, seguimiento y secreción de anticuerpos. B) La señalización p53→p21 río abajo de los DSBs inhibe la autorenovación de las NSC. El daño en las células precursoras neuronales, como los DSBs generados por IR, activan la regeneración axonal y crecimiento neurítico dependiente de p53. El texto verde indica incremento o activación y el texto en rojo indica disminución o inactivación. (Modificado de Sherman *et al*, 2011)

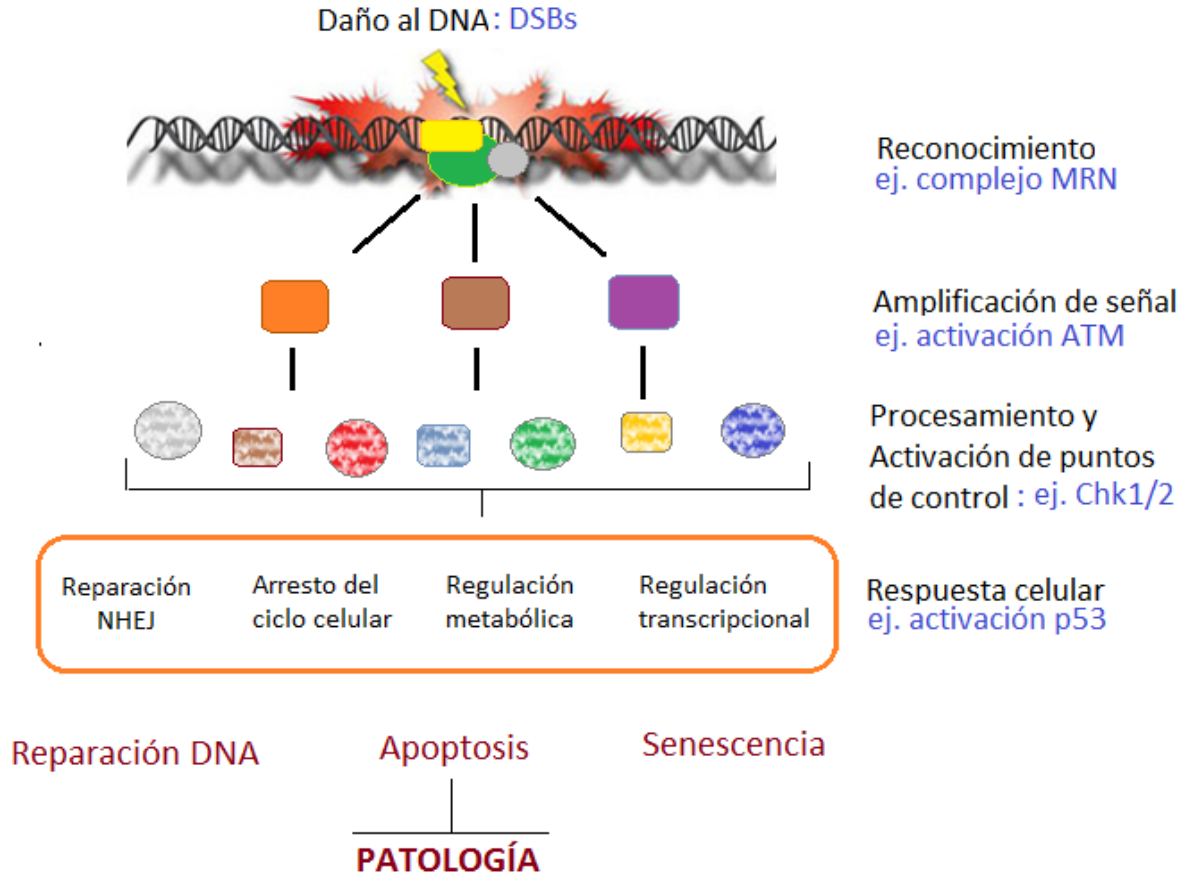


Figura 2. Esquema del mecanismo de DDR frente a DSBs— Seguido de la generación de DSBs, ocurre el proceso de reconocimiento por proteínas sensoras como el complejo Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN), lo cual conduce a la activación principalmente de ATM junto con proteínas quinasas que promueven rápidas modificaciones post-traduccionales (PTMs) en muchas proteínas y remodelación de la estructura de la cromatina alrededor del sitio de quiebre. Proteínas efectoras como las quinasas Chk1 y Chk2 ayudan en la amplificación de la señal y a activar los puntos de control del ciclo celular, regular la transcripción, traducción, y metabolismo y activar el apropiado proceso de reparación del DNA. Cuando la lesión supera la capacidad de reparación de la célula, se puede activar los mecanismos de apoptosis o senescencia. Como resultado final, éste mecanismo busca la mantención de la estabilidad genómica y prevención de patologías asociadas. (Modificado de Stracker *et al*, 2013)

El sistema nervioso presenta poca eficiencia en la capacidad de responder a los DSBs, lo cual podría conducir a enfermedades neurodegenerativas o tumores. En neuronas, ATM modula eventos de señalización en respuesta a DSBs, generando la rápida fosforilación de H2AX, una variante de la histona H2A, con el objetivo de facilitar el reclutamiento de una gran variedad de proteínas, además modula numerosas proteínas de la vía de reparación y de ciclo celular, como p53, Chk2, SMC1, BRCA1 y NBS1. (Frappart & McKinnon, 2008). Las neuronas requieren un riguroso control de respuesta de daño al ADN, debido a que cuando se encuentran funcionalmente activas generan un gran consumo de oxígeno y por lo tanto, se enfrentan a una permanente exposición a estrés oxidativo producido por su elevado requerimiento energético. Se ha descrito una relación entre la acumulación de mutaciones en el ADNmt y desórdenes neurodegenerativos y se han encontrado mutaciones y deleciones en personas con Enfermedad de Parkinson (PD), Alzheimer (AD) y Huntington (HD) las cuales correlacionan con daño oxidativo en cerebro (Ciccia & Elledge, 2010). La acumulación excesiva de mutaciones en el ADNmt podría disminuir la capacidad de cadena transportadora de electrones, consecuentemente generando una disminución en la producción de adenosina trifosfato e incremento de la producción de EROs (especies reactivas de oxígeno) (Cha *et al*, 2015).

Un desbalance en la regulación de estrés oxidativo respecto a los mecanismos de reparación de daño al ADN podría desencadenar en muerte neuronal y consecuentemente en alguna enfermedad neurodegenerativa (Radak *et al*, 2011; Smith *et al*, 2013; Canugovi *et al*, 2013). En Jeon y colaboradores (2012), se demuestra que los mecanismos de respuesta de daño al ADN, frente a la exposición a estrés oxidativo con una droga que genera daño, son deficientes en el modelo celular de la enfermedad de Huntington respecto a las células control. Acuña y colaboradores (2013), demostraron en un modelo murino de la misma enfermedad, que existe una falla en el

metabolismo energético y la captación de antioxidantes (ácido ascórbico) por parte de las neuronas, previo al desarrollo de la sintomatología. Se ha descrito en varios estudios en los cuales ATM cumple un importante rol en la mantención de la estabilidad genómica en neuronas frente a lesiones al ADN originado por algún agente genotóxico (Dobbin *et al*, 2013) e incluso se ha propuesto como blanco terapéutico para tratamientos de enfermedades con carácter neurodegenerativo como la Enfermedad de Huntington. Según Lu y colaboradores, (2014), ATM *knockdown* protege de la toxicidad que genera la HTTm (huntingtina mutante) tanto en modelo celular de la enfermedad, como en el modelo murino BACHD y en un modelo transgénico de la mosca *Drosophila*.

Como se mencionó anteriormente, la acumulación de daño al ADN tiene como consecuencia una serie de eventos de señalización que llevan a una alterada integridad genómica, la cual es indispensable para la prevención de enfermedades al sistema nervioso (Ciccia & Elledge, 2010; Dobbin *et al*, 2013; Katyal *et al*, 2014). Es así como, el daño al ADN conduce a inestabilidad genómica y disfunción celular, siendo estrés oxidativo una de las causas principales de generación de daño en cerebro, debido a la elevada generación de ROS. Los cambios en el estado redox generalmente se relacionan a la disminución de plasticidad sináptica dependiente de la edad. Durante el envejecimiento cerebral ocurren cambios que conducen a la reducción de la retención de memoria principalmente, como consecuencia de la plasticidad sináptica alterada. También se ha mostrado que las especies reactivas de oxígeno regulan la señalización de moléculas relacionadas con la plasticidad sináptica, como por ejemplo el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) el cual se ha encontrado que es sobre-regulado bajo condiciones de hipoxia asociadas a estrés oxidativo. (Hota *et al*, 2010), sin embargo son pocos los estudios que

relacionan directamente el daño al ADN con cambios directos en la plasticidad neuronal o los genes asociados a ella.

La plasticidad sináptica es un proceso mediante el cual ocurre una remodelación de circuitos neuronales; según Bliss & Collingridge (1993), la definen como cambios en la fuerza de las conexiones sinápticas frente a algún estímulo. Tiene un rol de gran relevancia cuando se trata de cambios de comportamientos a largo plazo, aprendizaje y memoria, entre otras actividades. Se piensa que las alteraciones en los mecanismos de la plasticidad sináptica son responsables de múltiples trastornos, como el autismo, la enfermedad de Alzheimer y varias formas de retraso mental. Existen varias formas de plasticidad sináptica las cuales son mecanismos dependientes de actividad sináptica, entre los cuales destacan la potenciación a largo plazo (LTP, del inglés “Long Term Potentiation”) y la depresión a largo plazo (LDP, del inglés “Long Term Depression”). Ambas formas de plasticidad representan cambios opuestos en la fuerza sináptica, una aumenta y la otra disminuye, respectivamente. Además, ambas plasticidades a largo plazo requieren principalmente, la remodelación del citoesqueleto de actina en las espinas dendríticas y cambios en la morfología de las espinas, ya sea para aumentar o disminuir las conexiones neuronales. (Grønli *et al*, 2014; Rosenberg *et al*, 2014). La potenciación a largo plazo (LTP) es una forma de plasticidad sináptica que permite la intensificación de transmisión de señales entre neuronas y se subdivide en 2 fases, temprana (E-LTP, del inglés “Early-LTP”) y tardía (L-LTP, del inglés “Late-LTP”). E-LTP suele durar 1 o 2 horas post-inducción de LTP, ésta fase depende de la modificación post- traduccional y el tráfico de proteínas pre-existentes. La formación de L-LTP, dura muchas horas y días y requiere una nueva expresión de genes y síntesis de proteínas. Algunos de los genes de plasticidad más relevantes son: BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) y Arc (que codifica para la proteína asociada al Citoesqueleto Regulada por Actividad).

BDNF es un péptido secretorio capaz de activar cascadas de señalización que consecuentemente inducen la síntesis de proteínas dependientes de LTP *in vitro* e *in vivo* (Messaoudi *et al*, 2002; Panja & Bramham, 2014). Se sabe que tiene un rol en la inducción de cambios estructurales en neuronas, como formación de espinas y arborización dendrítica (Bramham & Messaoudi, 2005), regula la formación de la memoria y la potenciación a largo plazo (LTP), mecanismo el cual es relevante para la eficaz actividad sináptica (Korwek *et al*, 2012). Esta neurotrofina tiene la capacidad de unirse a distintos receptores, en cerebro, el más conocido es el receptor tirosina quinasa B (TrkB), que es un receptor tirosina quinasa de la familia de las quinasas relacionadas a tropomiosina (TRKs). Una vez que, BDNF activa los receptores TrkB, se estimula la síntesis de otras proteínas y consecuentemente se generan modificaciones estructurales que aumenta las conexiones entre neuronas y permite la finalización de la formación de memoria y aprendizaje. También puede unirse al receptor p75^{NTR}, miembro de la familia de receptores TNF (factor de necrosis tumoral) resultando en la activación de señales pro-apoptóticas. En cerebros adultos, TrkB es su receptor predilecto, debido a su amplia patrón de expresión y afinidad de unión para BDNF superior que el receptor p75^{NTR} (Nagahara & Tuszynski, 2011).

El gen de BDNF consta de 9 exones (I- IX), siendo de nuestra importancia, el exón IV, el cual es principalmente inducido por actividad neuronal. La transcripción de este exón se encuentra alta y complejamente regulada. Entre 29 y 36 pares de bases río arriba del inicio de transcripción del exón IV de BDNF presenta una región reguladora de calcio denominada CaRE-3, la cual tiene estrecha relación con la proteína de unión a elementos de respuesta de AMPc, CREB (del inglés cAMP-responsive element binding), debido a que ambos son similarmente activados por proteínas quinasas estimuladas por calcio e interesantemente, CREB up-regula la transcripción de

BDNF mediada por CaRE3 y CRE (Zheng *et al*, 2012; Cohen-Cori *et al*, 2010; Lyons & West, 2011).

