



Departamento de Radiología y Medicina Física
Laboratorio de Investigaciones Médicas
y Biología Tumoral
Hospital Clínico Universitario
Universidad de Granada



Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra"
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Granada

TESIS DOCTORAL

MODULACIÓN POR LA POLI (ADP-RIBOSA) POLIMERASA-1 DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE LA CARCINOGENÉISIS EPIDÉRMICA

FRANCISCO DAVID MARTÍN OLIVA

GRANADA, ABRIL DE 2005

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Francisco David Martín Oliva
D.L.: Gr. 805 - 2005
ISBN: 84-338-3390-1



Departamento de Radiología y Medicina Física
Laboratorio de Investigaciones Médicas
y Biología Tumoral
Hospital Clínico Universitario
Universidad de Granada



Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra"
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Granada

MODULACIÓN POR LA POLI (ADP-RIBOSA) POLIMERASA-1 DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE LA CARCINOGENÉISIS EPIDÉRMICA

Trabajo presentado por **FRANCISCO DAVID MARTÍN OLIVA**,
Licenciado en Ciencias Biológicas, para optar al grado de Doctor.

Directores

Prof. Dr. FRANCISCO JAVIER OLIVER POZO, Científico Titular del
CSIC, Instituto de Parasitología y Biomedicina "Lopez-Neyra".

Prof. Dr. JOSÉ MARIANO RUIZ DE ALMODÓVAR RIVERA,
Catedrático de Radiología y Medicina Física de la Universidad de
Granada.

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada por el que suscribe en el Laboratorio de Investigaciones Médicas y Biología Tumoral del Hospital Clínico Universitario San Cecilio, y en el Instituto de Parasitología y Biomedicina "Lopez-Neyra" del CSIC, y concluida el 12 de Abril de 2005.

Fdo. Francisco David Martín Oliva

AUTORIZACIÓN PARA LA PRESENTACIÓN DE LA TESIS

FRANCISCO JAVIER OLIVER POZO, CIENTÍFICO TITULAR DEL CSIC, Y JOSÉ MARIANO RUIZ DE ALMODÓVAR RIVERA, CATEDRÁTICO DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA, DEPARTAMENTO DE RADIOLOGÍA Y MEDICINA FÍSICA

CERTIFICAN: Que la presente Tesis, titulada "Modulación por la Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa-1 de la expresión génica durante la carcinogénesis epidérmica", de la que es autor el Ldo. D. FRANCISCO DAVID MARTÍN OLIVA, que superó el Programa de Doctorado "Avances clínicos y desarrollo tecnológico en Radiología, Medicina Física y Física Médica", ha sido realizada bajo su dirección en el Laboratorio de Investigaciones Médicas y Biología Tumoral del Hospital Clínico Universitario San Cecilio de Granada, y en el Instituto de Parasitología y Biomedicina "Lopez-Neyra" del CSIC.

Revisado el presente trabajo, los directores consideran que tiene la calidad científica necesaria para ser defendido ante el Tribunal que se designe al efecto, por lo que:

AUTORIZAN la presentación de la referida Tesis para su defensa y mantenimiento de acuerdo con lo previsto en el Real Decreto 778/1998, de 30 de abril.

Y para que conste y surta sus efectos en el expediente correspondiente, expedimos la presente certificación en Granada a doce de Abril de dos mil cinco.

Francisco Javier Oliver Pozo

José Mariano Ruiz de Almodóvar Rivera

A mi madre y familia

A Maribel

A mi hijo David

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todos los que de una manera u otra han contribuido a la realización de esta tesis.

Al Dr. Francisco Javier Oliver Pozo, Director de esta tesis, a quien estoy especialmente agradecido por iniciarme en la línea de trabajo de su grupo de investigación de la cual ha nacido esta tesis, por su hábil y experta dirección, y por su continua preocupación para que mi formación estuviese a un alto nivel.

Al Prof. Dr. D. José Mariano Ruiz de Almodóvar Rivera, Director de esta tesis, por su constante apoyo y dedicación a este trabajo, por su detenida revisión y corrección del manuscrito, por su generosidad, buen trato y colaboración recibida.

Al Prof. Dr. D. Raimundo García del Moral y Prof. Dr. D. Francisco O`Valle Ravassa, por su colaboración en la realización de los estudios histológicos y por sus sabios y oportunos consejos.

Al Dr. Miguel Ángel Piris Pinilla, Director del Programa de Patología Molecular del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), por haberme permitido gentilmente la realización del estudio de *microarray* en su laboratorio.

A la Dra. Raquel Villuendas y Paloma de la Cueva, por su inestimable ayuda en la preparación de la hibridación del *microarray*, lectura e interpretación de datos.

A mis compañeros de laboratorio, José Antonio Muñoz Gámez, Rocío Aguilar Quesada, Rosa Quiles y Gustavo Ortiz Ferrón, porque de una u otra forma han contribuido al desarrollo de este trabajo, por compartir con ellos

innumerables experiencias, convirtiendo estos años de convivencia en una experiencia inolvidable.

Al grupo de investigación del Dr. D. Abelardo López Rivas, por sus sabios consejos y discusiones en los seminarios de grupos realizados durante el tiempo de estancia en el Instituto "López-Neyra".

A todas aquellas personas que han hecho que mi estancia en el Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra" (CSIC) sea una experiencia agradable e inolvidable, tanto a nivel científico como personal, por el trato amable recibido y cordialidad que han mostrado siempre. De manera especial, agradecer al Dr. D. Javier Martín Ibáñez, jefe del Departamento de Biología Molecular e Inmunología, por sus continuos esfuerzos para que mi estancia en este centro fuese productiva y duradera.

A las Dras. D^a Maria Isabel Nuñez Torres, D^a Mercedes Villalobos Torres y D^a Teresa Valenzuela Claros por los momentos compartidos en el inicio de este trabajo y ayuda recibida en mi formación.

A Dolores Beriso, Francisco Ferrer y Fernando Medina, personal del Servicio del Animalario del Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra" (CSIC), por su valiosa ayuda en el cuidado y realización de los experimentos con animales.

Al personal técnico del Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada por su colaboración en la realización de los cortes histológicos.

A Concepción Fernández España, Concepción Fernández Guerrero y Francisca Aguilar Torres, personal técnico del laboratorio de Investigaciones Médicas del Hospital Clínico San Cecilio, por su desinteresada ayuda en la parte inicial de este trabajo.

A mi madre y familia, por su apoyo incondicional y su cariño, y porque siempre han procurado que nada obstaculizara este camino tan importante para mí. Deseo hacer extensible estas consideraciones de manera especial a Ernesto, por su sincero interés en este trabajo de tesis, y lo que es aún más importante, por mostrarme de manera sorprendente como superar los inconvenientes y la necesidad de hacerles frente.

A Maribel, por su comprensión y por haber sacrificado muchas horas en beneficio de mi labor científica. Sin ella no sería lo mismo.

A mi hijo David, por permitirme que le haya robado horas de su tiempo de juego en beneficio de la confección de esta tesis y por acompañarme algunos sábados al laboratorio. Sin él los experimentos no saldrían igual...

Y por último, agradecer al Fondo de Investigación Sanitaria (Instituto de Salud Carlos III), por la ayuda económica recibida durante los años 2001-2005, dentro de las Becas de Formación en Investigación (BEFI), convocatoria del Ministerio de Sanidad y Consumo para el programa de Recursos Humanos y Difusión de la Investigación Biomédica.

Este trabajo de tesis ha sido posible gracias a la financiación recibida de los siguientes proyectos de investigación:

- "Oncología Experimental: La enzima PARP como diana antitumoral y como marcador de la agresividad de las neoplasias". Entidad financiadora: Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), proyecto 00/0948.
- "Factores celulares y moleculares determinantes de control tumoral y riesgo de complicaciones en las aplicaciones terapéuticas de la radiación". Entidad financiadora: CICYT-SAF: 2001-3533.
- "Nuevas funciones de la Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa-1 en la señalización y en el control de la respuesta celular durante el daño genotóxico. Entidad financiadora: CICYT-SAF: 2003-01217.

*La vida no es ningún pasillo recto y fácil
que recorremos libres y sin obstáculos,
sino un laberinto de pasadizos,
en el que tenemos que buscar nuestro camino,
perdidos y confusos, detenidos,
de vez en cuando, por un callejón sin salida.*

*Pero, si tenemos fe, siempre se abre
una puerta ante nosotros;
quizás no sea la que imaginamos,
pero si será, finalmente,
la que demuestre ser buena
para nosotros.*

A. J. Cronin
(1896-1981)

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL	7
1. INFLAMACIÓN Y CÁNCER	9
2. EL PROCESO DE CARCINOGENESIS EPITELIAL	11
2.1 Estructura de la piel.	11
2.2 Carcinogénesis epidérmica.	14
3. ACTIVACIÓN DE NF- κ B Y AP-1 EN LA CARCINOGENESIS	21
3.1 Papel de NF- κ B en la carcinogénesis epitelial.	21
3.2 Papel de AP-1 en la carcinogénesis epitelial.	24
4. POLI-ADP-RIBOSA POLIMERASA-1 (PARP-1)	28
4.1 Actividad enzimática de PARP-1.	28
4.2 Estructura de PARP-1.	31
4.3 Funciones de PARP-1.	32
5. ESTRATEGIAS EN EL ESTUDIO DE PARP-1	36
5.1 Desarrollo de ratones deficientes en PARP-1.	36
5.2 Desarrollo de inhibidores farmacológicos de PARP-1.	37
6. PARP-1 E INFLAMACIÓN	41
7. PARP-1 Y TRANSCRIPCIÓN GÉNICA.....	44
8. REGULACIÓN DE NF- κ B POR PARP-1.....	47
8.1 Interacción directa entre PARP-1 y NF- κ B.	47
8.2 Poli-ADP-ribosilación de NF- κ B por PARP-1.....	48
9. REGULACIÓN DE AP-1 POR PARP-1	51
10. REFERENCIAS.....	53
PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO	67
<u>CAPÍTULO I:</u> RESISTENCIA A LA CARCINOGENESIS EPIDÉRMICA	
EN RATONES PARP-1 KNOCKOUT DEBIDO A UNA ACTIVACIÓN	
DEFICIENTE DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF-κB.....	71
1.1 RESUMEN	73
1.2 INTRODUCCIÓN	75
1.3 MATERIALES Y MÉTODOS	77
1.3.1 Ratones y protocolo de inducción tumoral.....	77
1.3.2 Genotipaje de los ratones.....	77
1.3.3 Medidas de proliferación y apoptosis.....	79

1.3.4 Medidas de unión de NF- κ B al ADN.....	82
1.3.5 Obtención de los extractos nucleares.....	83
1.3.6 Determinación de las concentraciones de proteínas de los extractos nucleares.....	84
1.3.7 Expresión de genes regulados por NF- κ B mediante RT-PCR.....	84
1.3.8 Extracción y cuantificación del ARN.	86
1.3.9 Estudio histológico de las pieles de ratón.....	87
1.3.10 Análisis estadístico.	87
1.4 RESULTADOS.....	89
1.4.1 Genotipaje de los ratones <i>parp-1^{+/+}</i> y <i>parp-1^{-/-}</i> mediante PCR.....	89
1.4.2 Resistencia y retraso temporal a la carcinogénesis epidérmica en los ratones <i>parp-1^{-/-}</i>	89
1.4.3 Fenómenos de hiperplasia epitelial en el área tratada.	91
1.4.4 Modulación genética de la respuesta inflamatoria.....	91
1.4.5 Recambio celular en tumores quimioinducidos.....	92
1.4.6 Proliferación celular en los tumores experimentales.....	92
1.4.7 Proliferación celular en la fase inicial del desarrollo tumoral.	93
1.4.8 Activación de NF- κ B y expresión de genes dependientes.....	94
1.5 DISCUSIÓN	97
1.6 REFERENCIAS.....	99
1.7 FIGURAS Y TABLAS	103

CAPÍTULO II: LA INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PARP-1 CONFIERE RESISTENCIA AL DESARROLLO DE TUMORES..... 121

2.1 RESUMEN	123
2.2 INTRODUCCIÓN	125
2.3 MATERIALES Y MÉTODOS	127
2.3.1 Modelo experimental y protocolo de inducción tumoral.....	127
2.3.2 Medidas de unión de NF- κ B y AP-1 al ADN.	128
2.3.3 Obtención de los extractos nucleares.....	129
2.3.4 Determinación de las concentraciones de proteínas de los extractos nucleares.....	129
2.3.5 Ensayos de actividad enzimática de PARP-1.....	129

2.3.6 Actividad transcripcional de NF- κ B.....	130
2.3.7 Estudio histológico de las pieles de ratón.....	133
2.3.8 Análisis estadístico.	133
2.4 RESULTADOS.....	135
2.4.1 La inhibición de la actividad enzimática de PARP-1 interfiere en la tumorigénesis epidérmica.	135
2.4.2 Análisis histológico de la piel al final del proceso de carcinogénesis.....	137
2.4.3 Alteraciones moleculares en las etapas tempranas de promoción tumoral.....	138
2.4.4 La actividad transcripcional dependiente de NF- κ B no se encuentra disminuida al inhibir la actividad enzimática de PARP mediante DPQ.....	141
2.5 DISCUSIÓN.....	143
2.6 REFERENCIAS.....	147
2.7 FIGURAS Y TABLAS.....	151

<u>CAPÍTULO III:</u> EL BLOQUEO DE LA POLI-ADP-RIBOSILACIÓN MODULA LA EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL DURANTE EL PROCESO DE CARCINOGENÉNESIS EPIDÉRMICA.....	167
3.1 RESUMEN.....	169
3.2 INTRODUCCIÓN.....	171
3.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	173
3.3.1 Ratones y protocolo de promoción tumoral.....	173
3.3.2 Extracción, purificación y precipitación del ARN.....	174
3.3.3 Amplificación de ARN mensajero (aRNA) a partir de ARN total.....	175
3.3.4 Preparación del cDNA fluorescente para microarrays a partir de ARN mensajero amplificado (aRNA).	177
3.3.5 Hibridación de los microarrays.....	178
3.3.6 Lectura y análisis de los datos de la hibridación con microarrays.....	181
3.3.7 PCR en tiempo real.	181
3.4 RESULTADOS.....	187

3.4.1 <i>Análisis de la expresión génica diferencial dependiente de PARP-1 en el proceso de carcinogénesis.</i>	187
3.4.2 <i>Efecto de la inhibición de la actividad enzimática de PARP-1.</i>	189
3.4.3 <i>Hif1a, S100a9 y Nfkbzi: tres importantes genes en el desarrollo tumoral y la inflamación.</i>	191
3.4.4 <i>Genes cuya expresión resulta reprimida en el proceso de carcinogénesis química.</i>	192
3.4.5 <i>Estudio de la expresión génica mediante PCR en tiempo real.</i>	193
3.5 DISCUSIÓN	197
3.6 REFERENCIAS.....	205
3.7 FIGURAS Y TABLAS	213
CONCLUSIONES.....	227
ABREVIATURAS.....	231

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. INFLAMACIÓN Y CÁNCER

La asociación funcional entre inflamación y cáncer es un hecho que se empezó a relacionar hace más de un siglo. Ya por los años 1860, Virchow y col. hipotetizaban sobre el origen del cáncer. Decían que este se iniciaba en zonas o lugares sometidos a procesos de inflamación crónica. Para ello se basaban, en parte, en la hipótesis de que algunas sustancias irritantes junto a lesiones en tejidos, y la consecuente inflamación, producían en el órgano afecto, un incremento de la proliferación celular (Balkwill y Mantovani, 2001). Aunque no parece claro que la proliferación de células por sí sola pueda causar cáncer, si es cierto que una sostenida proliferación celular en un micro ambiente inflamatorio potencia el riesgo de desarrollar neoplasias, debido en gran parte a la gran liberación de mediadores pro-inflamatorios, factores de crecimiento, presencia de células inflamatorias y agentes que ocasionan daños en el ADN. En este sentido, células proliferativas con daños en su ADN (células iniciadas) continúan proliferando promovidas por ese ambiente inflamatorio y de respuesta a la agresión (estrés) que puede finalmente dar origen al desarrollo de un tumor (Dvorak, 1986).

Hoy en día, la relación causal entre inflamación, inmunidad y cáncer está extensamente aceptada, aunque muchos de los mecanismos celulares y moleculares que median esta relación no se conocen con precisión, por ejemplo, no sabemos cómo las células tumorales son capaces de escapar a los mecanismos a través de los cuales la inflamación interactúa con el cáncer. Los procesos por los cuales se desarrolla un tumor engloban a situaciones descontroladas de proliferación celular del propio tumor y respuesta inflamatoria, con el consecuente reclutamiento de células procedentes del hospedador (neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, eosinófilos, mastocitos, linfocitos) y producción local de grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno que producen daños en el ADN de las células implicadas en el proceso neoplásico. Esta continuada acción redundante en un proceso de inflamación crónica que puede ser mantenido debido bien a una persistencia de los factores desencadenantes de la

promoción tumoral, o bien, por el fracaso de los mecanismos de control de la respuesta inflamatoria. Además, el desarrollo de células tumorales potencia esta acción inflamatoria, haciéndola aún más persistente. Estas células tumorales tienen capacidad para producir citoquinas y quimocinas que atraen al componente inflamatorio hacia la zona de la lesión. A su vez, esta población de leucocitos genera también una posterior oleada de mediadores citotóxicos, radicales libres, proteasas, mediadores de muerte celular, TNF- α , interleuquinas e interferones (Kuper y col., 2000; Wahl y Kleinman, 1998). Dependiendo del balance de los productos pro-inflamatorios liberados, así será el resultado del desarrollo del tumor. De tal modo que los tumores que producen menor cantidad de citoquinas pro-inflamatorias (o mayor cantidad de citoquinas anti-inflamatorias) resultan en tumores de menor tamaño en comparación con aquellos tumores que sobre expresan estas citoquinas pro-inflamatorias. Ello se debe a que en presencia de una mayor inducción de los procesos inflamatorios, originados por estos mediadores, se potencia también fenómenos angiogénicos imprescindibles para el crecimiento tumoral (Coussens y Werb, 2002) (figura 1).

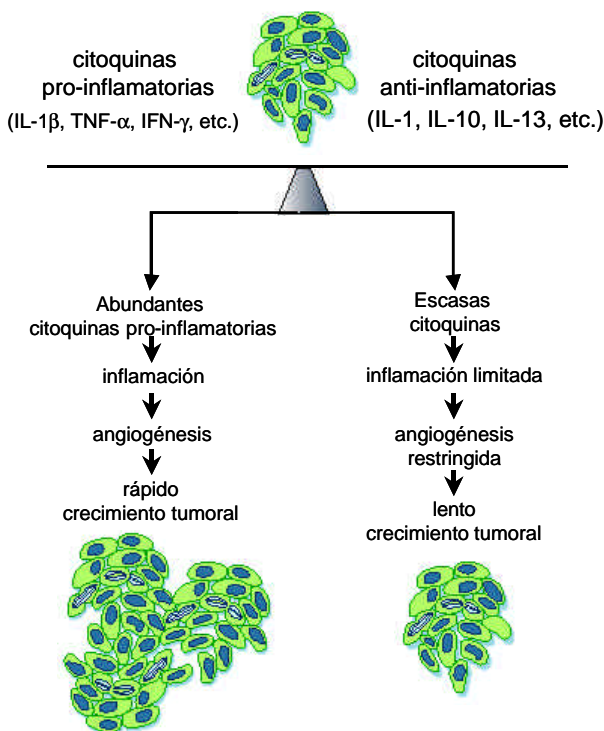


Fig. 1 Regulación del crecimiento tumoral por la inflamación. El balance de citoquinas pro y anti-inflamatorias liberadas en un tumor es crítico para el desarrollo de éste (adaptado de Coussens y Werb, 2002).

Por tanto, según todo lo anterior, parece claro que una terapia anti-inflamatoria puede ser eficaz para controlar el crecimiento tumoral y evitar la progresión maligna de la enfermedad, y en este sentido, regular la activación de factores de transcripción claves en los procesos inflamatorios, tales como NF- κ B y AP-1, durante el proceso de tumorigénesis resulta de vital importancia para lograr una buena respuesta anti-tumoral (Greten y Karin, 2004).

2. EL PROCESO DE CARCINOGENÉISIS EPITELIAL

El modelo murino de inducción a la carcinogénesis mediante el uso de sustancias químicas es uno de los mejores modelos establecidos para el estudio *in vivo* de la carcinogénesis epitelial (Yuspa y col., 1988; Yuspa, 1994), representando una importante herramienta para el estudio y comprensión de los fenómenos implicados en las distintas etapas del proceso tumoral y neoplasias humanas. Debido a la importancia de este fenómeno en nuestro modelo experimental, la piel de ratón, pasaremos a continuación a describir la estructura y función de este órgano.

2.1 Estructura de la piel.

La piel es un órgano destinado a mantener la forma del cuerpo, establecer relaciones sensoriales con el medio ambiente y protegerlo de las agresiones externas (microorganismos, luz ultravioleta, traumas mecánicos). Además es responsable de la homeostasis y la termorregulación; también es el reflejo de enfermedades sistémicas. La piel está constituida por 3 capas, situadas horizontalmente y organizadas desde la zona superficial hasta la zona profunda por la epidermis, dermis e hipodermis fundamentalmente y otras estructuras tales como pelo, uñas, glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas. Por tanto, la piel puede considerarse como un gran órgano constituido por tres tipos principales de tejidos: tejido epitelial (la epidermis) en la parte externa, tejido conjuntivo que constituye la capa de la dermis (a partir de la cual se fabrica la piel) y la capa más profunda de tejido adiposo: la hipodermis (Parakkal y col., 1962):

- La epidermis es un epitelio pluriestratificado constituido mayoritariamente por queratinocitos (denominados así debido a que su actividad característica diferenciada es la síntesis de proteínas denominadas queratinas que forman los filamentos intermedios). Estas células varían de aspecto de una capa a otra. Las que se hallan en la capa más interna, adheridas a una lámina basal subyacente, se denominan células basales y normalmente son éstas las que presentan un mayor número de mitosis (figura 2). Además, secretan interferón, prostaglandinas, interleuquinas, etcétera

(Braun-Falco y col., 1985). Por encima de las células basales se hallan unas cuantas capas de grandes células espinosas, cuyos numerosos desmosomas (zonas de anclaje de gruesos haces de filamentos de queratina) se visualizan al microscopio óptico como finas espigas alrededor de la superficie celular (de ahí su nombre) (Allen y Potten, 1975). Por encima del estrato espinoso se extiende la capa granular (figura 2). Esta capa marca la frontera entre la zona

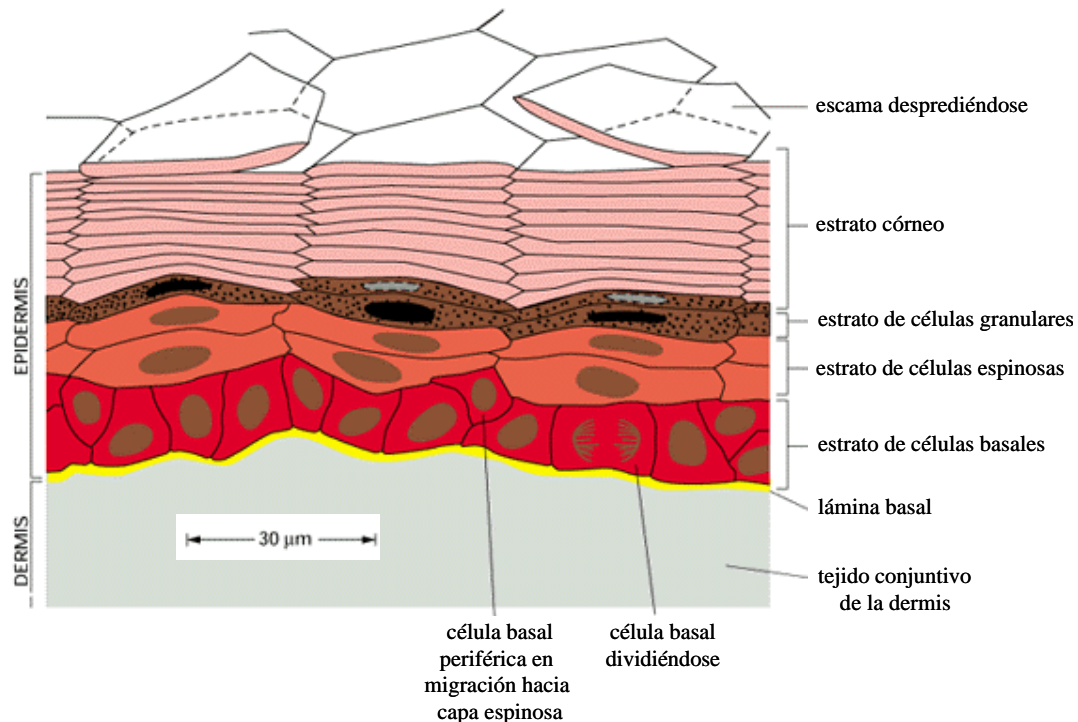


Fig. 2 Esquema de la organización de la capa epidérmica de la piel (adaptado de *Molecular Biology of the Cell, Third Edition*).

profunda metabólicamente activa y la zona externa de la epidermis constituidas por células muertas (escamas) cuyos orgánulos intracelulares han desaparecido dando lugar a la capa córnea. Las células granulares, entre las células espinosas y las escamas aplanadas, se hallan en la penúltima fase de queratinización y aparecen granuladas debido a que contienen unos agregados que se tiñen de oscuro, formados por un material denominado queratohialina, que al parecer participa en la compactación intracelular y en el ensamblaje de la queratina. La queratohialina está formada básicamente por una proteína conocida como filagrina. Además de las células destinadas a la queratinización, las capas profundas de la epidermis contienen un número reducido de células de carácter bastante diferente: como las células de Langerhans, que son

células dendríticas de la línea monocito-macrófago, derivadas de la médula osea (Shelley yJuhlin, 1978); los melanocitos, células pigmentarias derivadas de la cresta neural (Jimbow y col., 1976); y las células de Merkel, mecanorreceptores que están asociadas con terminaciones nerviosas de la epidermis (kurosumi y col., 1979). Como se ha comentado anteriormente, las células más externas de la epidermis se reducen a escamas repletas de queratina densamente empaquetada (figura 2). La membrana plasmática de las escamas y de las células granulares más externas se halla reforzada por su cara citoplasmática por una capa fina, resistente y entramada que contiene una proteína intracelular denominada involucrina. Normalmente las propias escamas se hallan tan comprimidas y son tan delgadas que sus límites se visualizan con dificultad al microscopio óptico. En cuanto a la imagen o estructura dinámica de la epidermis, sólo algunas células basales se dividen, incorporándose a la población celular de la capa basal, otras salen de la capa celular basal y entran en la capa de células espinosas, siendo éste el primer paso de su camino ascendente. Cuando llegan al estrato granular, las células empiezan a perder sus núcleos y orgánulos citoplasmáticos y se transforman en las células escamosas queratinizadas de la capa cornea. Finalmente las células escamosas queratinizadas se descaman en la superficie de la piel (figura 2). El periodo que transcurre desde el momento en que se forma una célula en la capa basal de la piel humana hasta el momento en que se desprende de su superficie, oscila entre dos y cuatro semana dependiendo de la región del cuerpo de que se trate.

- La dermis está formada por tejido conjuntivo laxo y sirve de soporte a la epidermis. Está compuesto por el componente celular fijo formado por fibroblastos, histiocitos (células que fagocitan la melanina dando origen a los melanófagos), mastocitos o células cebadas (con importancia en las reacciones inflamatorias), proteínas fibrosas como el colágeno (constituye aproximadamente el 95% del material fibrilar), la elastina (menos del 2% del material fibrilar), sustancia fundamental o amorfa y el componente celular migratorio compuesto por eosinófilos, linfocitos y leucocitos polimorfo nucleares (Briggaman, 1982). Los fibroblastos son las células más abundantes en la dermis, de origen mesenquimatoso, se observan a microscopio como células fusiformes, de núcleo claro, que dan origen a las fibras y la sustancia

fundamental. Son unas células especializadas en la síntesis de las fibras de colágeno, elásticas y reticulares. Los fibroblastos también tienen que ver con la destrucción del colágeno pues producen colagenasa, una enzima encargada de la degradación del colágeno. La sustancia fundamental o amorfa es el material que junto con las glicoproteínas y proteínas fibrilares forman la matriz extracelular de la dermis. Está compuesta por mucopolisarcáridos (ácido hialurónico, dermatán sulfato), agua, sales, glicoproteínas similares a las del plasma (fibronectina, laminina). Dentro de sus funciones destaca la de contribuir en la regulación del balance hidroelectrolítico, además de poseer un importante papel en el crecimiento, diferenciación y migración celular, unión de los componentes dérmicos y función estructural en la constitución de la membrana basal. Los componentes celulares y extracelulares de la dermis requieren de un complejo sistema de adhesión celular. Las moléculas de adhesión celular (CAMs) son glicoproteínas de la superficie celular que permiten la adhesión entre las células. También estas moléculas desempeñan un papel importante en la inmunidad (presentación de antígenos y adhesión a los vasos sanguíneos). Se reconocen 4 familias de moléculas de adhesión celular: las inmunoglobulinas, las integrinas, las caderinas y las selectinas.

- La hipodermis o tejido celular subcutáneo es un tejido constituido por grandes lóbulos de tejido graso limitados por tabiques de fibras de colágeno delgadas y escasas fibras elásticas. Las fibras de colágeno se disponen en haces distribuidos sin orientación fija. En este tejido los haces forman una trama tridimensional lo que le confiere cierta resistencia a las tracciones ejercidas en cualquier dirección. La proporción de tejido adiposo es variable según su localización; cuando es más abundante se le denomina panículo adiposo. En la hipodermis se encuentran la red vascular profunda, las porciones inferiores de algunos folículos pilosos, acinos de glándulas, corpúsculos sensoriales de Vater-Paccini (cambios de presión) y los corpúsculos de Rufini (cambios térmicos, principalmente calor).

2.2 Carcinogénesis epidérmica.

Los estudios experimentales de inducción de cáncer en la piel de ratones por la aplicación de compuestos químicos, han sido una importante

fuentes de información en lo que se refiere al conocimiento y caracterización de las etapas por las que atraviesa el proceso de carcinogénesis. En la década de 1940, diversos trabajos mostraron que ciertas sustancias, administradas en una dosis alta, eran capaces de provocar tumores malignos por sí solas, por lo que se les denominó carcinógenos completos. Por el contrario, se observó que una dosis baja de dichas sustancias sólo producía cáncer si se acompañaba de la aplicación repetida de otra sustancia capaz de promover la división celular (agente promotor). En un principio tal hallazgo hizo pensar que el cáncer pasaba por una primera etapa de "iniciación" (inducida por un agente iniciador), seguida por una segunda etapa de "promoción". Más tarde se descubrió que si se aplicaba alguna dosis de un agente iniciador y se espaciaba semanalmente hasta un año la aplicación del promotor, también se producían tumores (Siebert y col., 1981). Esto llevó a pensar que la célula "guardaba la memoria" del cambio provocado por el iniciador; dicho cambio, entonces, era irreversible y debería corresponder a una mutación, es decir, a una modificación en el material genético de la célula.

Por ejemplo, pueden producirse cáncer de piel en ratones aplicando repetidamente sobre la piel un carcinógeno químico mutagénico, como el benzo[a]pireno (un constituyente del alquitrán y del humo del tabaco), o el compuesto relacionado, dimetilbenzo[a]antraceno (DMBA). Sin embargo, generalmente una sola aplicación del agente cancerígeno no produce por sí sola ningún tumor o ninguna otra anomalía permanente. A pesar de ello, esta sustancia causa alteraciones genéticas latentes, lo cual se puede detectar a través de una mayor incidencia de cáncer cuando las células están expuestas ya sea a tratamientos posteriores con la misma sustancia o a otro tipo de agresiones bastante distintas. Un carcinógeno que siembra la "semilla del cáncer" de esta forma se dice que actúa como un iniciador tumoral, y la exposición repetida durante un periodo de meses a ciertas sustancias conocidas como promotores tumorales, que en sí mismo no son mutagénicos, pueden producir cáncer selectivamente en una piel que previamente ha sido expuesta a un iniciador tumoral. Los promotores tumorales más ampliamente estudiados son los ésteres de forbol como el acetato de tetradecanoilforbol (TPA, de *TetradecanoylPhorbol Acetate*), que son también activadores artificiales de la proteína quinasa C. Estas sustancias causan cáncer con una

frecuencia elevada tan sólo si se aplican después de un tratamiento con un iniciador mutagénico. Tan sólo aparece cáncer si la exposición al promotor sigue a la exposición al iniciador, y sólo si la intensidad de la exposición al promotor excede de un cierto umbral (Argyris, 1985; Kitchin y col., 1994). También puede producirse cáncer como resultado de la exposición repetida solamente al iniciador (figura 3).

Como cabe esperarse de un daño genético, los cambios ocultos producidos por un iniciador tumoral son irreversibles: así, se pueden poner de manifiesto mediante tratamiento con un promotor tumoral incluso después de un largo periodo de tratamiento. Aparentemente, el efecto inmediato del

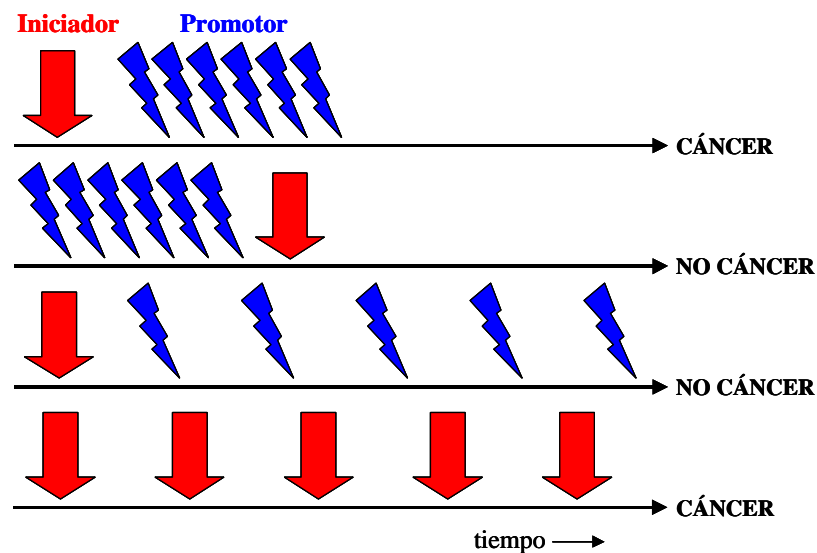


Fig. 3 Ejemplos de algunos programas posibles de exposición a un iniciador tumoral (mutagénico) y a un promotor tumoral (no mutagénico) y sus consecuencias.

promotor es estimular la división celular o hacer que las células que normalmente seguirían una diferenciación terminal continúen dividiéndose. La exposición previa al iniciador provoca el crecimiento de una gran cantidad de tumores benignos parecidos a verrugas, denominados papilomas. Cuanto mayor es la dosis previa del iniciador mayor es el número de papilomas inducidos (Argyris, 1985; Kitchin y col., 1994); parece que cada papiloma, al menos para bajas dosis del iniciador, consiste en un único clon de células descendiente de una célula mutante producida por el iniciador. Probablemente, la aplicación del promotor actúa induciendo la expresión de algunos de los

genes que directa o indirectamente afectan a la proliferación celular. Estos genes pueden permanecer quiescentes en el epitelio en reposo, de manera que cualquier mutación que se haya producido en respuesta al iniciador pasa inadvertida, pero al inducir la expresión génica mediante el promotor puede ponerse de manifiesto tales mutaciones y permitirles empezar a influir en la proliferación celular (figura 4). En caso de interrumpir la exposición al promotor tumoral casi todos los papilomas inducidos entran en regresión, y la piel recupera una apariencia prácticamente normal.

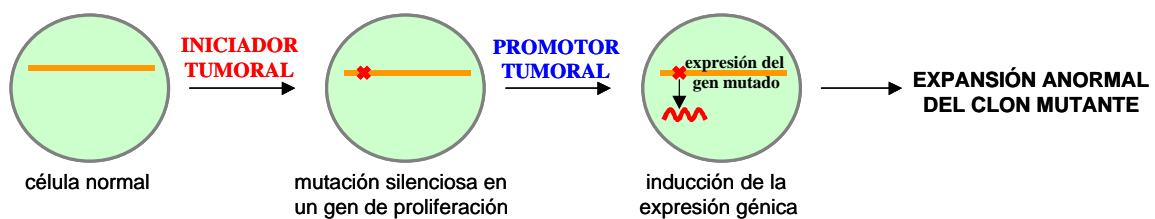


Fig. 4 Hipótesis propuesta para explicar el efecto de los promotores tumorales sobre el desarrollo de los tumores.

Sin embargo, puede ocurrir que en algunos papilomas se produzcan cambios adicionales que permitan que el crecimiento continúe de forma incontrolada. Estos cambios parecen originarse de vez en cuando en células de papilomas individuales, con una frecuencia aproximada igual a la esperada para las mutaciones espontáneas. De esta forma, una pequeña proporción de papilomas progresan hasta convertirse en cánceres malignos (Hecker, 1987). El estudio de los tumores permitió la identificación de múltiples cambios en el número y estructura de los cromosomas de las células tumorales, a medida que se volvían invasivos. Esto, junto con otros hallazgos, llevó a concluir la existencia de una tercera etapa en el desarrollo del cáncer: la "progresión tumoral", así como a considerar que se requería un segundo acontecimiento genético (probablemente mediado por una alteración cromosómica) para que las células adquirieran verdaderamente características cancerosas (figura 4). Así, aparentemente el promotor tumoral favorece el desarrollo del cáncer, al menos en este sistema, expandiendo la población de células que llevan una mutación inicial. De este modo, cuantas más células haya y más veces se

dividan, mayor será la probabilidad de que al menos una de ellas sufra otra mutación que la adelante un paso más en el camino de la transformación hacia la malignidad (figura 5). Aunque los cánceres que se producen de forma natural no necesariamente surgen a través de la secuencia específica de distintos pasos de iniciación y promoción que se acaba de describir, su evolución **sí** puede estar gobernada por principios similares a éstos.

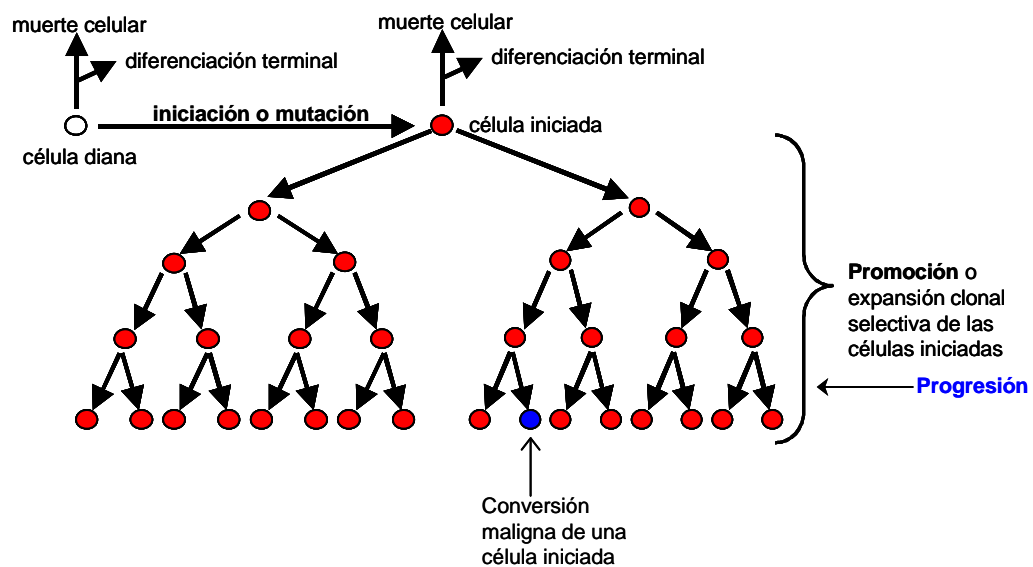


Fig. 5 Etapas de iniciación, promoción y progresión del cáncer.

El modelo artificial de carcinogénesis química epitelial, basado en la administración de una única dosis sobre la piel del animal de DMBA seguida de aplicaciones repetidas semanalmente del promotor TPA, es un sistema ideal para el estudio de alteraciones genéticas, tanto de tipo cualitativas como cuantitativas, que tienen lugar durante las diferentes fases del proceso de carcinogénesis, permitiendo también el análisis de los acontecimientos genéticos que se producen en la transición desde la etapa de iniciación a promoción y finalmente hasta su transformación maligna (figura 6). Este tratamiento da lugar al desarrollo de numerosos papilomas benignos, algunos de los cuales progresan hacia formas más malignas de carcinomas alrededor de las semanas 30-40 desde la primera exposición al carcinógeno. En la figura

6 se ilustra algunos de los acontecimientos genéticos de mayor relevancia que tienen lugar en las distintas etapas del proceso de carcinogénesis.

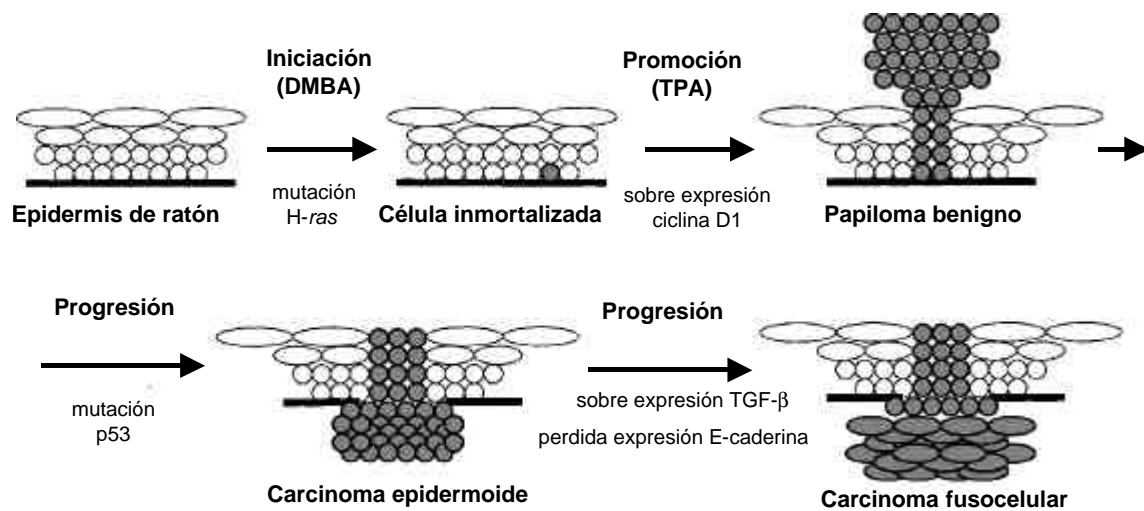


Fig. 6 Ejemplos de algunos cambios genéticos durante el proceso de carcinogénesis química DMBA/TPA.