En estudios recientes, BDNF ha sido involucrado en la regulación de la dinámica de reciclaje de endosomas para inducir la arborización dendrítica mediante la regulación de la GTPasa monomérica Rab11 (Lazo *et al*, 2013). Además, como ya es sabido, BDNF es un potente neuroprotector e incluso se ha utilizado para tratamientos contra enfermedades neurodegenerativas como, AD, HD y otras (Nagahara & Tuszynski, 2011; Lu *et al*, 2013; Van Kanegan *et al*, 2014). Brito y colaboradores (2014), demostraron la implicancia potencial de p75^{NTR} como contribuyente en el desarrollo de la disfunción sináptica y la deficiente memoria en la enfermedad de Huntington. Establecieron una correlación inversa entre la expresión de este receptor y la función sináptica en modelo murino mutante con la enfermedad, donde observaron una alterada morfología y reducción del número de espinas dendríticas, daño en la LTP y deficiencia en la memoria. Siendo evitados estos efectos, como el daño cognitivo, frente al desarrollo de estos ratones mutantes con p75^{NTR} hipocampal *knock-down*.

Por otro lado, Arc también se encuentra implicada en la LTP, estabiliza los filamentos de actina (F-actina) nacientes, regula el tipo y número de espinas y, además, disminuye la fuerza sináptica promoviendo la internalización de receptores de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico, AMPARs con el objetivo de mantener la plasticidad homeostática (Korb *et al*, 2013; Grønli *et al*, 2014). Su expresión ocurre rápidamente después de la inducción de LTP mediante una estimulación aferente de alta frecuencia (HFS) o BDNF. Se ha identificado elementos de respuesta en el promotor de Arc basados en su regulación transcripcional dependiente de la actividad, denominado Elementos de Respuesta a Actividad Sináptica (SARE,

del inglés synaptic activity-responsive element) e interesantemente en éste grupo hay sitios de unión para el factor de transcripción CREB. (Bramham *et al*, 2010). (**Figura 3**)

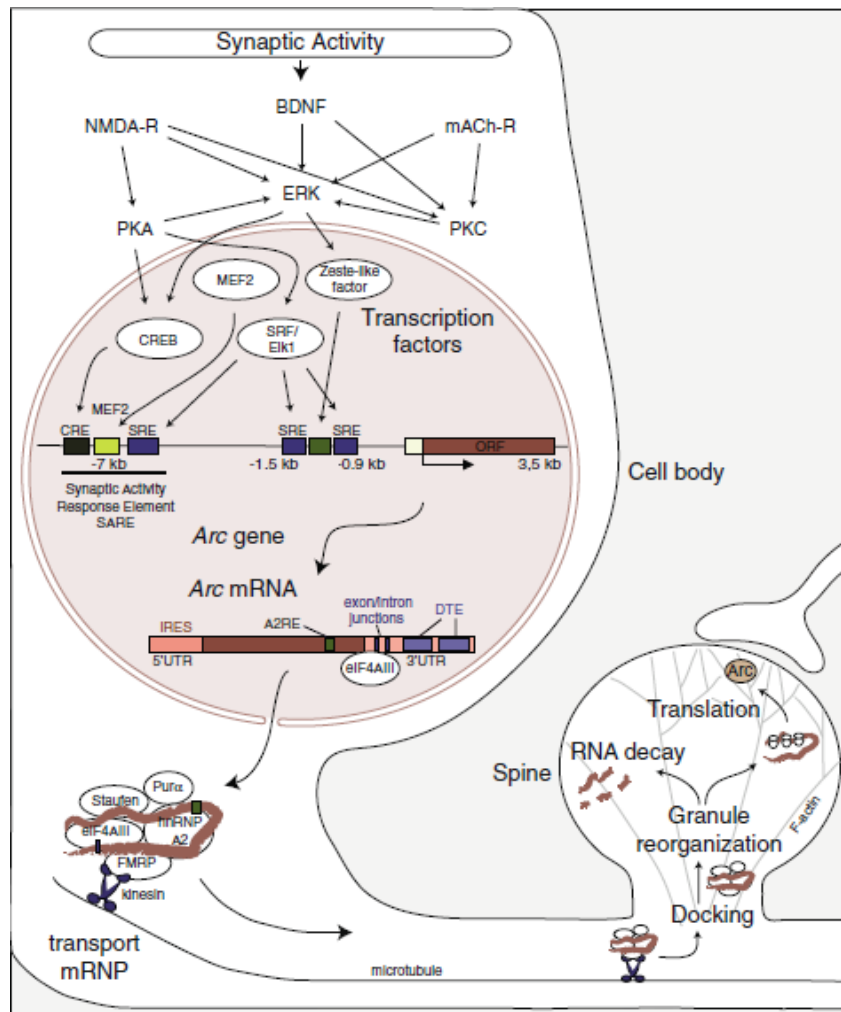


Figura 3. Regulación transcripcional de *Arc*, transporte y docking. – La expresión de *Arc* es inducida por cascadas de señalización que regula factores de transcripción en respuesta a actividad sináptica, siendo BDNF uno de los involucrados en la potencial expresión de *Arc*. El diagrama representa la organización genómica de los elementos de respuesta a actividad sináptica (SARE, del inglés synaptic activity- responsive element) y otros elementos regulatorios río arriba del marco de lectura abierto de *Arc* que sirve como sitio de unión para factores de transcripción. Seguido de la transcripción, elementos cis-regulatorios del mRNA de *Arc* regula su ensamblaje en la mRNP (ribonucleoproteína mensajera o ribonucleoproteína de transporte), la cual contiene además de sitios de unión a RNA, la maquinaria traduccional y motores moleculares para su correcta localización y degradación del RNA. La localización dendrítica y estabilidad del mRNA en las dendritas es un resultado del transporte activo basado en microtúbulos y el *docking* local dependiente de F-actina. (Modificado de Bramham *et al*, 2010)

Se cree que los primeros en responder a señales extracelulares y que regulan la expresión génica son los activadores transcripcionales dependientes de fosforilación, como CREB (Altarejos *et al*, 2011). CREB es una proteína de aproximadamente 37 kDa, la cual cumple funciones como factor de transcripción nuclear en una gran variedad de eventos celulares. Se une a un elemento de respuesta conocido como CRE (elemento de respuesta a AMPc) compuesto por 8 pb, TGACGTCA, promoviendo posteriormente, la expresión de diversos genes blanco inmediatos en cuestión de minutos o expresión de genes a largo plazo en un plazo de pocas horas (Lyons & West, 2011). Los llamados genes inmediatamente tempranos, normalmente codifican otras proteínas de unión al ADN, los que, a su vez diversifican la respuesta transcripcional mediante la activación de la expresión de genes tardíos. CREB es activado mediante su fosforilación en Ser133 en respuesta a señales como hormonas, neurotransmisores, entrada de calcio y factores de crecimiento, entre otros (Sandoval *et al*, 2009; Sakamoto *et al*, 2011) (**Figura 4A**). Éste factor de transcripción se encuentra altamente regulado mediante diversas vías, entre las que destaca su asociación con co-activadores como CBP/p300, los cuales son esenciales para mediar el aumento de la transcripción debido a su actividad histona acetiltransferasa intrínseca (Alberini *et al*, 2009) y los coactivadores transcripcionales regulados por CREB, CRTCs (antiguamente llamados TORCs, del inglés for Transducers of Regulated CREB activity) que median el aumento de transcripción a través de la asociación a los dominios bZIP de CREB (Sandoval *et al*, 2009). Según Sreaton y colaboradores (2004) en condiciones basales, los CRTCs son altamente fosforilados y mantenidos en el citoplasma mediante interacción con la proteína 14-3-3. Un incremento de AMPc o Ca^{+2} en la célula generarían la liberación del CRTC (defosforilación) y consecuentemente su migración al núcleo para potenciar la transcripción dependiente de CREB (**Figura 4B**).

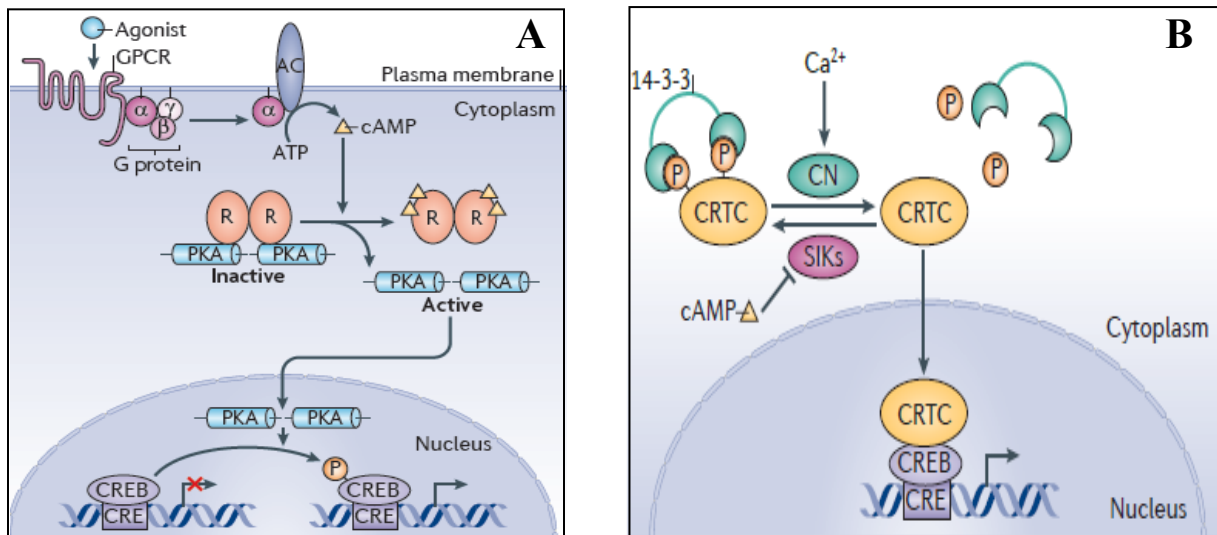


Figura 4. Mecanismo de activación de CREB— **A)** AMP cíclico estimula la fosforilación de CREB mediante la unión de un ligando a los receptores acoplados a proteína G (GPCRs), lo que conduce a la activación de adenilato ciclasa (AC) por unión de la subunidad α de la proteína G. AC cataliza la síntesis de AMP cíclico, el cual estimula la activación de PKA (proteína quinasa A). PKA ingresa al núcleo mediante difusión pasiva y se encarga de fosforilar CREB en Ser133, promoviendo la expresión de los genes blancos que contiene el promotor CRE. **B)** Las señales de AMP cíclico y calcio regulan los genes blanco de CREB mediante la estimulación de la translocación nuclear de los co-factores CRTCs. Bajo condiciones basales, los CRTCs se encuentran fosforilados y secuestrados en el citoplasma por las proteínas 14-3-3. AMPc y calcio promueven su defosforilación mediante la inhibición de proteínas SIK (quinasa inducida por sales) e inducción de calcineurina (CN), respectivamente. La defosforilación de CRTC permite su translocación nuclear y consecuentemente su unión a CREB para estimular su actividad. (Modificado de Altarejos *et al*, 2011)

La expresión de genes regulados por CREB es esencial para mediar procesos neuronales como aprendizaje, plasticidad sináptica, neuroprotección, adicción y formación de memoria. (Sandoval *et al*, 2009; Alberini *et al*, 2009). Diversos estudios han demostrado la existencia de un gran número de genes codificados enriquecidamente en neuronas, que son regulados por CREB de manera dependiente de actividad. Existen cerca de 4000 genes conocidos que se encuentran involucrados en función sináptica, supervivencia neuronal y memoria que contienen en su potencial promotor sitios de unión a CRE (Chen, 2014). Algunos genes blancos involucran neurotransmisores, factores de crecimiento, factores de transcripción, factores de traducción de señales y enzimas metabólicas, proteínas de respuesta inmune, entre muchos más (Sakamoto *et al*, 2013; Cho *et al*, 2011) (**Figura 5**). Según Jin y colaboradores (2013), CREB regula la expresión del transportador de glucosa 3 neuronal (GLUT3) y revelan un posible mecanismo molecular asociado a problemas de captación de glucosa en la enfermedad de Alzheimer debido a la deficiente actividad de CREB en la promoción de la expresión del transportador.