Los papilomas y carcinomas iniciados con diferentes carcinógenos muestran distintas alteraciones genéticas en el gen *H-ras*, un miembro de la familia oncogénica *ras* (Balmain y Pragnell, 1983; Brown y col., 1986). Más del 90% de los tumores iniciados con DMBA exhiben una mutación puntual en el gen *H-ras* por cambio de una adenina (A) por una timina (T) en el segundo nucleótido del codón 61 (CAA) dando lugar a una mutación activadora del gen (Quintanilla y col., 1986). Esta alta frecuencia del cambio de A por T en el codón 61 se debe a que la metabolización del DMBA produce diol-epóxidos que modifican principalmente a los nucleótidos de adenosina (Cheng y col., 1988). Además, *H-ras* juega un papel importante en etapas más avanzadas del proceso de carcinogénesis, en las cuales el alelo mutado es extensamente duplicado o amplificado. La carcinogénesis dependiente de Ras se debe principalmente a la actuación de esta proteína sobre la ciclina D1, una proteína nuclear con funciones de regulación en el control del ciclo celular, la cual se activa en fase G₁ (Robles y col., 1998). Generalmente, tanto la expresión de ARN mensajero como los niveles de proteína de ciclina D1 se encuentran elevados tanto en carcinomas como en papilomas de ratón. Más aún, los ratones deficientes en ciclina D1 muestran un descenso superior al 80% en el

desarrollo de tumores tras tratamiento químico de carcinogénesis (Robles y col., 1998). Por tanto, parece evidente la relación Ras-ciclina D1 en el proceso de carcinogénesis.

Mutaciones en la proteína supresora de tumores p53 se ha encontrado en más de la mitad de los cánceres humanos. Esta proteína funciona en las células normales como factor de transcripción. Sus niveles aumentan en respuesta a daños en el ADN y/o estrés celular, desencadenando una respuesta celular que adecuada al tipo de estímulo, puede conducir a la parada del ciclo celular, la senescencia o la apoptosis (Vousden, 2002). En un estudio realizado en ratones, utilizando inductores químicos para el desarrollo de tumores, se ha observado la pérdida de la heterozigosis para el locus p53 con una frecuencia superior a 1/3 en los carcinomas obtenidos, mientras éste cambio no ha sido detectado en los papilomas resultantes (Burns y col., 1991). En base a los resultados anteriores Burns y colaboradores concluyen que la alteración de p53 debe preceder a la transición de papiloma hacia carcinoma. Por otro lado, los trabajos de carcinogénesis química realizados con ratones deficientes en p53 muestran una reducida formación de papilomas, pero en cambio, los tumores inducido sufren más rápidamente la progresión hacia carcinomas en comparación con la velocidad de transformación observado en los experimentos con ratones control (Kemp y col., 1993). En conjunto, estos resultados sugieren que la ausencia de p53 no incrementa la frecuencia del proceso de iniciación ni la tasa de promoción de un tumor, pero si es necesaria para el control de la etapa de progresión maligna del tumor hacia carcinoma.

En casos extremos, las propiedades invasivas y metastásicas de las células neoplásicas en su transición hacia las formas más malignas de carcinomas se encuentran potenciadas por las alteraciones producidas en el citoesqueleto de la célula tumoral, y por la pérdida de expresión de moléculas de adhesión celular de la familia de las cadherinas (Diaz-Guerra y col., 1992; Navarro y col., 1991; Stoler y col., 1993) y por la sobre expresión de proteínas de la familia TGF- β (Caulin y col., 1995; Frontelo y col., 1998) (figura 6).

3. ACTIVACIÓN DE NF- κ B Y AP-1 EN LA CARCINOGENÉISIS

3.1 Papel de NF- κ B en la carcinogénesis epitelial.

El factor de transcripción NF- κ B (Nuclear Factor-Kappa B) desempeña un papel fundamental en la regulación génica de una gran variedad de procesos biológicos (Baeuerle y Baltimore, 1996; Siebenlist y col., 1994; Li y Verma, 2002). Este factor de transcripción es un mediador crucial en la respuesta celular a procesos de estrés e inmunes, con efectos tanto antiapoptóticos como proapoptóticos y con extraordinaria importancia en la proliferación y diferenciación celular (Burstein y Duckett, 2003). Una desregulación del sistema NF- κ B se ha observado en diferentes patologías de la piel, incluyendo aquellas que cursan con alteraciones o desordenes proliferativos tales como soriasis, procesos inflamatorios como la incontinencia pigmentaria, dermatitis, enfermedad de Lyme y enfermedades autoinmunes, así como también en cáncer (Klement y col., 1996; Landy y Donnai, 1993; Ebnet y col., 1997; Courtois e Israel, 2000; Baldwin, 2001a; Baldwin, 2001b; Bell y col., 2003).

El complejo NF- κ B está constituido por dos subunidades, formadas por miembros de una familia de proteínas caracterizadas por compartir unos dominios de homología altamente conservados de unión al DNA y dimerización conocidos como RHD (Rel homology domain). Estas subunidades para constituir el complejo NF- κ B pueden formar homo- o heterodímeros (Baeuerle y. Baltimore, 1996; Siebenlist y col., 1994). La forma dimérica prototípica de NF- κ B es la formada por los monómeros p50 y p65 (también denominada Rel A). Además, otras subunidades han sido también identificadas denominadas como p52, c-Rel y Rel B, así como las proteínas precursoras para p50 y p52 denominadas p105 y p100, respectivamente. En el citosol de células sin estimular, el complejo dimérico NF- κ B se encuentra en un estado inactivo debido a la unión de proteínas inhibitoras conocidas como I κ B, que agrupa a varias proteínas tales como I κ B- α , - β y - ϵ (Baeuerle y. Baltimore, 1996; May y Ghosh, 1998). Además, las mencionadas proteínas precursoras p105 (I κ B- γ) y p100 (I κ B- δ) pueden también actuar como inhibidores (Thanos y Maniatis,

1995). Una vez estimuladas, las células inducen la fosforilación de dos residuos de serina en posición aminoterminal de I κ B. A continuación, se produce una poli ubiquitinización de I κ B y degradación mediante el multicomplejo proteico del proteosoma (Baeuerle y. Baltimore, 1996; Thanos y Maniatis, 1995). De este modo, el complejo NF- κ B queda libre para su translocación al núcleo y unión a las secuencias específicas κ B de ciertos promotores del ADN; NF- κ B junto a otros factores de transcripción y otras proteínas constituye de esta forma el complejo de transcripción encargado de regular la transcripción de una gran variedad de genes (Baeuerle y. Baltimore, 1996; Siebenlist y col., 1994; May y Ghosh, 1998) (figura 7). Se ha sugerido también, que para la actividad transcripcional de NF- κ B es necesario que ocurran modificaciones postraduccionales tales como la fosforilación y la acetilación que afectarían a NF- κ B, tanto a su capacidad de translocación al núcleo como a su eficiencia transcripcional (Vermeulen y col., 2002; Chen y col., 2001; Sakurai y col., 1999).

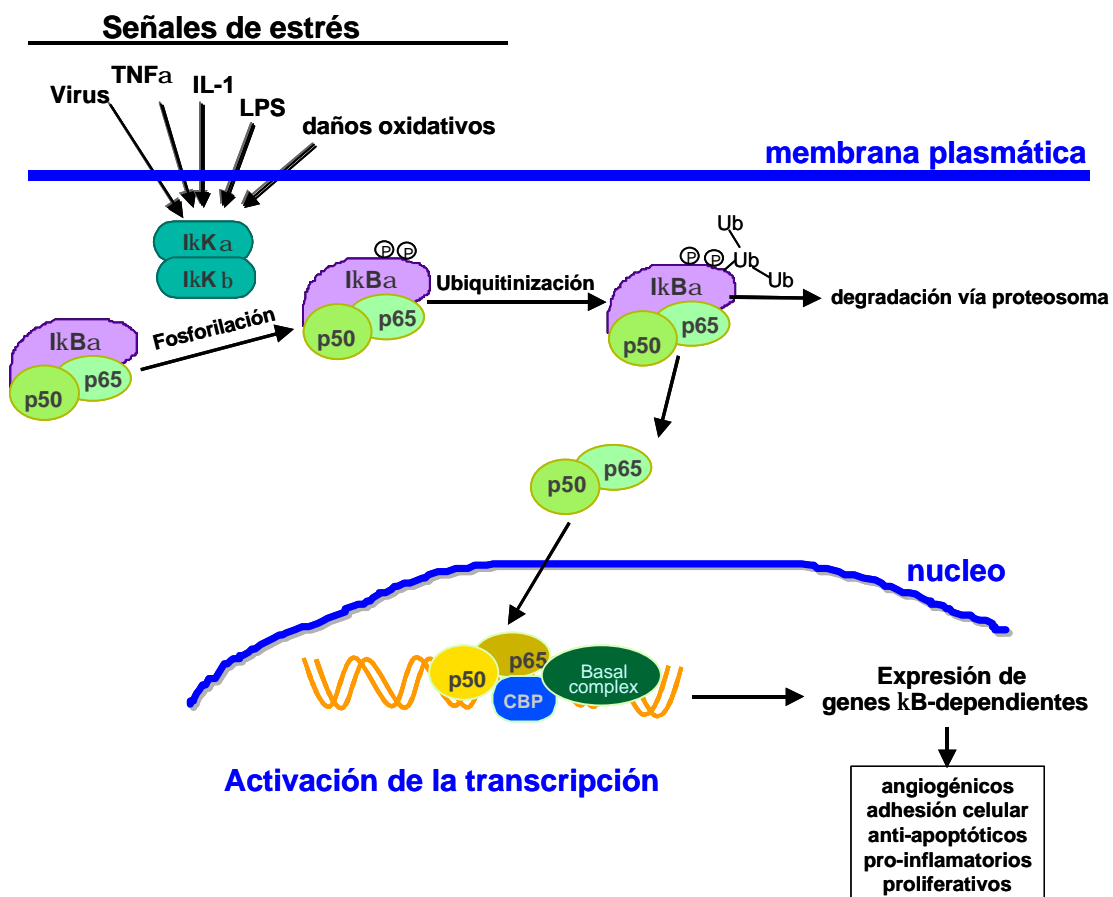


Fig. 7 Mecanismo de activación de NF- κ B y expresión de genes κ B-dependientes.

La fosforilación de la proteína inhibidora I κ B como paso previo para la activación de NF- κ B está mediada por un complejo de proteína de alto peso molecular denominadas colectivamente como I κ B quinasa (IKK) (Karin y Ben-Neriah, 2000; Israel, 2000) (figura 7). Se han identificado tres subunidades de este complejo: dos de ellas son proteínas quinasas activas denominadas IKK- α (IKK1; 85 kDa) y IKK- β (IKK2; 87 kDa) capaces de formar homo- o heterodímeros, dando lugar a la formación del complejo activo encargado de la fosforilación de I κ B, y una tercera quinasa con funciones adaptadoras/reguladoras denominada IKK- γ o NEMO (*NF- κ B essential modulator*, 50 kDa) (Karin y Ben-Neriah, 2000; Regnier y col., 1997; Scheidereit, 1998; Krappmann y col., 1997). Se han encontrado pocas excepciones a esta ruta universal para la activación de NF- κ B. Un ejemplo lo constituye la activación de NF- κ B en respuesta a radiación ultravioleta, la cual y aunque es dependiente de la degradación de I κ B, no se acompaña en ningún caso la fosforilación aminoterminal del inhibidor I κ B (Bender y col., 1998; Li y Karin, 1998).

Los modelos de carcinogénesis química en piel de ratón han aportado conclusiones importantes sobre el papel de NF- κ B en este proceso (Slaga y col., 1995). La hiperplasia epitelial junto a la inflamación constituye dos procesos críticos de gran importancia en la promoción tumoral. NF- κ B es uno de los mediadores mejor conocido que interviene en ambos procesos (Budunova y col., 1999). Desregulación del sistema NF- κ B puede producir la expresión de genes que intervienen en crecimiento tumoral, invasión y metástasis (Baldwin, 2001; Pahl, 1999). La activación de NF- κ B induce la expresión de más de 150 genes: citoquinas (TNF, IL-1, IL-6), quimocinas (MCP-1, IL-8), moléculas de adhesión celular (ICAM-1, VCAM-1), factores de crecimiento y proteasas (Baeuerle y Baltimore, 1996; Siebenlist y col., 1994; Pahl, 1999). Además, NF- κ B induce la producción de proteínas tales como TNF- α e IL-1 β que son capaces por sí mismas de estimular la activación de nuevo de NF- κ B. Incluso, el propio inhibidor I κ B α es en sí mismo regulado transcripcionalmente por NF- κ B.

La piel está sujeta a una gran variedad de daños, agresiones e infecciones. Se conocen más de 150 estímulos y condiciones capaces de inducir la activación de NF- κ B. Entre ellas podemos citar la actividad de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF, tumour necrosis factor) y la interleuquina-1 (IL- 1), bacterias y productos bacterianos como el lipopolisacárido (LPS), virus, factores de crecimiento, así como diferentes formas de estrés físico (radiación ultravioleta) y oxidativo (radicales libres) (Baeuerle y Baltimore, 1996; Siebenlist y col., 1994; Pahl, 1999). Además, es conocido también que sustancias que actúan como promotores tumorales en los protocolos de carcinogénesis química epidérmica, tales como los ésteres de forbol o el ácido ocadaico, son fuertes inductores de NF- κ B en los queratinocitos. Por otra parte, el oncogen *Ha-ras* se encuentra mutado en más del 90% de los tumores de piel de ratón y en ellos también está implicada la activación de NF- κ B (Budunova y col., 1999). Usando este modelo de carcinogénesis química epitelial sobre la piel del ratón se ha podido demostrar que, mientras en la epidermis normal no tratada la molécula de NF- κ B se localiza en el citoplasma de las células basales, en cambio, en los tumores producidos la expresión de p50 y p52 se encuentra elevada en el núcleo. Más aún, los niveles del inhibidor I κ B α resultan estar reducidos en células de carcinomas y papilomas. En consonancia con lo anterior, una constitutiva activación de NF- κ B se ha detectado en procesos neoplásicos de la línea hematopoyética, como en el caso del linfoma de Hodgkin's y de las leucemias linfoblásticas, así como en muchos otros tipos de tumores sólidos (Siebenlist y col., 1994; Mayo y Baldwin, 2000; Bargou y col., 1996; Kordes y col., 2000). Por todo ello, parece ser que NF- κ B desempeña un importante papel en el desarrollo del cáncer tal como se desprende de los estudios experimentales de carcinogénesis de la piel.

3.2 Papel de AP-1 en la carcinogénesis epitelial.

Se ha demostrado también, que la activación del factor de transcripción AP-1 se asocia a los mecanismos moleculares puestos en marcha por los procesos de promoción y progresión tumoral en queratinocitos de ratón (Dong y

col., 1994; Huang y col., 1997; Li y col., 1998). También AP-1 desempeña un papel importante en procesos de proliferación, diferenciación, apoptosis y transformación celular. El complejo AP-1 en su forma activa está compuesto por dos subunidades pertenecientes a la familia de proteínas Jun (c-Jun, Jun B, Jun D) para formar homodímeros de Jun, o bien por una unidad de Jun heterodimerizando con otra proteína de la familia Fos (c-Fos, Fos B, Fra-1, Fra-2) o ATF (ATF-2). En ambos casos se forma el complejo AP-1 (Nakabeppu y col., 1988; Ryder y Nathans, 1988; Cohen y Curran, 1988; Hai y col., 1988; Nishina y col., 1990; Wagner, 2001). Dependiendo de cual sea la composición del dímero de AP-1, éste puede actuar bien como regulador positivo o negativo de la expresión génica inducida por TPA a través de su unión a ciertas secuencias de los promotores de genes regulados por AP-1 denominadas secuencias TRE (*TPA responsive element*) (Vogt, 1995; Whitmarsh y Davis, 1996). Por ejemplo, el propio gen *c-jun* contiene en su región promotora sitios TRE de unión para AP-1 y debido a ello su expresión se encuentra positivamente autorregulada (Angel y col., 1988a; Angel y col., 1988b). Los miembros de estas 3 familias de proteínas que pueden componer el complejo AP-1 participan en la vía de transducción de señales iniciadas en la superficie celular en respuesta a citoquinas, factores de crecimiento, promotores tumorales y sobre expresión de ciertos oncogenes (Karin y col., 1997) y ejercida a través de la activación de la ruta de la MAP quinasas (figura 8).

La actividad de AP-1 se encuentra regulada a distintos niveles: i) a través de la transcripción de los genes *jun* y *fos*; ii) mediante interacción proteína-proteína; y iii) por modificaciones postraduccionales de las proteínas Jun y Fos (Pulverer y col., 1991; Gruda y col., 1994; Oehler y col., 1993; Radler-Pohl y col., 1993). Un ejemplo de regulación de la actividad de AP-1 lo constituye la proteína oncogénica Ras, la cual ejerce su regulación tanto a nivel transcripcional como postraducciona. De todos los genes *jun*, sólo el gen *c-jun* en cooperación con *H-ras* tiene potencial de transformar fibroblastos embrionarios de ratas (Schutte y col., 1989). Algunas de estas funciones dependen de la capacidad de AP-1 de regular transcripcionalmente la expresión de ciclina D1 en cooperación con RAS, dado que se han encontrado sitios TRE en la región promotora del gen que codifica para ciclina D1 (Albanese y col., 1995). La fosforilación de c-Jun en los residuos

aminoterminal de serina-63 y serina-67 mediante la JNK quinasa es necesaria para la transactivación de c-Jun y cooperación oncogénica anteriormente comentada. Además, Jun B y Jun D también pueden cooperar en este fin con Ras, pero la presencia de estas subunidades en el dímero de AP-1 produce una disminución en la eficiencia de transformación (Vandel y col., 1996).

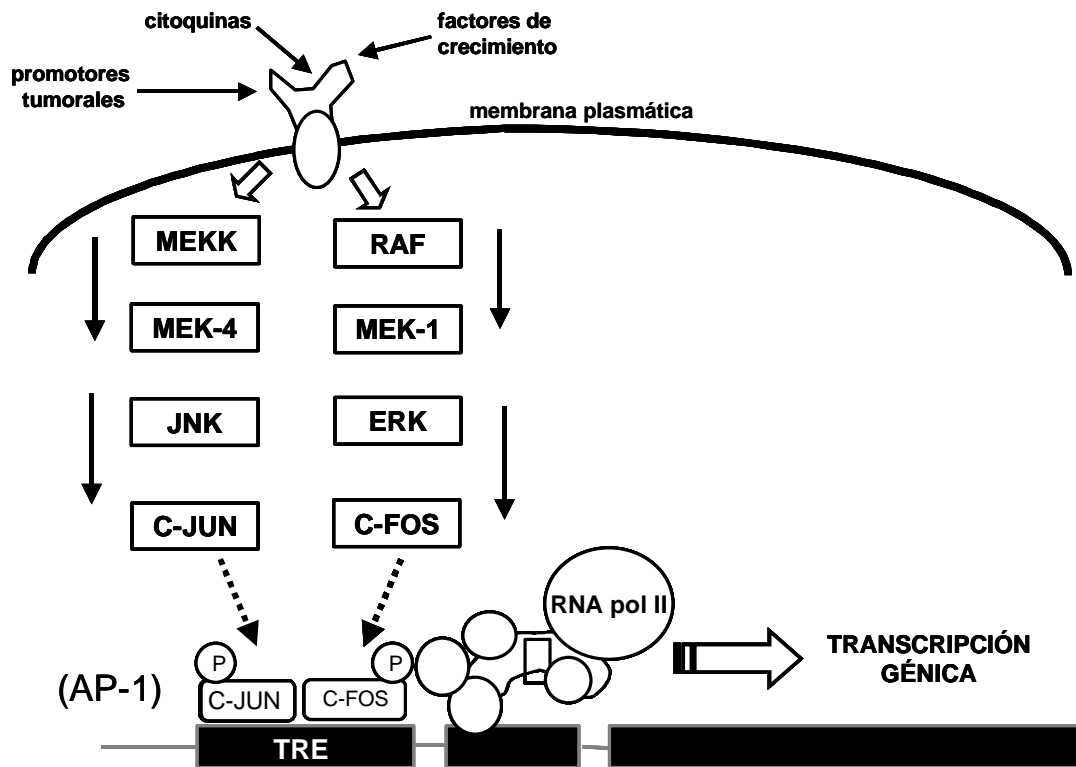


Fig. 8 Esquema de la activación de AP-1 a través de la cascada enzimática de las MAPK.

Los protocolos de carcinogénesis epidérmica basados en la aplicación de DMBA/TPA han sido una herramienta muy útil para el estudio de la contribución de las distintas subunidades de AP-1 en el proceso de progresión maligna o de transformación de células epiteliales. Se ha podido comprobar que los ratones deficientes en la proteína c-Fos no muestran progresión maligna de los papilomas hacia carcinomas, es decir, en ausencia de c-Fos se bloquea la transición benigna-maligna de un tumor epitelial (Saez y col., 1995). En cambio, la eficiencia en la formación de papilomas no difiere de la esperada en los ratones salvajes para c-Fos. Por otro lado, ratones modificados

genéticamente que sobreexpresan un dominante negativo de la proteína c-Jun son resistente a la inducción de tumores epiteliales por DMBA/TPA (Young y col., 1999). En este sentido, la formación de tumores también se ve afectada en ratones que sobreexpresan un mutante de c-Jun que imposibilita la fosforilación en serina 63 y 67 de esta proteína (Behrens y col., 2000). Estos datos sugieren que la activación de c-Jun y, por tanto, la expresión de genes dependientes de c-Jun, es un proceso crítico en el desarrollo de tumores epiteliales. Más aún, se ha observado en líneas celulares de tumores epiteliales malignos niveles elevados de fosforilación en las proteínas c-Jun, Fra-1, Fra-2, y ATF-2 que no aparecen en células de papilomas benignos (Zoumpourlis y col., 2000).

Los trabajos realizados con la línea celular JB6 de queratinocitos de ratón sensibles (P+) o resistentes (P-) a la transformación tumoral inducida mediante TPA (Hsu y col., 2000) avalan la hipótesis de que la sobreexpresión de c-Fos en líneas celulares de papilomas o tumores benignos parece ser condición suficiente para la transformación maligna de estas células (Greenhalgh y Yuspa, 1988), mientras la expresión de un mutante dominante negativo de c-Jun en células transformadas da lugar a la inhibición tanto de la expresión de genes dependiente de AP-1 que intervienen en transformación e invasión celular (Dong y col., 1994 y 1997) como a la capacidad de estas células para desarrollar tumores en ratones desnudos (Bowden y col., 1994).

Por tanto, la activación de NF- κ B y AP-1 contribuyen al desarrollo de la tumorigénesis mediante la trans-activación de genes que intervienen en la respuesta inflamatoria, genes con funciones inmunoreguladoras, genes antiapoptóticos y genes con funciones reguladoras del ciclo celular (Surh, 1999). Por ello, la capacidad de estos factores de transcripción para promover la progresión del ciclo celular así como para suprimir eventos apoptóticos, hacen que estos factores participen en muchos aspectos del proceso de carcinogénesis (Shaulian y Karin, 2002; Dhar y col., 2002).

4. POLI-ADP-RIBOSA POLIMERASA-1 (PARP-1)

4.1 Actividad enzimática de PARP-1.

La existencia de una proteína nuclear de 113 KDa de peso molecular, conocida actualmente como poli-ADP-ribosa polimerasa-1 (PARP-1; EC 2.4.2.30), fue descrita hace más de 40 años por Chambon y col. (1963). También denominada ADP-ribosa transferasa (ADPRT) o poli-ADP-ribosa sintetasa (PARS) cataliza la transferencia de unidades de ADP-ribosa procedentes del sustrato NAD^+ sobre los residuos carboxílicos de glutámico y aspártico (Suzuki y col., 1986) de una serie de proteínas nucleares (D'Amours y col., 1999). El dominio catalítico de esta proteína presenta alta homología con otra serie de enzimas ADP-ribosil transferasas. Esta característica ha servido para identificar hasta 18 proteínas (Amé y col., 2004) que podrían presentar actividad de poli-ADP-ribosa polimerasa. Esto ha dado lugar a la agrupación de estas 18 proteínas en la superfamilia de PARP. Aunque no se conoce la función biológica de muchos de los miembros de esta familia, si es posible sugerir que su existencia puede estar relacionada con un importante papel del proceso de poli-ADP-ribosilación en múltiples funciones celulares.

La modificación transitoria de proteínas nucleares por poli-ADP-ribosilación, entre las cuales se encuentra la propia PARP-1, constituye un tipo de modificación postraduccional necesaria para la activación de una serie de procesos celulares (Shall y de Murcia, 2000). PARP-1 principalmente se activa en respuesta a daños en el ADN generados por diferentes agentes genotóxicos, tales como radiación ionizante, agentes alquilantes y/o radicales libres, aunque recientemente han sido descritos otros estímulos diferentes al daño en el ADN como infección, estrés y hormonas derivadas de esteroides que son también activadores de la enzima en lugares muy específicos de los cromosomas (Tulin y Spradling, 2003; Gordon-Shaag y col., 2003) (figura 9).

El polímero de poli-ADP-ribosa sintetizado alcanza una extensión de aproximadamente 200 elementos unidos por enlaces glicosídicos de ribosa-ribosa ($1'' \rightarrow 2'$) constituyendo de este modo el eje lineal del polímero, aunque la iniciación del mismo se realiza mediante un enlace tipo éster entre el grupo carboxílico de un residuo aminoacídico de la proteína a modificar y un residuo

de ADP-ribosa (figura 9). La ramificación del polímero se consigue a través de enlaces glicosídicos $2'' \rightarrow 1''$ entre ribosas, llevándose a cabo una ramificación por cada 20-50 unidades de ADP-ribosa (Álvarez-González y col., 1999a; Kraus y Lis, 2003). La poli-ADP-ribosilación de proteínas mediada por PARP-1 es, por tanto, una modificación covalente de proteínas nucleares, que se realiza de una forma rápida pero transitoria, que permite a estas proteínas modificar su función biológica en un momento determinado.

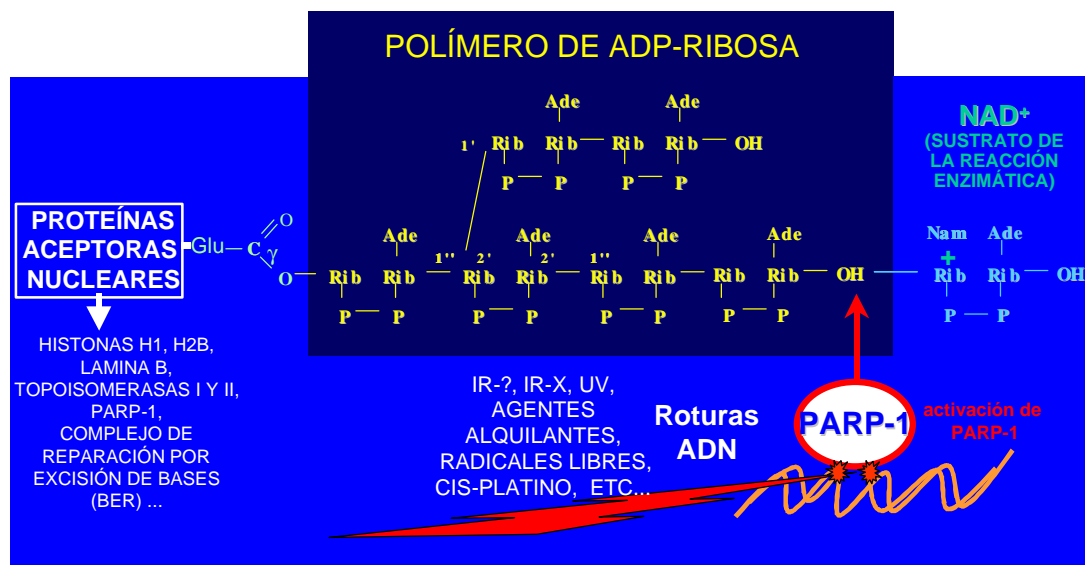


Fig. 9 Esquema de la activación de PARP-1 tras daños en el ADN y síntesis del polímero.

Esta enzima altamente conservada en la escala filogenética (aunque no existen evidencias de su presencia en levaduras) requiere para la formación del polímero de tres etapas básicas: primero, de una mono-ADP-ribosilación del sustrato; segundo, de una etapa de elongación del polímero; y tercero, de una ramificación del mismo (Álvarez-González y col., 1999a). Para ello, PARP-1 posee estas tres actividades enzimáticas. La degradación del polímero sintetizado se lleva a cabo por la enzima poli-ADP-ribosa glicohidrolasa (PARG) y la poli-ADP-ribosa liasa. La primera de ellas es la responsable de la hidrólisis de los enlaces glicosídicos (D'Amours y col., 1999; Davidovic y col., 2001), mientras la segunda hidroliza los enlaces éster (D'Amours y col., 1999; Kraus y Lis, 2003).

Una vez detectado el daño PARP-1 se une al ADN, activándose e iniciándose la síntesis del polímero y ocasionando la modificación postraduccional de una serie de proteínas implicadas en la reparación del daño (figura 9). Los niveles constitutivos de polímero son normalmente muy bajos en

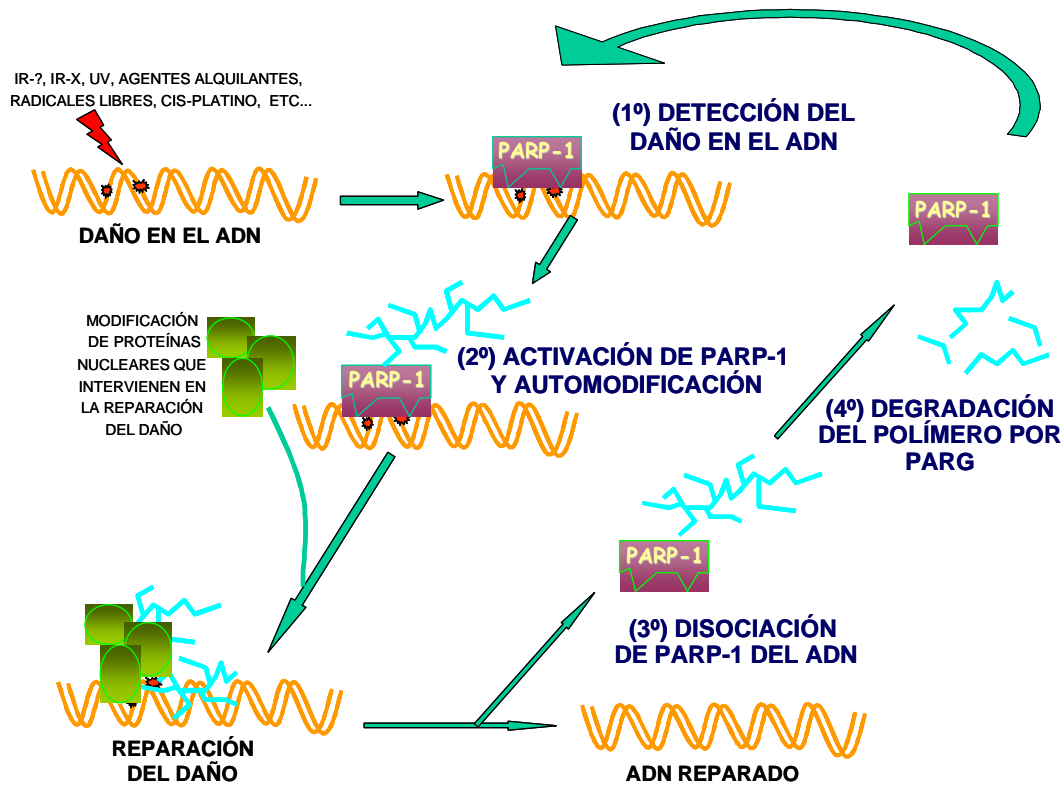


Fig. 10 Etapas en la activación de PARP-1.

células sin estimular. En presencia de daño en el ADN los niveles pueden aumentar entre 10 y 500 veces sobre su nivel basal. La automodificación que sufre la propia PARP-1 regula su actividad enzimática y su unión al ADN. D'Amours y col. (1999) han propuesto un modelo para explicar la disociación de la proteína de las zonas de unión al ADN tras su automodificación. El modelo se basa en la repulsión electrostática ocasionada por automodificación de la propia PARP-1 mediante el polímero, lo que le confiere una gran carga negativa a la enzima, produciendo su inactivación y la electrorepulsión entre PARP-1 y el ADN. A continuación, la enzima PARG llevaría a cabo la degradación del polímero. Esto permite de nuevo que la enzima PARP-1 esté lista para un nuevo ciclo de activación en respuesta a daños en el ADN (figura 10).

4.2 Estructura de PARP-1.

La proteína PARP-1 estructuralmente se divide en seis dominios (A, B, C, D, E y F) (figura 11), de los cuales sólo cuatro de ellos (A, B, D y F) posee función conocida:

- El dominio A o dominio de unión al ADN (DBD, *DNA Binding Domain*), situado en el extremo amino terminal, es el dominio a través del cual se produce la interacción de PARP-1 con el ADN, lo cual estimula la actividad catalítica del enzima (Lindahl y col., 1995; Caldecott y col., 1996). Esta interacción se realiza a través de dos estructuras en dedos de zinc denominadas FI y FII.

- La señal de localización nuclear o dominio B es un pequeño dominio de la proteína que contiene, como dato relevante, la señal responsable de la localización nuclear de la proteína (NLS), además de la secuencia diana de la caspasa-3 responsable de la proteólisis de PARP-1 (Kaufmann y col., 1993; Lazebnik, 1994).

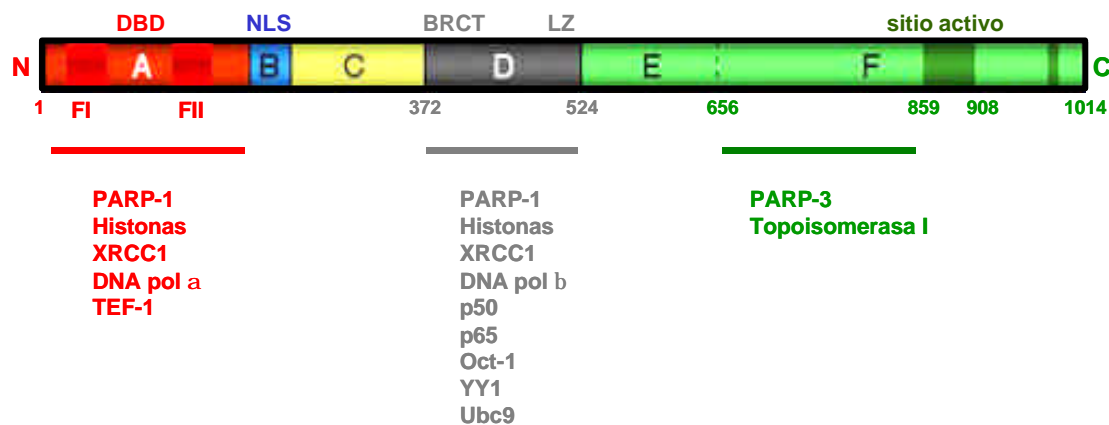


Fig. 11 Dominios estructurales de la proteína PARP-1. DBD, dominio de unión al ADN; FI y FII, estructuras en dedos de zinc; NLS, señal de localización nuclear; BRCT, *BRCA like C terminus*; LZ, estructura de cremallera de leucina. También se muestra los posibles sitios de interacción con otras proteínas.

- Los dominios C y E carecen de función conocida. Se cree que los motivos HTH (*Helix Turn Helix*) presentes en el dominio C pueden también actuar como enlaces entre la proteína y el ADN. Tanto es así, que se ha

sugerido que esta estructura HTH podría mediar la unión de PARP-1 al ADN no dañado, sin que por ello se produzca la activación catalítica de la proteína (D'Amours y col., 1999).

- El dominio de automodificación o dominio D comprende la mayoría de residuos de ácido glutámico que son modificados por poli-ADP-ribosilación. También contiene otros motivos de gran importancia en la proteína, tales como los motivo de cremallera de leucina (LZ, *Leucine Zipper*), supuestamente implicados en la homo- o heterodimerización del enzima, y el motivo BRCT (BRCA1 C-terminal) a través del cual PARP-1 podría interactuar con diferentes proteínas, tales como factores de transcripción (NF- κ B, Ying-Yang-1 y Oct-1) y proteínas asociadas con la reparación del ADN (histonas, XRCC1 y DNA polimerasa β).

- El dominio C-terminal o dominio catalítico (F) es el dominio que se encuentra más conservado en la escala filogenético, revelando relaciones evolutivas con otras enzimas ADP-ribosil transferasas. Presenta estructura terciaria idéntica a las mostradas por otras mono-ADP-ribosil transferasas, alternándose estructuras de láminas- β con hélices- α (Ruf y col., 1996 y 1998) en donde se une el NAD⁺. Como se ha comentado anteriormente, esta alta homología en el dominio catalítico de diversas ADP-ribosil transferasas ha dado lugar al establecimiento de la familia de las proteínas PARP (Amé y col., 2004).

4.3 Funciones de PARP-1.

Gracias al desarrollo de inhibidores farmacológicos de PARP-1 y de ratones deficientes en esta proteína se ha podido demostrar que la enzima PARP-1 está involucrada en diversos procesos tales como reparación y replicación del ADN, transcripción génica, muerte celular y respuesta inflamatoria (Shall y de Murcia, 2000). Debido a que los fenómenos de transcripción génica e inflamación dependiente de PARP-1 son importantes en la comprensión de este trabajo de tesis, por ello, se abordará de forma más minuciosa estas funciones de PARP-1 en próximos apartados. Respecto al resto de funciones de PARP-1, en las siguientes líneas se expone un breve resumen del conocimiento científico de cada una de ellas:

- Se ha observado actividad de PARP-1 durante la reparación del ADN en los procesos de reparación por excisión de bases (BER, *Base Excision Repair*) y reparación de daños de cadena simple (SSBR, *Single Strand Break Repair*) (Shall y de Murcia, 2000). El papel de PARP-1 en reparación del ADN dañado se debe a su capacidad de modificar de forma transitoria, mediante poli-ADP-ribosilación, proteínas que intervienen en la estructura de la cromatina (especialmente histonas), llevando a cabo de este modo una alteración estructural de la cromatina (D'Amours y col., 1999), haciéndola de esta forma más accesible a las proteínas que participan en el complejo de reparación del ADN. Además, PARP-1 también participa en el reclutamiento y regulación de las proteínas que forman parte de este complejo como XRCC1, DNA-polimerasa β y la DNA ligasa III (Amé y col., 2004; Leppard y col., 2003). Parece ser que este proceso de reclutamiento y regulación por parte de PARP-1 se debe tanto a su capacidad de modificar proteínas como por la interacción física entre PARP-1 y estas proteínas.

- Numerosos estudios han puesto de manifiesto que durante la replicación del material genético el metabolismo de la poli-ADP-ribosa se encuentra acelerado en el núcleo celular (Tanuma y col., 1978; Kanai y col., 1981; Leduc y col., 1988; Bakondi y col., 2002), aunque el mecanismo por el que PARP-1 participa en la regulación de la replicación del ADN no se conoce aún con exactitud. Algunos trabajos sugieren que PARP-1 podría formar parte del multicomplejo proteico encargado de la replicación (MRC, *Multiprotein Replication Complex*) (Simbulan-Rosenthal y col., 1996). En este sentido, se sabe que PARP-1 co-purifica junto a las DNA polimerasas α y β , DNA primasa, DNA helicasa, DNA ligasa, topoisomerasas I y II (Simbulan-Rosenthal y col., 1996; Dantzer y col., 1998; Bauer y col., 2001). Algunas de estas proteínas sufren, además, modificaciones por poli-ADP-ribosilación, tales como las topoisomerasas I y II, y DNA polimerasas α .

- Recientemente se ha demostrado que PARP-1 puede unirse a ciertas estructuras del ADN en ausencia de daño (Kun y col., 2002). Este hecho unido al descubrimiento de que PARP-1 interacciona con diferentes factores de transcripción (Oei y col., 1997; Hassa y Hottiger, 1999; Wesierska-Gadek y Schmid, 2001; Hassa y col., 2003) han hecho pensar a los investigadores en un

posible papel de PARP-1 en la regulación de la transcripción génica (Kraus y Lis, 2003). Hoy en día se conoce que PARP-1 puede regular dicho proceso a través de tres mecanismos no excluyentes entre sí: primero, mediante alteración de la estructura de la cromatina; segundo, a través de la interacción física con factores de transcripción; y tercero, uniéndose a secuencias reguladoras de distintos genes.

- El hecho de que la enzima caspasa-3 reconozca el motivo DEVD (Lazebnik y col., 1994) dentro de la secuencia de localización nuclear de PARP-1, y que esta proteína pueda ser cortada en dos fragmentos de 89 y 24 KDa (Kaufmann y col., 1993), ha relacionado a PARP-1 con estados precoces de muerte celular por apoptosis. Esta ruptura proteolítica se considera actualmente como un marcador de la apoptosis dependiente de caspasas. Los fragmentos generados por la acción de la caspasa-3 contribuyen a la inactivación del enzima intacta, ya que inhiben la unión del enzima no proteolizado al ADN y su homodimerización (Kim y col., 2000; D'Amours y col., 2001). Según este proceso, la rotura de PARP-1, y por tanto su pérdida de actividad, facilitaría el adecuado funcionamiento de la maquinaria apoptótica, preservando de esta forma energía celular necesaria para los siguientes pasos de la apoptosis. Sin embargo, los resultados obtenidos para saber si la poli-ADP-ribosilación afecta al proceso apoptótico, mediante la utilización de inhibidores de PARP-1, han deparado resultados muy dispares, dependientes del tipo celular, condiciones de cultivo y drogas utilizadas para inducir apoptosis. Por un lado, Wang y col. (1995) utilizando células derivadas de ratones *parp-1^{-/-}* han demostrado que PARP-1 es innecesaria para la apoptosis. Otros estudios demuestran un claro efecto de la deficiencia de PARP-1 en apoptosis, de modo que la delección genética de PARP-1 inhibe la apoptosis inducida por FAS (Simbulan-Rosenthal y col., 1999a). Recientemente, se ha demostrado que PARP-1 juega un papel crucial en la apoptosis dependiente de AIF e independiente de caspasas (Yu y col., 2003). La formación del polímero resultante de la activación de PARP-1 inicia una señal nuclear que se propaga hasta la mitocondria, por mecanismos aún desconocidos. Esto produce en la mitocondria la liberación de AIF, que se transloca al núcleo, donde induce la condensación periférica de la cromatina y la fragmentación del ADN a gran escala.

• En una célula las concentraciones de NAD^+ y ATP son cruciales para que la muerte celular se produzca por apoptosis o por necrosis (Virág y Szabó, 2002). Como es sabido, la característica diferencial más importante entre apoptosis y necrosis, quizás sea, la desintegración precoz de la envuelta celular o membrana plasmática, de tal forma que en la necrosis todo el contenido celular escapa a los tejidos ocasionando una respuesta inflamatoria a su alrededor. En este sentido, la activación de PARP-1 como enzima catalizadora de reacciones de ADP-ribosilación a partir del consumo de sustratos de NAD^+ , puede actuar como desencadenante de uno u otro proceso. De hecho, son numerosos los trabajos de investigación en modelos experimentales que relacionan la sobre activación de PARP-1 como detonante de los procesos de necrosis y disfunción orgánica que este proceso conlleva en determinadas circunstancias patológicas, tales como en procesos inflamatorios e isquémicos (Szabó y Dawson, 1998; Pieper y col., 1999a; Virág y Szabó, 2002) (figura 12).

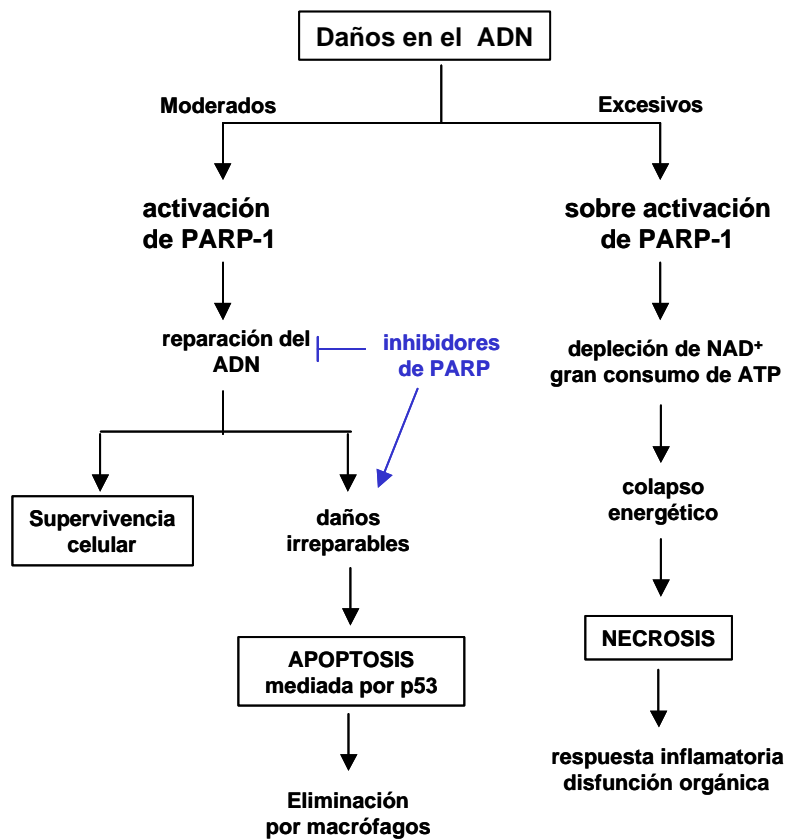


Fig 12 Esquema de las posibles eventos celulares (supervivencia, apoptosis o necrosis) en los que PARP-1 se encuentra implicados y que son dependientes de las concentraciones celulares de NAD^+ y ATP (adaptado de Virág y Szabó, 2002).

5. ESTRATEGIAS EN EL ESTUDIO DE PARP-1

Dos herramientas claves en el estudio del papel fisiológico de la proteína PARP-1 han sido el desarrollo de ratones deficientes en PARP-1 y la generación de fármacos inhibidores de la actividad enzimática de poli-ADP-ribosilación de PARP-1. Ambas han permitido relacionar a esta proteína con los procesos de reparación del ADN, señalización celular, transcripción génica, la inflamación y la muerte celular (Shall y de Murcia, 2000; Virág y Szabó, 2002).

5.1 Desarrollo de ratones deficientes en PARP-1.

Actualmente se tiene conocimiento de la generación de tres líneas de ratones *parp-1*^{-/-} por distintos laboratorios en años sucesivos. Todos ellos se han realizados mediante delección genética por recombinación homóloga de algunos de los exones presentes en el gen de PARP-1. De este modo, Wang y col. en el año 1995 establecieron una primera generación de ratones modificados genéticamente a través de la interrupción genética del exon 2 de PARP-1, Ménissier de Murcia y col. en el año 1997 lo lograron para el exon 4, y finalmente Masutani y col. lo establecieron para el exon 1 en el año 1999. A pesar de existir diferencias en los puntos de delección del gen *parp-1* las tres líneas de ratones generadas presentan alta similitud fenotípica. Estos ratones generados son viables y fértiles, presentan problemas en la capacidad de reparar daños en el ADN y alta inestabilidad genómica frente a estímulos genotóxicos (Simbulan-Rosenthal y col., 1999b; Trucco y col., 1998, Conde y col., 2001), acumulado p53 tras este daño (Masutani y col., 2000; Conde y col., 2001), parada de ciclo en G2/M y retraso del crecimiento (Conde y col., 2001; Trucco y col., 1998). Estos ratones además, ofrecen resistencia a distintas patologías, tales como diabetes inducida por estreptozotocina (Pieper y col., 1999b), artritis inducida por peroxinitrito (Szabó y col., 1998), Parkinson inducido por MPTP (Mandir y col., 1999), isquemia cerebral (Eliasson y col., 1997) y choque séptico inducido por LPS (Oliver y col., 1999). Por último, también se han establecidos otras características adicionales relacionadas con la deficiencia de PARP-1 tales como la presentación de desregulación en el

proceso de control celular de la longitud de los telómeros (d'Adda di Fagagna y col., 1999).

Gracias al establecimiento de ratones genéticamente deficientes en la PARP-1 se ha podido avanzar en el conocimiento de la función biológica de esta proteína. Sin embargo, ocurre que en estas condiciones no se tiene constancia si los resultados obtenidos se deben a una pérdida de la proteína en sí misma o bien debido a la pérdida de su función enzimática. Para ello, la generación de fármacos que inhiben la actividad enzimática de PARP-1 ha posibilitado discernir entre funciones de PARP-1 atribuibles a su actividad enzimática, y funciones independientes de ésta, como aquellas dependientes de su actividad estructural, como por ejemplo, en la modulación de otras proteínas mediante interacción física.

5.2 Desarrollo de inhibidores farmacológicos de PARP-1.

Los inhibidores de PARP-1 ejercen su acción a través de su unión al dominio catalítico de PARP-1, ocupando transitoriamente el centro de unión para NAD⁺. Por tanto, su efecto inhibitorio se debe a que producen una inhibición competitiva. Los primeros inhibidores en utilizarse fueron los denominados *inhibidores clásicos o de primera generación*, que son en su mayoría compuestos derivados de nicotinamidas, benzamidas y análogos. Entre ellos los más utilizados han sido las nicotinamidas ($IC_{50} = 210 \mu M$), las benzamidas ($IC_{50} = 22 \mu M$) y la 3-aminobenzamida (3-ABA, $IC_{50} = 33 \mu M$) (Purnell y Whish, 1980). Aunque 3-ABA ha sido extensamente utilizada como inhibidor de PARP-1 con efectos importantes en la sensibilización de células tumorales a la radiación ionizante, ocurre que es poco potente para inactivar al enzima ($IC_{50} = 33 \mu M$), además de poseer problemas de inespecificidad con otros miembros de la familia PARPs. Esto se debe al alto grado de homología en su dominio catalítico que comparte esta familia de proteínas. Por ello, la utilización de 3-ABA a las concentraciones necesarias para obtener beneficios en quimio y radioterapia (entre 3 y 10 mM) ocasiona importantes problemas de citotoxicidad que afectan a la viabilidad celular, metabolismo de la glucosa y síntesis de ADN (Milam y Cleaver, 1984).

En este sentido, y gracias al mayor conocimiento adquirido sobre la estructura del centro catalítico de PARP-1, una segunda generación de inhibidores más potentes y específicos se han desarrollado (veáse Southan y Szabó, 2003). La mayor contribución al desarrollo de inhibidores de PARP ha sido realizada por Banasik y col. (1992). Estos autores ensayaron hasta un total de 170 fármacos como potenciales drogas inhibitorias de PARP-1 y lograron identificar una gran variedad de componentes con potente actividad inhibitoria, entre los cuales destacan los derivados de quinazolinonas, isoquinolinonas y análogos, fenantridinonas y naftalimidinas, todas ellas con una IC_{50} muy inferior a $1 \mu M$.

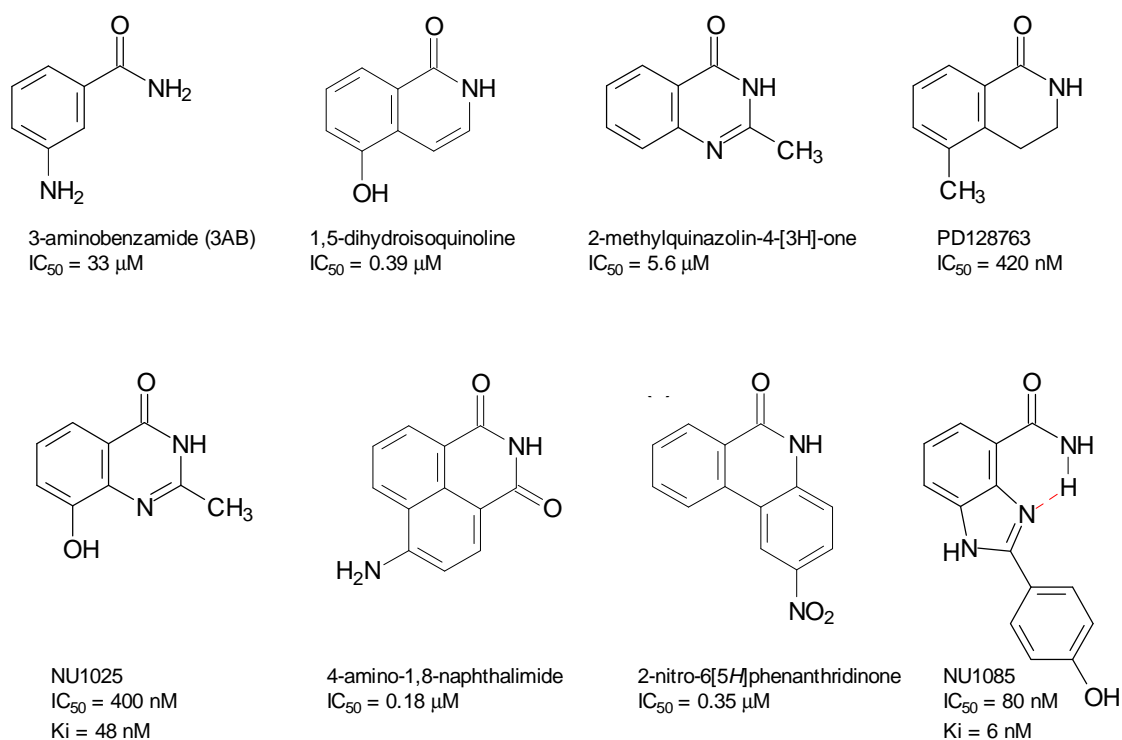


Fig. 13 Estructura de distintos inhibidores de PARP.

De forma simultánea numerosos estudios se han destinado a mejorar el diseño molecular de estos nuevos inhibidores de PARP-1 para conseguir un mayor efecto del bloqueo de la actividad enzimática. El perfeccionamiento de las características moleculares en la estructura de los inhibidores de PARP-1 ha dado lugar al desarrollo de fármacos 50 veces más potentes que la 3-ABA,

tales como el DPQ (3,4-dihidro-5-[4-(1-piperidinil)butoxi]-1(2H)-isoquinolinona), PD128763 (3,4-dihidro-5-metoxiisoquinolin-1(2H)-ona) y NU1025 (8-hidroxi-2-metilquinazolina-4-ona) (Suto y col., 1991; Arundel-Suto y col., 1991; Griffin y col., 1995) entre otros (figura 13). La realización de estudios celulares ha demostrado que tanto el tratamiento con PD128763 como NU1025 a concentraciones de 50-100 μM producen efectos de quimiosensibilización mayores que los obtenidos con 1-5 mM de 3-ABA.

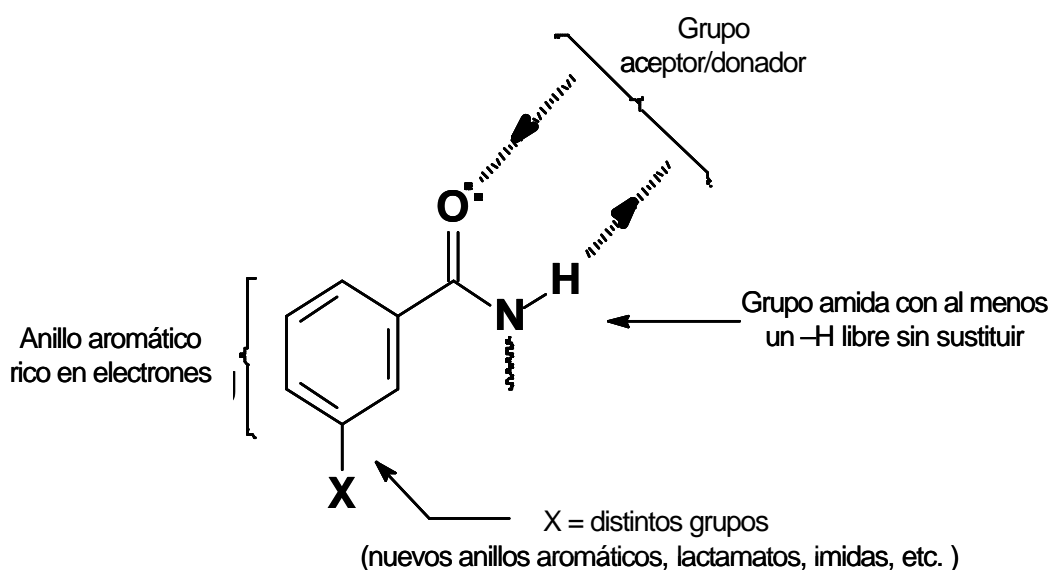


Fig. 14 Requerimientos estructurales necesarios de un potente inhibidor de PARP.

Las características moleculares necesarias que debe de presentar un potente inhibidor para bloquear la actividad enzimática de PARP-1 son las siguientes (figura 14): i) poseer un anillo heterocíclico poliaromático rico en electrones (dador de electrones para el grupo amida) necesario para su unión a la zona del dominio catalítico de PARP-1 en sustitución del NAD⁺; ii) contar con la presencia de un grupo amida (-CONH₂) con al menos un protón sin sustituir en orientación anti con respecto al enlace 1→ 2 del anillo aromático. Para la capacidad donadora de electrones al grupo amida es necesaria la conjugación de diversos grupos aromáticos ricos en electrones, o bien su fusión con lactamatos aromáticos o imidas (figura 14). Un acontecimiento importante en el

desarrollo de nuevos inhibidores de PARP-1 ha sido la resolución de la estructura cristalina del dominio catalítico de PARP (Ruf y col., 1996). La cristalización de los inhibidores PD128763, NU1025 y 4-amino-naftalimida en el sitio de unión para NAD⁺ ha aportado datos importantes a tener en cuenta en la síntesis de nuevos inhibidores de PARP-1, en concreto, han sido de utilidad los datos referentes a la importancia de la orientación del oxígeno presente en el grupo carboxiamida y su papel en la formación de enlaces con el hidrógeno (Ruf y col., 1998). Por ello, basándose en los datos cristalográficos se han desarrollado una tercera generación de inhibidores derivados de benzamidazoles (Canan-Koch y col., 2002; Skalitzky y col., 2003) que han resultado ser aún mas potentes en los fenómenos de quimio y radiosensibilización (Calabrese y col., 2003). En este sentido, uno de estos compuestos, el denominado AG14361 ha empezado a ensayarse clínicamente en combinación con el agente citotóxico temozolomida (TZM) (Calabrese y col., 2003) (figura 15).

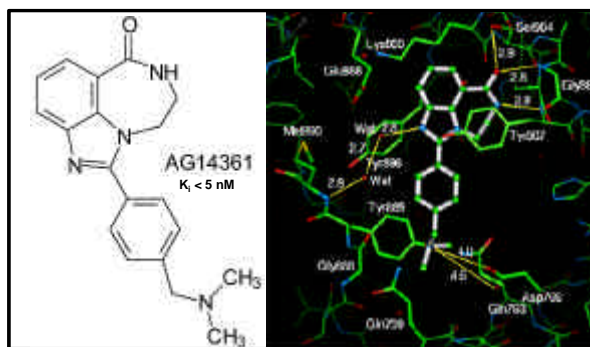


Fig. 15 Estructura de inhibidor AG14361 (izquierda) y de su interacción con el centro catalítico de PARP-1 (derecha). Adaptado de Calabrese y col., 2004.

En definitiva, gracias al uso de inhibidores de PARP-1 se ha podido demostrar que la actividad catalítica del enzima está implicada muy directamente en los procesos de reparación del ADN dañado y que la inhibición de la reparación de este daño producido (como por ejemplo con

el uso del agente alquilante TZM) sensibiliza a la células tumorales a la quimio y radioterapia. Esto se ha podido constatar a todo lo largo del proceso de desarrollo de los inhibidores de PARP-1, primero con el uso de benzamidas (Purnell y Whish, 1980), posteriormente con herramientas más potentes como el PD128763 (Suto y col., 1991; Arundel-Suto y col., 1991) y NU1025 (Griffin y col., 1995) y finalmente con su introducción en ensayos clínicos desde Junio de 2003 (Calabrese y col., 2003).

6. PARP-1 E INFLAMACIÓN

En los procesos patológicos derivados de diferentes respuestas inflamatorias, la inhibición farmacológica de PARP-1 o bien su bloqueo genético, confiere protección frente a estos fenómenos. Esto ha podido ser comprobado en numerosos modelos experimentales, tales como aquellos derivados de daños por isquemia/reperfusión, choque séptico, *shock* hemorrágico, diabetes y procesos inflamatorios crónicos (artritis reumatoide, lupus eritematoso, encefalomiелitis, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, etc.) (Oliver y col., 1999; Szabó y Dawson, 1998; Virág y Szabó, 2002). Una característica común a todos estos procesos relacionados con la inflamación es la liberación de mediadores pro-inflamatorios y la formación de radicales libres. Consecuencia de ello es la formación de radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroxilos (OH^{\cdot}) que interaccionan con el óxido nítrico sintetizado (producto de actividad de la isoforma inducible de la óxido nítrico sintetasa) dando lugar a peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$). Este compuesto es un potente activador de PARP-1 que ocasiona depleción energética en la célula y, por tanto necrosis, que favorece los procesos inflamatorios (figura 16). Simultáneamente este agente genotóxico activa también a diversos factores de transcripción, tales como NF- κ B y AP1, dando lugar a un aumento de expresión de genes dependientes de estos factores implicados en diversos procesos tales como inflamación, angiogénesis, respuesta inmune, estrés oxidativo, además de controlar la expresión de genes que codifican para proteínas antiapoptóticas, moléculas de adhesión celular, proteínas de señalización celular, etc. La expresión de mediadores pro-inflamatorios dependientes de la anterior expresión génica, a su vez, recluta más células (PMN neutrófilos) al foco inflamatorio, aumentando los efectos del estrés oxidativo, de manera que se produce una retroalimentación positiva que amplifica enormemente este estado, favoreciendo así fenómenos de promoción tumoral.

En esta cascada inflamatoria ocasionada por la sobre activación de PARP-1 hay que tener en cuenta también el efecto que esta proteína tiene sobre la activación de los mencionados factores de transcripción. Por tanto, es un hecho demostrado que los ratones *parp-1^{-/-}* muestran un mayor grado de protección frente a patologías asociadas con procesos inflamatorios debido a la

disminución del estado oxidativo producido ante este estímulo y a una activación defectuosa de factores de transcripción dependientes de PARP-1 e implicados en estos procesos (Oliver y col., 1999; Conde y col., 2001; Kraus y Lis, 2003). En este sentido, el hecho de que los ratones *parp-1^{-/-}* muestren también beneficios ante situaciones de estrés oxidativo que los ratones deficientes en NOS, sugiere un papel importante de PARP-1 a través de otros mecanismos, como por ejemplo, el relativo a la modulación de la expresión génica por su capacidad de co-estimular importantes factores de transcripción implicados en inflamación (figura 16).

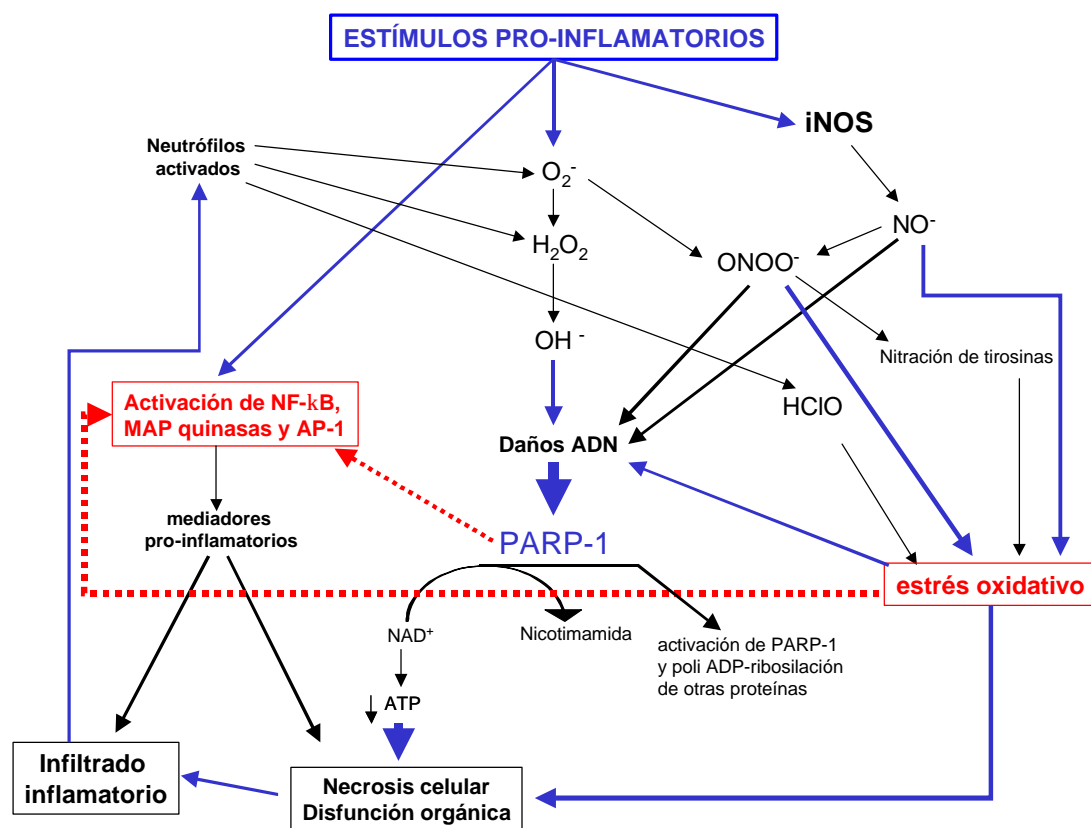


Fig. 16 Modulación de la respuesta inflamatoria a través de la sobre activación de PARP-1 (adaptado de Virág y Szabó, 2002).

Es posible también que el daño oxidativo se origine a pequeña escala, y en estas circunstancias el agotamiento energético y la necrosis celular puedan ayudar a la eliminación de células que han sido severamente dañadas, o que la propia respuesta inflamatoria originada ayude al reclutamiento de PMN al foco de la inflamación. En este sentido, es importante destacar que las únicas células de mamíferos que no expresan PARP-1 son los neutrófilos y

eosinófilos. Esto puede ser debido a que la cantidad de oxidantes y radicales libres que originan estas células sean incompatibles con la presencia de PARP-1 (Bhatia y col., 1995). Por tanto, es importante resaltar que una moderada activación de PARP-1 es beneficiosa en los procesos inflamatorios, no siendo conveniente su inhibición (Nagayama y col., 2000).

En cambio, ante elevadas concentraciones de oxidantes las células disparan además otras rutas citotóxicas independientes de PARP-1 que ocasionan importantes daños celulares. Entonces, es muy probable que en diversas patologías existan efectos citotóxicos sinérgicos entre la actividad de PARP-1 y estos otros procesos celulares independientes de PARP-1, siendo en este caso la inhibición farmacológica de PARP-1 un tratamiento parcial que puede influir en la mejora de los distintos estados inflamatorios derivados de estas patologías.

7. PARP-1 Y TRANSCRIPCIÓN GÉNICA

Un mecanismo a través del cual PARP-1 puede intervenir en la regulación de los diversos procesos patológicos enumerados anteriormente puede ser mediante modificación de los patrones de expresión génica en respuesta a los estímulos pro-inflamatorios. En los últimos años numerosos trabajos implican a PARP-1 en la regulación de la actividad transcripcional (Kraus y Lis, 2003). Como se ha comentado en apartados anteriores, PARP-1 puede regular la transcripción a través de diferentes mecanismos. A grandes rasgos esta regulación obedece a tres formas de actuación de PARP-1 (figura 17):

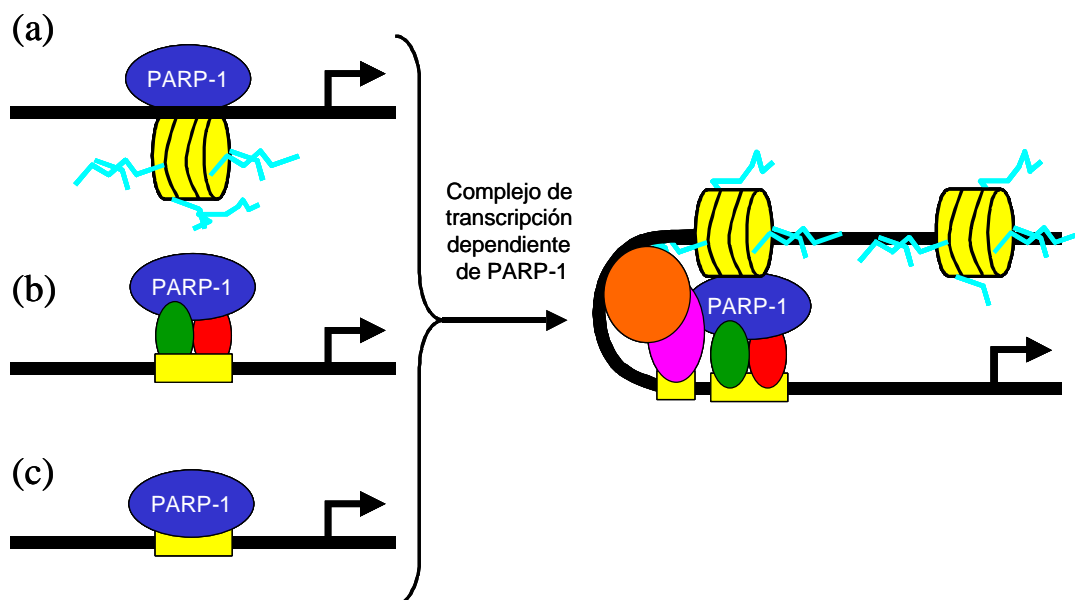


Fig. 17 Mecanismos a través de los cuales PARP-1 puede activar la transcripción génica (adaptado de Kraus y Lis, 2003).

- Mediante la alteración de la estructura de la cromatina. PARP-1 puede modificar de forma transitoria la estructura de la cromatina mediante poli-ADP-ribosilación de proteínas con papeles fundamentales en su ensamblaje (D'Amours y col., 1999). Entre estas proteínas destacan las histonas y las proteínas HMG. Esta alteración estructural de la cromatina permite su descondensación y la accesibilidad al ADN de proteínas implicadas en el inicio de la transcripción. Esto ha podido ser puesto de manifiesto en trabajos

realizados en *Drosophila* en las cuales se ha observado actividad enzimática de PARP en zonas del ADN con alta actividad transcripcional y con descondensación de la cromatina (Tulin y col., 2002; Tulin y Spradling, 2003) (figura 17 a).

- A través de la interacción con otros factores de transcripción. La descondensación de la cromatina no es un acontecimiento suficiente para la activación transcripcional, también es necesaria la presencia de factores de transcripción específicos en el complejo de inicio de la transcripción. Se ha visto, en este sentido, que PARP-1 regula la actividad de diversos factores de transcripción tales como YY1, OCT-1, SP-1, NF- κ B, P53, CREB, AP-1, AP-2, B-MYB, E2F-1, TEF-1 y HSF-1 (Rawling y Álvarez-González, 1997; Oei y col., 1998; Butler y Ordahl y col., 1999; Oliver y col., 1999; Hassa y Hottiger, 1999; Hassa y col., 2003; Andreone y col., 2003) a distintos niveles, es decir, algunos de estos factores de transcripción pueden ser sustratos de PARP-1 y de esta forma ser modificados, alterando así su capacidad para unirse a las secuencias promotoras de los genes. Esto se produciría, siempre y cuando el factor de transcripción no se encuentre ya unido al ADN, en cuyo caso ya no podría ser modificado por el enzima. Para otra serie de factores de transcripción, en cambio, no es necesaria la anterior modificación, pero sí la interacción física de estos con PARP-1. Por tanto, PARP-1, en este caso, actuaría como co-activador de una serie de factores de transcripción (NF- κ B, AP-2, B-MYB, E2F-1), de manera que esta interacción estabiliza y/o aumenta su unión al ADN, favoreciendo así la activación de los factores de transcripción y *trans*-activando la expresión de genes que se hallan bajo el control de estos factores (Kannan y col., 1999; Simbulan-Rosenthal y col., 2000, Cerverella y Sala, 2000; Oliver y col., 1999; Hassa y col., 2001) (figura 17 b).

- Mediante la unión a secuencia reguladoras o promotoras del ADN. PARP-1 puede ser reclutada a la región promotora de ciertas secuencias del ADN, reconociendo ciertas estructuras o interaccionando con otros factores de unión al ADN (Nie y col., 1998; Butler y Ordahl y col., 1999; Plaza y col., 1999; Akiyama y col., 2000; Nirodi y col., 2001; Ha y col., 2002). Para esta interacción, sólo en algunos casos se requiere de la actividad enzimática de PARP-1 (Butler y Ordahl y col., 1999; Miyamoto y col., 1999; Nirodi y col.,

2001), mientras en otros casos su función es independiente de esta actividad, actuando PARP-1 como un regulador clásico de la transcripción de ciertos promotores (Meisterernst y col., 1997; Anderson y col., 2000; Cerverella y Sala, 2000; Hassa y Hottiger, 2002). Un ejemplo de ello es el reconocimiento por parte de PARP-1 de regiones específicas en su propio promotor para regular su propia expresión (Soldatenkov y col., 2002). Para ello, PARP-1 se une a su promotor inhibiendo su expresión. Además de la *auto-unión* de PARP-1 a su promotor, Oei y col. (1997) han sugerido, tras demostrar posibles sitios de unión en el promotor de PARP-1 para SP-1 y YY1, que ambos factores de transcripción son necesarios para la regulación de la propia PARP-1. Para ello postulan que PARP-1 puede controlar su propia expresión no sólo por unión a su promotor, sino también por unión y/o modificación de proteínas capaces de unirse a su promotor (figura 17 c).

Todas estas anteriores propiedades hacen de PARP-1 un regulador de la transcripción único, capaz de modular la estructura de la cromatina y de activar la expresión génica.

8. REGULACIÓN DE NF- κ B POR PARP-1

De forma simultánea, en 1999, los trabajos de Oliver y col. y Hassa y col. demostraron que la proteína nuclear PARP-1 es necesaria para la activación del factor de transcripción NF- κ B y para la consecuente expresión de los genes dependientes en respuesta a estímulos pro-inflamatorios y al estrés genotóxico, aunque la ausencia de PARP-1 no impide la translocación de NF- κ B al núcleo. Esto indica que debe de existir un control nuclear de NF- κ B por parte de PARP-1, de manera que en condiciones de ausencia de PARP-1 se continúe permitiendo la translocación de NF- κ B al núcleo pero no la unión de este factor de transcripción a las secuencias promotoras de los genes regulados por NF- κ B. Este control de NF- κ B dependiente de PARP-1 puede ser debido bien a una interacción directa entre ambas proteínas y/o a modificaciones por poli-ADP-ribosilación de NF- κ B.

8.1 Interacción directa entre PARP-1 y NF κ B.

El trabajo de Hassa y col. de 2001 describe la interacción directa entre PARP-1 y las distintas subunidades de NF- κ B, p65 y p50, utilizando para ello un sistema experimental *in vitro*, además de demostrar *in vivo* la formación de inmunoprecipitados estables entre ambas proteínas, que resultaron ser independientes tanto de la unión de PARP-1 al ADN como de la actividad enzimática de PARP-1. Otros autores simultáneamente han llegado a la mismos resultados *in vivo* (Ullrich y col., 2001; Ha y col., 2002). Recientemente Hassa y col. (2003) describen una interacción PARP-1-p300 la cual actúa de forma sinérgica coactivando NF- κ B en respuesta a LPS y TNF- α . Por tanto, para estos autores ni la actividad enzimática de PARP-1 ni su capacidad de unión al ADN son necesarias para la activación de NF- κ B *in vivo*.

Aunque el mecanismo de actuación por el cual la interacción física de PARP-1 activaría NF- κ B no se conoce aún, parecen existir evidencias de que pueda ser debido a través de terceras proteínas que formarían parte del complejo de pre-iniciación de la transcripción, del cual forma parte la propia PARP-1 (Meisterenst y col., 1997; Hassa y col., 2003). Además, dependiendo

del tipo celular o del tipo de estímulo a que la célula está sometida, PARP-1 actúa interfiriendo o permitiendo la expresión de determinados genes regulados por NF- κ B, dado que el fenotipo de los ratones *parp-1*^{-/-} y *p65*^{-/-} no es el mismo ante determinados estímulos. Ello indica que sólo un grupo de genes dependientes de NF- κ B son a su vez regulados también por PARP-1, como es el caso de iNOS o TNF- α .

8.2 Poli-ADP-ribosilación de NF κ B por PARP-1.

Son todavía contradictorios los datos que aparecen en la bibliografía acerca del posible papel jugado por la poli-ADP-ribosilación en la activación de NF- κ B. Por ejemplo, hay autores que describen relación entre actividad enzimática de PARP-1 y activación de NF- κ B, en cambio, para otros sólo la interacción física entre ambas proteínas es necesaria para la activación del factor de transcripción.

Que la actividad enzimática de PARP-1 puede influir directamente en la activación de NF- κ B ha sido descrito por varios grupos independientes en años sucesivos (Le Page y col., 1998; Kameoka y col., 2000; Chang y Álvarez-González, 2001). Un trabajo pionero en este campo fue el de Le Page y col. en 1998, el cual concluye que el uso de inhibidores de PARP-1 disminuye la transcripción del gen iNOS a través de la inhibición de la activación de NF- κ B en un modelo experimental con macrófagos murinos. Para ello transfectaron transitoriamente un gen reportero de luciferasa bajo el control del promotor de iNOS, con diversos sitios de unión para NF- κ B, y observaron tras estimulación con IFN- γ y LPS un efecto inhibitorio de la expresión de este gen dependiente de NF- κ B tras el uso de inhibidores de PARP-1. Por tanto estos autores sugirieron un paso intermedio de poli-ADP-ribosilación para la activación de la transcripción de genes dependientes de NF- κ B. Más tarde en el año 2000, Kameoka y col., publican un segundo trabajo a este respecto en el que muestran cómo la poli-ADP-ribosilación de NF- κ B afecta a su unión al ADN, al igual que ocurre para otros factores de transcripción (Oei y col., 1998). Además, observan *in vitro* que las dos subunidades de NF- κ B (p50, p65) son modificadas por ADP-ribosilación, detectando además ADP-ribosilación de p65

en el citosol de la célula, sugiriendo para ello un posible papel de esta modificación en la localización de NF- κ B del núcleo al citosol celular. Posteriormente, Chang y Álvarez-González en el año 2001 publican un nuevo trabajo en el cual muestran *in vitro* que la unión al ADN de la subunidad p50 de NF- κ B es regulada de forma reversible por automodificaciones de PARP-1. Para ellos, PARP-1 podría interactuar con p50 enmascarando mediante esta interacción la secuencia de p50 que permite su unión a secuencias consenso del ADN. Muestran cómo PARP-1, cuando se encuentra ADP-ribosilada, revierte completamente este efecto.

De manera simultánea han ido surgiendo nuevos trabajos de investigación que están en desacuerdo con la idea mostrada en el párrafo anterior. De destacar son los trabajos anteriormente citados de Hassa y col. (2001), Ha y col. (2002), García-Soriano y col. (2001). Para ellos, la poli-ADP-ribosilación no afecta a la unión de NF- κ B al ADN, ni se requiere para la expresión de genes κ B-dependientes. En cambio, varios estudios muestran, en consonancia con la idea mostrada en el párrafo anterior, una disminución de la expresión génica de mediadores inflamatorios en modelos murinos tras tratamiento con inhibidores de PARP-1 (Szabó y col., 1997; Mabley y col., 2001; Liaudet y col., 2002; Cuzzocrea y col., 2002), aunque a priori estos resultados no parecen ser incompatibles con la idea mostrada por Hassa y Hottiger (2002). Para estos autores el uso de inhibidores de PARP, tales como 3-ABA y nicotinamida, así como otros, no sólo inhiben la actividad enzimática de PARP-1, sino que también inhiben a otros miembros de la superfamilia PARPs, tales como PARP-2, TANK-2, así como a otras ADP-ribosomas transferasas que también forman parte de la respuesta inflamatoria (Koch-Nolte y col., 1997; Hauschildt y col., 1997). Además, en este sentido, la actividad enzimática de PARP-1 podría ser requerida para la actividad transcripcional de otros factores de transcripción involucrados en los fenómenos inflamatorios como AP-1 (Zingarelli y col., 2004).

Por tanto, no existe aún un conocimiento exacto del mecanismo por el cual PARP-1 regula la actividad transcripcional de NF- κ B, aunque numerosos estudios apoyan la idea generalizada de que PARP-1 es un coactivador transcripcional de NF- κ B. Para ello ambas proteínas pueden interactuar

físicamente a través de las distintas subunidades de NF- κ B y de distintos dominios de PARP-1, o bien, PARP-1 a través de su actividad de poli-ADP-ribosilación puede modificar de forma transitoria a NF- κ B, así como a otras proteínas, para llevar a cabo su activación.

Por último, puede ser que NF- κ B se encuentre poli-ADP-ribosilado bajo determinadas condiciones *in vivo*, sin que por ello se requiera la poli-ADP-ribosilación de NF- κ B en condiciones fisiológicas para el proceso de activación o represión de este factor de transcripción.

9. REGULACIÓN DE AP-1 POR PARP-1

Una primera evidencia de una regulación del factor de transcripción AP-1 por parte de PARP-1 ha sido recientemente descrita por Andreone y col. (2003). Estos autores demuestran que bajo condiciones de estrés oxidativo o inmunológico, PARP-1 es un importante modulador de la vía de activación de AP-1. Además, encuentran evidencias de que la completa anulación de la unión de AP-1 al ADN, en condiciones de ausencia o inhibición farmacológica de PARP-1, está relacionada con alteraciones en la ruta de las MAPK. Concretamente observan alteraciones en el estado de activación de las enzimas MEK-4 y JNK. Estos autores sugieren un escenario en el cual PARP-1 podría modular la vía de AP-1 a través de la regulación de la activación de protein-quinasas nucleares. Es posible que PARP-1 se requiera para mantener un balance crítico en los niveles de actividad de la enzima JNK ante condiciones basales y durante procesos que promuevan el estrés oxidativo. En este sentido PARP-1 actuaría como un importante modulador de la composición del dímero de AP-1, ya que la ausencia de PARP-1 altera el contenido de las subunidades de este dímero, lo cual es dependiente de la activación de JNK (Davis, 1999; Karin y col., 1997). Por tanto, puede ocurrir que estas diferencias mostradas en cuanto a la composición del dímero en ausencia de PARP-1 sean cruciales para la unión de AP-1 al ADN, dado que en condiciones de eliminación genética o inhibición farmacológica de PARP-1 no se produce esta unión. Respecto a esto, Cerutti y col. (1992) han propuesto que tanto la fosforilación de proteínas como su poli-ADP-ribosilación son necesarias para la inducción transcripcional de c-fos ante estímulos oxidativos. En este sentido, Ha y col. (2002) han demostrado recientemente, en un sistema experimental con células gliales deficientes en PARP-1, la importancia de la poli-ADP-ribosilación en la vía de activación de AP-1. Estos autores han descrito en estas células una deficiente inducción de AP-1 tras tratamiento con TNF- α y endotoxinas.

Aunque son aún necesarios muchos otros estudios para dilucidar el papel de PARP-1 en la ruta de activación de AP-1, si es cierto que PARP-1, y concretamente la poli-ADP-ribosilación son necesarias para que se produzca una correcta transducción de señales que culmine con la activación de AP-1

ante estímulos pro-inflamatorios. En este contexto, Zingarelli y col. (2004), utilizando un modelo inflamatorio de colitis ulcerosa, han puesto de manifiesto que los ratones deficientes en PARP-1 exhiben una significativa reducción del daño inflamatorio que está relacionado con una disminuida activación del enzima JNK y con una importante reducción de la unión de AP-1 al ADN.