Como ya se ha mencionado, existen diversos estudios en los cuales apuntan a la asociación entre la desregulación de CREB y una variedad de enfermedades con desórdenes cognitivos tales como Alzheimer, Parkinson y Huntington, entre otros (Chaturvedi *et al*, 2012; Alberini *et al*, 2009, Jeon *et al*, 2012). La cascada de señalización de CREB y sus co-activadores CRTCs están fuertemente regulados por la DDR y esto se ha evaluado en una gran variedad de modelos celulares, como líneas celulares N2a de neuroblastoma murino o SH-SY5Y de neuroblastoma humano (Fernandes *et al*, 2007), células de ratón transgénico R6/2 o Q111 y Q7 utilizadas para estudios en la enfermedad de Huntington (Chaturvedi *et al*, 2012; Jeon *et al*, 2012), MCF-7 que son líneas celulares de cáncer de mama (Martin *et al*, 2013), y en líneas celulares de linfocitos B

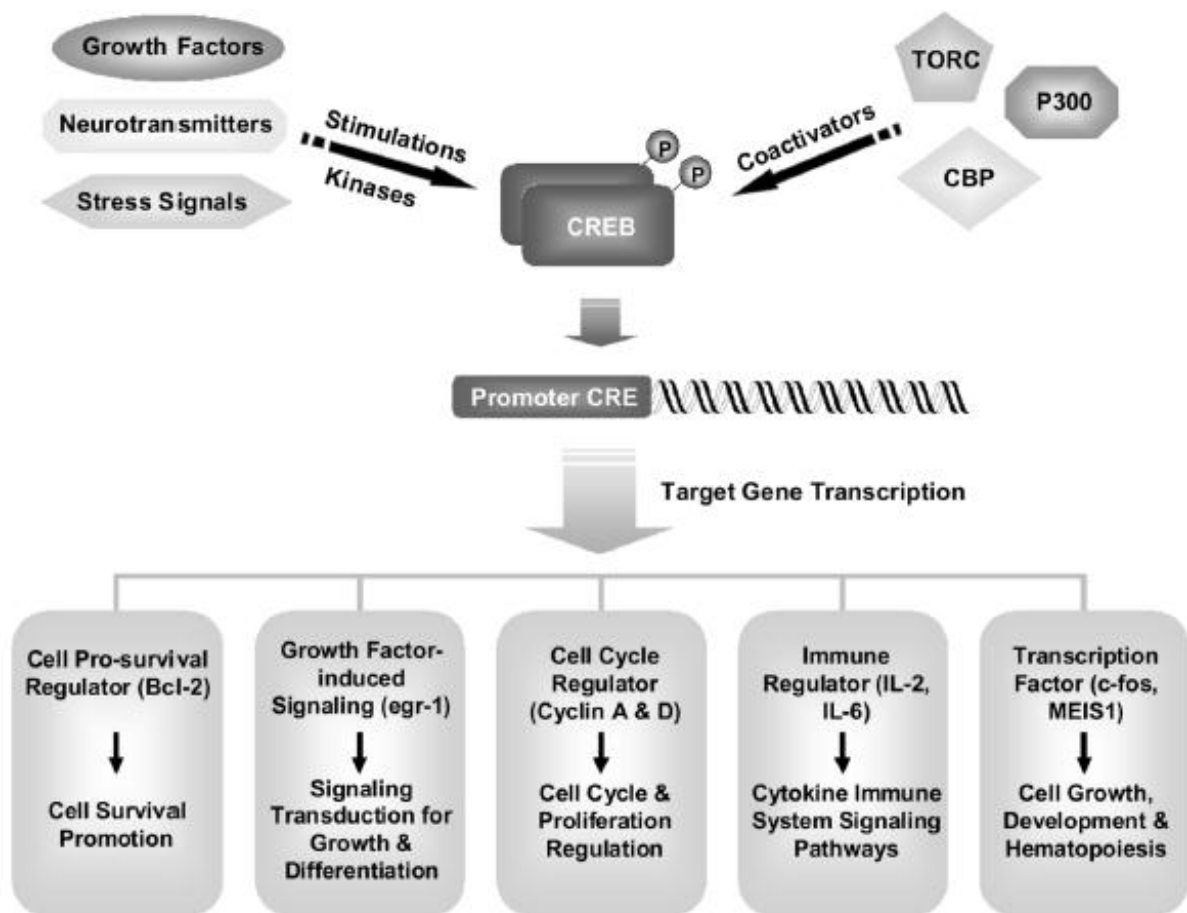


Figura 5. Regulación de la activación de CREB y sus genes blancos— La fosforilación del factor de transcripción CREB, puede ser inducida mediante diversos estímulos extracelulares y diversas quinasas. CREB puede interactuar con sus co-activadores para promover la transcripción de sus genes blanco. Se ha visto que tiene la capacidad de mediar diversos efectos celulares tales como, proliferación y supervivencia celular, diferenciación, e incluso en señalización de respuesta inmune y hematopoyesis. (Modificado de Cho *et al*, 2011)

para evaluar procesos de diferenciación como células Ramos (Sherman *et al*, 2010), entre otras. Pese a que, tanto CREB como sus co-activadores han sido estudiados en un gran número de enfermedades asociadas lesiones al ADN, son muy escasos los estudios que relacionan a ciencia cierta el daño a la doble hebra (DSBs) con la activación de éstas proteínas en neurodegeneración.

CRTC1 es la proteína co-activadora de CREB más estudiada en neuronas, debido a que se ha descrito como la más abundante en cerebro. Presenta un importante rol en el crecimiento dendrítico y desarrollo de neuronas corticales mediante la up-regulación de la transcripción de genes blanco de CREB (Li *et al*, 2009; Kovács *et al*, 2006). Además, se ha descrito que la expresión de genes de plasticidad como BDNF requieren de la función de CRTC1 (Kovács *et al*, 2006; Zheng *et al*, 2012). Otro co-activador presente en neuronas, pero de menor expresión, es CRTC2, el cual juega un rol relevante en la regulación de la homeostasis de glucosa en diversos modelos y posee un rol central durante el proceso de diferenciación del linfocito B (Lerner *et al*, 2009; Wang *et al*, 2010; Sherman *et al*, 2010; Yoon *et al*, 2009). Cabe destacar que, debido a la escasa abundancia de CRTC2 en neuronas, su función en el sistema nervioso es poco comprendida. Recientes estudios evidencian que, si bien su abundancia es baja, su actividad no es menor respecto a CRTC1; en algunos trabajos en modelos de Alzheimer (AD) se observó mediante ensayos de luciferasa que, al estimular las células con forskolina (FSK) existía un significativo aumento de actividad luciferasa para CRTC1 y CRTC2, tanto para el wild type (wt) como para células de neuronas primarias de la proteína precursora β -amiloide de ratón transgénico (APP_{Sw,Ind}), que desarrolla la patología (España *et al*, 2010). El grupo de Carriba, P. y colaboradores (2012), mediante ensayos de detección de CRTC1/2 en el núcleo de astrocitos, observaron que, la translocación de ambos es activada por ATP y noradrenalina (NA), e

interesantemente mostraron que CRTC2 permanece mayor tiempo en el núcleo que CRTC1, sugiriendo que CRTC2 podría estar cumpliendo alguna función posterior a la inducción.

A pesar de que se encuentra establecido que la muerte neuronal y disfunción progresiva en enfermedades neurodegenerativas son consecuencia, principalmente, de la acumulación de daños, aún permanece ambigua la directa relación entre el daño al DNA, la activación de los mecanismos de respuesta al daño y consecuentemente, la expresión de genes de plasticidad. Nosotros proponemos estudiar la posible relación entre el daño al ADN inducido por agentes externos en células neuronales y su capacidad de modular los patrones de expresión de los genes de plasticidad neuronal, dilucidando el posible rol de CRTC2 en estos cambios.

2.1 PROPUESTA DE LA INVESTIGACIÓN

Hipótesis : La inducción de daño al ADN en células neuronales es capaz de modificar los patrones de expresión de los genes de plasticidad.

Objetivo general : Determinar el efecto de compuestos inductores de daño al DNA en la expresión de genes de plasticidad sináptica y el posible rol de CRTCs en el mecanismo molecular implicado.

Objetivos específicos:

- I. Determinar la concentración inductora de muerte de Etopósido (Eto), agente inductor de daño al ADN y evaluar la activación del mecanismo de respuesta de daño al DNA (DDR).**
Para ello se realizarán ensayos de MTT, para determinar las concentraciones tóxicas de Eto en neuronas. Se analizará la activación de la respuesta al daño al ADN analizando la activación por fosforilación de la proteína ATM.
- II. Estandarizar protocolos para qPCR y analizar el efecto de etopósido en la expresión de genes de plasticidad sináptica en células N2a.** Para evaluar la expresión de genes de plasticidad en células control y tratadas con Eto se realizarán ensayos de RT-qPCR.
- III. Evaluar el efecto de Eto en la activación y localización de CRTCl/2.** Para determinar un posible mecanismo molecular, analizaremos el efecto del agente inductor de daño (Eto) sobre la expresión, localización y activación de CRTCs (isoformas 1 y 2).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 REACTIVOS Y CULTIVO CELULAR

La línea celular de Neuroblastoma murino, N2a (Neuro2a (ATCC® CCL131™) se mantuvo en medio DMEM (HyClone, Logan, UT, USA) suplementado con 10% suero bovino fetal (SBF, Hyclone, Logan, UT, USA), 2 mM L-glutamina (Nalgene, Rochester, NY, USA) y antibióticos (50 U/ml penicilina y 50 mg/ml estreptomina). Entre los reactivos se encuentran etopósido (Eto, Sigma Aldrich), Forskolina (FSK, Sigma Aldrich). Las células se trataron con etopósido 20 μ M y FSK 10 μ M a diferentes horas de tratamientos; además, se utiliza DMSO como vehículo.

3.2 ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR

Mediante el Ensayo de MTT en placas de 96 pocillos (dosis-respuesta), se evaluó la concentración de etopósido (Eto) en la cual induce la activación de muerte. Se añadieron 100 μ L de células neuronales por pocillo (20.000 células/pocillo) un día antes de iniciar el tratamiento con el objetivo de que se adhieran. Posteriormente, se inició el tratamiento con concentraciones crecientes de Eto (entre 0,5 y 100 μ M) en un periodo de incubación de 24 y 48 horas tal por cuadruplicado. Se añadió el reactivo MTT (5mg/mL) 4 hrs antes de finalizar el tratamiento. Luego adicionó buffer de lisis (50% Dimetilformamida y 20% SDS), considerando homogeneizar bien y, finalmente se incubó 10-15 minutos para posteriormente leer en espectrofotómetro a una absorbancia de 545 nm.

3.3 ACTIVACIÓN DE MECANISMOS DE RESPUESTA DE DAÑO AL ADN Y LOCALIZACIÓN DE CRTCs

Las células neuronales se trataron con Etopósido 20 μ M en diferentes periodos de tiempo. Una vez cumplido el tratamiento se procedió a la extracción de proteínas totales mediante el uso de buffer de extracción (NaCl 150 mM, NP40 0.5%, DTT 1 mM, Tris 20 mM [pH 7.2], MgCl₂ 2

mM e inhibidor de proteasas: PMSF 100 µg/ml; aprotinina 2 µM; leupeptina and pepstatina 1 µg/ml). Para la extracción de proteínas citoplasmáticas y nucleares se utilizó el kit NE-PER (Thermo Scientific) La cuantificación de la concentración proteica se determinó mediante uso del Método de Bradford. Utilizando el estándar de BSA (2 µg/uL) se construyó una curva de calibración, a partir de la cual se obtuvo la ecuación de la recta que permitió el cálculo de la concentración de proteínas. La medición se realizó mediante un espectrofotómetro, a una absorbancia de 595 nm.

3.4 ELECTROFORESIS E INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOTTING

Se realizaron SDS-PAGE a 110 V durante aproximadamente 2 hrs, cargando 40-100 ug de proteínas por carril y se electrotransfirieron a membrana de nitrocelulosa. Se bloqueó con leche TBS-T (5%) durante 1 hora. Los anticuerpos primarios (1:1000) utilizados fueron anti-CRTC1 (hecho en conejo, Santa Cruz), anti-CRTC2 (hecho en conejo, Calbiochem) y anti-ATM (hecho en ratón, Cell Signaling), Caspasa-3 activa (hecho en ratón, Invitrogen), anti-β actina como gen constitutivo (hecho en ratón, Santa Cruz Biotechnology), anti-tubulina (hecho en ratón, Santa Cruz) y anti- HDAC1 (hecho en conejo, Santa Cruz) como controles de citoplasma y núcleo, respectivamente. Los anticuerpos secundarios anti- conejo y anti-ratón se diluyeron 1:5000. Finalmente, se reveló mediante el sistema quimioluminiscente y se visualizó utilizando un equipo de captación de imágenes de LI-COR.

3.5 EXTRACCIÓN DE ARN, RT-PCR Y q-PCR

Se extrajo ARN total utilizando el método de Trizol (Invitrogen, San Diego, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación se desarrolló mediante el uso el equipo NanoQuant de TECAN, midiendo absorbancia 260 nm/ 280 nm para obtener su concentración de RNA y

pureza de la extracción. Para la síntesis de cDNA se realizó RT-PCR, utilizando 0,5- 1 µg de RNA total para la síntesis de cDNA mediante el kit iScript (BIO-RAD) o SuperScript III (Invitrogen, Inc). Para la estandarización de los partidores se desarrolló previamente un PCR en gradiente; las temperaturas de amplificación de las placas fueron 50.0 °C, 52.0 °C, 57.0 °C, 60.8 °C, 65.2 °C, 67.4 °C, control negativo (50°C). Finalmente se visualizaron los resultados mediante gel de agarosa 1%. El qPCR se realizó utilizando Master Mix de qPCR y Sybr Green Brillante II (Life Technology, Thermo Scientific), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Como etapa final de la estandarización de los partidores, se verificó el producto de PCR mediante electroforesis. El resultado del qPCR se evalúa mediante el Software StepOne v2.3 (equipo StepOne Plus, Thermo Scientific). El análisis de expresión se realizó mediante cuantificación relativa, utilizando $\Delta\Delta C_t$ y normalizando con la secuencia de mRNA de Ciclofilina (Cyc). El listado de partidores que se utilizarán se encuentra en la **Tabla I**.

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los resultados son representativos para cada experimento. Los datos de todas las gráficas fueron presentados como promedio \pm desviación estándar. Las imágenes de western blots fueron analizadas mediante el software ImageJ (no se muestra). La significancia estadística se obtuvo por análisis de varianza (ANOVA) utilizando el software GraphPad Prism 5.0, resultados fueron considerados significativos bajo un nivel de confianza de 99%.