10. REFERENCIAS

- Akiyama, T. et al. Activation of Reg gene, a gene for insulin-producing beta -cell regeneration: poly(ADP-ribose) polymerase binds Reg promoter and regulates the transcription by autopoly(ADP-ribosyl)ation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 48-53 (2001).
- Albanese, C. et al. Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. *J Biol Chem* **270**, 23589-97 (1995).
- Allen, T.D. & Potten, C.S. Desmosomal form, fate, and function in mammalian epidermis. *J Ultrastruct Res* **51**, 94-105 (1975).
- Alvarez-Gonzalez, R., Watkins, T.A., Gill, P.K., Reed, J.L. & Mendoza-Alvarez, H. Regulatory mechanisms of poly(ADP-ribose) polymerase. *Mol Cell Biochem* **193**, 19-22 (1999).
- Ame, J.C., Spelnhauer, C. & de Murcia, G. The PARP superfamily. *Bioessays* **26**, 882-93 (2004).
- Anderson, M.G., Scoggin, K.E., Simbulan-Rosenthal, C.M. & Steadman, J.A. Identification of poly(ADP-ribose) polymerase as a transcriptional coactivator of the human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein. *J Virol* **74**, 2169-77 (2000).
- Andreone, T.L., O'Connor, M., Denenberg, A., Hake, P.W. & Zingarelli, B. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 regulates activation of activator protein-1 in murine fibroblasts. *J Immunol* **170**, 2113-20 (2003).
- Angel, P. et al. Oncogene jun encodes a sequence-specific trans-activator similar to AP-1. *Nature* **332**, 166-71 (1988).
- Angel, P., Hattori, K., Smeal, T. & Karin, M. The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* **55**, 875-85 (1988).
- Argyris, T.S. Promotion of epidermal carcinogenesis by repeated damage to mouse skin. *Am J Ind Med* **8**, 329-37 (1985).
- Arundel-Suto, C.M., Scavone, S.V., Turner, W.R., Suto, M.J. & Sebolt-Leopold, J.S. Effect of PD 128763, a new potent inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase, on X-ray-induced cellular recovery processes in Chinese hamster V79 cells. *Radiat Res* **126**, 367-71 (1991).
- Baeuerle, P.A. & Baltimore, D. NF-kappa B: ten years after. *Cell* **87**, 13-20 (1996).
- Bakondi, E. et al. Detection of poly(ADP-ribose) polymerase activation in oxidatively stressed cells and tissues using biotinylated NAD substrate. *J Histochem Cytochem* **50**, 91-8 (2002).
- Baldwin, A.S., Jr. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest* **107**, 3-6 (2001a).
- Baldwin, A.S. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest* **107**, 241-6 (2001b).
- Balkwill, F. & Mantovani, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* **357**, 539-45 (2001).

- Balmain, A. & Pragnell, I.B. Mouse skin carcinomas induced in vivo by chemical carcinogens have a transforming Harvey-ras oncogene. *Nature* **303**, 72-4 (1983).
- Banasik, M., Komura, H., Shimoyama, M. & Ueda, K. Specific inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase and mono(ADP-ribosyl)transferase. *J Biol Chem* **267**, 1569-75 (1992).
- Bargou, R.C. et al. High-level nuclear NF-kappa B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* **87**, 4340-7 (1996).
- Bauer, P.I., Buki, K.G. & Kun, E. Selective augmentation of histone H1 phosphorylation sites by interaction of poly(ADP-ribose) polymerase and cdc2-kinase: comparison with protein kinase C. *Int J Mol Med* **8**, 691-3 (2001).
- Bauer, P.I. et al. Molecular interactions between poly(ADP-ribose) polymerase (PARP I) and topoisomerase I (Topo I): identification of topology of binding. *FEBS Lett* **506**, 239-42 (2001).
- Behrens, A., Jochum, W., Sibilica, M. & Wagner, E.F. Oncogenic transformation by ras and fos is mediated by c-Jun N-terminal phosphorylation. *Oncogene* **19**, 2657-63 (2000).
- Bell, S. et al. Involvement of NF-kappaB signalling in skin physiology and disease. *Cell Signal* **15**, 1-7 (2003).
- Bender, K., Gottlicher, M., Whiteside, S., Rahmsdorf, H.J. & Herrlich, P. Sequential DNA damage-independent and -dependent activation of NF-kappaB by UV. *Embo J* **17**, 5170-81 (1998).
- Bhatia, M., Kirkland, J.B. & Meckling-Gill, K.A. Modulation of poly(ADP-ribose) polymerase during neutrophilic and monocytic differentiation of promyelocytic (NB4) and myelocytic (HL-60) leukaemia cells. *Biochem J* **308 (Pt 1)**, 131-7 (1995).
- Bowden, G.T., Schneider, B., Domann, R. & Kulesz-Martin, M. Oncogene activation and tumor suppressor gene inactivation during multistage mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res* **54**, 1882s-1885s (1994).
- Braun-Falco, O., de Dulanto, F., Epstein, E., Bernstein, G. & Hanke, C.W. A decade of dermatologic surgery. *J Dermatol Surg Oncol* **11**, 199-202, 208 (1985).
- Briggaman, R.A. Epidermal-dermal interactions in adult skin. *J Invest Dermatol* **79 Suppl 1**, 21s-24s (1982).
- Brown, K. et al. v-ras genes from Harvey and BALB murine sarcoma viruses can act as initiators of two-stage mouse skin carcinogenesis. *Cell* **46**, 447-56 (1986).
- Budunova, I.V. et al. Increased expression of p50-NF-kappaB and constitutive activation of NF-kappaB transcription factors during mouse skin carcinogenesis. *Oncogene* **18**, 7423-31 (1999).
- Burns, P.A. et al. Loss of heterozygosity and mutational alterations of the p53 gene in skin tumours of interspecific hybrid mice. *Oncogene* **6**, 2363-9 (1991).

- Burstein, E. & Duckett, C.S. Dying for NF-kappaB? Control of cell death by transcriptional regulation of the apoptotic machinery. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 732-7 (2003).
- Butler, A.J. & Ordahl, C.P. Poly(ADP-ribose) polymerase binds with transcription enhancer factor 1 to MCAT1 elements to regulate muscle-specific transcription. *Mol Cell Biol* **19**, 296-306 (1999).
- Calabrese, C.R. et al. Anticancer chemosensitization and radiosensitization by the novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor AG14361. *J Natl Cancer Inst* **96**, 56-67 (2004).
- Calabrese, C.R. et al. Identification of potent nontoxic poly(ADP-Ribose) polymerase-1 inhibitors: chemopotential and pharmacological studies. *Clin Cancer Res* **9**, 2711-8 (2003).
- Caldecott, K.W., Aoufouchi, S., Johnson, P. & Shall, S. XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro. *Nucleic Acids Res* **24**, 4387-94 (1996).
- Canan Koch, S.S. et al. Novel tricyclic poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitors with potent anticancer chemopotentiating activity: design, synthesis, and X-ray cocrystal structure. *J Med Chem* **45**, 4961-74 (2002).
- Caulin, C., Scholl, F.G., Frontelo, P., Gamallo, C. & Quintanilla, M. Chronic exposure of cultured transformed mouse epidermal cells to transforming growth factor-beta 1 induces an epithelial-mesenchymal transdifferentiation and a spindle tumoral phenotype. *Cell Growth Differ* **6**, 1027-35 (1995).
- Cerutti, P., Shah, G., Peskin, A. & Amstad, P. Oxidant carcinogenesis and antioxidant defense. *Ann N Y Acad Sci* **663**, 158-66 (1992).
- Cervellera, M.N. & Sala, A. Poly(ADP-ribose) polymerase is a B-MYB coactivator. *J Biol Chem* **275**, 10692-6 (2000).
- Chambon, P., Weill, J.D. & Mandel, P. Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* **11**, 39-43 (1963).
- Chang, W.J. & Alvarez-Gonzalez, R. The sequence-specific DNA binding of NF-kappa B is reversibly regulated by the automodification reaction of poly (ADP-ribose) polymerase 1. *J Biol Chem* **276**, 47664-70 (2001).
- Chen, F., Castranova, V. & Shi, X. New insights into the role of nuclear factor-kappaB in cell growth regulation. *Am J Pathol* **159**, 387-97 (2001).
- Cheng, S.C. et al. A metabolite of the carcinogen 7,12-dimethylbenz[a]anthracene that reacts predominantly with adenine residues in DNA. *Carcinogenesis* **9**, 1721-3 (1988).
- Cohen, D.R. & Curran, T. fra-1: a serum-inducible, cellular immediate-early gene that encodes a fos-related antigen. *Mol Cell Biol* **8**, 2063-9 (1988).
- Conde, C. et al. Loss of poly(ADP-ribose) polymerase-1 causes increased tumour latency in p53-deficient mice. *Embo J* **20**, 3535-43 (2001).

- Courtois, G. & Israel, A. NF-kappa B defects in humans: the NEMO/incontinentia pigmenti connection. *Sci STKE* **2000**, PE1 (2000).
- Coussens, L.M. & Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* **420**, 860-7 (2002).
- Cuzzocrea, S. et al. Effects of 5-aminoisoquinolinone, a water-soluble, potent inhibitor of the activity of poly (ADP-ribose) polymerase, in a rodent model of lung injury. *Biochem Pharmacol* **63**, 293-304 (2002).
- d'Adda di Fagagna, F. et al. Functions of poly(ADP-ribose) polymerase in controlling telomere length and chromosomal stability. *Nat Genet* **23**, 76-80 (1999).
- D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I. & Poirier, G.G. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* **342 (Pt 2)**, 249-68 (1999).
- D'Amours, D., Sallmann, F.R., Dixit, V.M. & Poirier, G.G. Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases: implications for apoptosis. *J Cell Sci* **114**, 3771-8 (2001).
- Dantzer, F., Nasheuer, H.P., Vonesch, J.L., de Murcia, G. & Menissier-de Murcia, J. Functional association of poly(ADP-ribose) polymerase with DNA polymerase alpha-primase complex: a link between DNA strand break detection and DNA replication. *Nucleic Acids Res* **26**, 1891-8 (1998).
- Davidovic, L., Vodenicharov, M., Affar, E.B. & Poirier, G.G. Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism. *Exp Cell Res* **268**, 7-13 (2001).
- Davis, R.J. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase. *Biochem Soc Symp* **64**, 1-12 (1999).
- de Murcia, J.M. et al. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7303-7 (1997).
- Dhar, A., Young, M.R. & Colburn, N.H. The role of AP-1, NF-kappaB and ROS/NOS in skin carcinogenesis: the JB6 model is predictive. *Mol Cell Biochem* **234-235**, 185-93 (2002).
- Diaz-Guerra, M. et al. Expression of simple epithelial cytokeratins in mouse epidermal keratinocytes harboring Harvey ras gene alterations. *Cancer Res* **52**, 680-7 (1992).
- Dong, Z., Birrer, M.J., Watts, R.G., Matrisian, L.M. & Colburn, N.H. Blocking of tumor promoter-induced AP-1 activity inhibits induced transformation in JB6 mouse epidermal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 609-13 (1994).
- Dong, Z. et al. A dominant negative mutant of jun blocking 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced invasion in mouse keratinocytes. *Mol Carcinog* **19**, 204-12 (1997).
- Dvorak, H.F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* **315**, 1650-9 (1986).
- Ebnet, K., Brown, K.D., Siebenlist, U.K., Simon, M.M. & Shaw, S. *Borrelia burgdorferi* activates nuclear factor-kappa B and is a potent inducer of chemokine and adhesion molecule gene expression in endothelial cells and fibroblasts. *J Immunol* **158**, 3285-92 (1997).

- Eliasson, M.J. et al. Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nat Med* **3**, 1089-95 (1997).
- Frontelo, P. et al. Transforming growth factor beta 1 induces squamous carcinoma cell variants with increased metastatic abilities and a disorganized cytoskeleton. *Exp Cell Res* **244**, 420-32 (1998).
- Garcia Soriano, F. et al. Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *Nat Med* **7**, 108-13 (2001).
- Gordon-Shaag, A., Yosef, Y., Abd El-Latif, M. & Oppenheim, A. The abundant nuclear enzyme PARP participates in the life cycle of simian virus 40 and is stimulated by minor capsid protein VP3. *J Virol* **77**, 4273-82 (2003).
- Greenhalgh, D.A. & Yuspa, S.H. Malignant conversion of murine squamous papilloma cell lines by transfection with the fos oncogene. *Mol Carcinog* **1**, 134-43 (1988).
- Greten, F.R. & Karin, M. The IKK/NF-kappaB activation pathway-a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett* **206**, 193-9 (2004).
- Griffin, R.J. et al. Novel potent inhibitors of the DNA repair enzyme poly(ADP-ribose)polymerase (PARP). *Anticancer Drug Des* **10**, 507-14 (1995).
- Gruda, M.C., Kovary, K., Metz, R. & Bravo, R. Regulation of Fra-1 and Fra-2 phosphorylation differs during the cell cycle of fibroblasts and phosphorylation in vitro by MAP kinase affects DNA binding activity. *Oncogene* **9**, 2537-47 (1994).
- Ha, H.C., Hester, L.D. & Snyder, S.H. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 dependence of stress-induced transcription factors and associated gene expression in glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3270-5 (2002).
- Hai, T.W., Liu, F., Allegretto, E.A., Karin, M. & Green, M.R. A family of immunologically related transcription factors that includes multiple forms of ATF and AP-1. *Genes Dev* **2**, 1216-26 (1988).
- Hassa, P.O., Buerki, C., Lombardi, C., Imhof, R. & Hottiger, M.O. Transcriptional coactivation of nuclear factor-kappaB-dependent gene expression by p300 is regulated by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *J Biol Chem* **278**, 45145-53 (2003).
- Hassa, P.O., Covic, M., Hasan, S., Imhof, R. & Hottiger, M.O. The enzymatic and DNA binding activity of PARP-1 are not required for NF-kappa B coactivator function. *J Biol Chem* **276**, 45588-97 (2001).
- Hassa, P.O. & Hottiger, M.O. A role of poly (ADP-ribose) polymerase in NF-kappaB transcriptional activation. *Biol Chem* **380**, 953-9 (1999).
- Hassa, P.O. & Hottiger, M.O. The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders. *Cell Mol Life Sci* **59**, 1534-53 (2002).
- Hauschildt, S. et al. Role of ADP-ribosylation in activated monocytes/macrophages. *Adv Exp Med Biol* **419**, 249-52 (1997).

- Hecker, E. Three stage carcinogenesis in mouse skin--recent results and present status of an advanced model system of chemical carcinogenesis. *Toxicol Pathol* **15**, 245-58 (1987).
- Hsu, T.C., Young, M.R., Cmarik, J. & Colburn, N.H. Activator protein 1 (AP-1)- and nuclear factor kappaB (NF-kappaB)-dependent transcriptional events in carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* **28**, 1338-48 (2000).
- Huang, C. et al. Blocking activator protein-1 activity, but not activating retinoic acid response element, is required for the antitumor promotion effect of retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5826-30 (1997).
- Jimbow, K., Quevedo, W.C., Jr., Fitzpatrick, T.B. & Szabo, G. Some aspects of melanin biology: 1950-1975. *J Invest Dermatol* **67**, 72-89 (1976).
- Kameoka, M. et al. Evidence for regulation of NF-kappaB by poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochem J* **346 Pt 3**, 641-9 (2000).
- Kanai, Y., Tanuma, S. & Sugimura, T. Immunofluorescent staining of poly(ADP-ribose) in situ in HeLa cell chromosomes in the M phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 2801-4 (1981).
- Kannan, P., Yu, Y., Wankhade, S. & Tainsky, M.A. PolyADP-ribose polymerase is a coactivator for AP-2-mediated transcriptional activation. *Nucleic Acids Res* **27**, 866-74 (1999).
- Karin, M. & Ben-Neriah, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* **18**, 621-63 (2000).
- Karin, M., Liu, Z. & Zandi, E. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 240-6 (1997).
- Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N.E. & Poirier, G.G. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* **53**, 3976-85 (1993).
- Kemp, C.J., Donehower, L.A., Bradley, A. & Balmain, A. Reduction of p53 gene dosage does not increase initiation or promotion but enhances malignant progression of chemically induced skin tumors. *Cell* **74**, 813-22 (1993).
- Kim, J.W., Kim, K., Kang, K. & Joe, C.O. Inhibition of homodimerization of poly(ADP-ribose) polymerase by its C-terminal cleavage products produced during apoptosis. *J Biol Chem* **275**, 8121-5 (2000).
- Kitchin K.T., Brown J.L. & Setzer R.W. Dose-response relationship in multistage carcinogenesis: promoters. *Environ Health Perspect* **102** (suppl 1): 255-264 (1994).
- Klement, J.F. et al. IkappaBalpha deficiency results in a sustained NF-kappaB response and severe widespread dermatitis in mice. *Mol Cell Biol* **16**, 2341-9 (1996).
- Koch-Nolte, F. & Haag, F. Mono(ADP-ribosyl)transferases and related enzymes in animal tissues. Emerging gene families. *Adv Exp Med Biol* **419**, 1-13 (1997).

- Kordes, U., Krappmann, D., Heissmeyer, V., Ludwig, W.D. & Scheidereit, C. Transcription factor NF-kappaB is constitutively activated in acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia* **14**, 399-402 (2000).
- Krappmann, D. & Scheidereit, C. Regulation of NF-kappa B activity by I kappa B alpha and I kappa B beta stability. *Immunobiology* **198**, 3-13 (1997).
- Kraus, W.L. & Lis, J.T. PARP goes transcription. *Cell* **113**, 677-83 (2003).
- Kun, E., Kirsten, E. & Ordahl, C.P. Coenzymatic activity of randomly broken or intact double-stranded DNAs in auto and histone H1 trans-poly(ADP-ribosylation), catalyzed by poly(ADP-ribose) polymerase (PARP I). *J Biol Chem* **277**, 39066-9 (2002).
- Kuper, H., Adami, H.O. & Trichopoulos, D. Infections as a major preventable cause of human cancer. *J Intern Med* **248**, 171-83 (2000).
- Kurosumi, K., Kurosumi, U. & Inoue, K. Morphological and morphometric studies with the electron microscope on the Merkel cells and associated nerve terminals of normal and denervated skin. *Arch Histol Jpn* **42**, 243-61 (1979).
- Landy, S.J. & Donnai, D. Incontinentia pigmenti (Bloch-Sulzberger syndrome). *J Med Genet* **30**, 53-9 (1993).
- Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G. & Earnshaw, W.C. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* **371**, 346-7 (1994).
- Le Page, C., Sanceau, J., Drapier, J.C. & Wietzerbin, J. Inhibitors of ADP-ribosylation impair inducible nitric oxide synthase gene transcription through inhibition of NF kappa B activation. *Biochem Biophys Res Commun* **243**, 451-7 (1998).
- Leduc, Y., Lawrence, J.J., De Murcia, G. & Poirier, G.G. Cell cycle regulation of poly(ADP-ribose) synthetase in FR3T3 cells. *Biochim Biophys Acta* **968**, 275-82 (1988).
- Leppard, J.B., Dong, Z., Mackey, Z.B. & Tomkinson, A.E. Physical and functional interaction between DNA ligase IIIalpha and poly(ADP-Ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair. *Mol Cell Biol* **23**, 5919-27 (2003).
- Li, J.J., Rhim, J.S., Schlegel, R., Vousden, K.H. & Colburn, N.H. Expression of dominant negative Jun inhibits elevated AP-1 and NF-kappaB transactivation and suppresses anchorage independent growth of HPV immortalized human keratinocytes. *Oncogene* **16**, 2711-21 (1998).
- Li, N. & Karin, M. Ionizing radiation and short wavelength UV activate NF-kappaB through two distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13012-7 (1998).
- Li, Q. & Verma I. M. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* **2** (10), 725-734 (2002).
- Liaudet, L. et al. Activation of poly(ADP-Ribose) polymerase-1 is a central mechanism of lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* **165**, 372-7 (2002).

- Lindahl, T., Satoh, M.S., Poirier, G.G. & Klungland, A. Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks. *Trends Biochem Sci* **20**, 405-11 (1995).
- Mabley, J.G. et al. Anti-inflammatory effects of a novel, potent inhibitor of poly (ADP-ribose) polymerase. *Inflamm Res* **50**, 561-9 (2001).
- Mandir, A.S. et al. Poly(ADP-ribose) polymerase activation mediates 1-methyl-4-phenyl-1, 2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5774-9 (1999).
- Masutani, M. et al. The response of Parp knockout mice against DNA damaging agents. *Mutat Res* **462**, 159-66 (2000).
- Masutani, M. et al. Function of poly(ADP-ribose) polymerase in response to DNA damage: gene-disruption study in mice. *Mol Cell Biochem* **193**, 149-52 (1999).
- May, M.J. & Ghosh, S. Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol Today* **19**, 80-8 (1998).
- Mayo, M.W. & Baldwin, A.S. The transcription factor NF-kappaB: control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *Biochim Biophys Acta* **1470**, M55-62 (2000).
- Meisterernst, M., Stelzer, G. & Roeder, R.G. Poly(ADP-ribose) polymerase enhances activator-dependent transcription in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2261-5 (1997).
- Milam, K.M. & Cleaver, J.E. Inhibitors of poly(adenosine diphosphate-ribose) synthesis: effect on other metabolic processes. *Science* **223**, 589-91 (1984).
- Miyamoto, T., Kakizawa, T. & Hashizume, K. Inhibition of nuclear receptor signalling by poly(ADP-ribose) polymerase. *Mol Cell Biol* **19**, 2644-9 (1999).
- Nagayama, T. et al. Activation of poly(ADP-ribose) polymerase in the rat hippocampus may contribute to cellular recovery following sublethal transient global ischemia. *J Neurochem* **74**, 1636-45 (2000).
- Nakabeppu, Y., Ryder, K. & Nathans, D. DNA binding activities of three murine Jun proteins: stimulation by Fos. *Cell* **55**, 907-15 (1988).
- Navarro, P. et al. A role for the E-cadherin cell-cell adhesion molecule during tumor progression of mouse epidermal carcinogenesis. *J Cell Biol* **115**, 517-33 (1991).
- Nie, J. et al. Interaction of Oct-1 and automodification domain of poly(ADP-ribose) synthetase. *FEBS Lett* **424**, 27-32 (1998).
- Nirodi, C. et al. A role for poly(ADP-ribose) polymerase in the transcriptional regulation of the melanoma growth stimulatory activity (CXCL1) gene expression. *J Biol Chem* **276**, 9366-74 (2001).
- Nishina, H., Sato, H., Suzuki, T., Sato, M. & Iba, H. Isolation and characterization of fra-2, an additional member of the fos gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 3619-23 (1990).
- Oehler, T. et al. Mutation of a phosphorylation site in the DNA-binding domain is required for redox-independent transactivation of AP1-dependent genes by v-Jun. *Oncogene* **8**, 1141-7 (1993).

- Oei, S.L. et al. Interaction of the transcription factor YY1 with human poly(ADP-ribosyl) transferase. *Biochem Biophys Res Commun* **240**, 108-11 (1997).
- Oliver, F.J. et al. Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *Embo J* **18**, 4446-54 (1999).
- Pahl, H.L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **18**, 6853-66 (1999).
- Pandolfi, F. et al. Expression of cell adhesion molecules in human melanoma cell lines and their role in cytotoxicity mediated by tumor-infiltrating lymphocytes. *Cancer* **69**, 1165-73 (1992).
- Parakkal, P., Montagna, W. & Ellis, R.A. The skin of primates. XI. The skin of the white-browed gibbon (*Hylobates hoolock*). *Anat Rec* **143**, 169-77 (1962).
- Pieper, A.A. et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice are protected from streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3059-64 (1999a).
- Pieper, A.A., Verma, A., Zhang, J. & Snyder, S.H. Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends Pharmacol Sci* **20**, 171-81 (1999b).
- Plaza, S., Aumercier, M., Bailly, M., Dozier, C. & Saule, S. Involvement of poly (ADP-ribose)-polymerase in the Pax-6 gene regulation in neuroretina. *Oncogene* **18**, 1041-51 (1999).
- Pulverer, B.J., Kyriakis, J.M., Avruch, J., Nikolakaki, E. & Woodgett, J.R. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* **353**, 670-4 (1991).
- Purnell, M.R. & Whish, W.J. Novel inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase. *Biochem J* **185**, 775-7 (1980).
- Quintanilla, M., Brown, K., Ramsden, M. & Balmain, A. Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis. *Nature* **322**, 78-80 (1986).
- Radler-Pohl, A. et al. The activation and activity control of AP-1 (fos/jun). *Ann N Y Acad Sci* **684**, 127-48 (1993).
- Rawling, J.M. & Alvarez-Gonzalez, R. TFIIF, a basal eukaryotic transcription factor, is a substrate for poly(ADP-ribosylation). *Biochem J* **324 (Pt 1)**, 249-53 (1997).
- Regnier, C.H. et al. Identification and characterization of an IkappaB kinase. *Cell* **90**, 373-83 (1997).
- Robles, A.I. et al. Reduced skin tumor development in cyclin D1-deficient mice highlights the oncogenic ras pathway in vivo. *Genes Dev* **12**, 2469-74 (1998).
- Ruf, A., Mennissier de Murcia, J., de Murcia, G. & Schulz, G.E. Structure of the catalytic fragment of poly(AD-ribose) polymerase from chicken. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7481-5 (1996).
- Ruf, A., Rolli, V., de Murcia, G. & Schulz, G.E. The mechanism of the elongation and branching reaction of poly(ADP-ribose) polymerase as derived from crystal structures and mutagenesis. *J Mol Biol* **278**, 57-65 (1998).

- Saez, E. et al. c-fos is required for malignant progression of skin tumors. *Cell* **82**, 721-32 (1995).
- Sakurai, H., Chiba, H., Miyoshi, H., Sugita, T. & Toriumi, W. I κ B kinases phosphorylate NF- κ B p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *J Biol Chem* **274**, 30353-6 (1999).
- Scheidereit, C. Signal transduction. Docking I κ B kinases. *Nature* **395**, 225-6 (1998).
- Schutte, J., Minna, J.D. & Birrer, M.J. Deregulated expression of human c-jun transforms primary rat embryo cells in cooperation with an activated c-Ha-ras gene and transforms rat-1a cells as a single gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2257-61 (1989).
- Shall, S. & de Murcia, G. Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? *Mutat Res* **460**, 1-15 (2000).
- Shaulian, E. & Karin, M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* **4**, E131-6 (2002).
- Shelley, W.B. & Juhlin, L. The Langerhans cell: its origin, nature, and function. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* **58**, 7-22 (1978).
- Siebenlist, U., Franzoso, G. & Brown, K. Structure, regulation and function of NF- κ B. *Annu Rev Cell Biol* **10**, 405-55 (1994).
- Siebert, D., Marquardt, H., Friesel, H. & Hecker, E. Polycyclic aromatic hydrocarbons and possible metabolites: convertogenic activity in yeast and tumor initiating activity in mouse skin. *J Cancer Res Clin Oncol* **102**, 127-39 (1981).
- Simbulan-Rosenthal, C.M. et al. Chromosomal aberrations in PARP(-/-) mice: genome stabilization in immortalized cells by reintroduction of poly(ADP-ribose) polymerase cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13191-6 (1999a).
- Simbulan-Rosenthal, C.M. et al. Misregulation of gene expression in primary fibroblasts lacking poly(ADP-ribose) polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11274-9 (2000).
- Simbulan-Rosenthal, C.M. et al. The expression of poly(ADP-ribose) polymerase during differentiation-linked DNA replication reveals that it is a component of the multiprotein DNA replication complex. *Biochemistry* **35**, 11622-33 (1996).
- Simbulan-Rosenthal, C.M., Rosenthal, D.S., Iyer, S., Boulares, H. & Smulson, M.E. Involvement of PARP and poly(ADP-ribosylation) in the early stages of apoptosis and DNA replication. *Mol Cell Biochem* **193**, 137-48 (1999b).
- Skalitzky, D.J. et al. Tricyclic benzimidazoles as potent poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitors. *J Med Chem* **46**, 210-3 (2003).
- Slaga, T.J., DiGiovanni, J., Winberg, L.D. & Budunova, I.V. Skin carcinogenesis: characteristics, mechanisms, and prevention. *Prog Clin Biol Res* **391**, 1-20 (1995).
- Soldatenkov, V.A. et al. Transcriptional repression by binding of poly(ADP-ribose) polymerase to promoter sequences. *J Biol Chem* **277**, 665-70 (2002).
- Southan, G.J. & Szabo, C. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Curr Med Chem* **10**, 321-40 (2003).

- Stoler, A.B., Stenback, F. & Balmain, A. The conversion of mouse skin squamous cell carcinomas to spindle cell carcinomas is a recessive event. *J Cell Biol* **122**, 1103-17 (1993).
- Surh, Y. Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutat Res* **428**, 305-27 (1999).
- Suto, M.J., Turner, W.R., Arundel-Suto, C.M., Werbel, L.M. & Sebolt-Leopold, J.S. Dihydroisoquinolinones: the design and synthesis of a new series of potent inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Anticancer Drug Des* **6**, 107-17 (1991).
- Suzuki, H., Quesada, P., Farina, B. & Leone, E. In vitro poly(ADP-ribosyl)ation of seminal ribonuclease. *J Biol Chem* **261**, 6048-55 (1986).
- Szabo, C. & Dawson, V.L. Role of poly(ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia-reperfusion. *Trends Pharmacol Sci* **19**, 287-98 (1998a).
- Szabo, C. et al. Inhibition of poly (ADP-ribose) synthetase attenuates neutrophil recruitment and exerts antiinflammatory effects. *J Exp Med* **186**, 1041-9 (1997).
- Szabo, C. et al. Protection against peroxynitrite-induced fibroblast injury and arthritis development by inhibition of poly(ADP-ribose) synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3867-72 (1998b).
- Tanuma, S.I., Enomoto, T. & Yamada, M.A. Changes in the level of poly ADP-ribosylation during a cell cycle. *Exp Cell Res* **117**, 421-30 (1978).
- Tentori, L., Portarena, I. & Graziani, G. Potential clinical applications of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors. *Pharmacol Res* **45**, 73-85 (2002).
- Thanos, D. & Maniatis, T. NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell* **80**, 529-32 (1995).
- Trucco, C., Oliver, F.J., de Murcia, G. & Menissier-de Murcia, J. DNA repair defect in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient cell lines. *Nucleic Acids Res* **26**, 2644-9 (1998).
- Tulin, A. & Spradling, A. Chromatin loosening by poly(ADP)-ribose polymerase (PARP) at *Drosophila* puff loci. *Science* **299**, 560-2 (2003).
- Tulin, A., Stewart, D. & Spradling, A.C. The *Drosophila* heterochromatic gene encoding poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) is required to modulate chromatin structure during development. *Genes Dev* **16**, 2108-19 (2002).
- Ullrich, O., Diestel, A., Eyupoglu, I.Y. & Nitsch, R. Regulation of microglial expression of integrins by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Nat Cell Biol* **3**, 1035-42 (2001).
- Vandel, L. et al. Stepwise transformation of rat embryo fibroblasts: c-Jun, JunB, or JunD can cooperate with Ras for focus formation, but a c-Jun-containing heterodimer is required for immortalization. *Mol Cell Biol* **16**, 1881-8 (1996).
- Vermeulen, L., De Wilde, G., Notebaert, S., Vanden Berghe, W. & Haegeman, G. Regulation of the transcriptional activity of the nuclear factor-kappaB p65 subunit. *Biochem Pharmacol* **64**, 963-70 (2002).
- Virag, L. & Szabo, C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* **54**, 375-429 (2002).

- Vogt, P.K. The story of Jun. *Arch Biochem Biophys* **316**, 1-4 (1995).
- Vousden, K.H. Activation of the p53 tumor suppressor protein. *Biochim Biophys Acta* **1602**, 47-59 (2002).
- Wagner, E.F. AP-1--Introductory remarks. *Oncogene* **20**, 2334-5 (2001).
- Wahl, L.M. & Kleinman, H.K. Tumor-associated macrophages as targets for cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* **90**, 1583-4 (1998).
- Wang, Z.Q. et al. Mice lacking ADPRT and poly(ADP-ribose) polymerase-1 develop normally but are susceptible to skin disease. *Genes Dev* **9**, 509-20 (1995).
- Wesierska-Gadek, J. & Schmid, G. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 regulates the stability of the wild-type p53 protein. *Cell Mol Biol Lett* **6**, 117-40 (2001).
- Whitmarsh, A.J. & Davis, R.J. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med* **74**, 589-607 (1996).
- Young, M.R. et al. Transgenic mice demonstrate AP-1 (activator protein-1) transactivation is required for tumor promotion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9827-32 (1999).
- Yu, S.W., Wang, H., Dawson, T.M. & Dawson, V.L. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 and apoptosis inducing factor in neurotoxicity. *Neurobiol Dis* **14**, 303-17 (2003).
- Yuspa, S.H. The pathogenesis of squamous cell cancer: lessons learned from studies of skin carcinogenesis--thirty-third G. H. A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res* **54**, 1178-89 (1994).
- Yuspa, S.H. & Poirier, M.C. Chemical carcinogenesis: from animal models to molecular models in one decade. *Adv Cancer Res* **50**, 25-70 (1988).
- Zingarelli, B. et al. Activator protein-1 signalling pathway and apoptosis are modulated by poly(ADP-ribose) polymerase-1 in experimental colitis. *Immunology* **113**, 509-17 (2004).
- Zoumpourlis, V. et al. High levels of phosphorylated c-Jun, Fra-1, Fra-2 and ATF-2 proteins correlate with malignant phenotypes in the multistage mouse skin carcinogenesis model. *Oncogene* **19**, 4011-21 (2000).

PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

1) Antecedentes. Numerosos estudios en modelos experimentales han puesto de manifiesto que el bloqueo genético o la inhibición farmacológica de PARP-1, proteína nuclear implicada en fenómenos de señalización celular a través de modificaciones post-traduccionales mediante poli-ADP-ribosilación, confiere protección frente procesos citolíticos derivados que tienen lugar durante el desarrollo de la respuesta inflamatoria. Un denominador común en todos los procesos inflamatorios es la secreción de diversos mediadores pro-inflamatorios y la formación de radicales libres que van a desencadenar la activación de PARP-1 y simultáneamente, potenciando la activación de diversos factores de transcripción como NF- κ B y AP-1, dar lugar a la expresión de genes dependientes de éstos. Por otro lado, es bien conocido que la inflamación en el cáncer, como proceso de estrés oxidativo continuo, actúa como un fuerte promotor tumoral favoreciendo el desarrollo del tumor. En este sentido, el modelo murino de inducción química de la carcinogénesis epitelial supone una herramienta muy útil para el estudio del papel de PARP-1 y de la inflamación en el proceso de tumorigénesis.

2) Hipótesis. Mediante este trabajo se pretende demostrar la hipótesis que formulamos a continuación:

La proteína PARP-1 participa en la modulación del proceso de carcinogénesis epidérmica a través de la regulación de la actividad transcripcional de las células que componen los epitelios.

3) Objetivos. Para verificar la hipótesis anterior nos propusimos los objetivos que hemos estructurado por capítulos en la forma siguiente:

Capítulo I:

1. Estudiar comparativamente la susceptibilidad a la carcinogénesis epidérmica inducida mediante protocolo de tratamiento químico de inducción/promoción (DMBA/TPA) en los ratones genéticamente deficientes en *parp-1* frente a los ratones de tipo parental.

2. Analizar histológicamente la piel al final del proceso de carcinogénesis tratando de identificar diferencias proliferativas e inflamatorias relacionadas con la presencia/ausencia de PARP-1.
3. Examinar a nivel molecular la activación del factor de transcripción NF- κ B y la expresión de genes dependientes de este factor en la epidermis de ratón durante las etapas tempranas de promoción tumoral en ausencia de PARP-1.
4. Estudiar la actividad proliferativa y la muerte celular por apoptosis en la epidermis de los ratones deficientes en PARP-1 durante las etapas tempranas de promoción tumoral.

Capítulo II:

5. Comprobar la actividad del 3,4-dihidro-5-[4-(1-piperidinil)butoxi]-1(2H)-isoquinolinona (DPQ), inhibidor de la actividad enzimática de PARP, como molécula capaz de interferir en el desarrollo tumoral.
6. Realizar el estudio histológico de la piel de los ratones al término del proceso experimental de inducción de cáncer para detectar diferencias, si las hubiere, en proliferación, apoptosis e inflamación en condiciones de inhibición farmacológica de PARP-1 respecto a las observadas en experimentos de control.
7. Analizar la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1 en la epidermis de ratón durante las etapas tempranas de promoción tumoral en condiciones de inhibición farmacológica de PARP-1.
8. Constatar en la piel de ratón el efecto inhibitorio del DPQ sobre la capacidad de poli (ADP) ribosilación de PARP.

Capítulo III:

9. Valorar la expresión génica diferencial durante la promoción tumoral en condiciones de delección genética de *parp-1* e inhibiendo la actividad enzimática de PARP-1.
10. Identificar genes dependientes de PARP-1 en respuesta a la carcinogénesis epitelial.

CAPÍTULO I

RESISTENCIA A LA CARCINOGENÉISIS EPIDÉRMICA EN RATONES PARP-1 *KNOCKOUT* DEBIDO A UNA ACTIVACIÓN DEFICIENTE DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF- κ B

1.1 RESUMEN

En el presente capítulo se recogen los datos referentes a susceptibilidad frente a carcinogénesis inducida, mediante protocolo químico basado en la administración de DMBA más TPA, en la piel de ratones genéticamente deficientes en poli (ADP-ribosa)polimerasa-1 (PARP-1).

En los ratones *parp-1*^{-/-} la aparición y desarrollo de tumores de piel tipo papilomas mediante iniciación con DMBA y promoción con TPA, ha resultado retrasada en el tiempo respecto a los ratones de tipo salvaje y tanto el número de tumores desarrollados por ratón (multiplicidad) como el porcentaje total de ratones que desarrollaron tumores (incidencia), fue significativamente menor en los ratones genéticamente deficientes en PARP-1.

En ratones normales las etapas tempranas de promoción tumoral se caracterizan por hiperproliferación de queratinocitos e inflamación. En cambio, la epidermis de ratones *parp-1*^{-/-} no muestran incremento del índice de proliferación o inflamación. En nuestro estudio hemos observado cambios en la activación del factor de transcripción NF- κ B junto con la liberación temprana de mediadores pro-inflamatorios, TNF- α e IL-1 β , citoquinas que han sido descritas como marcadores de tumorigénesis. Nuestros resultados demuestran que durante la promoción tumoral, y en ausencia de PARP-1, no tiene lugar la activación de NF- κ B con la consecuente falta de inducción de los genes regulados por dicho factor de transcripción. Más aún, el estudio histológico de los papilomas de los ratones PARP-1 knockout muestra una disminución de los marcadores inflamatorios cuando se comparaban con los de tipo parental. En consonancia con el importante papel de NF- κ B en promoción/progresión tumoral, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el retraso temporal en el desarrollo de tumores y la parcial inhibición en su multiplicidad puede ser debida a que la ausencia de PARP-1 dificulta la activación de NF- κ B y la expresión de los genes necesarios para la promoción/progresión tumoral que resultan regulados por este factor de transcripción.

1.2 INTRODUCCIÓN

Poli (ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1) es una proteína nuclear que detecta específicamente roturas de cadena simple en el DNA generadas por diferentes agentes genotóxicos (D'Amours y col., 1999; de Murcia y Menissier-de Murcia, 1994) tal como se ha descrito anteriormente en el apartado 4 de la Introducción General. PARP-1 se asocia *in vivo* con XRCC1, una proteína de reparación de DNA, que junto con la DNA polimerasa β y la DNA ligasa III están implicadas en la reparación por escisión de base (Masson y col., 1998). Los ratones *parp-1*^{-/-} son extremadamente sensibles a los agentes genotóxicos presentando alta inestabilidad genómica al tratamiento con agentes alquilantes o irradiación- γ (Menissier-de Murcia y col., 1997; Samper y col., 2001).

Estudios realizados en ratones deficientes en p53 demuestran que la ausencia de PARP-1 provoca una disminución en la aparición espontánea de tumores, principalmente por un mecanismo dependiente de la inhibición del estrés oxidativo (Conde y col., 2001). Por otro lado, trabajos de nuestro grupo de investigación, junto a otros, han descrito una nueva función para la proteína PARP-1 como co-activador transcripcional del factor de transcripción NF- κ B (Oliver y col., 1999; Hassa y Hottiger, 1999; Hassa y col., 2001). Además, estos autores demuestran en sus trabajos que los fibroblastos embrionarios inmortalizados procedentes de ratones PARP-1 knockout son menos sensibles al estrés inflamatorio debido a deficiente liberación de mediadores pro-inflamatorios regulados transcripcionalmente por NF- κ B.

El factor de transcripción NF- κ B regula la transcripción de una gran variedad de genes celulares y virales. NF- κ B está compuesto de homo- o heterodímeros de una familia de proteínas que engloban a p50, p52, p65, Rel B y c-Rel (May y Ghosh, 1997; Hassa y Hottiger, 2002). El prototipo de NF- κ B se compone del heterodímero p65/p50 que tras el estímulo adecuado se libera del inhibidor I κ B que lo mantiene en el citosol y se transloca al núcleo uniéndose a las secuencias κ B de los promotores de genes inducibles por NF- κ B (Hassa y Hottiger, 2002).

Cada vez son más los trabajos de investigación que relacionan a las familias de proteínas de NF- κ B e I κ B con los procesos de carcinogénesis (Bharti y Aggarwal, 2002; Gilmore y col., 2002). NF- κ B controla la expresión de genes para factores de crecimiento, oncogenes, genes supresores de tumores, genes que codifican para proteínas de adhesión celular y proteasas de la matriz extracelular (Pahl, 1999). Por todo ello, NF- κ B puede jugar un papel crítico en carcinogénesis a través de la disrupción o alteración del crecimiento y de la adhesión celular.

Como primera aproximación para elucidar el papel de la interacción entre PARP-1 y NF- κ B en carcinogénesis, se ha estudiado el desarrollo de tumores tipo papiloma en ratones PARP-1 knockout mediante un protocolo químico de carcinogénesis basado en la administración de DMBA (7,12-dimethylbenz[a]-anthracene) + TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate), y su relación con la activación de NF- κ B y la respuesta inflamatoria producida en las etapas iniciales de carcinogénesis. Los resultados muestran de una forma clara la idea de que la proteína PARP-1 es un importante regulador de la carcinogénesis epidérmica debido, en parte, a la capacidad de modular a través de NF- κ B la respuesta inflamatoria.

1.3 MATERIALES Y MÉTODOS

1.3.1 Ratones y protocolo de inducción tumoral.

Ratones *parp-1^{-/-}* y *parp-1^{+/+}* de fondo genético C57BL/6 fueron generados por recombinación homóloga en el laboratorio de Gilbert de Murcia (Menissier-de Murcia y col., 1997). Para la inducción tumoral, se utilizaron ratones de entre 6-8 semanas de edad que fueron iniciados con una única dosis de DMBA (Sigma) disuelto en acetona (25 µg/100 µl) aplicada en la parte dorsal del animal afeitada dos días antes. La promoción tumoral se consiguió con la aplicación de TPA (12 µg en 200 µl de acetona; Sigma) dos veces por semana y durante 25 semanas, comenzando dicha pincelación una semana después de la aplicación del iniciador tumoral. Simultáneamente animales controles fueron tratados en paralelo con sólo acetona. Para efectuar el tratamiento anteriormente descrito se utilizaron un total de 42 ratones: 2 por cada genotipo utilizados como controles; 24 ratones *parp-1^{+/+}* y 14 ratones *parp-1^{-/-}* tratados con DMBA más TPA. Al igual que otros trabajos de inducción tumoral destinados a diagnosticar diferencias de susceptibilidad tumoral, se llevó a cabo un recuento semanal del número de tumores desarrollados (Weinberg y col., 1999; Moore y col., 1999).

1.3.2 Genotipaje de los ratones.

Los ratones *parp-1^{-/-}* y *parp-1^{+/+}* de fondo genético C57BL/6 utilizados en el proceso de carcinogénesis fueron genotipados siguiendo un protocolo previamente descrito (véase página web http://parplink.u-strasbg.fr/protocols/tools/parp1_typing.html). Como fuente de ADN se utilizaron biopsias de cola de ratón. Para la obtención de las biopsias, se anestesiaron las colas por su extremo con cloruro de etilo, y se diseccionó parte de ella con la ayuda de un bisturí. El material obtenido fue homogenizado mecánicamente con la ayuda de un mortero triturador y posteriormente disgregado con un cóctel enzimático (0.002 mg de pronasa, Sigma, 0.003 mg de colagenasa, Sigma, 0.002 mg de DN-asa, Sigma, todo ello resuspendido en un volumen final de 20 ml de DMEM, Sigma, conteniendo un 2 % de FBS, Invitrogen) durante 24 horas

en agitación en un incubador a 37 °C. Al día siguiente, se centrifugaron las muestras a 3000 r.p.m. durante 10 minutos, se lavaron en PBS y se añadió sobre el precipitado resultante 200 µl de TE más 2 ml de tampón de lisis (10 mM Tris pH=8, Bio-Rad; 0.1 M EDTA pH=8, Sigma; 20 µg/ml RN-asa, Sigma; 0.5 % SDS, Sigma). Se incubó la mezcla a 37 °C durante una hora, y a continuación se añadió a cada tubo proteinasa K (Sigma) a una concentración final de 100 µg/ml. Se dejó a temperatura ambiente en agitación durante toda la noche, y al día siguiente se realizó la extracción del ADN mediante la adición de un volumen igual (aproximadamente 2.5 ml) de la mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (Sigma). La mezcla resultante se agitó vigorosamente durante diez minutos, tras lo cual se centrifugó de nuevo (3500 r.p.m. durante 10 minutos) para extraer la fase superior. Se añadió a continuación 0.1 volúmenes (aproximadamente 200 µl) de acetato sódico 3 M (Sigma) y 2 volúmenes (4 ml) de etanol absoluto frío, luego se agitó suavemente la mezcla para la precipitación del ADN y se centrifugó (3000 r.p.m. durante 10 minutos). Posteriormente, el precipitado se lavó con etanol al 70 % y, eliminado el líquido de lavado, se resuspendió en 200 µl de TE. Una vez extraído el ADN se llevó a cabo su purificación utilizando el *QIAampâ DNA Purification Mini Kit* (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones aportadas por el fabricante. La concentración de ADN se calculó sabiendo que una unidad de absorbancia medida a 260 nm equivale a 50 µg/ml de muestra. También se obtuvo la relación entre absorbancia a 260 nm y absorbancia a 280 nm (ABS_{260}/ABS_{280}) para determinar el grado de pureza de las muestras.

Mediante la *Reacción en Cadena de la Polimerasa* (PCR) se pudo validar que los ratones utilizados para el experimento de carcinogénesis obedecían al genotipo con el cual estaban clasificados y estabulados. De este modo se comprobó que los ratones *parp-1^{-/-}* eran homocigotos para los alelos "bloqueados o interrumpidos" del gen que codifica para la proteína PARP-1, usando las parejas de cebadores descritas en http://parplink.u-strasbg.fr/protocols/tools/parp1_typing.html. Las PCR se realizaron en un termociclador Eppendorf Mastercycler (Eppendorf) teniendo en cuenta que para cada muestra a ensayar se añadía 3 µl de MgCl₂ 25 mM (Roche), 5 µl de tampón de PCR 10X (Roche), 1 µl de una mezcla de dNTP 10 mM (dATP, dTTP, dCTP y dGTP) (Roche), 0.5 µl de enzima Taq polimerasa *AmpliTaq GoldTM* (5 U/µl)

(Roche), cantidades de 0.5 μ M de cada uno de los cebadores tanto sentido como antisentido, 2.5 μ l de cada ADN y cantidad suficiente de agua hasta completar los 50 μ l de reacción. La PCR se llevó a cabo usando un programa térmico compuesto por una primera fase inicial de desnaturalización a 94 °C durante 2 minutos, seguido de una fase intermedia de 35 ciclos formada por una primera etapa de desnaturalización (94 °C durante 40 segundos), más una segunda etapa de hibridación a 61 °C durante 45 segundos y una etapa final de extensión a 73 °C durante 60 segundos, para acabar con una fase de extensión final durante 10 minutos a 73 °C. Los cebadores utilizados fueron sintetizados por el Servicio de Genómica del IPBLN (CSIC, Granada) de acuerdo a la secuencia descrita en la página web anteriormente mostrada. En cada PCR se utilizaron las siguientes combinaciones de cebadores: a) combinación del oligo (+) y oligo (+/-) para la amplificación del alelo salvaje y, b) oligos (-) más oligo (+/-), para la amplificación del alelo mutado. Los productos obtenidos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (Sigma) al 1 % (detección del alelo mutado, 700 pb) y al 2 % (detección del alelo salvaje, 200 pb) en TBE 1X conteniendo 0.5 μ g/ml de bromuro de etidio (Sigma) y visualizados con luz ultravioleta.

1.3.3 Medidas de proliferación y apoptosis.

Para medir proliferación celular en la piel de los ratones durante las etapas iniciales de promoción tumoral, se proporcionó a los ratones una inyección de bromodesoxiuridina (BrdU, análogo de la timidina) 24 horas después de la finalización de un tratamiento de una semana de duración consistente en una aplicación de DMBA (25 μ g) seguida de cuatro dosis de TPA (12 μ g/dosis) a lo largo de la semana (Moore y col., 1999). Se inyectó intraperitonealmente a cada animal BrdU (200 mg/kg peso animal de BrdU, Sigma, en 0.9% NaCl) y dos horas más tarde fueron sacrificados de acuerdo con los métodos de eutanasia del Servicio de Animalario del IPBLN (CSIC, Granada). A continuación, la piel tratada fue diseccionada y fijada en solución de Carnoy's, compuesta de cloroformo, ácido acético y etanol en proporciones de 3:1:6 respectivamente, a 4°C durante toda la noche, deshidratadas en concentraciones crecientes de alcohol y luego embebidas en parafina,

seccionadas a 4- μ m y marcadas para técnicas de inmunofluorescencia indirecta usando un anticuerpo monoclonal frente a BrdU (Sigma, clone BU-33) según protocolo (Wang y col., 1999; Greenhalgh y col., 1996). Para ello, los cortes histológicos adheridos sobre los portaobjetos fueron desparafinados mediante dos baños en xilol de 15 minutos cada uno, e hidratados en concentraciones decrecientes de alcohol hasta pasar por agua destilada. A continuación, se realizó un tratamiento para desnaturalizar el ADN, consistente en incubación de los cortes en HCl 4N durante 10 minutos, seguido de varios lavados en agua destilada y PBS tween al 0.1 %. Se permeabilizó el tejido en 0.2 % Tritón X-100 en PBS tween al 0.1 % durante 10 minutos, lavados en PBS tween al 0.1 %, seguido de una etapa de saturación de los sitios no específicos mediante incubación de los cortes en suero de cabra diluido en PBS tween 0.1 % (NGS 1:30; Sigma) durante 45 minutos y a temperatura ambiente. Posteriormente, se secaron los cortes y se incubaron durante toda la noche en una cámara húmeda y a 4°C con el anticuerpo primario anti-BrdU (obtenido en ratón) diluido 1:50 en PBS tween al 0.1 % conteniendo un 1 % de BSA (albúmina sérica bovina; Sigma) y un 5 % de NGS. Al día siguiente, se lavaron los cortes tres veces con PBS tween al 0.1 % y se incubaron a continuación una hora a temperatura ambiente, en oscuridad, con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) diluido 1:200 en PBS tween al 0.1 % conteniendo un 1 % de BSA y un 5 % de NGS. Se lavaron de nuevo los cortes tres veces con PBS tween al 0.1 % y finalmente se procedió a teñir los núcleos con Ioduro de Propidio (0.5-1 μ g/ml; Sigma) durante 10 minutos y en condiciones de oscuridad, seguido de lavados finales y del montaje final de las preparaciones utilizando cubreobjetos y una solución protectora de fluorescencia (Vectashield; Vector laboratorios). Para cuantificar el número de núcleos positivos para BrdU (células que proliferan) en las capas basales de la epidermis, varios campos por sección a aumentos de 400X tomados al azar fueron capturados y digitalizados con un microscopio confocal Leica TCS SP, calculándose de esta forma el porcentaje de núcleos basales BrdU-positivos en relación al número total de núcleos que constituye el estrato basal de la epidermis de ratón. Entre 5 y 8 secciones fueron analizadas por animal hasta completar para cada ratón un mínimo de 1000 núcleos totales

(Brantley y col., 2001). Se utilizaron tres ratones para cada condición de estudio (*parp-1^{+/+}* control, *parp-1^{+/+}* tratados, *parp-1^{-/-}* control y *parp-1^{-/-}* tratados).

Para detectar apoptosis en las etapas iniciales de promoción tumoral, una parte de las biopsias diseccionadas anteriormente fueron fijadas en formol tamponado al 10 % (v:v) a 4°C durante toda la noche. A continuación, fueron lavadas en PBS tween al 0.1 % e incubadas durante 24 horas a 4°C en PBS con Tritón X-100 al 2 %. La epidermis fue separada del resto de dermis y tejido muscular con la ayuda de material de disección y una lupa. Los extremos 3' del ADN fragmentado de las células epidérmicas fueron marcados usando una variedad comercial de la técnica TUNEL denominada *ApopTag® Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit* (Intergen) según las recomendaciones del fabricante. Para ello, se procedió a la realización de un pretratamiento de digestión enzimática de las biopsias con el fin de eliminar las proteínas de los núcleos celulares y hacerlas así más accesibles a la reacción. Esto se llevó a cabo utilizando Proteinasa K (20 µg/ml) en PBS durante 15 minutos y a Tª ambiente, seguido de dos lavados con PBS de 2 minutos cada uno. A continuación, se incubaron las muestras durante 15 minutos con una solución tampón y posteriormente en la solución de reacción que contenía la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) y nucleótidos trifosfatos de digoxigenina. Gracias a esta enzima, se produce la incorporación de nucleótidos de digoxigenina sobre los extremos OH-3' del ADN de cadena doble o simple (Gravielli y col., 1992; Schmitz y col., 1991). La reacción se detuvo trasladando las biopsias a un baño con solución de parada/lavado durante 15 minutos y a Tª ambiente. Posteriormente, se llevó a cabo la detección por métodos de inmunofluorescencia directa de la digoxigenina incorporada en la etapa anterior. Para ello, se utilizó una nueva solución de reacción que contenía solución bloqueadora y anticuerpos anti-digoxigenina marcados con FITC. Esta última incubación se realizó en oscuridad, durante 30 minutos y a Tª ambiente. Finalmente, se lavaron las preparaciones tres veces en PBS y se tiñeron los núcleos con Ioduro de Propidio (0.5-1 µg/ml) durante 10 minutos en oscuridad, seguido de lavados y montaje final utilizando portaobjetos, cubreobjetos y solución protectora de fluorescencia. Distintos campos aleatorios de la epidermis fueron visualizados a 200X y 400X mediante microscopía confocal. Fragmentos de piel derivadas de tres ratones distintos

fueron procesadas en la forma descrita con anterioridad para cada genotipo y condición (Labat-Moleur y col., 1998).

1.3.4 Medidas de unión de NF- κ B al ADN.

Para comprobar la trans-activación de NF- κ B al núcleo celular durante el proceso de promoción tumoral se han realizados experimentos de geles de retardo o EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*). Oligonucleótidos con la secuencia de unión para NF- κ B en el promotor del gen que codifica para iNOS (5'-TGCTAGGGGGATTTTCCCTCTTCTTGT-3'-sentido y 5'-ACAAGAAGAGG GAAAATCCCCCTAGCA-3'-antisentido) fueron marcados con [γ - 32 P] ATP utilizando la enzima polinucleótido quinasa T4 (Xie y col., 1994). Para ello, se preparó a 4°C la reacción de marcaje radiactivo para cada uno de los oligos, de tal modo que cada mezcla de reacción contuviese 1 μ l de oligo, 1 μ l de tampón de fosforilación 10X (Roche), 4.5 μ l de agua destilada, 2.5 μ l de [γ - 32 P] ATP y 1 μ l de la enzima polinucleótido quinasa (10 U/ μ l; Roche). A continuación, las muestras se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Al final de este tiempo, se añadió a una de las muestras 90 μ l de agua destilada y se mezcló con el contenido de la otra. Se calentó la mezcla a 65°C durante 10 minutos, y se dejó enfriar a T^a ambiente durante 2 horas para lograr la hibridación de los oligos marcados. El resultado de esta reacción constituye la sonda marcada. Para extraer y purificar la sonda, se añadió ésta a una columna de Sephadex G25 (Amersham), la cual se centrifugó a 2.500 r.p.m. durante 3 minutos. Un microlitro del eluyente resultante (sonda marcada) fue introducido en viales de centelleos conteniendo 2 ml de solución de centelleo (Ecoscint™ H) para la medida del índice de radioactividad de la muestra, utilizando para ello un contador de centelleo líquido LKB 1209 RackBeta.

Extractos nucleares de epidermis de ratones controles y tratados (igual que en el apartado 1.2.3) fueron obtenidos de acuerdo con trabajos anteriores (Velasco y col., 1997). 180 μ g de proteínas de los extractos nucleares se incubaron con 2 μ l de sonda 32 P-radiactiva (6 X 10⁴ d.p.m.) en un volumen final de 20 μ l de reacción durante 15 minutos y a 4°C de temperatura (Oliver y col., 1999). Cada tubo de reacción contenía los siguientes componentes: 5 μ l de tampón de ensayo 4X (20 % glicerol, 4 mM EDTA, 0.4 M KCl, 20 mM MgCl₂, 40

mM Tris-HCl pH=7.8 y 4 mM DTT adicionado extemporaneamente), 1 µg de BSA, 1 µg de poli (dl-dC) (Roche), proteínas de los extractos nucleares, 60.000 d.p.m. de sonda marcada, completando con agua destilada hasta un volumen final de 20 µl. Los complejos DNA-proteína (DNA-NF-κB) fueron separados en un gel de poli(acrilamida no desnaturizante al 5% en 0.5X de tampón EDTA Tris-borato (1,65 ml bis/acrilamida 29:1 al 30 %, Bio-rad; 1 ml de glicerol, Sigma; 50 µl de persulfato amónico al 10%, Bio-rad; 48 µl TEMED, Bio-rad; 7,252 ml de tampón EDTA Tris-borato 0.5X) durante 2 horas a un voltaje constante de 100 voltios en hielo. A continuación fueron secados y visualizados por impresión en placas fotográficas tras una exposición de 24 horas. Un experimento de competición usando un exceso de diez veces de la sonda no marcada (sonda fría) con respecto a la sonda ³²P-radiactiva fue llevado a cabo para comprobar que la señales obtenidas anteriormente eran específicas.

1.3.5 Obtención de los extractos nucleares.

Las biopsia de piel de ratón conservadas a -80°C fueron disgregadas en 5 ml de PBS de una forma mecánica utilizando para ello portaobjetos esmerilados. A continuación, el disgregado obtenido fue centrifugado a 2.500 r.p.m. a 4°C durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y el precipitado obtenido fue resuspendido en 200 µl de tampón A (10 mM HEPES, pH = 7.9, Sigma; 1 mM EDTA, Merck; 1 mM EGTA, Sigma; 10 mM KCl, Merck; y de forma extemporánea 1 mM DTT, Sigma; 1 mM PMSF, Sigma; y cóctel de inhibidores de proteasas, Roche, de tal forma que una tableta era añadida a un volumen de 10 ml de tampón) sobre hielo. A continuación, se utilizó un homogenizador o *dounzer* (Áfora) para romper las membranas plasmáticas de los disgregados, dando 15 pulsos de homogenización en hielo, al final del cual se recuperó el homogenizado. A este homogenizado se le añadió el detergente Igepal (Sigma) a una concentración final del 0.5 %, luego se agitó vigorosamente la mezcla durante 15 segundos, tras lo cual, se incubó sobre hielo durante 10 minutos. A continuación, los tubos fueron centrifugados a 13.000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante correspondió a la fracción citosólica, el cual se guardó a -80°C, mientras el precipitado se resuspendió en 50 µl de tampón A conteniendo 20 % de glicerol y 0.4 M de

KCl. La fracción resuspendida fue mezclada en un agitador orbital-vertical durante 30 minutos en cámara fría. Por último, la mezcla se centrifugó a 13.000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido de esta forma corresponde a la fracción nuclear de proteínas (Velasco y col., 1997).

1.3.6 Determinación de las concentraciones de proteínas de los extractos nucleares.

La concentración de proteínas en los extractos nucleares anteriormente obtenidos se midió mediante la reacción colorimétrica de Bradford. Para ello, se realizó una curva patrón de concentración crecientes de BSA (Sigma), desde 1 mg/ml hasta 10 mg/ml. 1 µl de extracto nuclear se añadió a 200 µl de solución Bradford 1X (Bio-Rad) por triplicado. La densidad óptica resultante se midió a 596 nm en un detector de ELISA (Molecular Devices). Para cada condición, la densidad óptica obtenida fue extrapolada respecto a las concentraciones proporcionadas por la curva patrón. De este modo, se obtuvo la concentración de los distintos extractos nucleares.

1.3.7 Expresión de genes regulados por NF-κB (TNF-α, IL-1β, MnSOD y TRAIL) mediante RT-PCR.

DMBA y TPA fueron aplicados a los ratones de igual forma a la descrita en el apartado 1.2.3. 24 horas después de la última aplicación de TPA se diseccionó la piel y se conservó en N₂ líquido hasta el momento de la extracción del ARN. El ARN total fue aislado utilizando el método de extracción basado en Trizol (Gibco) y la expresión de varios genes (TNF-α, IL-1β, MnSOD y TRAIL) regulados por NF-κB fue determinada de forma semi-cuantitativa mediante RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*). Para cada reacción de transcripción inversa o retro-transcripción se tomaron sobre hielo 2 µg de ARN total en un volumen final de reacción de 20 µl conteniendo 2 µl de MgCl₂ 50 mM (GeneCraft), 2 µl de tampón de PCR 10X (GeneCraft), 2 µl de una mezcla de dNTP (10 mM de dATP, dTTP, dCTP y dGTP) (Roche), 1 µl de inhibidores de ARNasas *rRNasin*® (39 U/µl) (Promega), 1 µl de oligo d(T)₁₆ (50 µM) (Roche), 1 µl de transcriptasa reversa M-MLV (200 U/µl) (Invitrogen) y

agua-DEPC al 0.1 % hasta completar los 20 μ l de reacción. El agua-DEPC se preparó añadiendo a un litro de agua destilada 1 ml de DEPC (Sigma), se dejó toda la noche en agitación suave y posteriormente se autoclavó antes de su uso. La transcripción reversa se llevó a cabo usando un programa térmico de 25°C durante 10 minutos (fase de incubación), 42°C durante 45 minutos (fase de transcripción reversa), 99°C durante 5 minutos (fase de desnaturalización) y refrigeración a 4°C. Posteriormente, a partir del ADN complementario (cDNA) resultante de la reacción de transcripción inversa se llevó a cabo la reacción de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). 2.5 μ l de ADN complementario de cada una de las muestras fueron tomados para la realización de la PCR, en un volumen final de reacción de 50 μ l. Para la realización de la mezcla de reactivos de la PCR se tuvo en cuenta que por cada muestra a ensayar se añadía 3 μ l de $MgCl_2$ 25 mM (Roche), 5 μ l de tampón de PCR 10X (Roche), 1 μ l de una mezcla de dNTP 10 mM (dATP, dTTP, dCTP y dGTP) (Roche), 0.5 μ l de enzima Taq polimerasa *AmpliTaQ GoldTM* (5 U/ μ l) (Roche), cantidades de 0.5 μ M de cada uno de los cebadores tanto sentido como antisentido y cantidad suficiente de agua hasta completar los 50 μ l de reacción. La mezcla se agitó vigorosamente, se le dio un pulso a máxima revolución y se repartió la cantidad de 47.5 μ l en tubos de PCR independientes para la posterior adición de 2.5 μ l de ADN complementario a ensayar. Las condiciones de PCR para la amplificación de los distintos genes fue de 35 ciclos de desnaturalización, hibridación y extensión (95°C x 1 min; 58°C para TNF-a, MnSOD, TRAIL y 50°C para IL-1 β x 1 min; 72°C x 1 min). Los resultados fueron obtenidos mediante la realización de tres experimentos independientes. Los cebadores usados fueron: 5'-CCTGTAGCCCACGTCGTAGC-3' (sentido) y 5'-GTTGAGTCGCGACTCCAGTT-3' (antisentido) para TNF-a; 5'-AAGGAGAACAAGCAACGAC-3' (sentido) y 5'-ACTCGTCTGTCGAGTTAGAG-3' (antisentido) para IL-1 β ; 5'-GACCTGCCTTACGACTATGG-3' (sentido) y 5'-GACCTTGCTCCTTATTGAAGC-3' (antisentido) para MnSOD; 5'-TCACCAACGAGATGAAGCAGC-3' (sentido) y 5'-CTCACCTTGTCCTTTGAGACC-3' (antisentido) para TRAIL (Tucker y Sack, 2001; Liu y col., 2000; Musgrave y col., 1999). La expresión de α -tubulina fue usada como control interno (5'-GACAGTGTGGCAACCAGATCG-3'-sentido y 5'-GTACGGAAGCAGATGTCGTAG-3'-antisentido; T^a hibridación = 66°C). Los productos de la RT-PCR

fueron separados en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/ml), digitalizados y los distintos niveles de expresión respecto al control fueron determinados por densitometría óptica convencional utilizando el software de análisis de imagen Leica Qwin®. Los tamaños de los amplicones en pares de bases (pb) resultante de las distintas reacciones de PCR fueron los siguientes: 374 pb para TNF- α ; 381 pb para IL-1 β ; 513 pb para TRAIL; 385 pb para MnSOD y 600 pb para α -tubulina (Tucker y Sack, 2001; Liu y col., 2000; Musgrave y col., 1999).

1.3.8 Extracción y cuantificación del ARN para los ensayos de RT-PCR.

Las biopsias de pieles de ratón (aproximadamente 1 cm²) provenientes de su conservación en N₂ líquido se introducen en un mortero-triturador preparado específicamente para la disgregación de material biológico. El material resultante de la disgregación mecánica se introduce en un tubo eppendorf de 1.5 ml tratado con DEPC (Sigma) conteniendo 1 ml de Trizol (Gibco) a T^a ambiente durante 5 minutos, mezclándose cuidadosamente el contenido con la ayuda de una pipeta. A continuación, se adiciona 200 µl de cloroformo (Merck) a la mezcla, tras lo cual se agita vigorosamente durante 15 segundos, y se deja incubar a T^a ambiente durante 3 minutos. Luego, se centrifuga la mezcla a 13.000 r.p.m. durante 15 minutos en frío. Cuidadosamente y con la ayuda de una micropipeta se recoge la fase acuosa y se pasa a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml tratado con DEPC. Se le añade a continuación 0.5 ml de isopropanol (Sigma), se incuba a T^a ambiente durante 10 minutos y se centrifuga de nuevo la mezcla a 13.000 r.p.m. durante 10 minutos en frío. La fase acuosa es eliminada y el precipitado se lava con 1 ml de etanol (Merck) al 75 % en agua DEPC. Para efectuar el lavado, se agita vigorosamente la mezcla y se centrifuga por última vez a 7.500 r.p.m. durante 5 minutos en frío. Se elimina de nuevo la fase acuosa y el precipitado que constituye el ARN se deja secar a T^a ambiente durante 5-10 minutos. Por último, se resuspende el precipitado en 20 µl de agua-DEPC pipeteando varias veces, se agita, y se calienta hasta 55-60°C durante 10 minutos para favorecer dicho proceso. A continuación, de cada muestra se recogen 0.5 µl de ARN (dilución 1:200) para su cuantificación en el espectrofotómetro (Eppendorf). El

resto, se conserva a -80°C hasta su utilización. La concentración de ARN se calculó sabiendo que una unidad de absorbancia medida a 260 nm equivale a 40 $\mu\text{g/ml}$ de muestra. También se obtuvo la relación entre absorbancia a 260 nm y absorbancia a 280 nm ($\text{ABS}_{260}/\text{ABS}_{280}$) para determinar el grado de pureza de las muestras.

1.3.9 Estudio histológico de las pieles de ratón.

Fragmentos de pieles con o sin lesiones y procedentes de ratones *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* tratados con DMBA/TPA durante 25 semanas, y pieles sin lesiones controles fueron diseccionadas, fijadas en formaldehído (Panreac) al 4% tamponado a $\text{pH}=7$, deshidratadas en concentraciones crecientes de etanol (Merck), lavadas en xilol (Merck), embebidas en parafina, seccionadas en un microtomo Leica a $4\text{-}\mu\text{m}$ y teñidas con colorantes de hematoxilina y eosina (H&E) o con la reacción de PAS (*Periodic Acid Schiff*). Se contabilizaron por aspectos morfológicos el número de mitosis y apoptosis en diez campos distintos por ratón, tomados al azar y utilizando para ello un microscopio Olympus BH2 a aumentos de 600X en pieles tanto tratadas (con papilomas y sin ellos) como pieles controles. También se contabilizaron el número de mastocitos por mm^2 en diez campos distintos, a aumentos de 400X, en las pieles tratadas en zonas con lesión y en los controles. La presencia de hiperplasia epitelial e infiltrado inflamatorio fue también evaluada y expresada en porcentajes respecto del control.

1.3.10 Análisis estadístico.

Para el estudio de independencia de variables con distribución no normal, como fue el análisis de las diferencias de incidencia y multiplicidad tumoral, en una población de ratones con distintos genotipos a lo largo del proceso de promoción tumoral (figura I-1A y I-1B) se ha utilizado el test de Mann-Whitney. En cambio, para el resto de análisis realizados se ha aplicado un test *t* de Student, considerándose diferencias significativas todas aquellas en las que se obtenían valores de $P < 0.05$.

1.4 RESULTADOS

1.4.1 Genotipaje de los ratones *parp-1*^{+/+} y *parp-1*^{-/-} mediante PCR.

Previo al experimento de carcinogénesis fue la comprobación del genotipo de los ratones. Éste se realizó a partir de ADN, procedente de cola de ratón, mediante análisis por PCR, utilizando para ello cebadores específicos para cada alelo (salvaje y mutado). Para validar los resultados del genotipaje se debe de conseguir, en cada caso, los fragmentos de amplificación expuestos a continuación: la combinación de cebadores oligo (+) y oligo (+/-) amplifica en los ratones *parp-1*^{+/+} una sólo banda de 200 pb de tamaño correspondiente al alelo salvaje, mientras en los ratones *parp-1*^{-/-} no debe de apreciarse ninguna banda con el uso de los anteriores cebadores; en cambio, la combinación de cebadores oligo (-) más oligo (+/-) amplifica en los *parp-1*^{-/-} únicamente un fragmento de 700 pb correspondiente al alelo mutado, mientras los ratones *parp-1*^{+/+} no deben de mostrar ninguna banda con estos cebadores. De acuerdo con lo anterior, en el panel superior de la figura I-1 (combinación de cebadores oligo (+) y oligo (+/-)) se muestra un ejemplo del fragmento de 200 pb resultado de la amplificación de ADN procedente de ratones *parp-1*^{+/+} (números del 1 al 4), en cambio, el ADN procedente de ratones *parp-1*^{-/-} no muestra amplificación alguna (números del 5 al 11). De igual modo, el panel inferior de la figura I-1 (combinación de cebadores oligo (-) y oligo (+/-)) muestra un ejemplo del fragmento de 700 pb resultado de la amplificación de ADN procedente de ratones *parp-1*^{-/-} (números del 5 al 11), en cambio, el ADN procedente de ratones *parp-1*^{+/+} no muestra banda alguna (números del 1 al 4).

1.4.2 Resistencia y retraso temporal a la carcinogénesis epidérmica en los ratones *parp-1*^{-/-}.

Ratones de fondo genético C57BL/6 fueron iniciados con una única dosis del carcinógeno químico DMBA, y una semana más tarde se les aplicó periódicamente el promotor tumoral TPA dos veces por semana, tal y como se describe en el apartado 1.2.1 de este capítulo. El primer papiloma visualizado se desarrolló en los ratones de tipo parental a la 8ª semana del tratamiento,

mientras, los ratones *parp-1*^{-/-} desarrollaron el primer papiloma a la 12^a semana, es decir, cuatro semanas después que los ratones *parp-1*^{+/+} (fig. I-2). En cada grupo el porcentaje final de ratones que desarrollaban tumores al final del tratamiento fue del 58.3% (N=24) para los *parp-1*^{+/+} y del 28.6% (N=14) para los *parp-1*^{-/-} (tabla I-1). Estas diferencias de incidencia tumoral entre los dos grupos resultaron ser estadísticamente significativas ($P < 0.05$) (fig. I-2A). Ningún ratón de los utilizados como situación control desarrolló tumores. En la figura I-2B se muestra gráficamente el número medio de tumores desarrollados por ratón en cada grupo a lo largo del proceso de promoción tumoral. Nótese como el periodo de latencia tumoral, definido como el número de semanas necesarias para que al menos se desarrolle como término medio un tumor por ratón, fue de aproximadamente 11.5 semanas para los ratones *parp-1*^{+/+} mientras que los ratones *parp-1*^{-/-} en ningún momento alcanzó esta cifra de desarrollo de tumores durante el periodo experimental de carcinogénesis. Las diferencias de multiplicidad tumoral obtenidas entre estos dos grupos a lo largo del proceso de carcinogénesis resultaron ser también estadísticamente significativas ($P < 0.05$). La figura I-2C muestra las diferencias entre estos dos grupos en cuanto número, morfología y tamaño de los tumores desarrollados en etapas intermedias del proceso de promoción tumoral. Se puede observar la morfología tubular del único tumor incipiente desarrollado en uno de los ratones *parp-1*^{-/-}, en cambio, los tumores desarrollados por los ratones parentales muestran ya una morfología papilomatosa a este tiempo de promoción tumoral. Los resultados obtenidos indican que la aparición de tumores tras tratamiento de carcinogénesis química epitelial en los ratones deficientes en la proteína PARP-1 suele retrasarse considerablemente en el tiempo respecto a los ratones de tipo parental, y además, que tanto el número final de tumores desarrollados por ratón, así como el porcentaje total de ratones que desarrollaron tumores disminuye significativamente en los ratones genéticamente deficientes en PARP-1, mostrándose así una parcial resistencia al desarrollo de tumores en ausencia de la proteína PARP-1.

1.4.3 Fenómenos de hiperplasia epitelial en el área tratada.

Con el fin de analizar fenómenos de hiperplasia epitelial como fenómeno previo al desarrollo de los papilomas, se llevó a cabo un estudio histológico de las pieles tratadas según el protocolo de carcinogénesis descrito anteriormente, tanto en ratones PARP-1 knockout (N=12) como en ratones salvajes (N=8) en aquellas zonas de la piel que no habían desarrollado lesiones. El epitelio de la piel de los ratones *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* controles (N=2), en ambos casos, estaba compuesto solamente por dos o tres capas de células: una capa córnea de células muertas, un delgado estrato granuloso apenas perceptible, un estrato de células espinosas y una capa de células basales. El grosor epitelial en ambos controles resultó ser de aproximadamente 0.017-0,020 mm (tabla I-3). Todos los ratones analizados tratados con DMBA más TPA, tanto salvajes como PARP-1 knockout, desarrollaron hiperplasia epitelial, con un significativo engrosamiento irregular del epitelio (0.075 ± 0.007 mm y 0.097 ± 0.011 mm, respectivamente) ($P < 0.001$) y del estrato granuloso en particular (0.025 ± 0.002 mm en ambos casos) ($P < 0.001$) con respecto a los no tratados (tabla I-2) (fig I-3). Estos datos indican que los fenómenos de hiperplasia epitelial tras tratamiento de carcinogénesis y en ausencia de la proteína PARP-1 muestran una evolución igual a la esperada para los ratones de tipo parental.

1.4.4 Modulación genética de la respuesta inflamatoria.

La presencia de una menor respuesta inflamatoria en la piel lesionada de los ratones knockout con respecto a los de tipo parental tras el tratamiento de carcinogénesis se ha podido constatar, tanto al medir la presencia de polimorfonucleares neutrófilos (PMN, asociados a fenómenos de aparición de infiltrado inflamatorio), como al cuantificar cantidad de mastocitos presentes en zonas de la piel que desarrollan lesión. La presencia de infiltrado inflamatorio se detectó en 3 pieles de cada 4 estudiadas en los ratones *parp-1^{+/+}* (N=8), en cambio, sólo 1 de cada 2 pieles de ratones *parp-1^{-/-}* (N=4) mostraba infiltrado leucocitario (tabla I-2) (fig. I-4A). En ningún caso, en las pieles controles se detectó este fenómeno. Por otro lado, el número de mastocitos por mm² resultó estar significativamente disminuido en los ratones *parp-1^{-/-}* (123.8 ± 1.7 mm²)

en comparación con los parentales ($249.4 \pm 3.6 \text{ mm}^2$) ($P < 0.01$) (tabla I-2) (fig. I-4).

1.4.5 Recambio celular en tumores quimioinducidos.

Se realizó también un estudio histológico (ver apartado de técnicas histológicas en la sección de materiales y métodos correspondiente a este capítulo) comparativo del recambio celular que se llevaba a cabo en los papilomas resultantes del proceso de carcinogénesis en ambos grupos. El "turnover" o recambio celular en los tumores, medido como relación de células que proliferan y mueren, se encuentra claramente incrementado en los ratones *parp-1^{+/+}* (N=8) versus *parp-1^{-/-}* (N=4), con más mitosis (7.12 versus 3.17) y cuerpos apoptóticos (6.37 versus 1.42) ($P < 0.05$) (tabla I-2) (fig. I-5).

1.4.6 Proliferación celular en los tumores experimentales.

De igual modo que en el apartado anterior, se realizó un estudio histológico comparativo del estado proliferativo y de muerte celular por apoptosis en la epidermis de ratón, pero utilizando para ello, en este caso, fragmentos de piel que no hubiesen desarrollado lesión tras tratamiento. Se pudo comprobar de este modo, que la epidermis de ratones tratados *parp-1^{+/+}* (N=8) mostraban un número considerablemente mayor de divisiones celulares (5.12 ± 0.40) en comparación con la epidermis de ratones tratados *parp-1^{-/-}* (N=12) (1.75 ± 0.49) y los respectivos controles (N=2) (1.25 ± 0.31 y 1.12 ± 0.35) ($P < 0.001$) (tabla I-2). En cuanto a los eventos de muerte celular, en condiciones control este fenómeno apenas tenía relevancia (0.12 ± 0.12), en cambio, el tratamiento con DMBA/TPA aumenta significativamente, indistintamente del genotipo, este fenómeno ($P < 0.05$) (tabla I-2) (fig. I-5). Estos resultados interpretados de forma conjunta, sugieren una menor tasa proliferativa para la epidermis de ratones deficientes en la proteína PARP-1 tras tratamiento con agentes químicos.

Una vez establecidas diferencias en cuanto a la susceptibilidad al desarrollo de tumores inducidos, así como en fenómenos de recambio celular, inflamación y tasa proliferativa al final del proceso de carcinogénesis en ausencia de la proteína PARP-1 se estudió qué cambios tanto a nivel celular como molecular se estaban produciendo en las etapas iniciales de promoción tumoral, etapa de gran importancia para el posterior desarrollo del tumor. Para ello, se llevó a cabo un protocolo de promoción tumoral de corta duración, consistente en la aplicación de una única dosis de DMBA (25 μ g) y cuatro dosis de TPA (12 μ g/dosis) durante una semana (Moore y col., 1999), según se describe en la sección de materiales y métodos correspondiente a este capítulo.

1.4.7 Proliferación celular en la fase inicial del desarrollo tumoral.

Al estudiar el estado proliferativo de la piel en los primeros eventos de carcinogénesis, sometiendo ésta a un tratamiento intensivo de una semana de duración tal como se describe en el apartado de materiales y métodos de este capítulo, se pudo comprobar que los queratinocitos de la epidermis de los ratones knockout proliferaban significativamente menos que los parentales ($P < 0.001$), aproximándose sus valores a los obtenidos en las pieles controles. En los ratones *parp-1^{+/+}* casi un 17% de los queratinocitos basales aparecían marcados con BrdU, mientras sólo un 10% de los queratinocitos basales *parp-1^{-/-}* incorporaban BrdU (fig. I-6A y I-6B). También se llevo a cabo el marcaje de células apoptóticas TUNEL positivas para estimar el porcentaje de células muertas en las primeras etapas de carcinogénesis, pero este fenómeno resultó ser extraordinariamente escaso, no habiendo diferencias significativas entre ambos genotipos, aunque las células positivas para TUNEL aparecían con mayor frecuencia en las pieles tratadas de los ratones de tipo parental (fig. I-6C), sugiriendo que el incremento en el porcentaje de células que proliferan se correlaciona con un aumento en la eliminación celular. Estos resultados de proliferación y muerte celular han sido corroborados con los estudios histológicos mostrados anteriormente en los cuales la relación del porcentaje de células que proliferan y mueren resultó disminuir notablemente en las lesiones de las pieles de los ratones *parp-1^{-/-}* (fig. I-5A).

1.4.8 Activación de NF-κB y expresión de genes dependientes.

Trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación y otros grupos, han demostrado que los ratones *parp-1^{-/-}* son resistentes al choque séptico inducido por LPS debido a una deficiente activación del factor de transcripción NF-κB (Oliver y col., 1999; Hassa y col., 2001). Sabemos, además, que NF-κB está implicado en fenómenos de inflamación, desórdenes proliferativos y cáncer (Baldwin, 2001; Bell y col., 2003). Por ello, en el intento de buscar un mecanismo de acción que explique la reducción en el número de papilomas, retraso temporal en la aparición de los mismos y la disminución tanto del componente inflamatorio como de la tasa proliferativa en los ratones deficientes en PARP-1 durante la carcinogénesis epidérmica, hemos centrado nuestro estudio en el factor de transcripción NF-κB y en la consecuente expresión de genes dependientes de su activación relacionado con los fenómenos de promoción y progresión tumoral (Bharti y Aggarwal, 2002).

Para estudiar estos mecanismos en nuestro sistema experimental hemos analizado los extractos nucleares procedentes de epidermis de ratones *parp-1^{+/+}* tratados con DMBA más cuatro dosis de TPA durante una semana. En ellos se ha podido comprobar, mediante ensayos de geles de retardo, la transactivación de NF-κB (unión de NF-κB al ADN); en cambio, los extractos nucleares obtenidos de epidermis de ratones *parp-1^{-/-}* de manera análoga no manifiestan que tal activación ocurra (fig.I-7A). Además, en experimentos de expresión génica realizados mediante RT-PCR hemos podido comprobar en los extractos procedentes de la piel de ratones *parp-1^{-/-}* (en los que no se activa NF-κB) que no se produce de una forma correcta la inducción de genes modulados por NF-κB tales como genes que codifican para citoquinas involucradas en la respuesta inflamatoria (como TNF-α e IL-1β) y otros genes tales como MnSOD y TRAIL. Por ello, la activación deficiente de NF-κB en los ratones *parp-1^{-/-}* podría determinar los niveles de expresión de genes dependiente de NF-κB que participan en carcinogénesis.

La expresión de TNF-α e IL-1β puede ser detectada en las epidermis de los ratones incluidos como controles, a los cuales se les aplicó solamente el vehículo (acetona). Este hecho ha sido descrito en células humanas tras tratar la piel con irritantes químicos (Matsunaga y col., 1998). Además, el tratamiento

de DMBA + TPA efectuado sobre la piel de los ratones no produce efectos diferenciales de expresión de TNF- α en ratones *parp-1^{-/-}* respecto a los controles (fig.I-7B). El tratamiento con DMBA + TPA permite detectar la inducción de IL-1 β en los ratones de tipo parental tratados respecto a los controles. En cambio en los ratones knockout no hemos observado diferencias de expresión génica. Los resultados para MnSOD y TRAIL mostraban la misma tendencia anterior, es decir, inducción de los genes regulados por NF- κ B con el tratamiento, en el caso de los ratones *parp-1^{+/+}*, y niveles basales de expresión para los ratones deficientes en PARP-1, a pesar del tratamiento (fig.I-7B). El motivo por el cual la expresión de TNF- α no se altera tras el tratamiento de inducción y promoción tumoral en los ratones parentales, en contra de lo que ocurre con el resto de genes estudiados, puede relacionarse con el tiempo al cual se ha realizado observación experimental de expresión génica. Es posible que la citoquina pro-inflamatoria TNF- α , como primera citoquina inducida en los procesos de promoción tumoral (Komori y col., 1993; Suganuma y col., 2002) se encuentre en niveles basales al cabo de una semana de tratamiento y otras citoquinas con un papel secundario en la cascada, como la IL-1 β , se encuentren en este momento de promoción en su periodo de expresión máxima.

1.5 DISCUSIÓN

El papel de PARP-1 en carcinogénesis y en el desarrollo tumoral ha sido investigado durante bastante tiempo con el uso de inhibidores químicos y en los últimos años usando ratones PARP-1 knockout (Virág y Szabó, 2002). Creemos que nuestro estudio reviste un particular interés por cuanto pone de manifiesto la posibilidad del uso de inhibidores químicos de PARP-1 como una nueva terapia anti-neoplásica. La respuesta celular en ausencia de la actividad de PARP-1, ya sea por eliminación genética o por una inhibición farmacológica, es dependiente de la intensidad y del tipo de estímulo que recibe la célula. En el caso de daños oxidativos producidos durante la respuesta inflamatoria, la ausencia de PARP-1 conlleva una ventaja respecto al daño producido debido a que dos posibles vías que generan una exacerbada respuesta celular, tales como la activación de NF- κ B y la muerte celular mediada por PARP-1, se encuentran anuladas.