Tabla I. Resumen de partidores utilizados en qPCR

Oligo	Secuencia sentido/ antisentido 5'→3'	Tm (°C)	Producto PCR (pb)
BDNF	CGGCGCCCATGAAAGAAGTA/	57	115
	AGACCTCTCGGACCTGCCCT	60	
Arc	GGTGAGCTGAAGCCACAAAT/	55	330
	TTCACTGGTATGAATCACTGCTG	55	
Ciclofilina (Cyc)	GGCAATGCTGGACCAAACACAA/	58	221
	GTAAAATGCCCGCAAGTCAAAG	55	

4. RESULTADOS

4.1 LA EXPOSICIÓN A ESTRÉS GENOTÓXICO DE CÉLULAS N2a ALTERA LA VIABILIDAD CELULAR E INDUCE ACTIVACIÓN DE p-ATM

La línea celular de neuroblastoma murino, Neuro-2a derivada de tejido de cerebro de ratón *Mus musculus* (N2a), son células adherentes que presentan varias prolongaciones axonales y tienen como ventaja una gran capacidad proliferativa. Con la utilización de éste modelo, se pretendió determinar el efecto de agentes genotóxicos externos, en este caso Etopósido, en la expresión de genes de plasticidad en las células N2a. Para ello, primero fue necesario determinar la concentración en la cual Etopósido (Eto) genera una disminución de la viabilidad celular no tan agresiva para nuestros propósitos. Etopósido es conocido comúnmente como una droga anticancerígena que, inhibe la Topoisomerasa II produciéndose la ruptura de la doble hebra de ADN (DSBs). Se genera daño al ADN, afectando consecuentemente, la replicación y transcripción, entre otros eventos celulares. Si éste daño supera la capacidad de reparación, puede tener consecuencias fatales para la célula. Dado que las neuronas son especialmente susceptibles a los daños externos es relevante realizar ensayos de viabilidad celular en presencia de éste agente inductor de DSBs. En la **Figura 6** se evaluó la viabilidad celular frente a concentraciones crecientes de etopósido en dos periodos de tiempo diferentes, mediante ensayo de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol). Éste ensayo se basa en la reducción metabólica del reactivo MTT a un compuesto coloreado de color azul denominado formazán. Este proceso es llevado a cabo por el complejo enzimático mitocondrial de la célula, destacando la enzima succinato-deshidrogenasa. Ésto permite determinar la función mitocondrial de las células tratadas, por lo que ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Se

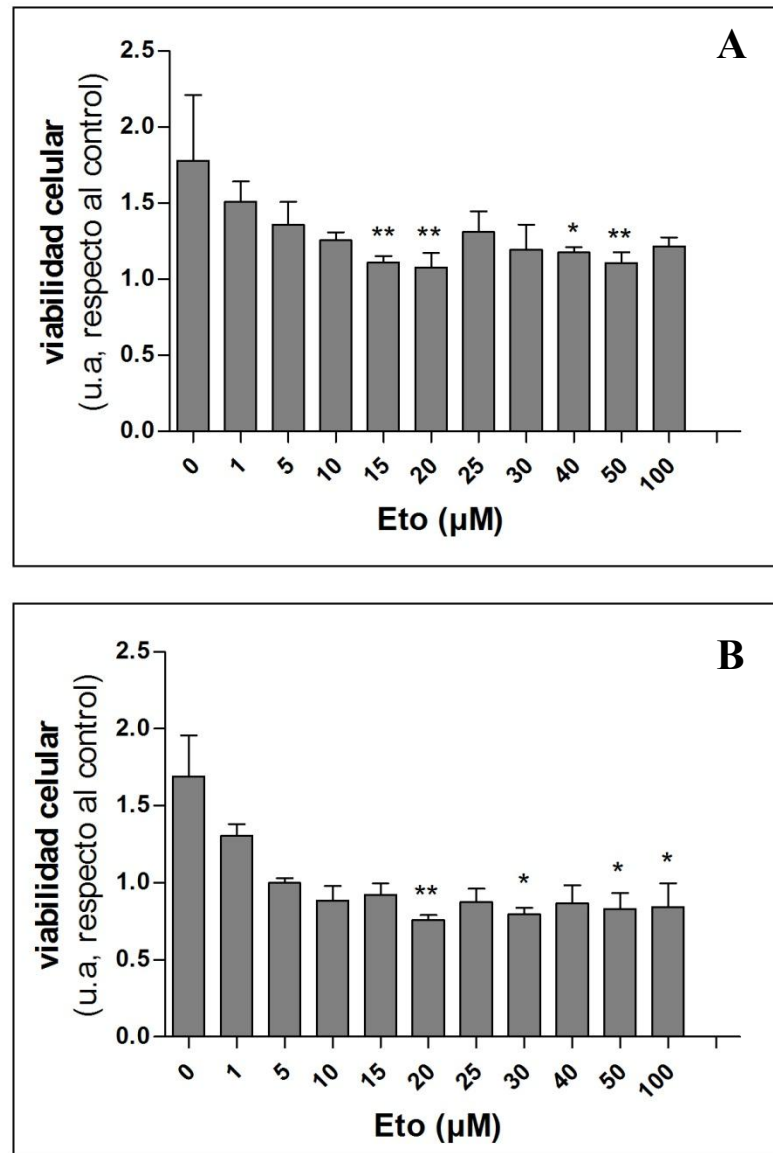


Figura 6. *Concentraciones crecientes de etopósido afectan la viabilidad celular en células N2a— A) y B) Gráfica de viabilidad celular luego de 24 y 48 horas de tratamientos con etopósido en concentraciones crecientes, respectivamente. La determinación se realizó mediante ensayo de MTT (absorbancia 545 nm) a una confluencia de 20.000 células por pocillo. Cada ensayo se desarrolló por cuadruplicado. Intervalo de confianza de 99% ($p < 0.01$).*

observó que a medida que aumenta la concentración de etopósido, el porcentaje de viabilidad celular va disminuyendo. Cabe destacar que, tal cual esperábamos, al realizar tratamientos con etopósido 20 μM , se obtiene una significativa disminución de la viabilidad celular, por lo tanto, se considera utilizar como concentración inductora de muerte, considerando que es la misma concentración utilizada en nuestro laboratorio para inducir muerte celular en otras líneas celulares (Korwek *et al*, 2012; Sohn *et al*, 2013). En células N2a, bajo tratamientos con la concentración mencionada, se muestra un porcentaje de viabilidad celular de 60,59 y 44,96 para los tratamientos de 24 y 48 horas, respectivamente (ver **Tabla II**). Ésto permitió determinar la concentración de droga utilizar para los análisis posteriores.

Tabla II. Viabilidad celular frente a tratamientos con etopósido en células N2a.

Eto (μM)	% viabilidad	
	24 hrs	48 hrs
0	100	100
1	84,80	77,30
5	76,44	59,11
10	70,62	52,29
15	62,45	54,55
20	60,59	44,96
25	73,69	51,86
30	67,20	47,14
40	66,07	51,40
50	62,25	49,08
100	68,46	49,89

Durante el DSB se produce una cascada de señalización que gatilla la activación de la vía de respuesta al daño del DNA, la cual tiene la capacidad de sensor el daño al DNA y enviar la información a la célula con el objetivo de influenciar el desarrollo de una respuesta al daño. El actor principal dentro de este mecanismo de respuesta es ATM, la cual se activa mediante su fosforilación y, luego desencadena una cascada de señalización mediante su capacidad de fosforilar varios sustratos llevando las células a la reparación del daño mediante el arresto transiente del ciclo celular, senescencia mediante un arresto estable del ciclo celular o a muerte celular por apoptosis (Korwek, 2012).

Considerando que la concentración de etopósido 20 μM generó una disminución de la viabilidad celular, se evaluó la capacidad de las células para responder frente al daño celular inducido por etopósido. Para ello, se evaluó la activación de la principal molécula sensora de daño a la doble hebra de DNA, ATM. En la **Figura 7** se observó que a medida que al aumentar la concentración de Eto o el tiempo de tratamiento, se genera un aumento en la fosforilación de ATM (p-ATM). Este resultado sugirió que las células N2a se ven afectadas frente a estrés genotóxico, produciéndose así, una disminución de la viabilidad celular y además son capaces de responder a este daño activando un mecanismo de respuesta a daño del ADN mediado por p-ATM. De igual modo se realizaron tratamientos de 24 horas con el objetivo de analizar mediante inmunodetección de caspasas 3 activa, la activación del mecanismo de apoptosis celular (**Fig. 7B**). Se observó una débil banda indicativa del *cleavage* de la proteína caspasa 3.

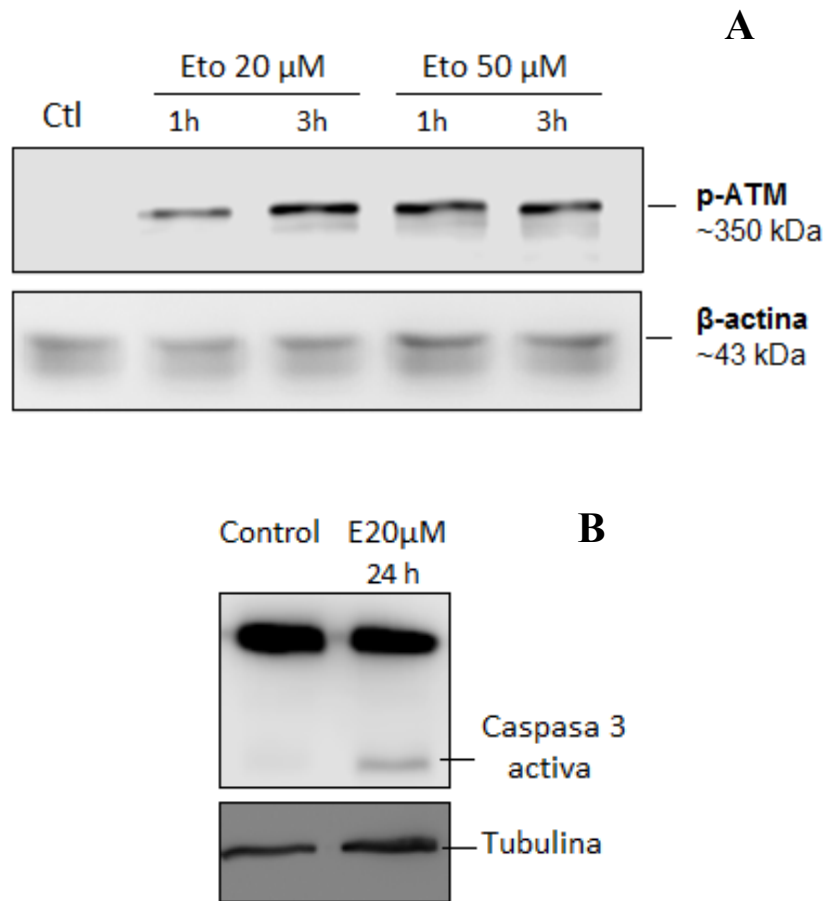


Figura 7. Etopósido induce activación de p-ATM en células N2a— A) El análisis se realizó mediante inmunodetección con anti-p-ATM y anti- β -actina (control de carga) - El primer carril corresponde al control sin tratamiento y los otros carriles son los tratamientos con etopósido a dos concentraciones y tiempos diferentes, tal cual se encuentra indicado. B) Inmunodetección de caspasa 3 activa bajo tratamiento de 24 horas con etopósido 20 μ M. La captura de imagen fue realizada con un equipo de captación de imágenes de Licor.

4.2 ESTANDARIZACIÓN DE PARTIDORES PARA qPCR

Con el objetivo de optimizar el trabajo de PCR, uno de los procedimientos previos para el uso de partidores nuevos en un laboratorio es la estandarización. Se desarrolló la estandarización de 3 juegos de partidores, el gen housekeeping Ciclofilina (Cyc) y los correspondientes a genes de plasticidad sináptica, BDNF y Arc. Para ello, es necesario evaluar su estabilidad y sensibilidad frente a un rango de temperaturas mediante PCR convencional en gradiente, lo que permitirá determinar cuál es la temperatura en la que se obtiene una mejor amplificación, donde se espera no detectar bandas que indiquen inespecificidad, ni formación de dímeros de partidores. Cabe destacar que la temperatura de melting o fusión (T_m), corresponde a la T° donde se encuentra la mitad de las hebras de DNA disociadas y la otra mitad se encuentra como doble hebra, permitiendo así que los cebadores se hibriden a la región consenso. Esta primera etapa se representa en la **Figura 8A, 9A y 10A**. Para Cyc (**Fig. 8A**) se observó una buena estabilidad de los partidores en las distintas temperaturas evaluadas, con un producto único. Lo mismo ocurrió con BDNF (**Fig.10A**), a excepción el carril 5 y 6, en los que se observa una disminución de la intensidad de banda indicando una disminución de la sensibilidad de los partidores. La **Figura 9A**, correspondiente a Arc, muestra una disminución de la intensidad de la banda en los carriles 5 y 6 debido a pérdida de sensibilidad, además, hay formación de dímero de partidores en todos los carriles lo cual podría alterar los resultados del qPCR con la generación de hombros en la curva de amplificación. No obstante, a pesar de los dímeros de partidores de Arc observados en el PCR, se decidió continuar con la estandarización y evaluarlos mediante qPCR.