El desarrollo del cáncer es un proceso que conlleva múltiples etapas. Entre ellas destacan el proceso de crecimiento e invasión local del tumor, periodo al que sigue la diseminación de células tumorales las cuales, a través del sistema linfático o del sistema circulatorio, pueden ocasionar nuevos focos del tumor (metástasis) en zonas distantes a la de su origen. La capacidad de un tumor para metastatizar es el determinante principal de la mortalidad en los pacientes con cáncer. Por ello, el estudio de los procesos biológicos en cáncer se ha encaminado a la investigación de nuevas terapias que eviten o disminuyan esta potencialidad tumoral de crecimientos secundarios. El descubrimiento del factor de transcripción NF- κ B como activador fundamental de la respuesta inmune e inflamatoria debido, a gran parte, a su capacidad para inducir la expresión de genes codificantes para citoquinas pro-inflamatorias, receptores de citoquinas y moléculas de adhesión celular (Pahl, 1999), explica que se considere a este factor de transcripción en el control de la proliferación y oncogenesis (Bharti y Aggarwal, 2002). Otras evidencias aportadas por otros grupos también sugieren que la activación de NF- κ B puede facilitar los procesos de invasión, angiogénesis y metástasis (Gilmore y col., 2002). Por ello, la supresión de NF- κ B en células cancerígenas podría ser

objetivo de nuevas terapias en cáncer. Esto es, agentes que anulen la actividad de NF- κ B, o bien, no permitan su activación (como en el caso de la inhibición o eliminación de PARP-1) podrían ser considerados en la terapia del cáncer en combinación con los agentes quimioterapéuticos o irradiación- γ .

El cáncer como enfermedad multifactorial requiere también una terapia multimodal. En la mayoría de los casos cuando la enfermedad es diagnosticada ya se han producidos numerosos cambios en el tumor, constituyendo este hecho un reto a la hora de adjudicar el tratamiento adecuado para el paciente. Actualmente el tratamiento del cáncer se basa en cirugía, radioterapia, combinaciones de agentes quimioterapéuticos, inhibidores de la transducción de señales, anticuerpos contra varios antígenos de superficie celular o inmunomoduladores. Por lo tanto, una nueva estrategia que haga uso de la combinación de agentes quimioterapéuticos con agentes quimiopreventivos podría ser de utilidad en el tratamiento del cáncer. En este sentido, nuestros resultados sugieren que la eliminación de PARP-1 puede aportar algún tipo de beneficio en el tratamiento del tumor debido a que la ausencia de esta proteína limita la proliferación celular, impide la activación de NF- κ B, y en estas condiciones se produce una deficiente respuesta inflamatoria y una débil expresión de los genes relacionados con la promoción/progresión tumoral. No obstante, el beneficio derivado de la inhibición farmacológica de la actividad de PARP-1 parece no estar relacionado con la inhibición de la activación de NF- κ B (Oliver y col., 1999; Hassa y col., 2001). En este sentido, el uso de una terapia local basada en el RNA de interferencia (siRNA, *small interference RNA*) frente a PARP-1 en combinación con quimio o radioterapia podría potenciar los efectos de control local de las enfermedades neoplásicas al tiempo que inhibiría los procesos de promoción/progresión tumoral a través de la inactivación de NF- κ B.

1.6 REFERENCIAS

- Baldwin, A.S., Jr. Series Introduction: The transcription factor NF- κ B and human disease. *J Clin Invest*, **107**, 3-6 (2001).
- Bharti, A.C. & Aggarwal B.B. Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. *Biochem. Pharmacol.* **64**, 883-888 (2002).
- Brantley, D.M. *et al.* Nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) regulates proliferation and branching in mouse mammary epithelium. *Mol. Biol. Cell.* **12**, 1445-1455 (2001).
- Bell, S. *et al.* Involvement of NF-kappaB signalling in skin physiology and disease. *Cell Signal.* **15**, 1-7 (2003).
- Conde, C. *et al.* Loss of poly(ADP-ribose) polymerase-1 causes increased tumour latency in p53-deficient mice. *EMBO J.* **20**, 3535-3543 (2001).
- D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I. & Poirier, G.G. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem. J.* **342**, 249-268 (1999).
- de Murcia, G. & Menissier-de Murcia, J., Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 172-176 (1994).
- Gavrieli, Y. *et al.* Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell. Biol.* **119**, 493-501 (1992).
- Greenhalgh, D.A., Wang, X.J., Donehower, L.A. & Roop, D.R. Paradoxical tumor inhibitory effect of p53 loss in transgenic mice expressing epidermal-targeted v-rasHa, v-fos, or human transforming growth factor alpha. *Cancer Res.* **56**, 4413-4423 (1996).
- Gilmore, T., Gapuzan, M.E., Kalaitzidis, D. & Starczynowski, D. Rel/NF-kappa B/I kappa B signal transduction in the generation and treatment of human cancer. *Cancer Lett.* **181**, 1-9 (2002).
- Hassa, P.O., Covic, M., Hasan, S., Imhof, R. & Hottiger, M.O. The enzymatic and DNA binding activity of PARP-1 are not required for NF-kappa B coactivator function. *J. Biol. Chem.* **276**, 45588-45597 (2001)
- Hassa, P.O. & Hottiger, M.O. A role of poly (ADP-ribose) polymerase in NF-kappaB transcriptional activation. *Biol. Chem.* **380**, 953-959 (1999).
- Hassa, P.O. & Hottiger, M.O. The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders. *Cell Mol. Life. Sci.* **59**, 1534-1553 (2002).
- Komori, A. *et al.* Tumor necrosis factor acts as a tumor promoter in BALB/3T3 cell transformation. *Cancer Res.* **53**, 1982-1985 (1993).
- Labat-Moleur, F. *et al.* TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement critical evaluation and improvement. *J. Histochem. Cytochem.* **46**, 327-334 (1998).
- Liu, D. *et al.* Cytokines induce apoptosis in β -cells isolated from mice lacking the inducible isoform of nitric oxide synthase (iNOS^{-/-}). *Diabetes* **49**, 1116-1122 (2000).

- Masson, M. *et al.* XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol. Cell Biol.* **18**, 3563-3571 (1998).
- Matsunaga, T., Katayama, I., Yokozeki, H. & Nishioka, K. Epidermal cytokine mRNA expression induced by hapten differs from that induced by primary irritant in human skin organ culture system. *J. Dermatol.* **25**, 421-428 (1998).
- Matsunaga, T., Katayama, I., Yokozeki, H. & Nishioka, K. Epidermal cytokine mRNA expression induced by hapten differs from that induced by primary irritant in human skin organ culture system. *J. Dermatol.* **25**, 421-428 (1998).
- May, M.J. & Ghosh, S. Rel/NF-kappa B and I kappa B proteins: an overview. *Semin Cancer Biol* **8**, 63-73 (1997).
- Menissier-de Murcia, J. *et al.* Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 7303-7307 (1997).
- Moore, R.J. *et al.* Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis. *Nat. Med.* **5**, 828-831 (1999).
- Musgrave, B.L., Phu, T., Butler, J.J., Makrigiannis, A.P. & Hoskin, D.W. Murine TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) expression induced by T cell activation is blocked by rapamycin, cyclosporin A, and inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase C, and protein tyrosine kinases: evidence for TRAIL induction via the T cell receptor signaling pathway. *Exp. Cell Res.* **252**, 96-103 (1999).
- Oliver, F.J. *et al.* Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *EMBO J.* **18**, 4446-4454 (1999).
- Pahl H. L. Activators and target genes of Rel/NF-kB transcription factors. *Oncogene* **18**, 6853-6866 (1999)
- Samper, E. *et al.* Normal telomere length and chromosomal end capping in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice and primary cells despite increased chromosomal instability. *J. Cell Biol.* **154**, 49-60 (2001).
- Schmitz, G.G. *et al.* Nonradioactive labeling of oligonucleotides *in vitro* with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase. *Anal Biochem.* **192**, 222-231 (1991).
- Suganuma, M. *et al.* Discrete roles of cytokines, TNF- α , IL-1, IL-6 in tumor promotion and cell transformation. *Int. J. Oncol.* **20**, 131-136 (2002).
- Tucker, P.C. & Sack, G.H. Jr. Expression of serum amyloid A genes in mouse brain: unprecedented response to inflammatory mediators. *FASEB J.* **15**, 2241-2246 (2001).
- Velasco, M., Diaz-Guerra, M.J., Martin-Sanz, P., Alvarez, A. & Bosca, L. Rapid up-regulation of IkappaBbeta and abrogation of NF-kappaB activity in peritoneal macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* **272**, 23025-23030 (1997).

- Virag, L. & Szabo, C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* **54**, 375-429 (2002).
- Wang, X.J., Liefer, K.M., Tsai, S., O'Malley, B.W. & Roop, D.R. Development of gene-switch transgenic mice that inducibly express transforming growth factor β 1 in the epidermis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 8483-8488 (1999).
- Weinberg, W.C. *et al.* Genetic deletion of p21WAF1 enhances papilloma formation but not malignant conversion in experimental mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res.* **59**, 2050-2054 (1999).
- Xie, Q.W., Kashiwabara, Y. & Nathan, C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **269**, 4705-4708 (1994).

1.7 FIGURAS Y TABLAS

Fig. I-1. Genotipaje de los ratones *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* mediante PCR. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa para la visualización del fragmento de 200 pb (alelo salvaje) y 700 pb (alelo mutado). El panel superior muestra los productos de PCR del alelo salvaje obtenido a partir de la utilización de la combinación de cebadores oligo (+) y oligo (+/-) en muestras aleatorias de ratones *parp-1^{+/+}* (números del 1 al 4) y *parp-1^{-/-}* (números del 5 al 11). De igual modo, el panel inferior muestra los productos de PCR del alelo mutado obtenido a partir de la utilización de la combinación de cebadores oligo (-) y oligo (+/-) en las mismas muestras anteriores de ratones *parp-1^{+/+}* (números del 1 al 4) y *parp-1^{-/-}* (números del 5 al 11). M, marcador de peso molecular; C, control positivo de productos de PCR, utilizando para ello ADN de referencia del alelo salvaje (panel superior) y del alelo mutado (panel inferior); B, control negativo del proceso de PCR.

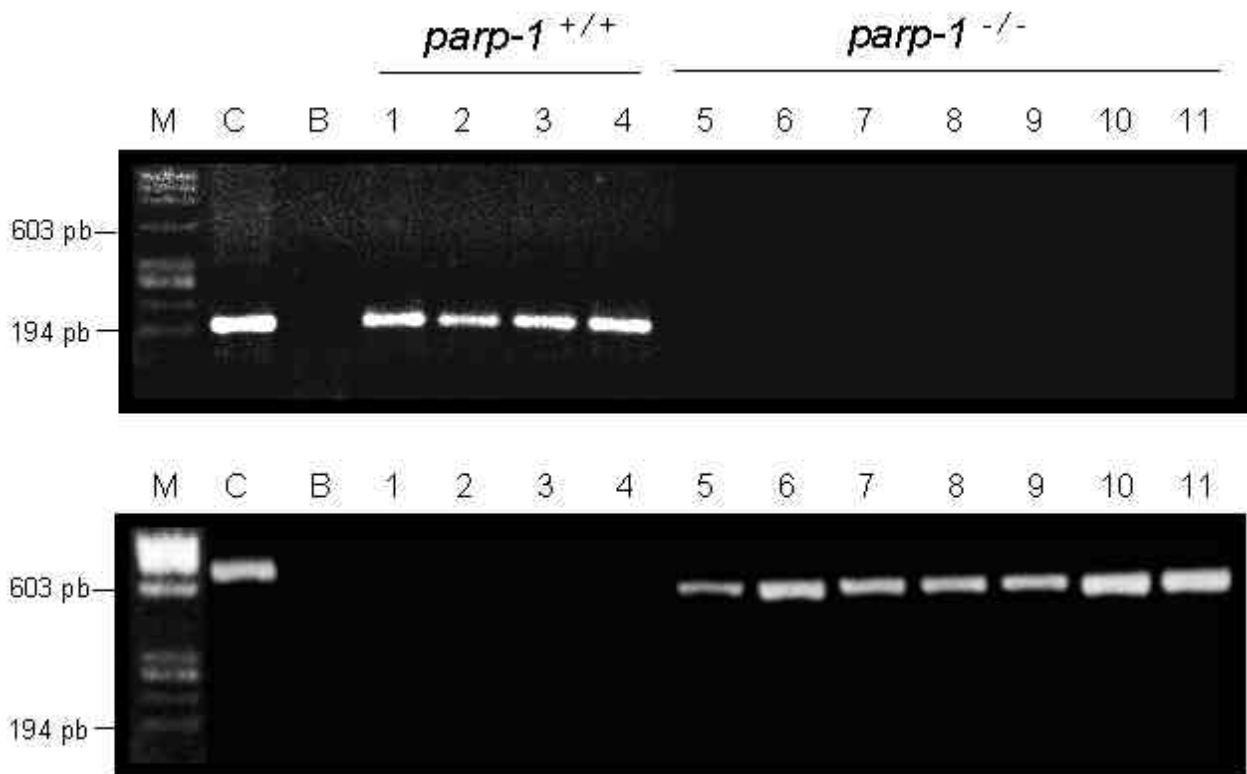
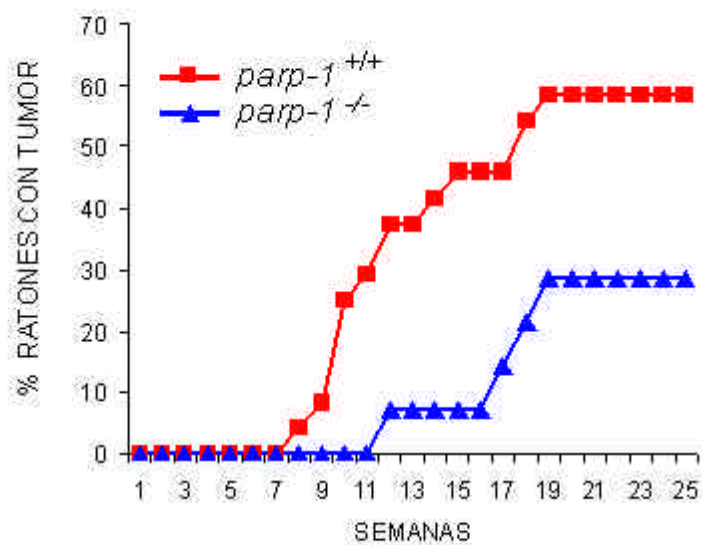
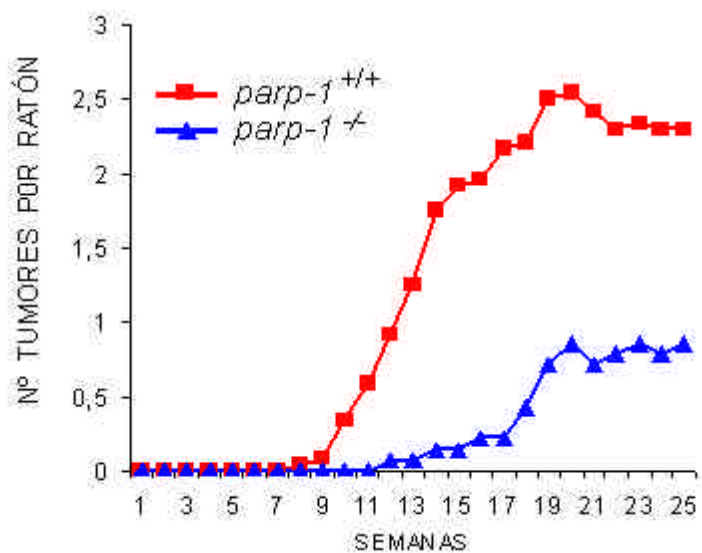


Fig. I-2. Resultado del proceso de carcinogénesis epidérmica en ratones salvajes y *parp-1*^{-/-}. Ambos grupos de ratones fueron tratados con una única dosis de 25 µg DMBA más 12 µg TPA dos veces por semana durante 25 semanas. Los tumores desarrollados fueron registrados y contabilizados semanalmente. **A**, porcentaje de ratones que desarrollan semanalmente tumores tras tratamiento, tanto en ratones *parp-1*^{+/+} (N=24) (■) como en ratones *parp-1*^{-/-} (N=14) (▲). **B**, número medio de tumores por ratón desarrollados durante el proceso de tumorigénesis tanto en ratones *parp-1*^{+/+} (N=24) (■) como en ratones *parp-1*^{-/-} (N=14) (▲). Las diferencias observadas resultaron ser estadísticamente significativas ($P < 0.05$). **C**, ejemplos de lesiones papilomatosas a la semana 17 de tratamiento con el promotor tumoral, tanto en ratones *parp-1*^{+/+} (izquierda) como en ratones *parp-1*^{-/-} (derecha). Se puede observar también a nivel microscópico (PAS X 40) la morfología papilomatosa de estas lesiones en el recuadro adjunto.

A



B



C

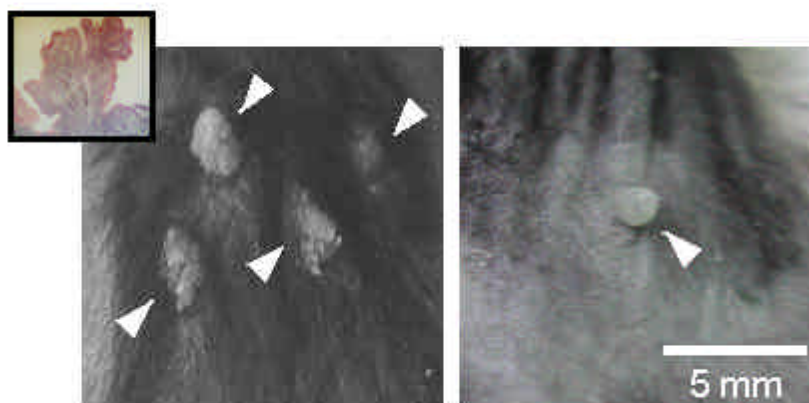


Fig. I-3. Morfología de la epidermis de ratón. **A** y **B**, preparaciones histológicas correspondientes a epidermis de ratón *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* controles, respectivamente. Nótese el escaso espesor de la epidermis, apenas formada por dos o tres capas de células (PAS X 400). **C** y **D**, preparaciones histológicas correspondientes a fragmentos de epidermis de ratón *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* al final del proceso de carcinogénesis, respectivamente. Obsérvese el grado de hiperplasia epitelial que muestran las epidermis, con un moderado engrosamiento, hipergranulosis e hiperqueratosis. Las flechas resaltan el significativo engrosamiento que se produce en la capa de células granulosa (PAS X 400).

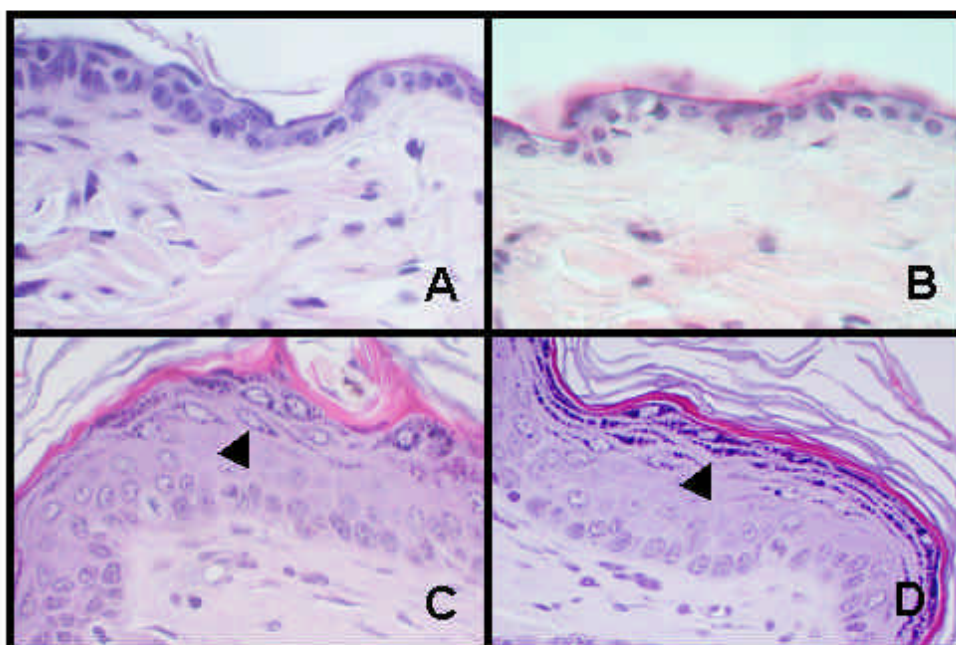
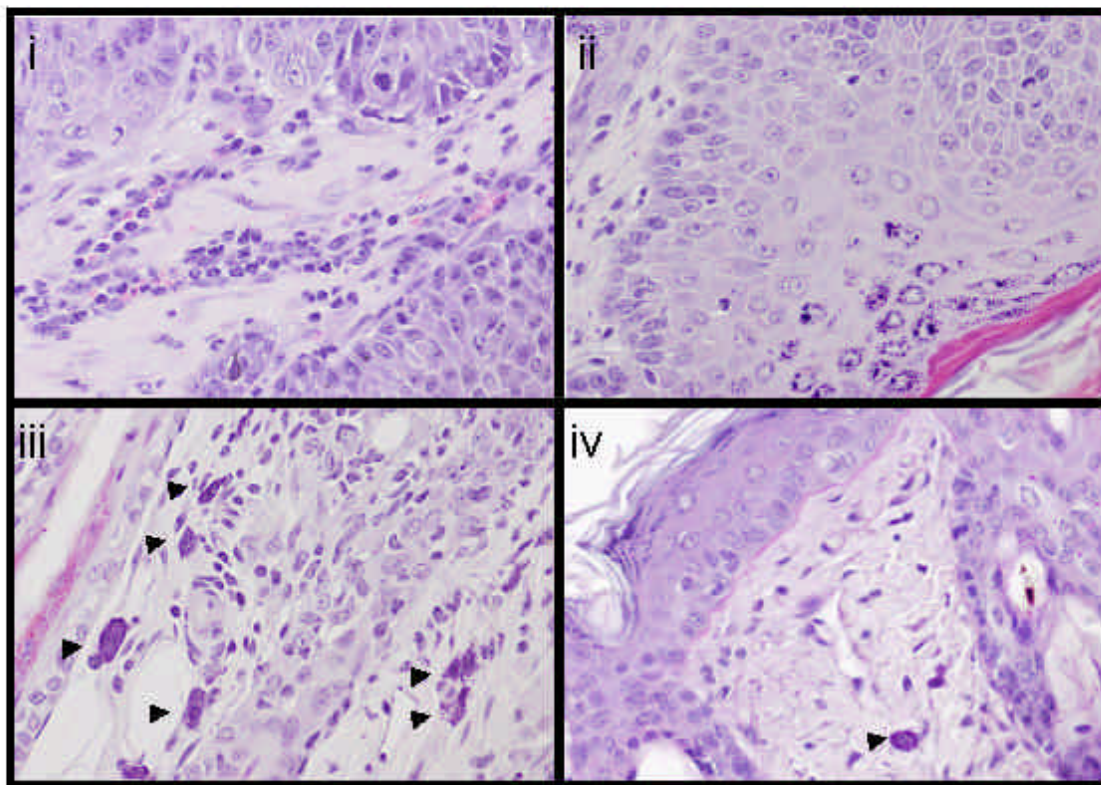


Fig. I-4. Evaluación morfológica del proceso de inflamación. **A**, análisis histológico de la piel de ratones *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* al final del tratamiento de carcinogénesis basado en DMBA/TPA durante 25 semanas. **(i)** ejemplo de un acusado infiltrado inflamatorio (PMN neutrófilos) en los tumores de los ratones *parp-1^{+/+}* tratados con DMBA + TPA (PAS X 400). Compárese con **(ii)** la escasez de acúmulos de PMN neutrófilos tras el tratamiento de carcinogénesis en un fragmento de piel con lesión correspondiente a un ratón *parp-1^{-/-}* (PAS X 400). **(iii)** Sección histológica de piel de ratón parental en la cual se observan un número importante de células cebadas o mastocitos, indicadas mediante flechas (PAS X 400), en comparación con **(iv)** la escasa presencia de mastocitos en pieles de ratón *parp-1^{-/-}* al final del tratamiento tumoral (PAS X 400). **B**, histograma que muestra el número medio de mastocitos por mm² tanto en las pieles de los ratones *parp-1^{+/+}* como *parp-1^{-/-}* tratados con DMBA/TPA durante 25 semanas (C: control; T: tratados con DMBA + TPA). Para la realización del recuento de mastocitos se contabilizó el número de estas células presentes en diez campos distintos tomados al azar a 600X sobre tumores de ratones *parp-1^{-/-}* tratados (N=4), *parp-1^{+/+}* tratados (N=8) y pieles sin lesión de ambos controles (N=2). Las barras de error representan el error estándar de las medias (s.e.m). * $P < 0.001$ respecto de ambos grupos de ratones controles; ** $P < 0.01$ respecto al grupo de ratones tratados *parp-1^{-/-}*.

A



B

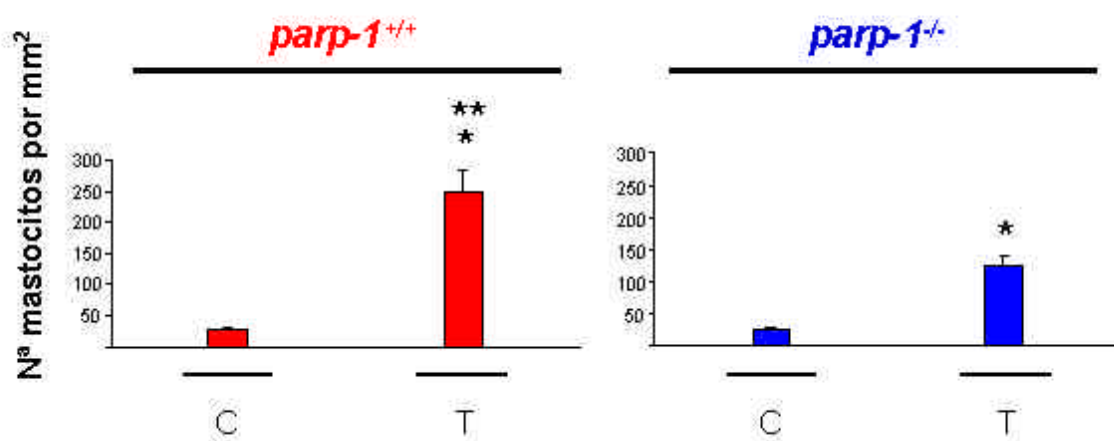
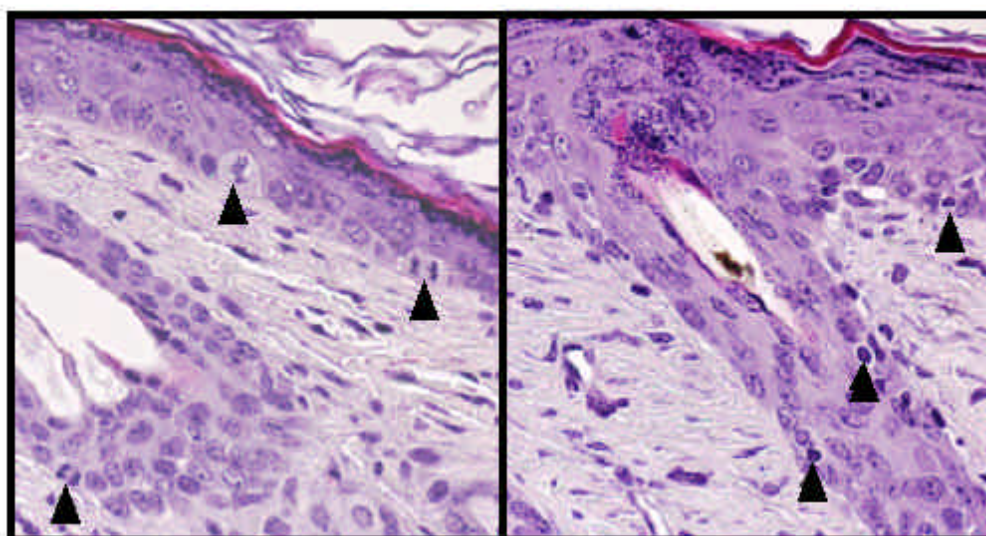


Fig. I-5. Análisis histológico, según criterios morfológicos, del proceso de proliferación y muerte celular al final del proceso de carcinogénesis basado en la administración de DMBA/TPA durante 25 semanas. **A**, microfotografías que muestran ejemplos de eventos mitóticos en la piel de ratones tratados *parp-1^{+/+}* (izquierda) y fenómenos apoptóticos en ratones *parp-1^{-/-}* tratados (derecha), indicados mediante flechas. Obsérvese la fuerte condensación nuclear (microfotografía de la derecha) característica de las células apoptóticas (PAS X 400). **B**, número medio de eventos de mitosis (M) y apoptosis (A) por ratón, tanto en los papilomas (rectángulo superior) como en los fragmentos de pieles sin lesión (rectángulo inferior) de los ratones *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* tratados con DMBA/TPA durante 25 semanas (C: control; T: tratados con DMBA + TPA), tal y como se indica en el pie de figura. Para la realización del recuento se contabilizó el número de estas células mitóticas y apoptóticas, según criterio morfológicos, presentes en diez campos distintos tomados al azar a 600X en pieles de ratones *parp-1^{-/-}* tratados (N=4 ratones para el estudio de estos fenómenos en los tumores, y N=12 ratones en caso de estudio de estos eventos en las pieles sin lesión), *parp-1^{+/+}* tratados (N=8 ratones tanto para el estudio de estos fenómenos en los tumores como para el estudio de estos eventos en las pieles sin lesión) y ambos controles (N=2 ratones en caso de estudio de estos fenómenos en las pieles sin lesión). Ningún ratón control desarrolló tumores, por ello, no fue contabilizado el número de mitosis ni apoptosis en esta situación (rectángulo superior). Las barras de error representan el error estándar de las medias (s.e.m). **P* <0.05 respecto al grupo de ratones tratados *parp-1^{-/-}*; ***P* <0.001 respecto de *parp-1^{-/-}* tratados y ambos grupos de ratones controles; ****P* <0.05 respecto ambos grupos de ratones controles.

A



B

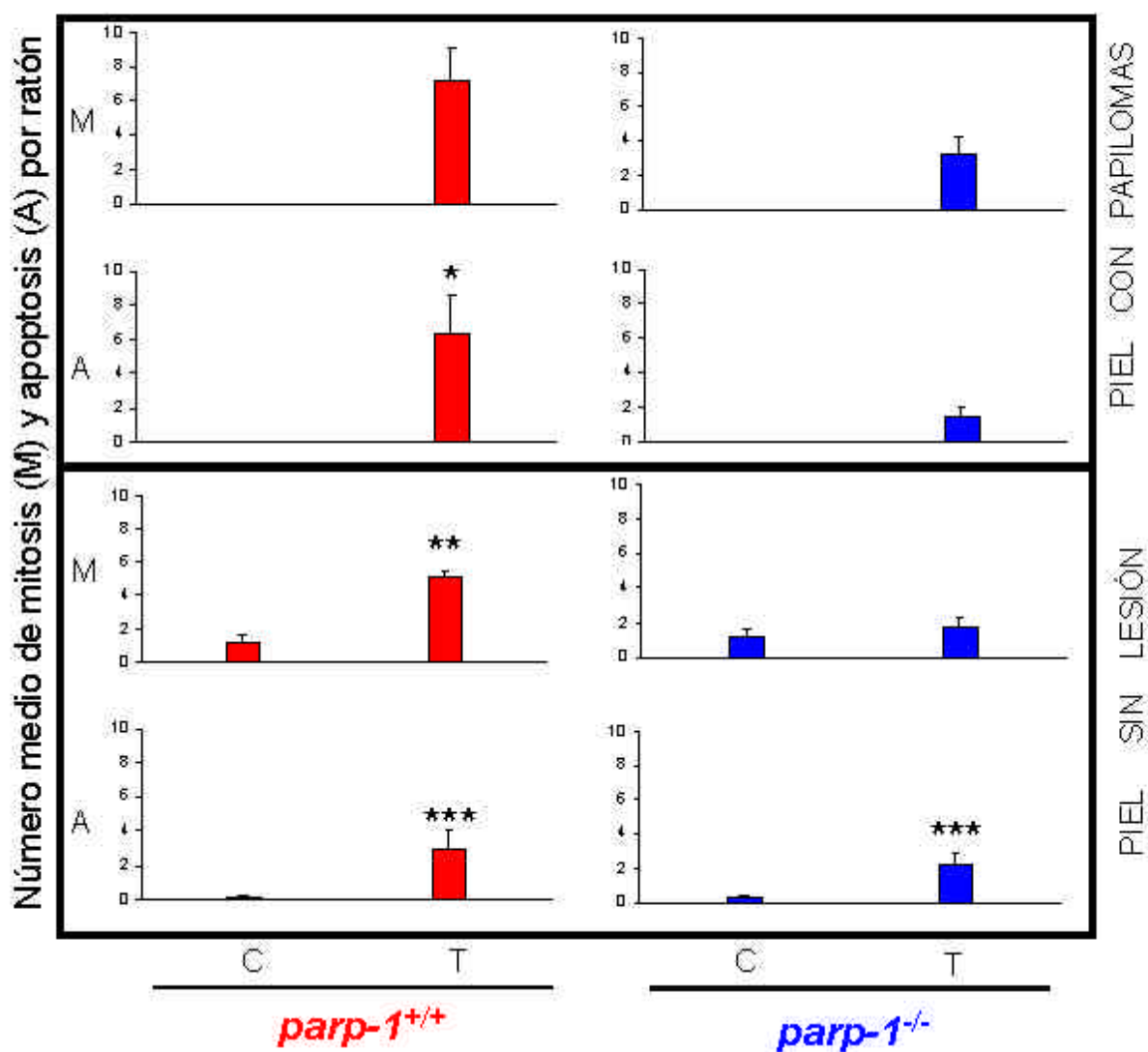


Fig. I-6. Cambios celulares en la piel de los ratones *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* durante las etapas tempranas de promoción tumoral. **A**, marcaje por técnicas de inmunofluorescencia indirecta de la BrdU incorporada por los núcleos basales proliferativos (fluorescencia amarilla-anaranjada) en epidermis de ratones *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}*. La incorporación de BrdU por las células basales, como medida del estado proliferativo de la epidermis, se realizó dando un pulso de BrdU a las 24 horas de un tratamiento semanal con 25 µg de DMBA más cuatro dosis de 12 µg de TPA como se indica en la sección de materiales y métodos de este capítulo. Los núcleos totales fueron teñidos con yoduro de propidio (fluorescencia roja). Nótese la reducida incorporación de BrdU de la epidermis tratada correspondiente a los ratones knockout en comparación con la epidermis tratada de los ratones salvajes (imágenes capturadas a 400X aumentos). **B**, histograma que muestra las medidas de incorporación de BrdU contabilizadas como la media del número de núcleos positivos para BrdU/1.000 núcleos basales realizados en tres experimentos independientes para cada condición (C: control; T: tratados con DMBA + TPA) y genotipo. Obsérvese que los niveles de incorporación que muestran los ratones tratados *parp-1^{-/-}* son similares a los mostrados por los ratones controles. Las barras de error representan el error estándar de las medias (s.e.m). **P* <0.001 respecto de los ratones *parp-1^{-/-}* tratados y ambos grupos de ratones controles. **C**, inmunofluorescencia directa *in toto* para el marcaje de núcleos apoptóticos mediante la técnica TUNEL sobre tejido epidérmico de ratones *parp-1* knockout y ratones salvajes 24 horas después de la última aplicación de TPA, correspondiente al protocolo intensivo de promoción tumoral citado anteriormente y de una semana de duración, según lo descrito en la sección de materiales y métodos de este capítulo. Las flechas blancas indican la localización de los escasos eventos de muerte celular (imágenes capturadas a 400X aumentos). Aunque este fenómeno posee una baja frecuencia en general, se puede observar como son aquellos núcleos más proliferativos los que también parecen tener una mayor tasa de apoptosis.

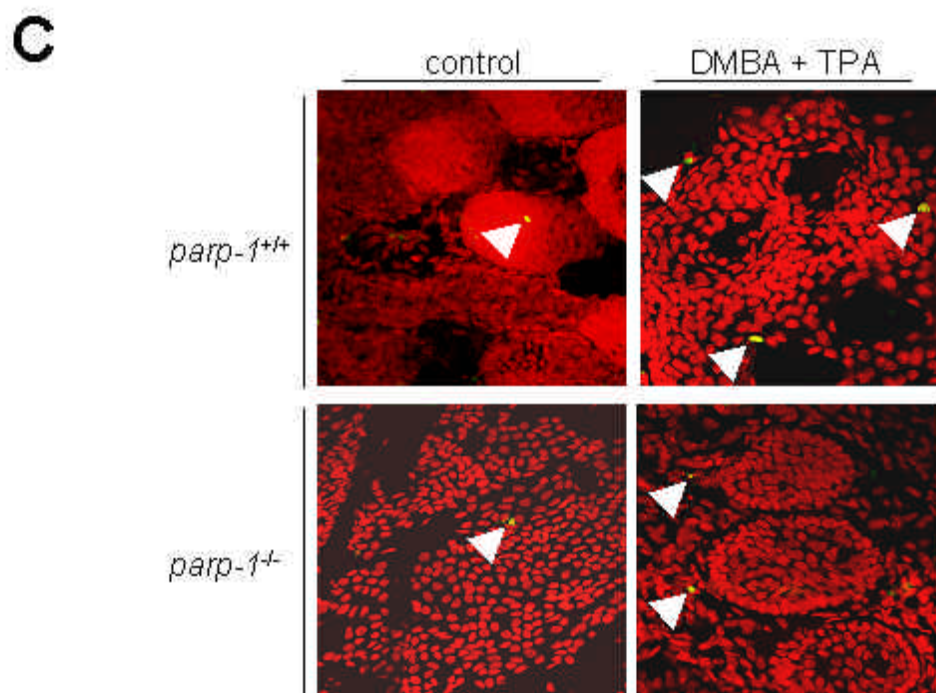
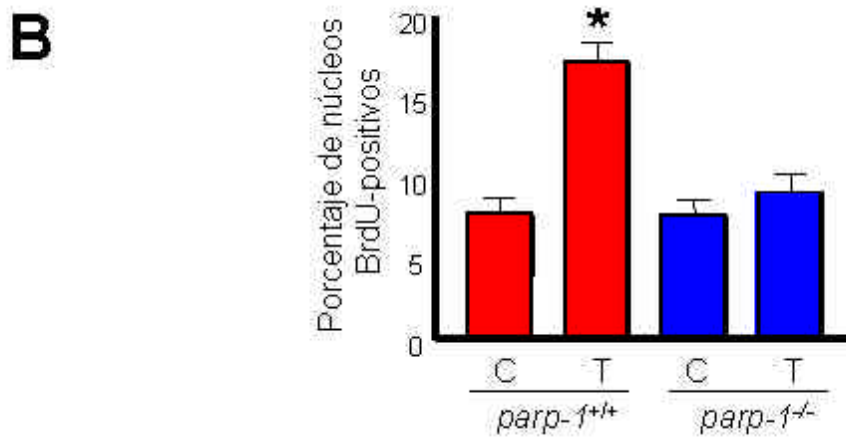
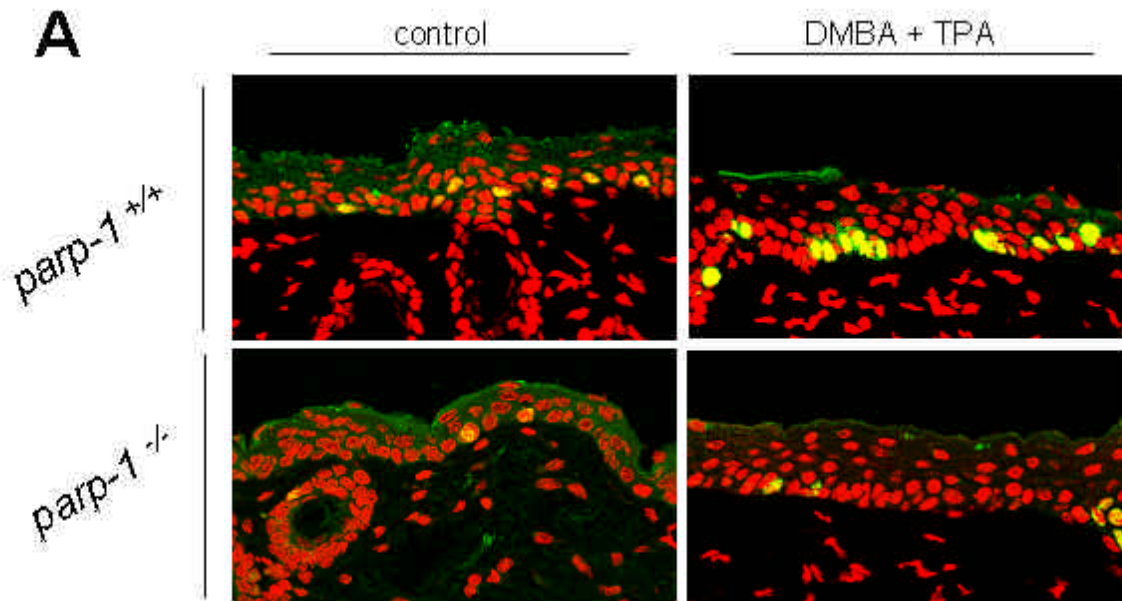
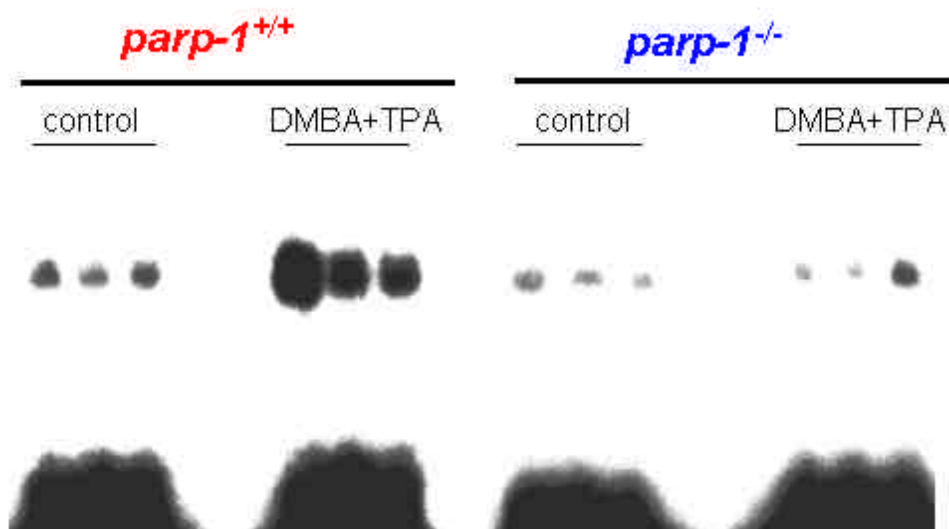


Fig. I-7. Activación deficiente del factor de transcripción NF- κ B y de la expresión génica κ B-dependiente en las pieles de los ratones *parp-1^{-/-}* durante las etapas tempranas de promoción tumoral. **A**, medidas de la unión de NF- κ B a las secuencias κ B del ADN mediante ensayos de geles de retardo o EMSA. Para ello, se utilizó la sonda ³²P-radiactiva que contenía la secuencia κ B del promotor perteneciente al gen que codifica para la iNOS. Obsérvese como los extractos nucleares procedente de pieles de ratones *parp-1^{-/-}*, 24 horas después del tratamiento con una única dosis de DMBA y cuatro aplicaciones de TPA durante una semana (DMBA + TPA), muestran una disminuida unión de NF- κ B al ADN o activación, en comparación con los extractos nucleares de ratones salvajes tratados con DMBA/TPA. En la figura se muestran tres experimentos independientes procedentes de extractos nucleares de tres ratones diferentes para cada condición y genotipo. **B**, niveles de expresión de algunos de los genes regulados por NF- κ B en la piel de ratones *parp-1^{-/-}* y *parp-1^{+/+}* en las etapas tempranas de promoción tumoral, según se describe en la sección de materiales y métodos de este capítulo (C: control; T: tratamiento con DMBA/TPA durante una semana). La expresión de los genes fue determinada mediante la técnica semicuantitativa de RT-PCR. Los productos de la RT-PCR fueron digitalizados en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio y los distintos niveles de expresión respecto al control fueron determinados por densitometría óptica. Los valores obtenidos fueron normalizados según expresión de tubulina- α . Las barras de error representan el error estándar de las medias (s.e.m) correspondientes a tres experimentos independientes.

A



B

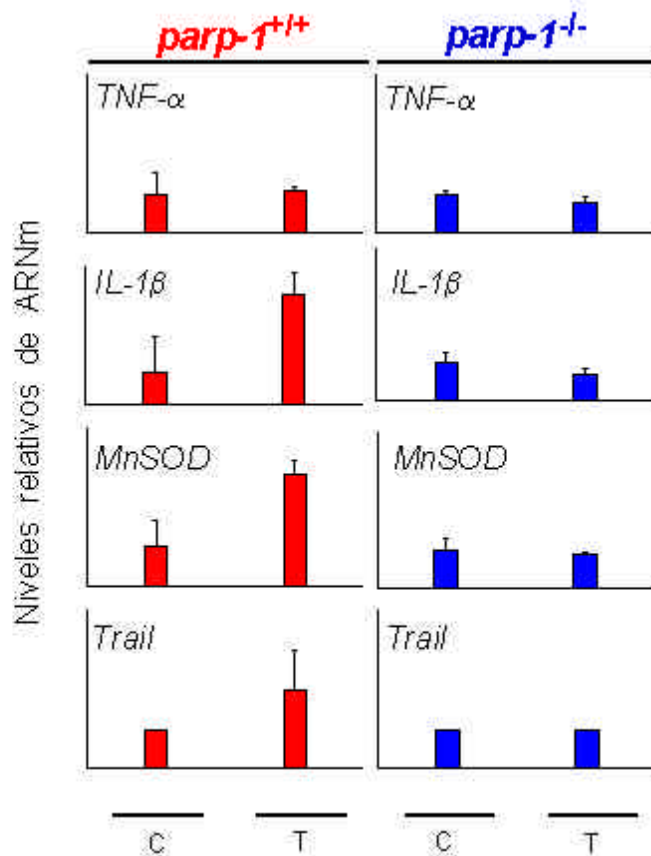


Tabla I-1. Resultados final del proceso de carcinogénesis química en ratones deficientes en PARP-1 y en ratones de tipo parental.

Genotipo ratones PARP-1	% ratones desarrollan papilomas	Nº ratones desarrollan tumor / ratones totales	Nº medio de tumores por ratón
+/+	58.3	14/24	2.29
-/-	28.6	4/14	0.86

Las diferencias anteriores resultaron ser estadísticamente significativas con una $P < 0.05$ (test de Mann-Whitney)

Tabla I-2. Resumen del estudio histológico de la piel de ratones *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* al final del proceso de carcinogénesis.

	espesor epitelio (mm)	espesor granulosa (mm)	presencia infiltrado inflamatorio	nº mastocitos por mm ²	nº mitosis zona sin lesión	nº apoptosis zona sin lesión	nº mitosis papilomas	nº apoptosis papilomas
<i>parp-1^{+/+}</i> C ^A	0.017± 0.001	0.001± 0.000	0/2	22.2 ± 4.1	1.25 ± 0.31	0.12 ± 0.12	-	-
<i>parp-1^{-/-}</i> C ^A	0.020 ± 0.001	0.002 ± 0.001	0/2	28.7 ± 7.4	1.12 ± 0.35	0.12 ± 0.12	-	-
<i>parp-1^{+/+}</i> T ^B	0.075 ± 0.007 ^C	0.025 ± 0.002 ^C	6/8	249.4 ± 3.6 ^D	5.12 ± 0.40 ^E	2.88 ± 1.11 ^F	7.12±1.88	6.37 ± 2.18 ^G
<i>parp-1^{-/-}</i> T ^B	0.097± 0.011 ^C	0.025 ± 0.002 ^C	6/12	123.8 ± 1.7	1.75 ± 0.49	2.17 ± 0.67 ^F	3.17±1.04	1.42 ± 0.66

^A C: control, tratamiento con el vehículo acetona durante 25 semanas

^B T: tratados, tratamiento con DMBA/TPA durante 25 semanas

^{C, D} $P < 0.01$ con respecto a las situaciones *parp-1^{-/-}* tratados y controles

^E $P < 0.001$ con respecto a las situaciones *parp-1^{-/-}* tratados y controles

^F $P < 0.05$ con respecto a las situaciones controles

CAPÍTULO II

LA INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PARP-1 CONFIERE RESISTENCIA AL DESARROLLO DE TUMORES

2.1 RESUMEN

Los inhibidores farmacológicos de la actividad enzimática de PARP-1, han sido descritos recientemente por varios laboratorios como opciones terapéuticas para el tratamiento de enfermedades degenerativas relacionadas con la inflamación. Dado que el componente inflamatorio juega un importante papel en la etapa de promoción de las neoplasias epiteliales, el presente capítulo se centra en el estudio de la capacidad de los inhibidores de PARP en el control del proceso de carcinogénesis en ratones normales.

Mediante este estudio hemos podido demostrar que la administración sobre la piel de los ratones del iniciador tumoral DMBA más la aplicación semanal del promotor tumoral TPA junto con el inhibidor de PARP (DPQ) ocasiona el retraso en la aparición de tumores, la disminución del número de tumores desarrollados y de su volumen medio, en comparación con los ratones tratados en ausencia del inhibidor, aunque el porcentaje final de ratones que desarrollan tumores no difiere entre uno y otro grupo experimental.

Sabemos que los ratones deficientes en la proteína PARP-1 muestran, durante las etapas tempranas de promoción tumoral, una menor activación de factores de transcripción implicados en procesos de carcinogénesis, tales como NF- κ B y AP-1, en cambio cuando se utilizan inhibidores farmacológicos de PARP-1, sólo AP-1 muestra una deficiente activación. En resumen, los resultados indican que la pérdida de función de la proteína PARP-1 interfiere en el proceso de carcinogénesis química retrasando el crecimiento tumoral.

2.2 INTRODUCCIÓN

Los procesos de promoción tumoral en carcinogénesis producen una serie de cambios en las vías de señalización intracelular y transducción de señales. Consecuencia de ello, es la expresión anormal o sobre expresión de genes que contribuyen en la proliferación y crecimiento celular. Es bien conocido, que la activación de numerosas cascadas de señalización intracelulares bien por estimulación con citoquinas, mitógenos, ésteres de forbol, factores de crecimiento y factores ambientales convergen en su punto final en la activación de los factores de transcripción NF- κ B (nuclear factor-kappaB) y AP-1 (activator protein-1), los cuales pueden actuar bien de forma independiente o coordinadamente en la expresión génica ocasionada por dicho estímulo (Baeuerle y Baltimore, 1996; Karin y col., 2001; Hsu y col., 2000). La activación de NF- κ B y AP-1 contribuyen al desarrollo de la tumorigénesis mediante la trans-activación de genes que intervienen en la respuesta inflamatoria, genes con funciones inmunoregulatoras, genes antiapoptóticos y genes con funciones reguladoras del ciclo celular (Surh, 1999). Todo lo anterior resulta en un favorecimiento de la actividad mitótica y supresión de eventos apoptóticos, con la consiguiente alteración del balance homeostático que es causa del proceso de carcinogénesis (Shaulian y Karin, 2002, Dhar y col., 2002).

PARP-1, además de las funciones en señalización y reparación del ADN descritas con anterioridad, posee una función reguladora de la transcripción génica ejercida a tres niveles distintos, no excluyentes entre sí (Kraus y Lis, 2003): i) de manera directa PARP-1 se une a secuencias reguladoras de ciertos genes induciendo la transcripción de éstos (Yélamos y Oliver, 2002); ii) mediante interacción física o funcional de PARP-1 con otras proteínas reguladoras, formando complejos que inducen la actividad transcripcional (Oliver y col., 1999; Hassa y Hottiger, 1999); y iii) transitoriamente, a través de su mecanismo de acción enzimático de poli-ADP-ribosilación, puede modificar la estructura de la cromatina produciendo su descondesación para facilitar así el enlace a ésta de proteínas activadoras del proceso de transcripción del ADN (D'Amours y col., 1999). Por tanto, PARP-1 puede regular la transcripción

génica a través de la directa con NF- κ B (Hassa y col., 2001), y/o produciendo modificaciones por poli-ADP-ribosilación que faciliten la cascada de activación de otros factores de transcripción, como por ejemplo en la llevada a cabo para la activación de AP-1 a través de la quinasa aminoterminal de c-Jun (JNK, c-Jun N-terminal kinase) (Andreone y col., 2003).

En este sentido, y dado que existe una relación causal entre inflamación y promoción tumoral (Coussens y Werb, 2002), y que tanto NF- κ B como AP-1 median procesos inflamatorios, parece obvio que el tratamiento con fármacos anti-inflamatorios que actúen sobre la activación de los citados factores de transcripción, pueda contribuir al retraso o disminución del proceso de tumorigénesis. En este contexto, en el capítulo anterior de esta tesis, se concluía que la delección genética de la proteína PARP-1 en ratones disminuía considerablemente la susceptibilidad de los mismos al desarrollo de tumores debido a una deficiente activación de NF- κ B (capítulo I). Además, trabajos recientes publicados por el grupo de investigación de la Dra. Basilia Zingarelli demuestran también una disminuida activación de AP-1 en ratones y fibroblastos que carecen de la proteína PARP-1 cuando se tratan con agentes que producen estrés oxidativo o inmunológico, y concluyen que esta deficiente activación es dependiente de la actividad enzimática de PARP-1 (Zingarelli y col., 2004; Andreone y col., 2003).

Por todo ello, y como aproximación experimental para elucidar el papel de la actividad enzimática de PARP-1 en carcinogénesis, se ha estudiado el desarrollo de tumores tipo papilomas inducidos mediante protocolo químico de carcinogénesis basado en la administración de DMBA/TPA en ratones salvajes tratados simultáneamente con un inhibidor de la actividad enzimática de poli-ADP-ribosilación de PARP-1.

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1 Modelo experimental y protocolo de inducción tumoral.

Ratones *parp-1^{+/+}* tratados con el inhibidor de la actividad enzimática de poli-ADP-ribosilación de PARP fueron utilizados para la inducción tumoral mediante el protocolo químico de carcinogénesis descrito anteriormente (pág. 75). El inhibidor de la actividad enzimática de PARP-1 utilizado para tal efecto fue el 3,4-Dihidro-5-[4-(1-piperidinil)butoxi]-1(2H)-isoquinolinona (DPQ, $IC_{50}=0.13 \mu\text{M}$) (Banasik y col., 1992; Cosi, 2002).

Un grupo de diez ratones, de 6-8 semanas de edad, fueron utilizados como referencia positiva del proceso de carcinogénesis mediante la aplicación de DMBA/TPA. De forma paralela, otro grupo de ratones compuesto por trece animales, fueron tratados simultáneamente con los mismos reactivos del protocolo de carcinogénesis DMBA/TPA, pero con la salvedad de que el promotor tumoral TPA se aplicó conjuntamente con 30 μg de inhibidor DPQ (Alexis Biochemicals). Un tercer grupo de dos animales tratados simultáneamente con sólo acetona fueron también utilizados como situación control. Con el fin de establecer diferencias en cuanto a la susceptibilidad tumoral de los ratones tratados conjuntamente con el inhibidor de PARP-1 respecto a los no tratados con el inhibidor en el proceso de carcinogénesis, se realizó semanalmente un recuento del número de tumores desarrollados por ambos grupos. Al final del tratamiento tumoral (25 semanas), se procedió a sacrificar los ratones. La piel tratada fue diseccionada y fijada en formaldehído (Panreac) al 4% tamponado a $\text{pH}=7$, para la realización de posteriores estudios histológicos y de medidas de tamaños de los tumores resultantes en ambos grupos.

Al igual que en el capítulo anterior, se llevó a cabo un corto protocolo de iniciación/promoción tumoral destinado a medir la activación de NF- κ B y AP-1 durante las etapas tempranas del proceso de promoción tumoral, tanto en presencia como en ausencia del inhibidor de la actividad enzimática de PARP-1. Para ello, una única dosis de DMBA (25 μg) más cuatro aplicaciones de 12 μg TPA en presencia o ausencia de 30 μg DPQ fueron administrados sobre las pieles de los ratones, previamente afeitadas, en un intervalo de una semana.

2.3.2 Medidas de unión de NF- κ B y AP-1 al ADN.

Para comprobar la trans-activación de NF- κ B y AP-1 al núcleo durante el proceso de promoción tumoral en presencia o ausencia del inhibidor DPQ en las etapas tempranas de promoción tumoral, se llevó a cabo la realización de geles de retardo o EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*). Oligonucleótidos con la secuencia de unión para NF- κ B en el promotor del gen que codifica para iNOS, descritos en la sección de materiales y métodos del capítulo I, y oligonucleótidos conteniendo la secuencia TRE (*TPA response elements* o elementos de respuesta a TPA; 5'-TGA(C/G)TCA-3') de unión para el factor de transcripción AP-1 (5'-ACACACGCTGACTCAGCATAAGCC-3'-sentido y 5'-CGAATGAGTGAATCATCAACGAGT-3'- antisentido) fueron marcadas con [γ - 32 P] ATP para ensayarlas como sonda 32 P-radiactiva en geles de retardo, tal y como se describe en la sección de materiales y métodos del capítulo I. Tres microgramos de proteínas procedentes de los extractos nucleares de epidermis de ratones controles y tratados tanto en ausencia como en presencia de DPQ, según el protocolo de promoción tumoral de una semana de duración descrito anteriormente y destinado al estudio de las diferencias de activación de los anteriores factores de transcripción en los eventos tempranos de promoción tumoral, fueron incubados con 2 μ l de sonda 32 P-radiactiva (6 X 10⁴ d.p.m.) en un volumen final de 20 μ l de reacción para la realización de ensayos de EMSA, según se describió en la sección de materiales y métodos del capítulo anterior. El gel resultante fue secado y a continuación expuesto durante 6 horas sobre el sistema de pantallas radiográficas de almacenaje de fosforo "Storage Phosphor Screens" (Amersham Biosciences) para la posterior digitalización de las bandas impresas usando el escáner *Storm 840 PhosphorImager* (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). Las bandas obtenidas como resultado de la impresión radioactiva fueron cuantificadas usando el software *ImageQuant* (Molecular Dynamics). Al igual que en el capítulo anterior, se llevó a cabo un experimento de competición usando un exceso de diez veces de cada una de las sonda no marcada (sonda fría) con respecto a las sondas 32 P-radiactiva para comprobar que la señales obtenidas anteriormente eran específicas.

2.3.3 Obtención de los extractos nucleares.

Las biopsias obtenidas de piel de ratón 24 horas después del tratamiento con una única dosis de DMBA (25 µg) más cuatro aplicaciones de 12 µg TPA en presencia o ausencia de 30 µg DPQ durante una semana fueron conservadas a -80°C hasta el momento de su disgregación para la obtención de los extractos nucleares. Para ello, se utilizó el mismo protocolo descrito en la sección de materiales y métodos correspondiente al capítulo I (Velasco y col., 1997).

2.3.4 Determinación de las concentraciones de proteínas de los extractos nucleares.

La concentración de proteínas en los extractos nucleares anteriormente obtenidos se midió utilizando la reacción colorimétrica de Bradford, según lo descrito en la sección de materiales y métodos del capítulo I de esta tesis.

2.3.5 Ensayos de actividad enzimática de PARP-1.

Para comprobar que realmente la actividad enzimática de PARP-1 estaba siendo inhibida con el uso de DPQ, se realizaron ensayos de medidas de incorporación [3H]-NAD⁺ tanto en las pieles de los ratones *parp-1^{+/+}* 24 horas después del tratamiento con una única dosis de DMBA (25 µg) más cuatro aplicaciones de 12 µg TPA en presencia o ausencia de 30 µg DPQ durante una semana como en fibroblastos embrionarios inmortalizados *parp-1^{+/+}* 24 horas después de tratamiento con una sola aplicación de TPA (12 µg) en presencia o ausencia de DPQ (30 µg). Para ello, se utilizó el protocolo descrito por el Dr. László Virág (Debrecen, Hungría) para su ensayo en cultivos celulares, y se adaptó a las nuevas condiciones de trabajo con muestras procedentes de tejido. De este modo, una vez diseccionada la piel tras tratamiento, se llevó a cabo la obtención de extractos nucleares de igual manera a la descrita anteriormente. A continuación, se añadió 5 µg de proteínas nucleares a 0.5 ml de solución de ensayo, conteniendo 56 mM HEPES (Sigma) a pH 7.5, 28 mM KCl, 28 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.01% digitonina (Calbiochem), 0.125 µM de NAD⁺ no tritiado (Calbiochem) y 2.5 µl de

[³H]-NAD⁺ (Perkin-Elmer; 50 µCi/0.5 ml; 28.2 Ci/mmol) y se dejó incubar a 37 °C durante 30 minutos. Posteriormente, se precipitaron las proteínas con 0.2 ml de tricloroacético (TCA, Calbiochem) frío al 50 % durante cuatro horas en agitación y se decantaron mediante la centrifugación de las mismas a 10.000 r.p.m. durante 10 minutos en frío. Luego, el precipitado resultante fue lavado con 0.5 ml de TCA frío al 5 % y nuevamente separado mediante una nueva centrifugación a 10.000 r.p.m. durante 5 minutos en frío. Los lavados fueron repetidos cuatro veces más, al final de los cuales, se añadió sobre el precipitado 0.5 ml de una solución de 0.1 N de NaOH conteniendo SDS al 2 % con la finalidad de solubilizar el precipitado para la posterior cuantificación de actividad. La solubilización se consigue incubando la mezcla anterior a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente, una alícuota de solubilizado fue añadida sobre viales de centelleo conteniendo 4 ml de solución de centelleo (Ecoscint™ H), tras lo cual se agitó vigorosamente la mezcla, se dejó reposar y por último se midió la radiactividad (c.p.m.) en un contador de centelleo líquido LKB 1209 RackBeta para emisores beta. Para el ensayo con fibroblastos, se procedió de igual forma con la salvedad de que las células cultivadas sobre placas de seis pocillos (*Nunc Multidish 6 well*) en un incubador *ThermoForma* (Hucoa-Erloss) a 37 °C y 5 % de CO₂, a una densidad celular de 75.000 células/pocillo, fueron tratadas con TPA o TPA+DPQ, al día siguiente se le retiró los 3 ml de medio DMEM rico en glucosa (Invitrogen) conteniendo FBS (Invitrogen) al 10 %, se lavó con PBS y se añadieron los 0.5 ml de solución de ensayo. Tras el periodo de incubación, las células fueron despegadas del soporte plástico y en esta solución resultante se cuantificó la actividad de titrio (c.p.m.).

2.3.6 Actividad transcripcional de NF-κB.

La actividad transcripcional dependiente del factor de transcripción NF-κB se ha llevado a cabo mediante un ensayo de expresión de un gen reportero de luciferasa integrado en un plásmido que contiene el ADN que codifica para la enzima *Firefly luciferasa* (*Photinus pyralis*; *Fluc*) bajo el control del promotor de HIV dependiente de NF-κB, con tres sitios de unión para este factor de transcripción, generosamente suministrado por el Dr. A. Israel (Instituto

Pasteur, Paris). La actividad enzimática de *Fluc*, por tanto, está directamente relacionada con la actividad transcripcional dependiente del factor de transcripción NF- κ B. La reacción de bioluminiscencia derivada de la actividad de esta enzima pudo ser cuantificada usando el *kit Luciferase Assay System* (Promega), de acuerdo a las instrucciones aportadas por el fabricante. Fibroblastos primarios embrionarios derivados de ratones *parp-1^{+/+}* fueron co-transfectados con el plásmido NF- κ B/Luciferasa y β -galactosidasa (control de transfección) mediante el método de transferencia génica mediada por polímeros catiónicos. Para ello, los fibroblastos se sembraron sobre placas de seis pocillos a una densidad celular de 75.000 células/pocillo, con el fin de que al día siguiente, cuando se realicen los experimentos de transferencia génica las células se encuentren entre un 70-80 % de confluencia. A continuación, se incubaron las células en un incubador *ThermoForma* (Hucoa-Erloss) a 37 °C en una atmósfera conteniendo un 5 % CO₂. Al día siguiente, se retiró el medio de las células y se adicionó 2 ml de medio fresco DMEM alto en glucosa conteniendo un 10 % de FBS, a los cuales se añade una mezcla que contiene 6 μ l del polímero catiónico jetPEI™ (PolyPlus-transfection), 1.0 μ g del plásmido NF- κ B/Luciferasa y 0.1 μ g del plásmido β -galactosidasa, en un volumen final de 0.2 ml de NaCl 150 mM. Antes de adicionar la mezcla al cultivo, se incubó ésta a temperatura ambiente durante 30 minutos para permitir la formación de los complejos DNA-polímeros catiónicos. La incubación de los complejos sobre las muestras se realiza durante 12 horas a 37 °C en incubador de CO₂. Transcurrido este tiempo, se retira el medio de cultivo, y se añade 3 ml de nuevo medio de crecimiento. 24 horas después, parte de las células son tratadas con la misma solución de TPA (12 μ g) utilizada para la promoción tumoral sobre la piel de los ratones y otra parte tratadas con la mezcla TPA (12 μ g) + DPQ (30 μ g). Se incubó 24 horas a 37 °C en incubador de CO₂, tras lo cual, se procedió a la preparación de las muestras para la lectura de la luminiscencia. Para tal fin, se utilizó los reactivos aportado por el kit anteriormente citado de medidas de luciferasa, de tal forma que una vez retirado el medio de cultivo sobre la placa de cultivo y lavada con PBS, se añadió sobre cada pocillo 200 μ l de solución de lisis 1X, se incubó a T^a ambiente y en agitación durante 5 minutos, tras lo cual, se rasparon las células del fondo de la

placa y se vertió el contenido en un tubo eppendorf. A continuación, se agitaron vigorosamente los tubos durante 15 segundos y se centrifugaron a 12.000 r.p.m. durante 2-4 minutos en refrigeración. El sobrenadante obtenido fue transferido a un nuevo tubo para la medida de la luminiscencia emitida. Una alícuota de este contenido se guardó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la posterior normalización de los resultados a través de la medida de la eficiencia de transfección mediante la actividad β -galactosidasa. Para iniciar la reacción enzimática, y por tanto, la lectura de la bioluminiscencia se utilizaron 20 μl de sobrenadante por muestra, añadidas sobre 100 μl de reactivo de reacción (*Luciferase Assay Reagent*, Promega). Estas medidas se realizaron introduciendo las muestras en un luminómetro FB12 (Berthold Detection Systems) durante 30 segundos. Los resultados fueron expresados en RLU/seg.

La actividad enzimática β -galactosidasa, como control interno de la eficiencia de transfección, se midió usando la hidrólisis enzimática del sustrato artificial Orto-nitrofenil- β -galactósido (ONP_G) en galactosa y Orto-nitrofenil (ONP). El ONP en solución alcalina adquiere un color amarillo susceptible de ser medido en el espectrofotómetro a 420 nm. La cantidad de color amarillo detectado por el espectrofotómetro es indicativa de la cantidad de OPN formada, y por tanto, de la cantidad de enzima co-transfectada (Schenborn y Goiffon, 1993). Para ello, 30 μl de sobrenadante obtenido anteriormente fueron ensayados en un volumen final de 300 μl de reactivo de reacción conteniendo 201 μl de fosfato sódico 0.1 M a pH 7.5, 3 μl de MgCl_2 y 66 μl de una disolución de ONP_G de 4 mg/ml en fosfato sódico 0.1 M a pH 7.5. A continuación, se incubó la mezcla a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que desarrolló color amarillo. Esto se consiguió, aproximadamente, a los 15 minutos de incubación. Paralelamente se leyó un control positivo y otro negativo de la reacción, que consistían en la adición, en vez del sobrenadante de proteínas obtenido, de 1 μl del enzima β -galactosidasa (Sigma, 500 U/ml) o agua, respectivamente. Las medidas de las muestras siempre se realizaron en el rango lineal de lectura a 420 nm en placas de 96 pocillos usando un detector de ELISA (Molecular Devices).

2.3.7 Estudio histológico de las pieles de ratón.

Fragmentos de pieles con o sin lesiones y procedentes de ratones *parp-1^{+/+}* tratados durante 25 semanas con DMBA/TPA en presencia o ausencia del inhibidor DPQ, y pieles sin lesiones de ratones control fueron diseccionadas, fijadas en formaldehído (Panreac) al 4% tamponado a pH=7, deshidratadas en concentraciones crecientes de etanol (Merck), lavadas en xilol (Merck), embebidas en parafina, seccionadas en un microtomo Leica a 4- μ m y teñidas con colorantes de hematoxilina y eosina (H&E) o con la reacción de PAS (*Periodic Acid Schiff*). Se contabilizó por aspectos morfológicos el número de mitosis y apoptosis en diez campos distintos por ratón, tomados al azar y utilizando para ello un microscopio Olympus BH2 a aumentos de 600X en pieles tanto tratadas (con papilomas y sin ellos) como pieles controles. También se contabilizó al microscopio el número de mastocitos por mm² en diez campos distintos por ratón a aumentos de 400X en las pieles tratadas en zonas con lesión y en los controles. La presencia de hiperplasia epitelial e infiltrado inflamatorio fue también evaluada y expresada en porcentajes respecto del control.

2.3.8 Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico de los datos de incidencia y multiplicidad tumoral en una población de ratones a lo largo del proceso de promoción tumoral, mostrados en la figura II-2A y II-2B, se ha utilizado el test de Mann-Whitney. En cambio, para el resto de análisis realizados se ha aplicado un test *t* de Student, considerándose diferencias significativas todas aquellas en las que se obtenían valores de $P < 0.05$.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 La inhibición de la actividad enzimática de PARP-1 interfiere en la tumorigénesis epidérmica.

Con el propósito de probar el impacto de la inhibición de la actividad catalítica de PARP en el proceso de promoción/progresión tumoral, se trataron ratones salvajes con una única dosis de DMBA más la aplicación dos veces por semana del promotor tumoral TPA en presencia o ausencia del inhibidor DPQ durante 25 semanas, según se describe en la sección de materiales y métodos correspondiente a este capítulo. Estos inhibidores se unen al dominio catalítico de PARP en la zona de unión a NAD^+ , sustrato de esta reacción enzimática, produciendo de este modo la inhibición competitiva de la reacción de modificación postraduccional por poli-ADP-ribosilación de ciertos aceptores nucleares (D'Amours y col., 1999; Cosi, 2002).

Previo al análisis de carcinogénesis, se confirmó el efecto inhibitorio del DPQ sobre la actividad de poli-ADP-ribosilación de PARP mediante medidas de incorporación de $[\text{}^3\text{H}]\text{-NAD}^+$ tanto en las pieles de los ratones *parp-1^{+/+}* 24 horas después del tratamiento, y en presencia o ausencia de DPQ, como en fibroblastos embrionarios inmortalizados *parp-1^{+/+}* (ver sección materiales y métodos de este capítulo) (fig. II-1). En el proceso de carcinogénesis, el primer papiloma visualizado en los ratones tratados en ausencia del inhibidor se observó a la semana número 8 de tratamiento de promoción tumoral con TPA (fig. II-2A). Este dato coincide con el obtenido en el experimento de carcinogénesis del capítulo I para los ratones *parp-1^{+/+}*. En cambio, la promoción tumoral llevada a cabo en ratones tratados simultáneamente con el inhibidor DPQ no desarrolló tumores hasta dos semanas más tarde (fig. II-2A). Por tanto, si comparamos la semana de promoción tumoral con TPA en que se inicia la aparición de tumores en ratones salvajes tratados simultáneamente con el inhibidor (fig. II-2A) con los ratones deficientes en PARP-1 (fig. I-2A, capítulo I) y ratones *parp-1^{+/+}* tratados sólo con TPA, podemos concluir que con solamente anular la actividad enzimática de PARP se consigue situaciones de retraso temporal en el proceso de carcinogénesis intermedias entre la condición salvaje y knockout para *parp-1*. Este hecho se puede comprobar al

comparar las figuras I-2A y II-2A. Se puede observar en ellas, que para que la población de ratones alcance una incidencia tumoral del 50 % son necesarias sólo 10 semanas de promoción tumoral en el caso de ratones salvajes no tratados con el inhibidor, y en cambio, entre 16-17 semanas de promoción en el caso de ratones salvajes tratados simultáneamente con DPQ (fig. II-2A). A pesar de ello, pocas semanas después apenas existían diferencias apreciables entre ambos grupos en cuanto al número total de ratones que desarrollaban tumores. Éste porcentaje, al final del tratamiento de tumorigénesis resultó ser del 90.0% para el grupo de ratones *parp-1^{+/+}* tratados sin el inhibidor (N=10) y del 69.2% en el caso de tratamiento simultáneo con DPQ (N=13) (fig. II-2A; tabla II-1). Por otro lado, y aunque la incidencia tumoral en terminos globales resultó ser menor en el experimento de carcinogénesis del capítulo I, los ratones genéticamente deficientes en *parp-1* en ningún momento del proceso de carcinogénesis alcanzaron un porcentaje del 50 % en la incidencia tumoral, en cambio, los ratones salvajes necesitaron entre 17-18 semanas para conseguirlo (fig. I-1A).

Al final del proceso de carcinogénesis, y como término medio, un total de 4.6 y 1.7 tumores por ratón fueron desarrollados por el grupo de ratones tratados sin (N=10) y con el inhibidor (N=13), respectivamente (fig. II-2B; tabla II-1). Las diferencias de multiplicidad tumoral observadas en ambos grupos a lo largo del proceso de promoción tumoral resultaron ser estadísticamente significativas ($P < 0.05$). El periodo de latencia tumoral, entendido como número de semanas necesarias para que al menos se haya desarrollado un tumor por ratón, fue de 10.4 semanas para el grupo de ratones tratados sin el inhibidor (N=10) y de 16.6 para los tratados simultáneamente con DPQ (N=13) (fig. II-2B). Si se compara este considerable retraso en el periodo de latencia tumoral con el obtenido en el experimento de carcinogénesis utilizando ratones genéticamente deficientes en *parp-1* (fig. I-2B, capítulo I), se puede concluir de nuevo que el efecto del inhibidor de la actividad enzimática de PARP sobre el proceso de tumorigénesis es intermedio entre la condición salvaje y knockout para *parp-1*.

Una de las grandes diferencias observadas a nivel macroscópico entre los tumores desarrollados por los ratones tratados con o sin DPQ fue, además del número medio de tumores obtenidos, el tamaño que estos presentaban

(figura II-2C; tabla II-2). El menor tamaño que mostraban los tumores desarrollados por los ratones tratados simultáneamente con el inhibidor de PARP hacía pensar que éstos eran tumores menos proliferativos.

Los resultados de carcinogénesis sobre la piel de ratones tratados simultáneamente con el inhibidor DPQ sugieren el hecho de que, con solamente bloquear la actividad enzimática de poli-ADP-ribosilación de PARP, se consiguen fenómenos acusados de retraso temporal en la aparición de tumores, disminución en la multiplicidad tumoral y tamaño de los tumores similares a los obtenidos en la tumorigénesis con los ratones genéticamente deficientes en *parp-1*.

2.4.2 Análisis histológico de la piel al final del proceso de carcinogénesis.

Los ratones tratados con DMBA+TPA, en ausencia del inhibidor DPQ, presentan hiperplasia epitelial idéntica a la descrita en el capítulo I para los ratones *parp-1^{+/+}*, con un significativo engrosamiento epitelial (0.096 mm), especialmente del estrato granuloso, en comparación con las pieles de los ratones controles (0.019 mm) y tratados en presencia del inhibidor DPQ (0.020 mm, $P < 0.0001$) (fig. II-3A). En el caso de los ratones tratados en presencia de DPQ, el epitelio de las zonas de la piel que no han desarrollado lesión muestra una morfología regular, compuesto por dos o tres capas de células con escaso o ausente componente granuloso (fig. II-3A, centro). Esta homogénea e inalterada estructura de la epidermis es similar a la observada en ausencia de tratamiento (fig. II-3A, izquierda). Por tanto, el estudio histológico de las pieles tratadas simultáneamente con el inhibidor DPQ muestra una acusada reducción de los fenómenos de hiperplasia epitelial en aquellas zonas de la piel que no han desarrollado lesión.

Además, el estudio histológico de los tumores desarrollados en ambas condiciones revela una acusada disminución de la presencia de infiltrado inflamatorio (fig. II-3B, II-4A) y del número de mastocitos por mm^2 ($P < 0.05$) (fig. II-4B) presentes en los papilomas que se han desarrollado en presencia de DPQ. Al observar al microscopio, mediante criterios morfológicos, el número de mitosis y eventos de apoptosis que tenían lugar tanto en la piel sin lesión como en la piel lesionada (con papilomas) se pudo comprobar, como cabía esperar, a

tenor de los resultados mostrados anteriormente, que el recambio celular en los ratones tratados con DPQ se encontraba significativamente disminuido en comparación con los ratones tratados sin inhibidor (fig. II-4C), mostrando estos últimos, en las pieles tratadas que no han desarrollado lesión, un mayor número de mitosis (3.5) y apoptosis (1.6) que los ratones tratados con DPQ (1.3 y 0.6, respectivamente) ($P < 0.05$) (fig. II-4C, panel de la izquierda). Como se comentó en el apartado anterior, un hecho significativo observado en el transcurso del proceso de carcinogénesis en presencia de DPQ fue el reducido tamaño que presentaban los tumores desarrollados en estas condiciones. Para ello, sugeríamos entonces como hipótesis una menor tasa proliferativa de estas células en un ambiente inhibitorio de la actividad enzimática de PARP. Pues bien, el estudio del número de eventos de mitosis y apoptosis en los tumores desarrollados por los ratones tratados con DPQ confirma nuestra hipótesis dado que estos ratones, en estas condiciones, presentan una considerable disminución de la tasa proliferativa (1.7) con respecto a los tumores desarrollados en ausencia de DPQ (12.2) ($P < 0.0001$), manteniéndose constante en ambos casos los fenómenos de muerte celular por apoptosis (2.5 y 2.3, respectivamente) (fig. II-4C, panel de la derecha).

2.4.3 Alteraciones moleculares en las etapas tempranas de promoción tumoral.

Los factores de transcripción AP-1 y NF- κ B se encuentran altamente activados en modelos tumorales de queratinocitos murinos y humanos (Li y col., 1996). Estas observaciones han sido minuciosamente descritas en los trabajos realizados con queratinocitos murinos JB6 sensibles (P+) y resistente (P-) a la promoción tumoral (Bernstein y Colburn, 1989; Huang y col., 1995; Young y col., 1999). Además, los trabajos realizados con ratones y fibroblastos embrionarios inmortalizados genéticamente deficientes en *parp-1* han puesto de manifiesto una deficiente activación de los factores de transcripción NF- κ B, (capítulo I, Oliver y col., 1999; Hassa y Hottiger, 1999) y AP-1 (Andreone y col., 2003; Zingarelli y col., 2003; Zingarelli y col., 2004) tras tratamiento con diferentes estímulos.

Una vez establecidas diferencias con el uso del inhibidor de PARP en cuanto a la susceptibilidad al desarrollo de tumores inducidos tras tratamiento de carcinogénesis (DMBA/TPA), se estudió a continuación qué cambios a nivel de activación de factores de transcripción descritos en los procesos de carcinogénesis estaban ocurriendo en las etapas iniciales de promoción tumoral en presencia del inhibidor de la actividad enzimática de PARP. Para ello, se llevó a cabo un protocolo de promoción tumoral de corta duración, similar al descrito en el capítulo I, con la salvedad de que las cuatro aplicaciones del promotor tumoral TPA (12 µg/dosis) se proporcionaban simultáneamente con DPQ (30 µg/dosis), durante una semana.

En los extractos nucleares procedentes de epidermis de ratones tratados con TPA+DPQ, se pudo comprobar mediante ensayos de geles de retardo la deficiente activación del factor de transcripción AP-1 (unión de AP-1 al ADN) (fig. II-5A). Este resultado indicaba que la actividad de poli-ADP-ribosilación de la proteína PARP-1 estaba implicada en los fenómenos de activación del factor de transcripción AP-1 durante las etapas tempranas de promoción tumoral en la epidermis de ratón. Esta misma deficiencia en cuanto a la activación de AP-1 fue también demostrada en los ratones genéticamente deficientes en *parp-1* tras tratamiento con el promotor tumoral (fig. II-5A). En cambio, los extractos nucleares obtenidos de epidermis de ratones tratados simultáneamente con TPA y DPQ mostraban una considerable activación de NF-κB durante las etapas tempranas de promoción tumoral (fig. II-5B). Es decir, la actividad enzimática de PARP-1 no era necesaria para la activación del factor de transcripción NF-κB. En este sentido, en el capítulo anterior se demostraba que en ausencia de PARP-1 los ratones tratados con DMBA + TPA mostraban una deficiente activación de NF-κB en las etapas tempranas de promoción tumoral y que este hecho repercutía negativamente en la expresión de genes que intervienen en los fenómenos de promoción tumoral. Las figuras II-5C y II-5D muestran los distintos niveles de activación de AP-1 y NF-κB con respecto a la situación control (tratamiento con el vehículo acetona) obtenidas mediante la lectura de la densidad de las bandas impresas en las placas autoradiográficas resultantes del revelado de los geles de retardo. Se puede comprobar en este análisis como la inhibición farmacológica de la actividad de PARP, mediante el

uso de DPQ, en las etapas tempranas del proceso de promoción tumoral, resulta en una considerable reducción de los niveles relativos de unión de AP-1 al ADN cuando se compara con las situaciones de tratamiento tumoral sin inhibidor (fig. II-5C). Estas diferencias obtenidas resultaron ser estadísticamente significativas ($P < 0.01$). Por otro lado, el tratamiento en presencia del inhibidor DPQ, en ningún caso, reducía los niveles de unión de NF- κ B al ADN cuando se comparaba con aquellos ratones tratados solamente con TPA. En ambos casos, las diferencias obtenidas respecto a ambos grupos de ratones controles y *parp-1^{-/-}* tratados con TPA resultaron ser estadísticamente significativas ($P < 0.01$) (fig. II-5D).

Los efectos de resistencia al proceso de tumorigénesis observados en ausencia de la proteína PARP-1 en los ratones *parp-1^{-/-}* tratados con DMBA+TPA, según lo descrito en el capítulo I, podrían ser debido, en parte, a una deficiente activación del factor de transcripción NF- κ B. Por otro lado, ha quedado demostrado en el presente capítulo que en presencia del inhibidor DPQ el proceso tumoral se ve afectado y, en este caso, al contrario de lo sucedido anteriormente, el factor de transcripción NF- κ B se encuentra normalmente activado. Por tanto, el hecho de que NF- κ B no se encuentre negativamente afectado con el uso del inhibidor, y que a pesar de ello, se observen diferencias de susceptibilidad tumoral, ha provocado un interés en el estudio o análisis de otros factores de transcripción implicados en estos fenómenos. Por ello, se ha enfocado el estudio en la interacción de PARP-1 con otros factores de transcripción altamente activados en los procesos de carcinogénesis, como es el caso del factor de transcripción AP-1. Factor de transcripción cuya actividad, según los resultados mostrados, está significativamente disminuida tanto en ausencia de la proteína PARP-1 como en condiciones de bloqueo de la actividad enzimática de poli-ADP-ribosilación de esta proteína en las etapas tempranas de promoción tumoral.

2.4.4 La actividad transcripcional dependiente de NF-κB no se encuentra disminuida al inhibir la actividad enzimática de PARP mediante DPQ.

Para tener la completa seguridad de que la inhibición enzimática de la proteína PARP-1 no afecta a la activación de NF-κB y por tanto, a su actividad transcripcional, se realizaron ensayos de expresión de luciferasa bajo el control de un promotor dependiente de NF-κB, tal y como se describe en la sección de materiales y métodos correspondiente a este capítulo. El tratamiento de fibroblastos murinos embrionarios inmortalizados, procedentes de ratones *parp-1^{+/+}*, con la misma mezcla de TPA+DPQ utilizada en la promoción tumoral no inhibía la actividad luciferasa dependiente del factor de transcripción NF-κB inducida mediante TPA (fig. II-6). De forma simultánea a este análisis, se confirmó el efecto inhibitorio del DPQ sobre la actividad de poli-ADP-ribosilación de PARP mediante medidas de incorporación de [³H]-NAD⁺ (fig. II-1B). Se puede comprobar como los anteriores valores de inducción transcripcional obtenidos en los fibroblastos *parp-1^{+/+}* tras tratamiento con TPA, tanto en presencia como ausencia del inhibidor, se aproxima con bastante exactitud a los valores relativos de unión de NF-κB al ADN (o trans-activación de NF-κB) obtenidos en semejantes condiciones de tratamiento en las pieles de los ratones *parp-1^{+/+}* mediante ensayos de geles de retardo (fig. II-5D). Por tanto, se puede concluir que la trans-activación del factor de transcripción NF-κB es independiente de modificaciones por poli-ADP-ribosilación originadas mediante la activación de la proteína PARP-1.