La temperatura de hibridación es uno de los factores fundamentales a considerar durante el proceso de amplificación de un PCR y además depende de la T_m de los partidores, se consideró la elección de la mayor temperatura en la cual se observó una buena especificidad y sensibilidad

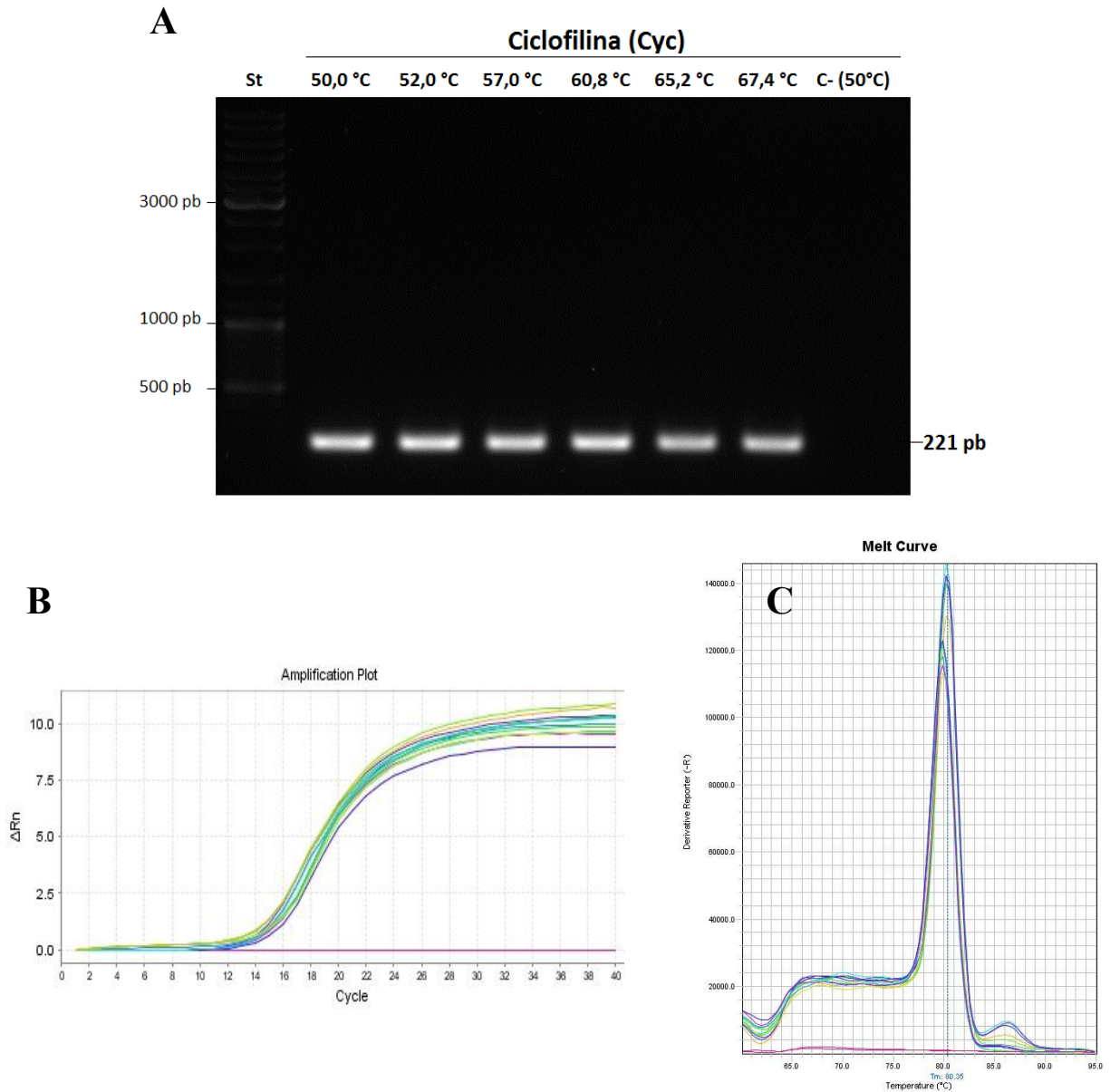


Figura 8. Estandarización de partidores de Ciclofilina utilizados en qPCR— A) Evaluación de T_m de partidores mediante PCR en gradiente; de izquierda a derecha, los carriles corresponden a: Estándar (St) Thermo SM0331-(1)50,0 °C- (2) 52,0 °C- (3) 57,0 °C- (4) 60,8 °C- (5) 65,2 °C- (6) 67,4 °C- (7) C- (50°C). **B)** y **C)** corresponden al plot de amplificación y curva de T° de fusión obtenidos mediante qPCR en el equipo StepOne Plus.

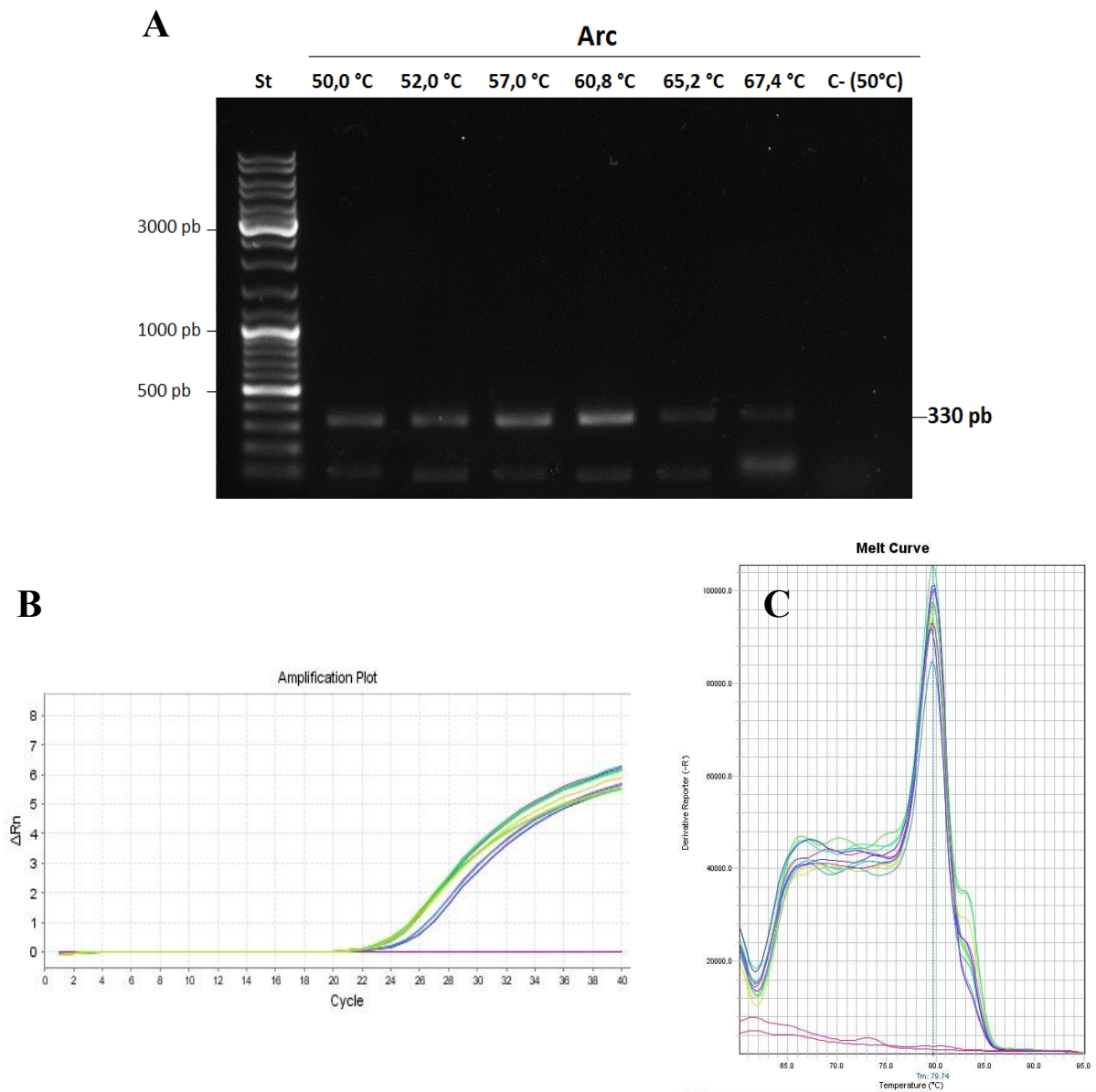


Figura 9. Estandarización de partidores de Arc utilizados en qPCR— A) Evaluación de sensibilidad de T_m de partidores mediante PCR en gradiente; de izquierda a derecha, los carriles corresponden a: Estándar (St) Thermo SM0331-(1) 50,0 °C- (2) 52,0 °C- (3) 57,0 °C- (4) 60,8 °C- (5) 65,2 °C- (6) 67,4 °C- (7) C- (50°C). **B)** y **C)** corresponden al plot de amplificación y curva de T° de fusión obtenidos mediante qPCR en el equipo StepOne Plus.

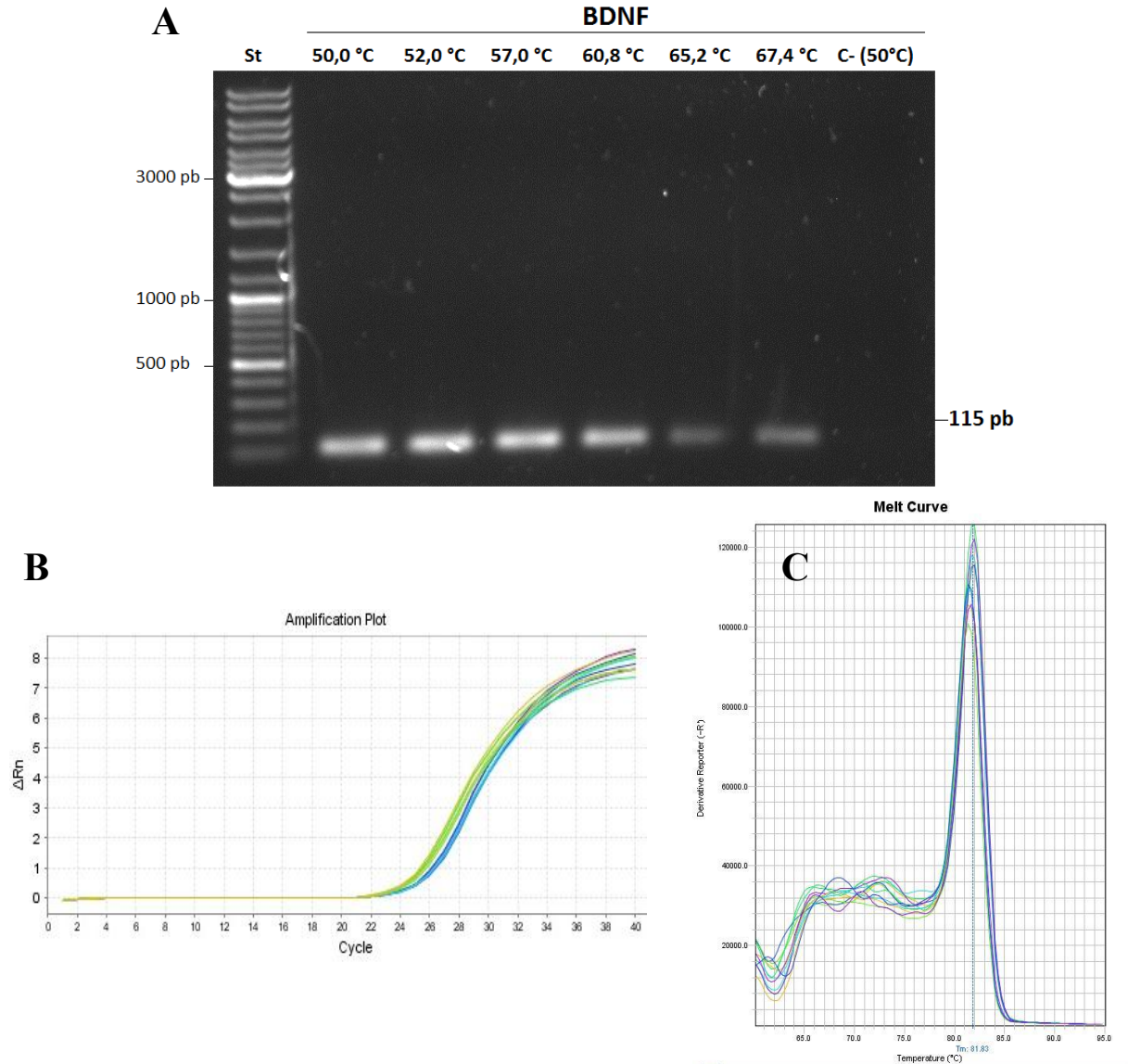


Figura 10. Estandarización de partidores de BDNF utilizados en qPCR— A) Evaluación de sensibilidad de Tm de partidores mediante PCR en gradiente; de izquierda a derecha, los carriles corresponden a: Estándar (St) Thermo SM0331-(1)50,0 °C- (2) 52,0 °C- (3) 57,0 °C- (4) 60,8 °C- (5) 65,2 °C- (6) 67,4 °C- (7) C- (50°C). **B)** y **C)** corresponden al plot de amplificación y curva de T° de fusión obtenidos mediante qPCR en el equipo StepOne Plus.

de los partidores. Una hibridación elevada minimiza la inespecificidad de los cebadores y disminuye la generación de dímeros (Ceccotti, 2007). Teniendo en cuenta que la T° óptima para el alineamiento en un qPCR es entre 50 y 65 $^{\circ}\text{C}$, consideramos realizar ésta etapa a 60 $^{\circ}\text{C}$ para los 3 juegos de partidores. Se realizó el análisis por qPCR utilizando en la preparación del mix de reacción diferentes volúmenes de partidor 0,5 y 1 μL de cada uno. El resultado se analizó observando la curva amplificación y curva de temperatura de fusión o melting. Para los tres genes se observa un plot de amplificación aceptable, con una buena curva sigmoidea (**Fig. 8B, 9B y 10B**). Las curvas de melting presentaron un único pico significativo para los análisis de los tres genes, descartando que los dímeros de partidores de Arc observados en el análisis mediante PCR en gradiente generen alguna alteración en los resultados del PCR en tiempo real (**Fig. 9A**).

Finalmente se evaluaron los productos de amplificación del PCR en tiempo real mediante un gel de agarosa 1% (datos no mostrados).

4.3 LA EXPRESIÓN DE GENES DE PLASTICIDAD SE VE ALTERADA FRENTE A TRATAMIENTOS CON ETOPÓSIDO.

El cerebro humano está conformado por miles de conexiones neuronales, las cuales permiten la comunicación mediante el proceso denominado sinapsis. Se ha demostrado que las conexiones sinápticas entre neuronas son dinámicas, es decir, frente a ciertos estímulos se puede generar la potenciación de estas conexiones o contrariamente, que se debiliten, generando incluso hasta la eliminación de la conexión. (Lewis, 2013)

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, nos preguntamos qué ocurre frente a estrés genotóxico con la expresión de dos importantes genes involucrados en estos procesos de plasticidad sináptica, como lo son BDNF y Arc. Primero se evaluó la expresión de éstos genes al inducir su expresión con Forskolina (FSK) 10 μ M y así asegurarnos que nuestra línea celular responde adecuadamente al estímulo (**Fig 11A**), presentando su máxima expresión a la hora de tratamiento. En la **Fig. 11B** se analizó la expresión frente a tratamientos con etopósido 20 μ M en distintos períodos de tiempo (1 y 3 horas). Se observó que a medida que se aumentó el tiempo de exposición, se generó un creciente aumento de la expresión de ambos genes, obteniendo la máxima expresión del gen de BDNF luego de una hora y el gen de Arc después de 3 horas de exposición a la droga. Una vez cumplidas las 3 horas de tratamiento ambos genes mantienen una expresión equivalente.

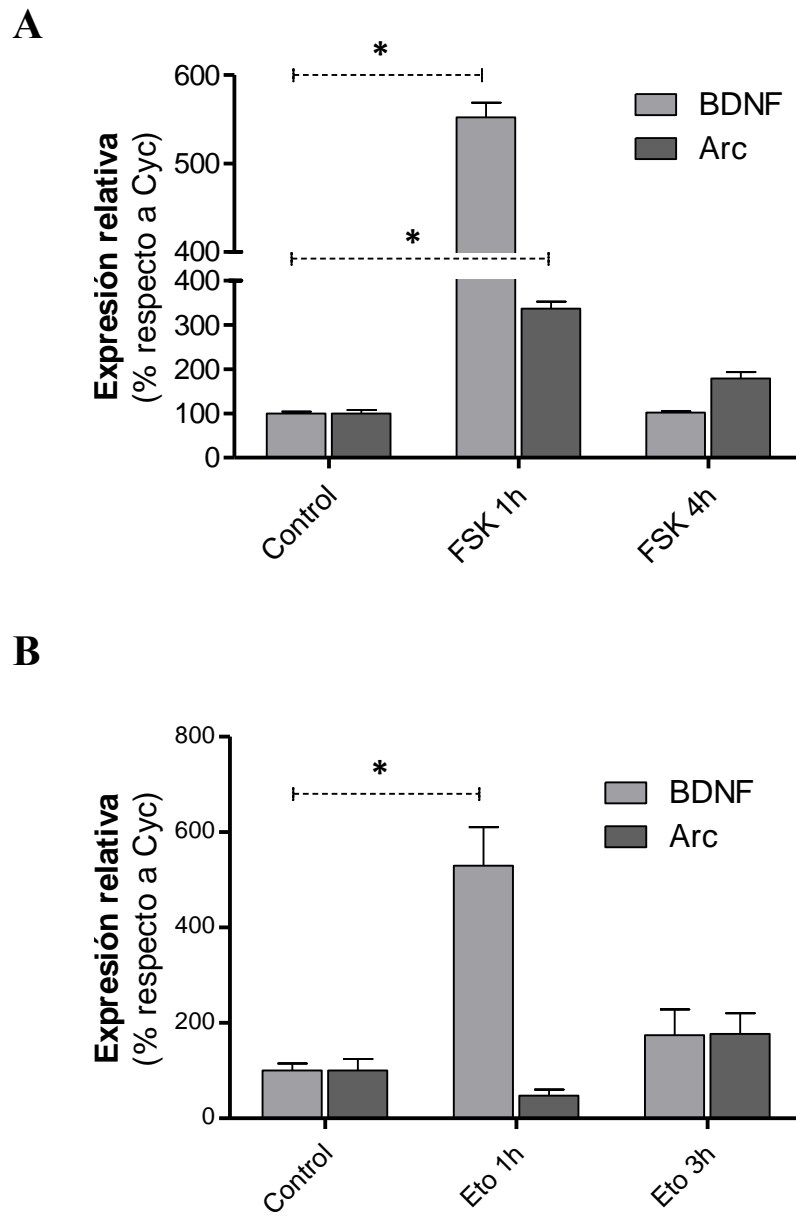


Figura 11. Etopósido 20 μM induce el aumento de expresión de genes de plasticidad en células

N2a— **A)** Evaluación de la respuesta de las células frente a tratamientos con FSK 10 μM en distintos periodos de tiempo. **B)** Expresión de genes de plasticidad frente a tratamientos con etopósido 20 μM en distintos periodos de tiempo. El equipo utilizado fue el termociclador

StepOne Plus. ($p < 0.05$)

4.4 TRATAMIENTOS CON ETOPÓSIDO ALTERAN LA LOCALIZACIÓN DE CRTIC1 Y CRTIC2 EN LA CÉLULA

Ambos genes Arc y BDNF presentan sitios de unión para el factor de transcripción CREB, el cual tiene un rol esencial en el proceso de plasticidad sináptica (Alberini *et al*, 2009). Se ha asociado este factor en deficiencias de expresión de genes de plasticidad, trastornos mentales y neurodegeneración, entre otros (Altarejos & Montminy, 2011; Chen *et al*, 2012). Éste factor se encuentra fuertemente regulado por los coactivadores transcripcionales, CRTICs, los cuales son activados mediante su defosforilación y consecuente migración al núcleo.

Luego de observar que a consecuencia del daño al DNA, la expresión de genes de plasticidad incrementó respecto al control, en búsqueda del mecanismo molecular implicado, se procedió a evaluar la localización de dos co-factores importantes que potencian la actividad de CREB en la célula, CRTIC1 y CRTIC2. Para ello, se realizaron tratamientos de 1 y 3 horas con etopósido 20 μM en las células N2a, de las cuales se hizo extracción núcleo-citoplasma para posteriormente evaluarlo mediante *western blot* (**Figura 12A**). La cuantificación de la extracción indica que ambos CRTICs, luego de una hora de tratamiento presentaron un aumento de localización a nivel citoplasmático, no siendo de igual manera a nivel nuclear, donde se observó que solo CRTIC1 incrementa (**Fig. 12B**). La localización nuclear de los CRTICs indica activación de éste co-factor, debido a que su defosforilación, genera su liberación de la proteína 14-3-3 en el citoplasma. Se procedió a evaluar el estado de fosforilación de CRTIC2 a nivel de proteínas totales, donde se visualizó que las muestras que fueron expuestas a estrés genotóxico, no generaron un cambio en el estado de fosforilación, sino más bien, presentaron una marca similar a la muestra control (**Fig. 12C**).

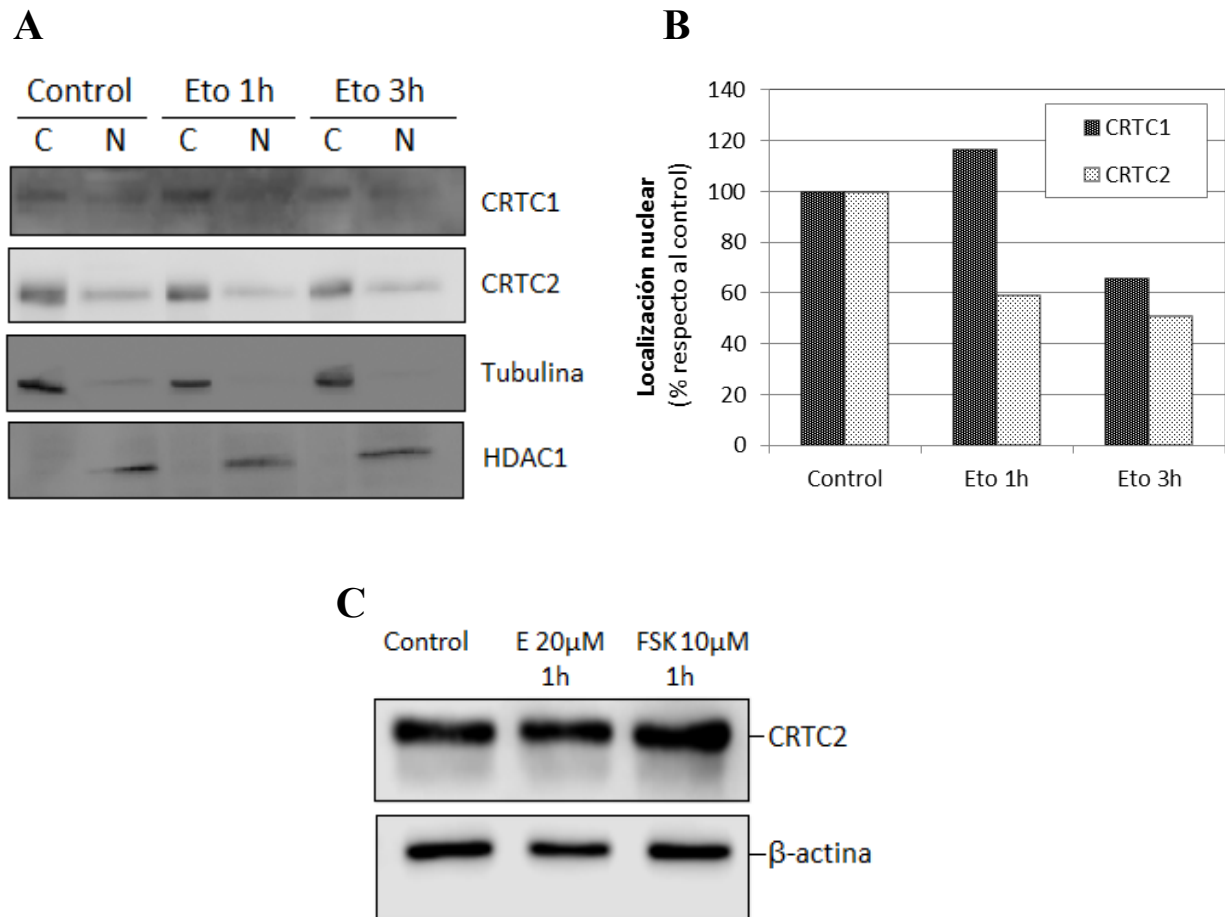


Figura 12. Etopósido altera la localización de CRTC1 y CRTC2 en células N2a— A) Inmunodetección de CRTCs en respuesta a tratamientos de 1 y 3 horas con Eto 20 μ M. **B** Cuantificación de western blot de CRTC1 y CRTC2, respectivamente. **C)** Inmunodetección de CRTC2 en extractos de proteínas totales. La captura de imagen se realizó con el equipo de captación de imágenes de LICOR. La cuantificación se llevó a cabo mediante el software ImegeJ.

5. DISCUSIÓN

Éste estudio tuvo por objetivo determinar el efecto de lesiones al ADN, específicamente, el quiebre de la doble hebra, sobre la expresión de genes de plasticidad sináptica. Utilizando un modelo celular derivado de cerebro de ratón se simuló un ambiente de estrés para la célula generando DSBs con etopósido con el objeto de evaluar el modelo y analizar qué ocurre con la expresión de genes de plasticidad.

Etopósido (Eto) es un compuesto que forma parte de la amplia gama de drogas utilizadas en los tratamientos de algunos tipos de cáncer por su capacidad de alterar la multiplicación de éste tipo de células. Pero desde el punto de vista de la investigación ha sido utilizada en la evaluación de los mecanismos de activación de respuesta a daño al DNA debido a la generación de DSBs (Pietrzak *et al*, 2011). La muerte celular inducida por Etopósido en las células N2a, fue evaluada mediante ensayos de viabilidad celular. Se observó que Etopósido es capaz de inducir una disminución significativa de la viabilidad en este modelo celular. Esta observación es de suma importancia debido a que los diferentes tipos celulares son más o menos sensibles a diferentes tipos de daño, dependiendo principalmente a la capacidad de cada línea celular de responder de manera rápida y eficientemente frente al daño generado. Específicamente en los ensayos de viabilidad celular observamos una disminución en la supervivencia de las células N2a, la cual fue directamente proporcional a la concentración de Eto utilizada en ambos periodos de tiempo (24 y 48 hrs).

Considerando que el cerebro metaboliza alrededor del 20% del oxígeno consumido y que presentan una baja capacidad para controlar la generación de especies reactivas de oxígeno es el motivo que hace que las neuronas sean particularmente susceptibles a estrés oxidativo. En el caso

que el estrés oxidativo supere la capacidad de las células para mantener la homeostasis, se activan los mecanismos de muerte neuronal. Las lesiones al ADN, específicamente el doble quiebre a la hebra de ADN es uno de los daños que, en caso de no ser solucionados correctamente y superen los mecanismos de reparación de daño al DNA, podrían iniciar cascadas de señalización que conduzcan a consecuencias catastróficas para la célula. Una vez que se genera el DSB, la quinasa ATM, es secuestrada en el sitio de daño por el complejo MRN. Inmediatamente esta proteína, catalogada como master regulador de la respuesta celular frente este tipo de lesiones, se encarga de la amplificación de la señal. Luego de su activación, se encarga de fosforilar diversos sustratos involucrados en el mecanismo de respuesta de reparación del ADN, generando la amplificación de la señal, la cual tiene como resultado final la reparación del ADN, senescencia o muerte celular por apoptosis (Stracker *et al*, 2013). El síndrome A-T (Ataxia Telangiectasia) es una de las primeras enfermedades en las cuales se asocia parcialmente daño y neurodegeneración. Éste síndrome es resultado de la mutación de un único gen que codifica para ATM (McKinnon, 2009). Interesantemente, una de las características de ésta enfermedad son las anormalidades neurológicas, entre otros síntomas. ATM ha sido también relacionada a muerte celular en algunos modelos celulares, es así como; según Li Y. y colaboradores (2012), bajo tratamientos con etopósido 10 μ M se induce muerte celular por apoptosis dependiente de ATM en el modelo celular SH-SY 5Y sólo cuando las células neuronales se encuentran indiferenciadas (proliferación). Aun siendo ATM consagrada bajo el rol de principal activadora del mecanismo DDR, también se le atribuye el rol como iniciadora de la señal de supervivencia en respuesta a insulina, mediante la activación de Akt en células tipo neuronas post-mitóticas. Nuestros resultados muestran que, en las células N2a, se logra la clara activación de los mecanismos de

respuesta frente a daño al DNA, debido a que, luego de los tratamientos de 1 y 3 horas con etopósido 20 μM , se observa la activación de la molécula sensora de lesiones, p-ATM.

La muerte celular es una característica en común, que involucra a las enfermedades de tipo neurodegenerativas, tales como ELA, HD, AD o PD e implica señales de muerte como estrés oxidativo, homeostasis de calcio alterada, disfunción mitocondrial, activación de cisteína proteasas (caspasas), entre otras. El clivaje de proteínas sinápticas mediado por caspasas puede controlar procesos de muerte neuronal e incluso en eventos no apoptóticos (Mattson, 2000; D'Amelio *et al*, 2011). Existe evidencia en la cual se muestra que las caspasas también median eventos regulatorios en la maduración del sistema nervioso, los cuales son cruciales para funciones neuronales como la poda del axón o la eliminación de la sinapsis, eventos importantes para el proceso de refinación de los circuitos neuronales maduros. Incluso existen estudios que involucran directamente las caspasa 3 en funciones neuronales como apoptosis, poda dendrítica, plasticidad sináptica y procesos de aprendizaje y memoria en modelos murinos (D'Amelio *et al*, 2010; Hyman & Yuan, 2012). En esta tesis se muestra que, a tratamientos de 24 horas con etopósido, se logró la inmunodetección de caspasas 3 activa en células N2a, lo cual podría indicar una eficiente señalización de la DDR y en algunos casos la activación del proceso de apoptosis en una subpoblación celular. Es relevante considerar que, durante el desarrollo del sistema nervioso, es muy común que las células prefieran la apoptosis frente a DSBs del ADN, en vez de la reparación del ADN, debido a la abundante población de progenitores presentes durante el desarrollo neuronal que entrega la posibilidad de que las células sean fácilmente reemplazadas (McKinnon, 2009; D'Amelio *et al*, 2010).

Considerando la posibilidad que la detección de p-ATM y caspasas3 activa, puedan generar, consecuentemente modificaciones en el patrón de expresión de genes de plasticidad en respuesta a daño, se procedió a evaluar mediante ensayos de qPCR la expresión de Arc y BDNF, dos genes de gran relevancia en este proceso. Los genes de plasticidad sináptica forman parte de un circuito de control sináptico altamente controlado, el cual es dependiente de actividad sináptica en respuesta a diversos estímulos. (Alberini, 2009; Lyons & West, 2011). La consecuencia final de la plasticidad sináptica es el aumento de conexiones interneuronales y consecuentemente un incremento de la complejidad del circuito neuronal. (Zschätzsch *et al*, 2014).

BDNF como todo factor neurotrófico, tiene por función principal promover la supervivencia y crecimiento neuronal. Si bien, el gen de BDNF, contiene 9 promotores, se ha demostrado que el promotor IV es el que estaría principalmente inducido por actividad neuronal (Zheng 2012; Cohen-Cori *et al*, 2010). Este promotor es dependiente de Ca^{+2} y controlado por factores de transcripción, entre los que se involucra CREB (Lyons & West, 2011). BDNF es un potente neuroprotector e incluso se ha utilizado para tratamientos contra enfermedades neurodegenerativas como, AD, HD y otras (Nagahara & Tuszynski, 2011; Lu *et al*, 2013; Van Kanegan *et al*, 2014). Tiene la capacidad de unirse a sus receptores y desencadenar diversas cascadas de señalización. La activación del ya mencionado TrkB, induce la síntesis de proteínas que, consecuentemente generan modificaciones estructurales para incrementar las conexiones interneuronales, permitiendo la consolidación de la memoria y aprendizaje. La activación del receptor $p75^{NTR}$ que resulta en la inducción de señales pro-apoptóticas.

Sin embargo, según los análisis de Van Kanegan y colaboradores (2014) la proteína BDNF por si misma genera problemas como agente de tratamiento clínico, debido a su corta vida media

en suero, escasa biodisponibilidad, baja capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y limitada difusión en los tejidos del sistema nervioso central (SNC). El gen Arc también se encuentra dentro de los genes de plasticidad de relevancia y es expresado inmediatamente mediante la estimulación de BDNF y presenta un rol importante en la estabilización de los filamentos de actina durante la prolongación de las ramificaciones (Bramham *et al*, 2010).

Existen diversos estudios que relacionan las alteraciones del sueño con deficiencia en la expresión de genes de plasticidad sináptica. Grønli y colaboradores (2014) indican la existencia de una clara relación entre los mecanismos del sueño y la consolidación de la plasticidad sináptica y memoria a largo plazo. Para evaluar la expresión de estos genes en nuestro modelo, se utilizó como control positivo tratamientos con forskolina (FSK), considerando que esta droga incrementa el contenido de AMPc intracelular, estimulando su expresión (Bałkowiec-Iskra *et al*, 2011). Tal cual se esperaba, se observó la expresión máxima de los genes de plasticidad a la hora de tratamiento con FSK 10 μ M. La expresión de estos genes frente a tratamientos con etopósido 20 μ M evidenció el aumento del transcrito de BDNF durante la primera hora de exposición y a las 3 horas Arc, concordando con lo anteriormente mencionado en la Figura 3, donde se observa que BDNF sobre-regula la expresión de Arc. Estos resultados sugieren que el daño al ADN regula de manera directa o indirecta la expresión de ambos genes en éste modelo.

Considerando los resultados obtenidos en la expresión de genes de plasticidad en respuesta a DSBs y que ambos genes presentan elementos de respuesta a CREB, se procedió a iniciar la búsqueda de algún mecanismo involucrado. CREB es ampliamente expresado en cerebro, especialmente en áreas asociadas a memoria y aprendizaje. Teniendo en conocimiento, la ya

mencionada amplia asociación de los CRTCs en neurodegeneración, se procedió a evaluar su posible rol frente a lesiones del ADN.

Según la literatura CRTC1 ha sido fuertemente involucrado en la modulación de la plasticidad sináptica a largo plazo y en la neuroprotección (Kovacs *et al*, 2007; España *et al*, 2010; Cohen *et al*, 2012) y en consecuencia a ello, se han propuesto terapias dirigidas a la modulación de éste co-factor en enfermedades neurodegenerativas. No existen estudios en los cuales lo involucre directamente a CRTC2, principalmente debido a su baja expresión respecto a la isoforma 1. Nuestros resultados apoyan estas investigaciones en relación a la posible implicancia de CRTC1 en plasticidad, y entregan señales de la posible asociación entre su activación y el daño al ADN. La translocación de CRTC2 hacia el núcleo no fue posible en respuesta al daño, lo cual no coincide con los resultados obtenidos en Carriba y colaboradores (2012). Lo anterior, fue confirmado mediante ensayos de inmunodetección de CRTC2 en proteínas totales, donde se tenía como objetivo analizar su estado de fosforilación bajo tratamientos con etopósido. Se confirmó la baja activación de CRTC2 debido a que se comportó de igual manera que en muestras control, no siendo así en el control positivo tratado con FSK.

Los resultados entregan una confirmación parcial de la hipótesis en la cual proponemos que la generación de daño a la doble hebra de ADN en células neuronales es capaz de modificar los patrones de expresión de los genes de plasticidad. Se observó principalmente, que los DSBs generados por tratamientos con etopósido produjeron un notorio aumento de ambos genes de plasticidad sináptica analizados en este estudio, sugiriendo que el DSBs del DNA genera la activación de los mecanismos de respuesta de daño al DNA mediante la activación de ATM y que la célula posiblemente trata de estabilizar ese dicho daño mediante el incremento de

conexiones neuronales, modulando para ello, la expresión de dos de los genes de plasticidad primordiales en éste proceso, BDNF y Arc. Para ello, consecuentemente al daño, aumenta la translocación nuclear de CRTIC1 principalmente.

En conclusión, de acuerdo a los resultados preliminares obtenidos en esta investigación, se sugiere un importante rol para el daño al ADN en los mecanismos de supervivencia a nivel neuronal y sus consecuencias en la expresión génica, específicamente regulando la expresión de BDNF. Sería interesante profundizar en un futuro, en los mecanismos moleculares que involucran los co-activadores de CREB, ya que se observó una evidente modificación de su localización (principalmente de CRTIC1) e interesante modificación en el estado de fosforilación de CRTIC2 que se visualizó frente al daño.

Además, el desarrollo de un estudio futuro en modelos patológicos o neurodegenerativos sería de gran relevancia, para así establecer una relación más directa entre el daño al ADN y la expresión de genes de plasticidad sináptica modulados en respuesta a daño.

6. BIBLIOGRAFIA

- Acuña AI, Esparza M, Kramm C, Beltrán FA, Parra AV, Cepeda C, Toro CA, Vidal RL, Hetz C, Concha II, Brauchi S, Levine MS & Castro MA. (2013) A failure in energy metabolism and antioxidant uptake precede symptoms of Huntington's disease in mice. *Nat. Commun.* 4:2917-2929.
- Alberini, C. (2009) Transcription Factors in Long-Term Memory and Synaptic Plasticity. *Physiol Rev.* 89:1-46.
- Altarejos JY & Montminy M (2011) CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. *Nat Rev Mol Cell Biol.*; 12:141–151.
- Bałkowiec-Iskra E., Vermehren-Schmaedick A. & Balkowiec A. (2011) Tumor necrosis factor- α increases BDNF expression in trigeminal ganglion neurons in an activity-dependent manner. *Neurosci.*; 180: 322–333.
- Barnum, K. J. & O'Connell, M. J. (2015) Molecular mechanisms involved in initiation of the DNA damage response. *Mol & Cell Oncol.* 2: e970065-1 - e970065-7.
- Bliss TV & Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*; 361: 31-39.
- Bramham C & Messaoudi E (2005) BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol.*; 76: 99-125.
- Bramham, CR, Alme MN, Bittins M, Kuipers SD, Nair RR, Pai B, Panja D, Schubert M, Soule J, Tiron A, Wibrand K (2010) The Arc of synaptic memory. *Exp Brain Res*, 200: 125–140.
- Brito V., Giralt A., Enriquez-Barreto L., Puigdellívol M., Suelves N., Zamora-Moratalla A., Ballesteros J.J., Martín E.D, Dominguez-Iturza N., Morales M., Alberch J. & Ginés S. (2014) Neurotrophin receptor p75NTR mediates Huntington's disease-associated synaptic and memory dysfunction. *J Clin Invest*; 124: 4411-4428.
- Canugovi, C., Misiak, M., Ferarelli L.K., Croteau D.L., & Bohr, V.A. (2013) The role of DNA repair in brain related disease pathology. *DNA Repair (Amst)*; 12: 578–587.

- Carriba P., Pardo L., Parra-Damas A., Lichtenstein MP., Saura CA., Pujo A., Masgrau R. & Galea E. (2012) ATP and Noradrenaline Activate CREB in Astrocytes via Noncanonical Ca^{+2} and Cyclic AMP Independent Pathways. *GLIA*; 60: 1330-1344.
- Ceccotti, E.L. (2007). El Diagnóstico en Clínica Estomatológica. Ed. Médica Panamericana, pp. 22-23.
- Cha, M.Y., Kim, D.K. & Mook-Jung, I. (2015) The role of mitochondrial DNA mutation on neurodegenerative diseases. *Exp. & Mol Med.*; 47: e150-e158.
- Chaturvedi, R.K. Hennessey T, Johri A, Tiwari SK, Mishra D, Agarwal S, Kim YS, Beal MF (2012) Transducer of regulated CREB-binding proteins (TORCs) transcription and function is impaired in Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*, 21: 3474–3488.
- Chen M. (2014). Rol of the transcriptional coactivator CRT1 on hippocampal- dependent associative memory. Tesis de Doctorado, Instituto de Neurociencias, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Autónoma de Barcelona, 111pp.
- Chen Y., Huang X, Zhang Y., Rockenstein E., Bu G, Golde TE., Masliah E & Xu H. (2012) Alzheimer's β -secretase (BACE1) regulates the cAMP/PKA/CREB pathway independently of β -amyloid. *J Neurosci.*; 32: 11390–11395.
- Cho EC., Mitton B. & Sakamoto KM. (2011) CREB and leukemogenesis. *Crit Rev Oncog.*; 16: 37–46.
- Ciccia, A. & Elledge, S. (2010) The DNA Damage Response: Making it safe to play with knives. *Mol Cell*; 40: 179–204.
- Cohen-Cory, S. Kidane A.H., Shirkey N.J. & Marshak S. (2010) Brain-Derived Neurotrophic Factor and the Development of Structural Neuronal Connectivity. *Dev Neurobiol*; 70: 271–288.
- D'Amelio M., Cavallucci V. & Cecconi F. (2010) Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death Differ.*; 17: 1104-1114.
- D'Amelio M., Cavallucci V., Middei S., Marchetti C., Pacioni S., Ferri A., Diamantini A., De Zio D., Carrara P., Battistini L., Moreno S., Bacci A., Ammassari-Teule M., Marie H. &

- Cecconi F. (2011) Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci.*; 14: 69-76.
- Ditch, S & Paull, TT. (2012) The ATM protein kinase and cellular redox signaling: beyond the DNA damage response. *Trends Biochem Sci*; 37: 15–22.
- Dobbin MM., Madabhushi R., Pan L., Chen Y., Kim D., Gao J., Ahanonu B., Pao P–C., Qiu Y., Zhao Y. & Tsai L-H. (2013) SIRT1 collaborates with ATM and HDAC1 to maintain genomic stability in neurons. *Nat. Neurosci*; 16: 1008- 1015.
- España J, Valero J, Miñano-Molina AJ., Masgrau R., Martín E., Guardia-Laguarta C, Lleó A., Giménez-Llort L., Rodríguez-Alvarez J. & Saura CA. (2010) β - Amyloid Disrupts Activity-Dependent Gene Transcription Required for Memory through the CREB Coactivator CRTC1. *Journ. Neurosci*; 30: 9402–9410.
- Fernandes ND, Sun Y & Price BD (2007) Activation of the Kinase Activity of ATM by Retinoic Acid Is Required for CREB-dependent Differentiation of Neuroblastoma Cells. *J. Biol. Chem*; 282: 16577–16584.
- Frappart, PO & McKinnon, PJ (2008) Mouse models of DNA Double Strand Break Repair and Neurological Disease. *DNA Repair (Amst)*; 7: 1051-1060.
- Grønli, J, Soulé J and Bramham CR (2014) Sleep and protein synthesis-dependent synaptic plasticity: impacts of sleep loss and stress. *Front. Behav. Neurosci*; 7: 1-18.
- Hota SK, Hota KB, Prasad D, Ilavazhagan G, Singh SB. (2010) Oxidative-stress-induced alterations in Sp factors mediate transcriptional regulation of the NR1 subunit in hippocampus during hipoxia, *Free Rad. Biol. & Med.* 49: 178-191.
- Hyman BT. & Yuan J. (2012) Apoptotic and non-apoptotic roles of caspases in neuronal physiology and pathophysiology. *Nat Rev Neurosci.*;13: 395-406.
- Iyama, T. & Wilson III, D.M. (2013) DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst)*; 12: 620–636.
- Jalal, S, Earley JN, Turchi JJ. (2011) DNA repair: From genome maintenance to biomarker and therapeutic target. *Clin Cancer Res.*; 17: 6973–6984.

- Jackson, S. P. & Bartek, J. (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*; 461: 1071–1078.
- Jeon G.S., Kim K.Y., Hwang Y.J., Jung M.-K., An S., Ouchi M., Ouchi T., Kowall N., Lee J. & Ryu H. (2012) Deregulation of BRCA1 Leads to Impaired Spatiotemporal Dynamics of γ -H2AX and DNA Damage Responses in Huntington's Disease. *Mol Neurobiol*, 45: 550–563.
- Jin N, Qian W, Yin X, Zhang L, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong CX & Liu F (2013) CREB regulates the expression of neuronal glucose transporter 3: a possible mechanism related to impaired brain glucose uptake in Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Research*; 41: 3240–3256
- Katyal, S, Lee Y, Nitiss KC, Downing SM, Li Y, Shimada M, Zhao J, Russell HR, Petrini JH, Nitiss JL & McKinnon PJ (2014) Aberrant topoisomerase-1 DNA lesions are pathogenic in neurodegenerative genome instability syndromes. *Nat. Neurosci.* 17: 813–821.
- Korwek, Z. Sewastianik T, Bielak-Zmijewska A, Mosieniak G, Alster O, Moreno-Villaneuva M, Burkle A, Sikora E. (2012) Inhibition of ATM blocks the etoposide-induced DNA damage response and apoptosis of resting human T cells. *DNA Repair*; 11: 864– 873.
- Kovács KA, Steullet P, Steinmann M, Do KQ, Magistretti PJ, Halfon O & Cardinaux J-R (2006) TORC1 is a calcium- and cAMP-sensitive coincidence detector involved in hippocampal long-term synaptic plasticity. *PNAS*; 104: 4700–4705
- Korb E, Wilkinson CL, Delgado RN, Lovero KL & Finkbeiner S. (2013) Arc in the nucleus regulates PML dependent GluA1 transcription and homeostatic plasticity *Nat Neurosci*; 16: 1-30.
- Lazo O.M., Gonzalez A., Ascano M., Kuruvilla R., Couve A. & Bronfman F.C. (2013) BDNF regulates Rab11-mediated recycling endosome dynamics to induce dendritic branching. *Neurosci.*; 33: 6112–6122.

- Li, S, Zhang C, Takemori H, Zhou Y, Xiong ZQ. (2009) TORC1 regulates activity-dependent CREB-target gene transcription and dendritic growth of developing cortical neurons. *J. Neurosci.*; 29: 2334–2343.
- Li Y., Xiong H. & Yang DQ. (2012) Functional switching of ATM: sensor of DNA damage in proliferating cells and mediator of Akt survival signal in post-mitotic human neuron-like cells. *Chin J Cancer*; 31: 364-372.
- Lerner RG, Depatie C, Rutter GA, Screatton RA & Balthasar N. (2009) A role for the CREB co-activator CRTC2 in the hypothalamic mechanisms linking glucose sensing with gene regulation. *EMBO reports*; 10: 1175- 1181.
- Lewis, T.L. Jr., Courchet, J., and Polleux, F. (2013) Cellular and molecular mechanisms underlying axon formation, growth, and branching. *J. Cell Biol.*; 202: 837–848.
- Lu B., Nagappan G., Guan X., Nathan P.J. & Wren P. (2013) BDNF-based synaptic repair as a disease-modifying strategy for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.*; 14: 401-416
- Lu X-H, Mattis VB, Wang N, Al-Ramahi I, van den Berg N, Fratantoni SA, Waldvogel H, Greiner E, Osmand A, Elzein K, Xiao J, Dijkstra S, de Pril R, Vinters HV, Faull R, Signer E, Kwak S, Marugan JJ, Botas J, Fischer DF, Svendsen CN, Munoz-Sanjuan I, Yang XW (2014) Targeting ATM ameliorates mutant Huntingtin toxicity in cell and animal models of Huntington's disease. *Sci Transl Med*; 6: 268ra178- 268ra190.
- Lyons M.R. & West A.E. (2011) Mechanisms of specificity in neuronal activity-regulated gene transcription. *Prog Neurobiol.*; 94: 259–295
- Martin NT, Nakamura K, Davies R, Nahas SA, Brown C, Tunuguntla R, Gatti RA & Hu H. (2013) ATM-Dependent MiR-335 Targets CtIP and Modulates the DNA Damage Response. *PLoS Genet*; 9: e1003505.
- Mattson M.P (2000) Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 1: 120-129.
- McKinnon PJ. (2009) DNA Repair Deficiency and Neurological Disease. *Nat Rev Neurosci.*; 10: 100–112.

- Messaoudi E, Ying SW, Kanhema T, Croll SD & Bramham CR (2002) Brain-derived neurotrophic factor triggers transcription-dependent, late phase long-term potentiation in vivo. *J. Neurosci*; 22: 7453–7461.
- Nagahara A.H & Tuszynski M.H. (2011) Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. *Nat. Rev*; 10: 209-219.
- Panja D. y Bramham C. R. (2014). BDNF mechanisms in late LTP formation: a synthesis and breakdown. *Neuropharmacology*; 76: 664–676.
- Pietrzak M, Smith¹ SC, Geraldts JT, Hagg T, Gomes C & Hetman M. (2011) Nucleolar disruption and apoptosis are distinct neuronal responses to etoposide-induced DNA damage. *J Neurochem.*; 117: 1033–1046.
- Radak Z, Zhao Z, Goto S & Koltai E. (2011) Age-associated neurodegeneration and oxidative damage to lipids, proteins and DNA. *Mol Aspects Med*; 32: 305-315.
- Rosenberg, T, Gal-Ben-Ari S, Dieterich DC , Kreutz MR , Ziv NE, Gundelfinger ED & Rosenblum K (2014) The roles of protein expression in synaptic plasticity and memory consolidation. *Front. Mol. Neurosci.* 7: 1-14.
- Smith JA, Park S, Krause JS & Banik NL. (2013) Oxidative stress, DNA damage, and the telomeric complex as therapeutic targets in acute neurodegeneration. *Neurochem Int*; 62: 764–775.
- Sandoval S, Pigazzi M & Sakamoto KM. (2009) CREB: A Key Regulator of Normal and Neoplastic Hematopoiesis. *Adv Hematol*; 2009: 1-8.
- Sakamoto K, Karelina K & Obrietan K (2011) CREB: a multifaceted regulator of neuronal plasticity and protection. *J. Neurochem*; 116: 1–9.
- Screaton RA, Conkright MD, Katoh Y, Best JL, Canettieri G, Jeffries S, Guzman E, Niessen S, Yates JR III, Takemori H, Okamoto M, Montminy M. (2004) The CREB coactivator TORC2 functions as a calcium- and cAMP-sensitive coincidence detector. *Cell*; 119: 61–74.
- Sherman MH, Kuraishy AI, Deshpande C, Hong JS, Cacalano NA, Gatti RA, Manis JP, Damore MA, Pellegrini M & Teitell MA (2010) AID-Induced Genotoxic Stress Promotes B Cell

- Differentiation in the Germinal Center via ATM and LKB1 Signaling. *Mol. Cell* ; 39: 873-885.
- Sherman, M.H., Bassing, C.H. & Teitell, M.(2011) DNA damage response regulates cell differentiation. *Trends Cell Biol.*; 21: 312–319.
- Sirbu, B. M. & Cortez, D. (2014) DNA Damage Response: Three Levels of DNA Repair Regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*; 5: 1-22
- Sohn S, Im JE, Kim TE, Kee C. (2013) Effect of Heat Shock Protein 72 Expression on Etoposide-induced Cell Death of Rat Retinal Ganglion Cells. *KJO*; 27: 48-51.
- Stracker, T.H., Roig, I., Knobel P.A. and Marjanovic, M. (2013) The ATM signaling network in development and disease. *Front. in genet.*; 4: 1-19.
- Van Kanegan MJ, He DN, Dunn DE, Yang P, Newman RA, West AE & Lo DC. (2014) BDNF Mediates Neuroprotection against Oxygen-Glucose Deprivation by the Cardiac Glycoside Oleandrin. *J. Neurosci.*, 34: 963–968.
- Wang Y, Inoue H, Ravnskjaer K, Viste K, Miller N, Liu Y, Hedrick S, Vera L & Montminy M (2010) Targeted disruption of the CREB coactivator Crtc2 increases insulin sensitivity. *PNAS*; 107: 3087–3092.
- Yoon YS, Ryu D, Lee MW, Hong S & Koo SH. (2009) Adiponectin and thiazolidinedione targets CRTC2 to regulate hepatic gluconeogenesis. *Exp. Mol. Med*; 41: 577-583.
- Zheng F, Zhou X, Moon C & Wang H. (2012) Regulation of brain-derived neurotrophic factor expression in neurons. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*; 4: 188-200.
- Zschätzsch M., Oliva C., Langen M., De Geest N., Özel M.N., Williamson W.R., Lemon W.C, Soldano A., Munck S., Hiesinger P.R., Sanchez-Soriano N, Hassan B.A. (2014) Regulation of branching dynamics by axon-intrinsic asymmetries in Tyrosine Kinase Receptor signaling. *eLife* ; 3: e01699.