2.5 DISCUSIÓN

A partir del descubrimiento de la proteína PARP-1 hace 40 años, se inició la búsqueda de inhibidores farmacológicos capaces de bloquear la actividad enzimática de esta proteína. Los primeros inhibidores utilizados fueron la nicotinamida, benzamida y 3-aminobenzamida (3-ABA) (Purnell y Whish, 1980); posteriormente otra generación de inhibidores más potentes y específicos han sido generados y utilizados. Entre ellos destacan los derivados de quinazolinas, isoquinolinas y análogos, como es el caso del inhibidor DPQ (3,4-Dihydro-5-[4-(1-piperidinil)butoxi]-1(2H)-isoquinolinona) (Banasik y col., 1992; Cosi, 2002). Gracias al uso de estos inhibidores se ha demostrado la importancia de PARP-1 en fenómenos de reparación del ADN, supervivencia celular, expresión génica, diferenciación celular, intercambio de cromátidas hermanas y carcinogénesis (Cosi, 2002). A principio de la década de los 90 aparecieron los primeros trabajos de utilización de inhibidores de PARP en modelos de carcinogénesis murina (Ludwig y col., 1990), en este caso, mediante administración de benzamidas junto a agentes promotores, y más tarde, utilizando inhibidores más potentes como PD128763 en terapia antitumoral (Sebolt-Leopold y Scavone, 1992).

En este sentido, nuestro trabajo con inhibidores, en comparación con los experimentos de carcinogénesis del Dr. Andreas Ludwig, aportan el conocimiento de cuales son las rutas que posiblemente se esten afectando con el uso de inhibidores de PARP y también cuales se alteran cuando no existe la proteína PARP-1. Sabemos por los resultados mostrados en este trabajo de tesis que dos importantes factores de transcripción (NF- κ B y AP-1) descritos en los procesos de tumorigénesis (Hsu y col., 2000) no se encuentran transcripcionalmente activados en condiciones de ausencia de la proteína PARP-1 en las etapas tempranas de promoción tumoral, midiendo su estado de activación mediante la eficacia de estos factores de transcripción para unirse a secuencias específicas del ADN para formar los complejos de transcripción (fig. I-7A y II-5A). Además, se ha comprobado que algunos de los genes regulados por estos factores de transcripción se expresan débilmente en ausencia de PARP-1 (fig. I-7B). Por tanto, creemos que las diferencias observadas respecto

a la susceptibilidad tumoral en ausencia de PARP-1 al final del proceso de carcinogénesis puedan deberse a una deficiente expresión de genes implicados en la progresión tumoral regulados por NF- κ B y AP-1. Es decir, PARP-1 actuaría como un co-activador transcripcional de NF- κ B y AP-1 (Oliver y col., 1999; Hassa y Hottiger, 1999; Andreone y col., 2003).

En el presente capítulo se ha estudiado el uso de inhibidores de PARP-1 como aproximación experimental para elucidar el papel de la inhibición de la actividad enzimática de PARP-1 en el proceso de carcinogénesis. Se ha comprobado como el uso del inhibidor DPQ administrado conjuntamente con el promotor tumoral TPA en las etapas tempranas del proceso de tumorigénesis es capaz por sí mismo de bloquear la trans-activación de AP-1 al núcleo pero no la de NF- κ B (fig. II-5). Este resultado respecto a NF- κ B está en consonancia con los obtenidos por el grupo de investigación del Dr. Michael O. Hottiger en los cuales demuestran que la actividad enzimática de poli-ADP-ribosilación de PARP-1 no es necesaria para la trans-activación de NF- κ B en fibroblastos murinos inmortalizados, es decir, los inhibidores de PARP-1 no afectan a la unión de NF- κ B a las secuencias específicas en los promotores de genes diana regulados vía NF- κ B (Hassa y col., 2001). También en células gliales ha sido demostrado que sólo la delección genética de *parp-1* confiere resistencia a la unión de NF- κ B al ADN (Ha y col., 2002). En este sentido, al no estar afectado NF- κ B en su activación mediante el uso de DPQ, las diferencias observadas en cuanto a la multiplicidad tumoral, incidencia tumoral y retraso temporal en la aparición de tumores en estas condiciones (fig. II-2) deben de ser atribuidas, en parte, a la deficiente activación del factor de transcripción AP-1.

La actividad de AP-1 se regula a dos grandes niveles, por un lado, mediante control de la abundancia de los componentes del dímero, y por otro, a través de la estabilización de los componentes del dímero de AP-1. La abundancia se regula a nivel transcripcional por los respectivos genes, mientras, la estabilidad de la subunidad c-Jun se debe a su fosforilación en los residuos de serina 63 y 73 por la quinasa JNK, la cual a su vez se fosforila por otra quinasa denominada MEK-4, provocando así la activación de la JNK (Davis, 1999; Xia y col., 1998; Kyriakis y col., 1994). En este contexto, se sabe, gracias a los trabajos de la Dra. Basilia Zingarelli, que la ruta de activación de

los distintos componentes del complejo AP-1 se inhibe mediante el uso de inhibidores de PARP-1 (Andreone y col., 2003). Esto implica un nivel de regulación de AP-1 dependiente de la actividad enzimática de PARP-1. Estos autores han demostrado en fibroblastos embrionarios inmortalizados que la inhibición farmacológica de PARP-1 produce alteraciones tanto en el estado de fosforilación de la quinasa aminoterminal de c-Jun (JNK) como en el contenido de c-Jun fosforilado y en la capacidad de unión de AP-1 al ADN. En su trabajo, además sugieren que PARP-1 puede ser requerida para modular de una forma directa la composición del dímero de AP-1. De acuerdo con lo anterior, los estudios realizados con células epidérmicas de ratón a las cuales se les inhibe la actividad de poli-ADP-ribosilación y la actividad quinasa muestran, en ambos casos, supresión de la inducción transcripcional de c-fos cuando se les trata con promotores tumorales (Cerutti y col., 1992). Además, tanto la fosforilación de proteínas como su poli-ADP-ribosilación son necesarias para la inducción transcripcional de c-fos, así como para la síntesis de proteínas que forman el complejo fos-AP-1 (Amstad y col., 1992).

Aunque los resultados mostrados en este capítulo no describen los mecanismos por los cuales la enzima PARP-1, o bien su capacidad de modificar mediante poli-ADP-ribosilación a otras proteínas, pueda ser necesaria para modular la actividad de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, en cambio y según lo descrito anteriormente, nuestros datos sugieren un múltiple papel de PARP-1 en la regulación de los factores de transcripción implicados en fenómenos de tumorigénesis. Por tanto, y teniendo en cuenta el anterior escenario, podemos sugerir un papel dual para PARP-1 en la modulación de la transcripción, de tal modo que ésta pueda ser dependiente de la actividad enzimática de PARP-1 o bien dependiente de la interacción de PARP-1 con otras proteínas o factores de transcripción e independiente de su actividad enzimática. Por ejemplo, ha sido demostrado que PARP-1 interacciona a nivel proteína-proteína con otros factores de transcripción tales como AP-2 (Kannan y col., 1999), Oct-1 (Nie y col., 1998), Ying-Yang-1 (Oei y col., 1997), Tef-1 (Butler y col., 1999) y NF- κ B (Oliver y col., 1999; Hassa y col., 2001) en la regulación de la transcripción de una manera independiente de su actividad catalítica. En contraste, ha sido descrito en ratas que la PARP activa y el polímero de poli-ADP-ribosa se encuentran asociadas a regiones de la

cromatina que están activas desde el punto de vista transcripcional (De Lucia y col., 1996; Kim y col., 2004; Ju y col., 2004), además, de un nivel de regulación de AP-1 dependiente de la actividad enzimática de PARP-1 demostrado en este capítulo y en los trabajos descritos anteriormente (Andreone y col., 2003; Zingarelli y col., 2003; Zingarelli y col., 2004). Esta hipótesis es coherente con nuestros resultados en experimentos de carcinogénesis basados en el tratamiento combinado con DMBA/TPA con ratones deficientes en PARP-1 y ratones salvajes a los cuales se les inhibe la actividad de poli-ADP-ribosilación. En ellos, y según lo descrito en el apartado de resultados correspondiente a este capítulo, se puede comprobar cómo solamente anulando la actividad enzimática de PARP (activación deficiente de AP-1) se consigue situaciones de retraso temporal en la aparición de tumores, disminución del factor de multiplicidad tumoral y valores de incidencia tumoral intermedias entre la condición salvaje (activación de AP-1 y NF- κ B) y *knockout* para *parp-1* (deficiente activación de AP-1 y NF- κ B). Por tanto, el uso de inhibidores de PARP-1 puede ser una herramienta útil en el tratamiento de patologías tumorales como coadyuvante de otras terapias. Además, agentes que anulen la actividad de NF- κ B, o bien que no permitan su activación (como en el caso del bloqueo de la interacción PARP-1-NF- κ B) podrían también ser considerados en la terapia del cáncer en combinación con los agentes quimioterapéuticos o irradiación- γ . Recientemente, el equipo de Thomas Helleday, de la Universidad de Estocolmo, en Suecia, ha demostrado también que el bloqueo de la PARP-1 mediante el uso de inhibidores ofrece resistencia al desarrollo de tumores en ratones deficientes en una proteína de reparación del ADN por recombinación homóloga denominada BRCA2 (Bryant y col., 2005).

2.6 REFERENCIAS

- Amstad, P.A., Krupitza, G. & Cerutti, P.A. Mechanism of c-fos induction by active oxygen. *Cancer Res* **52**, 3952-60 (1992).
- Andreone, T.L., O'Connor, M., Denenberg, A., Hake, P.W. & Zingarelli, B. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 regulates activation of activator protein-1 in murine fibroblasts. *J Immunol* **170**, 2113-20 (2003).
- Baeuerle, P.A. & Baltimore, D. NF-kappa B: ten years after. *Cell* **87**, 13-20 (1996).
- Banasik, M., Komura, H., Shimoyama, M. & Ueda, K. Specific inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase and mono(ADP-ribosyl)transferase. *J Biol Chem* **267**, 1569-75 (1992).
- Bernstein, L.R. & Colburn, N.H. AP1/jun function is differentially induced in promotion-sensitive and resistant JB6 cells. *Science* **244**, 566-9 (1989).
- Bryant, H. E. et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* **434**, 913-917 (2005).
- Butler, A.J. & Ordahl, C.P. Poly(ADP-ribose) polymerase binds with transcription enhancer factor 1 to MCAT1 elements to regulate muscle-specific transcription. *Mol Cell Biol* **19**, 296-306 (1999).
- Cerutti, P., Shah, G., Peskin, A. & Amstad, P. Oxidant carcinogenesis and antioxidant defense. *Ann N Y Acad Sci* **663**, 158-66 (1992).
- Cosi C. New inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase and their potencial therapeutic targets . *Expert Opin. Ther. Patents*. **12**, 1047-1071 (2002).
- Coussens, L.M. & Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* **420**, 860-7 (2002).
- Davis, R.J. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase. *Biochem Soc Symp* **64**, 1-12 (1999).
- D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I. & Poirier, G.G. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* **342 (Pt 2)**, 249-68 (1999).
- Dhar, A., Young, M.R. & Colburn, N.H. The role of AP-1, NF-kappaB and ROS/NOS in skin carcinogenesis: the JB6 model is predictive. *Mol Cell Biochem* **234-235**, 185-93 (2002).
- De Lucia, F., Mennella, M.R., Quesada, P. & Farina, B. Poly(ADPribosyl)ation system in transcriptionally active rat testis chromatin fractions. *J Cell Biochem* **63**, 334-41 (1996).
- Ha, H.C., Hester, L.D. & Snyder, S.H. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 dependence of stress-induced transcription factors and associated gene expression in glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3270-5 (2002).
- Hassa, P.O. & Hottiger, M.O. A role of poly (ADP-ribose) polymerase in NF-kappaB transcriptional activation. *Biol Chem* **380**, 953-9 (1999).
- Hassa, P.O., Covic, M., Hasan, S., Imhof, R. & Hottiger, M.O. The enzymatic and DNA binding activity of PARP-1 are not required for NF-kappa B coactivator function. *J Biol Chem* **276**, 45588-97 (2001).

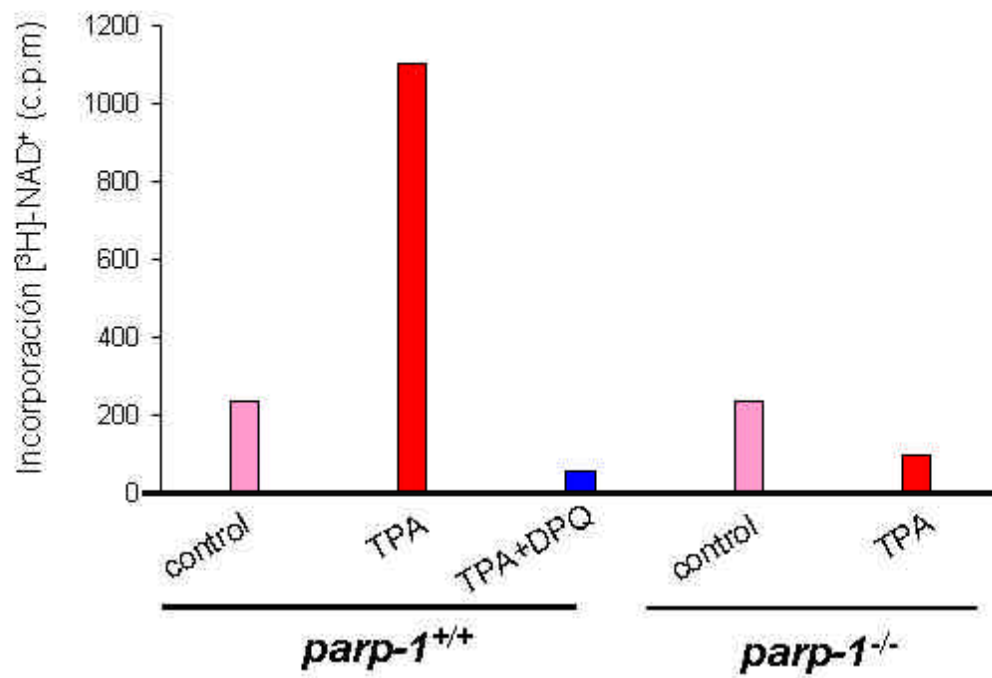
- Hsu, T.C., Young, M.R., Cmarik, J. & Colburn, N.H. Activator protein 1 (AP-1)- and nuclear factor kappaB (NF-kappaB)-dependent transcriptional events in carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* **28**, 1338-48 (2000).
- Huang, M.T. et al. Effects of curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin and tetrahydrocurcumin on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion. *Carcinogenesis* **16**, 2493-7 (1995).
- Ju, B. G., Solum, D., Song, E. J., Lee, K. J., Rose, D. W., Glass, C. K. & Rosenfeld, M. G. Activating the PARP-1 sensor component of the groucho/ TLE1 corepressor complex mediates a CaMKinase IIdelta-dependent neurogenic gene activation pathway. *Cell* **119**, 815-829 (2004).
- Kannan, P., Yu, Y., Wankhade, S. & Tainsky, M.A. PolyADP-ribose polymerase is a coactivator for AP-2-mediated transcriptional activation. *Nucleic Acids Res* **27**, 866-74 (1999).
- Karin, M. et al. Oxidative stress and gene expression: the AP-1 and NF-kappaB connections. *Biofactors* **15**, 87-9 (2001).
- Kim, M. Y., Mauro, S., Gevry, N. Lis, J. T. & Kraus, W. L. NAD⁺-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1. *Cell* **119**, 803-814 (2004).
- Kyriakis, J.M. et al. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* **369**, 156-60 (1994).
- Kraus, W.L. & Lis, J.T. PARP goes transcription. *Cell* **113**, 677-83 (2003).
- Li, Y., Leung, L.K., Spear, B.T. & Glauert, H.P. Activation of hepatic NF-kappaB by phenobarbital in rats. *Biochem Biophys Res Commun* **229**, 982-9 (1996).
- Li, Y., Leung, L.K., Glauert, H.P. & Spear, B.T. Treatment of rats with the peroxisome proliferator ciprofibrate results in increased liver NF-kappaB activity. *Carcinogenesis* **17**, 2305-9 (1996).
- Li, X., Song, L. & Jope, R.S. Cholinergic stimulation of AP-1 and NF kappa B transcription factors is differentially sensitive to oxidative stress in SH-SY5Y neuroblastoma: relationship to phosphoinositide hydrolysis. *J Neurosci* **16**, 5914-22 (1996).
- Ludwig, A., Dietel, M., Schafer, G., Muller, K. & Hiltz, H. Nicotinamide and nicotinamide analogues as antitumor promoters in mouse skin. *Cancer Res* **50**, 2470-5 (1990).
- Martin-Oliva, D. et al. Crosstalk between PARP-1 and NF-kappaB modulates the promotion of skin neoplasia. *Oncogene* **23**, 5275-83 (2004).
- Nie, J. et al. Interaction of Oct-1 and automodification domain of poly(ADP-ribose) synthetase. *FEBS Lett* **424**, 27-32 (1998).
- Oei, S.L. et al. Interaction of the transcription factor YY1 with human poly(ADP-ribosyl) transferase. *Biochem Biophys Res Commun* **240**, 108-11 (1997).

- Oliver, F.J. et al. Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *Embo J* **18**, 4446-54 (1999).
- Purnell, M.R. & Whish, W.J. Novel inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase. *Biochem J* **185**, 775-7 (1980).
- Schenborn, E. & Goiffon, V. A new lysis buffer for luciferase, CAT and β -galactosidase reporter gene co-transfections. *Promega Notes* **41**, 11 (1993).
- Sebolt-Leopold, J.S. et al. Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. *Nat Med* **5**, 810-6 (1999).
- Shaulian, E. & Karin, M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* **4**, E131-6 (2002).
- Surh, Y. Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutat Res* **428**, 305-27 (1999).
- Velasco, M., Diaz-Guerra, M.J., Martin-Sanz, P., Alvarez, A. & Bosca, L. Rapid Up-regulation of IkappaBbeta and abrogation of NF-kappaB activity in peritoneal macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J Biol Chem* **272**, 23025-30 (1997).
- Xia, Y., Wu, Z., Su, B., Murray, B. & Karin, M. JNKK1 organizes a MAP kinase module through specific and sequential interactions with upstream and downstream components mediated by its amino-terminal extension. *Genes Dev* **12**, 3369-81 (1998).
- Xie, Q.W., Kashiwabara, Y. & Nathan, C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **269**, 4705-4708 (1994).
- Yélamo, J. & Oliver F.J. Role of poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in the inflammatory response. *Inmunología* **21**, 219-227 (2002).
- Young, M.R. et al. Transgenic mice demonstrate AP-1 (activator protein-1) transactivation is required for tumor promotion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9827-32 (1999).
- Zingarelli, B., O'Connor, M. & Hake, P.W. Inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase modulate signal transduction pathways in colitis. *Eur J Pharmacol* **469**, 183-94 (2003).
- Zingarelli, B. et al. Activator protein-1 signalling pathway and apoptosis are modulated by poly(ADP-ribose) polymerase-1 in experimental colitis. *Immunology* **113**, 509-17 (2004).

2.7 FIGURAS Y TABLAS

Fig. II-1. Inhibición de la actividad enzimática de PARP-1 por DPQ. **A**, medidas de incorporación $[^3\text{H}]\text{-NAD}^+$ en los extractos nucleares de pieles de los ratones *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* 24 horas después del tratamiento con una única dosis de 25 μg de DMBA más cuatro aplicaciones de 12 μg de TPA en presencia de 30 μg del inhibidor DPQ (TPA+DPQ) o en ausencia de éste (TPA) durante una semana, así como en situaciones de tratamiento control en el cual sólo se aplicó el vehículo acetona (control). **B**, incorporación $[^3\text{H}]\text{-NAD}^+$ en fibroblastos embrionarios inmortalizados *parp-1^{+/+}* 24 horas después de tratamiento con una sola aplicación de TPA (12 μg) en presencia o ausencia de DPQ (30 μg). En este caso, se utilizó también agua oxigenada 1 mM durante 10 minutos como control positivo de la reacción de poli-ADP-ribosilación (H_2O_2). Las barras de error representan el error estándar de las medias (s.e.m) de tres experimentos independientes. * $P < 0.001$ respecto situación control y TPA+DPQ.

A



B

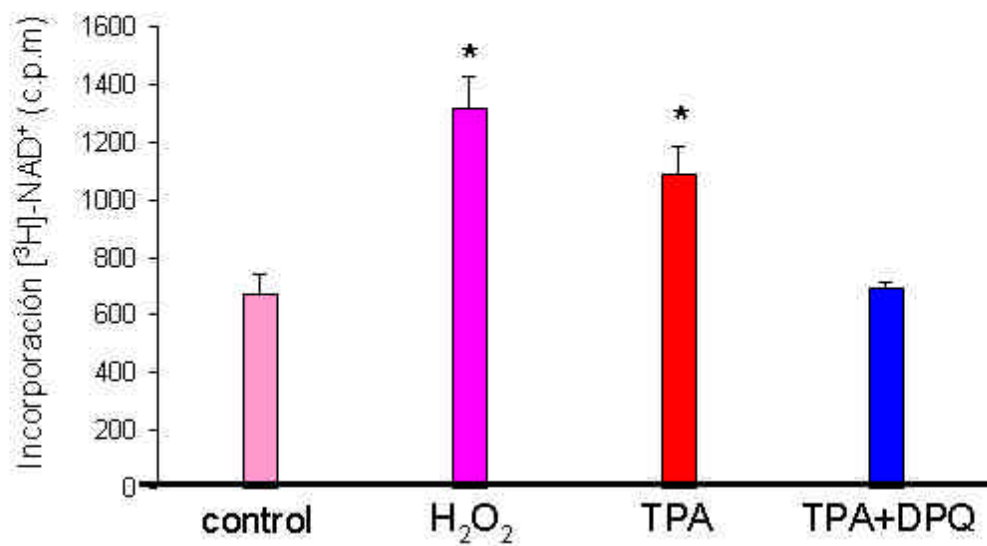
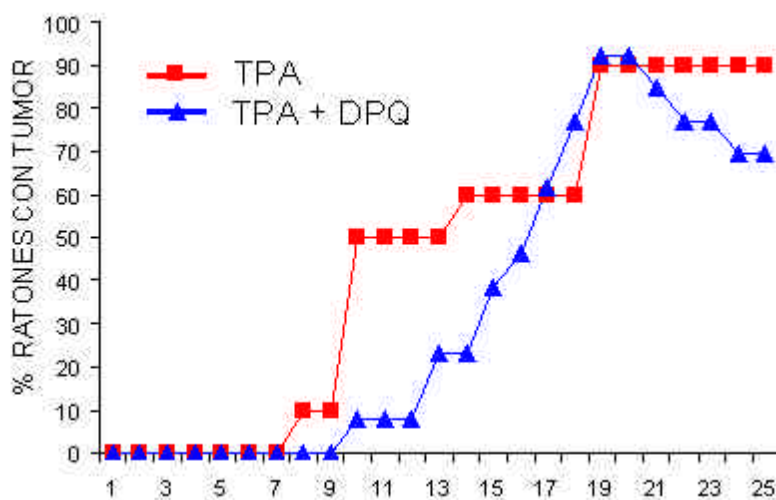
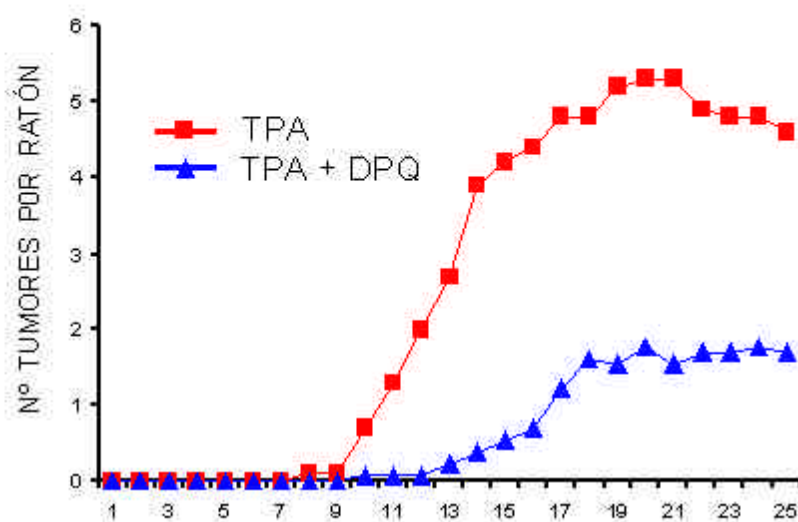


Fig. II-2. Resultado del proceso de carcinogénesis epidérmica en ratones *parp-1^{+/+}* tratados simultáneamente con el inhibidor de PARP. Ambos grupos de ratones fueron tratados con una única dosis de 25 µg DMBA más 12 µg TPA dos veces por semana en presencia o ausencia de 30 µg de DPQ, durante 25 semanas. Los tumores desarrollados fueron registrados y contabilizados semanalmente. **A**, porcentaje de ratones que desarrollan semanalmente tumores tras tratamiento, tanto en ratones tratados en ausencia de DPQ (N=10) (■) como en ratones tratados en presencia del inhibidor (N=13) (▲). **B**, número medio de tumores por ratón desarrollados durante el proceso de tumorigénesis tanto en ratones tratados sin DPQ (N=10) (■) como en ratones tratados simultáneamente con el inhibidor (N=13) (▲). Las diferencias observadas en la multiplicidad tumoral a lo largo del tratamiento resultaron ser estadísticamente significativas ($P < 0.05$). **C**, ejemplos de lesiones papilomatosas al final del tratamiento de carcinogénesis, tanto en ratones *parp-1^{+/+}* en ausencia del inhibidor (izquierda) como en ratones *parp-1^{+/+}* en presencia de DPQ (derecha). Nótese las diferencias en cuanto al número de tumores inducidos y tamaño de éstos entre estos dos grupos.

A



B



C

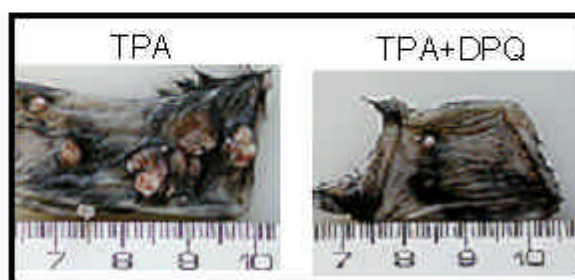
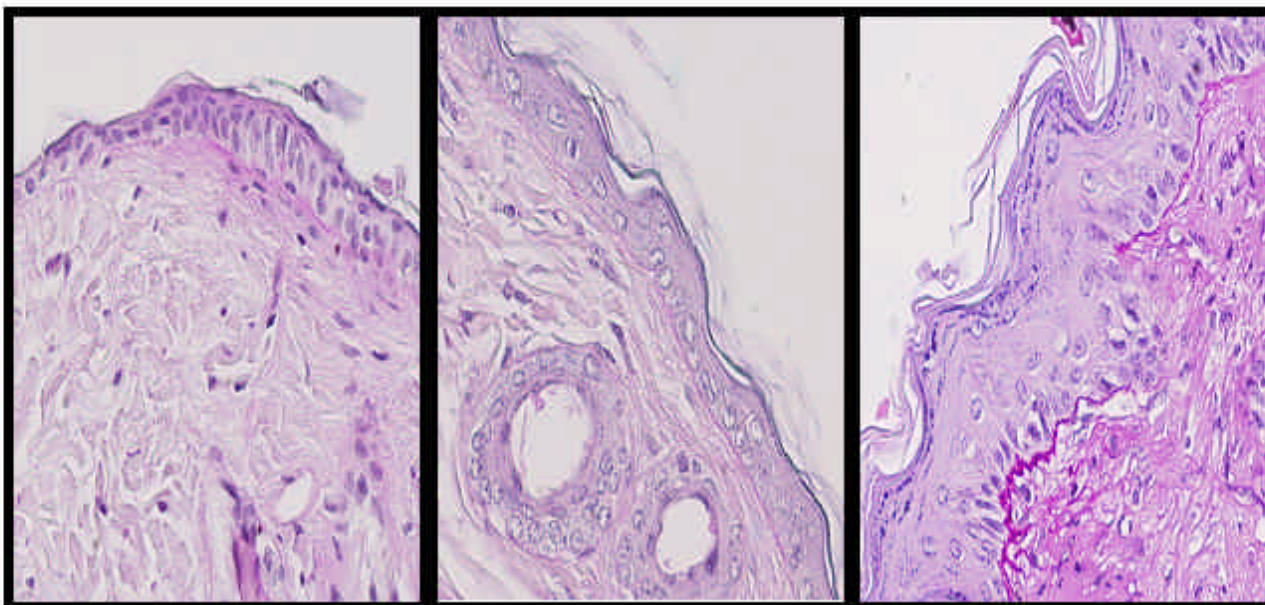


Fig. II-3. Evaluación morfológica de los procesos de hiperplasia epitelial y presencia de infiltrado inflamatorio en la epidermis de ratón al final del proceso de carcinogénesis y en presencia de DPQ. **A**, preparaciones histológicas correspondientes a epidermis de ratón control (izquierda), tratadas con DMBA+TPA en presencia del inhibidor DPQ (centro) o en ausencia de éste (derecha) (PAS X 400). Nótese el escaso espesor de la epidermis en la piel de los ratones tratados en presencia de DPQ (centro) y compárese con el grado de hiperplasia epitelial que muestran la epidermis de los ratones tratados en ausencia del inhibidor (derecha), con un moderado engrosamiento, hipergranulosis e hiperqueratosis. **B**, ejemplo de un acusado infiltrado inflamatorio (PMN neutrófilos indicado mediante flechas negras) en un tumor de ratón tratado con DMBA + TPA en ausencia de DPQ (izquierda) (PAS X 400). Compárese con la escasez de acúmulos de PMN neutrófilos (derecha) en los tumores desarrollados en presencia del inhibidor DPQ (PAS X 400).

A



B

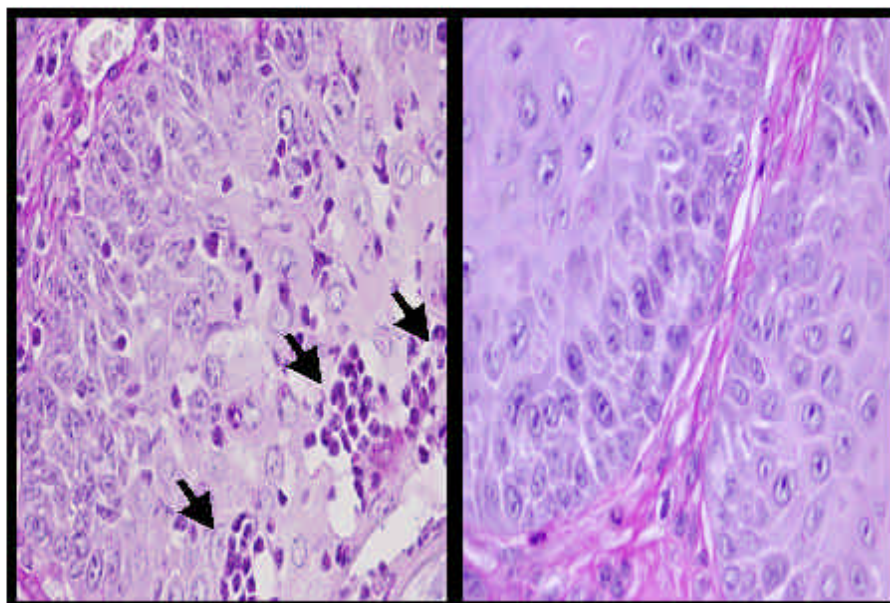
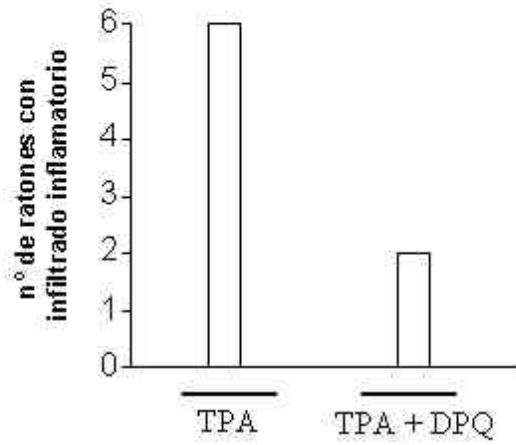
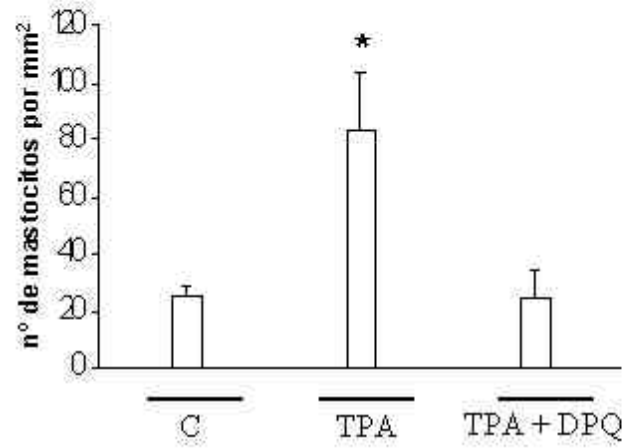


Fig. II-4. Análisis histológico, según criterios morfológicos, del proceso de inflamación, proliferación y muerte celular al final del proceso de carcinogénesis y en presencia de DPQ. Para el estudio cuantitativo se utilizaron secciones histológicas teñidas con la reacción de PAS procedentes de ratones controles (N=2) y ratones iniciados con DMBA, tratados durante 25 semanas con TPA tanto en ausencia (N=6) como presencia de DPQ (N=6) (C: control; TPA: tratados con DMBA + TPA; TPA+DPQ: tratados con DMBA + TPA + DPQ). La realización de los distintos recuentos se llevó a cabo contabilizando el número de estos eventos, según criterio morfológicos, presentes en diez campos distintos por ratón tomados al azar a 600 aumentos de magnificación. **A**, histograma que indica el número total de ratones con presencia de infiltrado inflamatorio en sus tumores. **B**, número medio de mastocitos por mm² en los papilomas de los ratones tratados con DMBA/TPA durante 25 semanas en presencia o ausencia del inhibidor DPQ. Ningún ratón control desarrolló tumores, por ello, el número de mastocitos contabilizado en esta situación corresponde al presente en las pieles controles sin lesión. **C**, número medio de eventos de mitosis (M) y apoptosis (A) por ratón, tanto en los papilomas (panel de la derecha) como en los fragmentos de pieles sin lesión (panel de la izquierda) al final del proceso de carcinogénesis. Ningún ratón control desarrolló tumores, por ello, no fue contabilizado el número de mitosis ni apoptosis en esta situación (panel de la derecha). En los anteriores histogramas las barras de error representan el error estándar de las medias (s.e.m). **P* <0.05 respecto al grupo de ratones controles y tratados en presencia de DPQ; ***P* <0.01 respecto al grupo de ratones controles y tratados en presencia de DPQ; ****P* <0.0001 respecto al grupo de ratones tratados en presencia de DPQ.

A



B



C

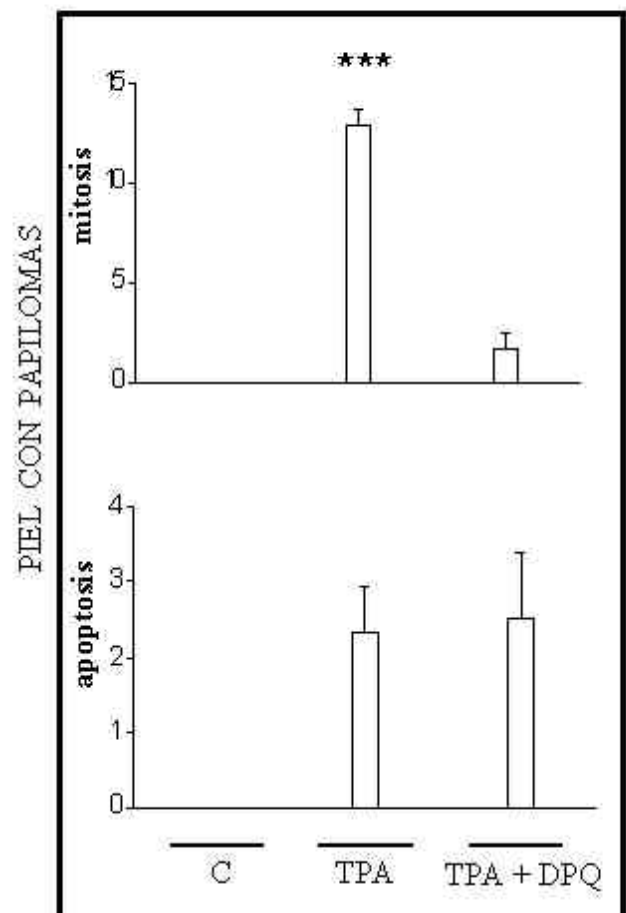
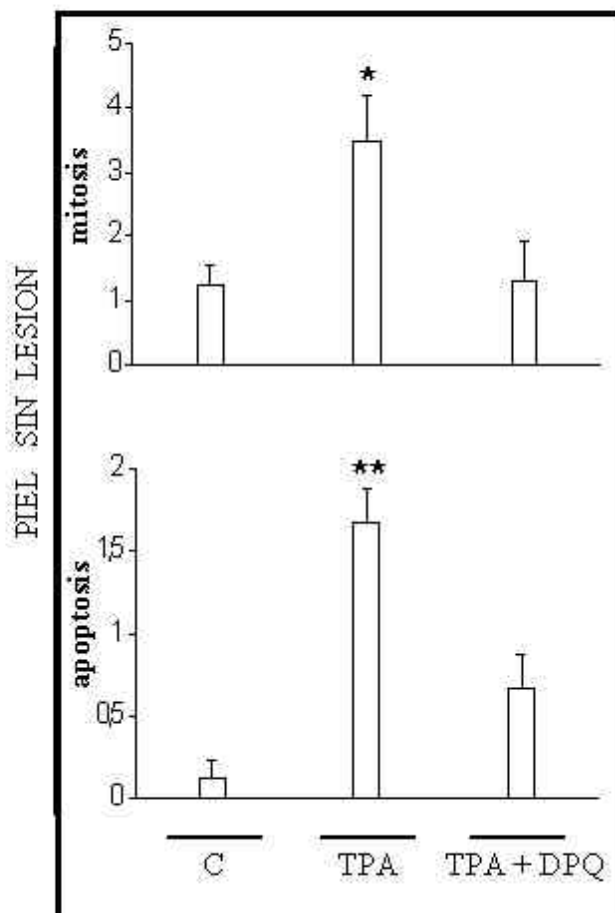
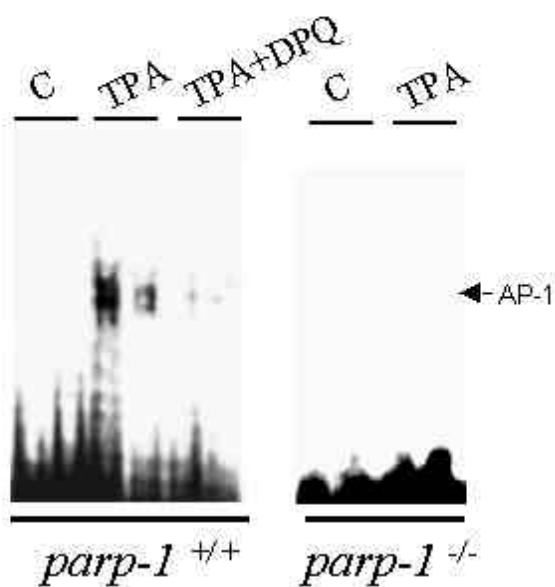
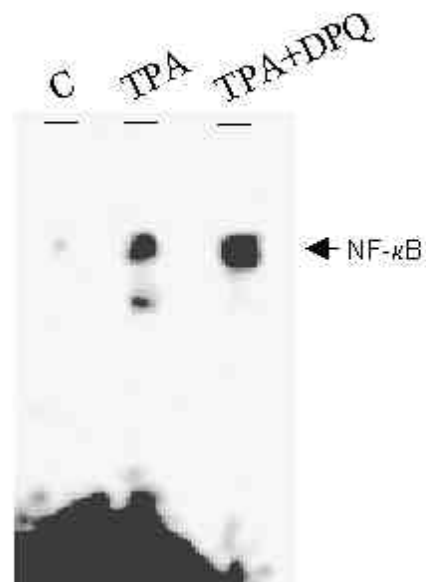


Fig. II-5. Deficiente activación del factor de transcripción AP-1, pero no de NF- κ B, en las etapas tempranas de promoción tumoral con TPA en presencia de inhibidores de PARP. **A**, medidas de la unión de AP-1 a las secuencias TRE del ADN mediante ensayos de geles de retardo o EMSA. Para ello, se utilizó la sonda 32 P-radiactiva que contenía oligonucleótidos con la secuencia TRE de unión para AP-1. Obsérvese como los extractos nucleares procedente de pieles de ratones *parp-1*^{+/+}, 24 horas después del tratamiento con una única dosis de DMBA y cuatro aplicaciones de TPA, administradas junto a DPQ, durante una semana (TPA+DPQ), muestran una disminuida unión de AP-1 al ADN o activación, en comparación con los extractos nucleares de ratones salvajes tratados sólo con DMBA más TPA. Los ratones genéticamente deficientes en *parp-1* también mostraban una disminuida activación de AP-1. En la figura se muestran dos experimentos independientes procedentes de extractos nucleares de dos ratones diferentes para cada condición y genotipo. **B**, medidas de la unión de NF- κ B a las secuencias κ B del ADN mediante ensayos de geles de retardo o EMSA. Para ello, se utilizó la sonda 32 P-radiactiva que contenía la secuencia κ B del promotor perteneciente al gen que codifica para la iNOS. Nótese como los extractos nucleares procedente de pieles de ratones *parp-1*^{+/+}, 24 horas después del tratamiento con una única dosis de DMBA y cuatro aplicaciones de TPA, administradas junto a DPQ, durante una semana (TPA+DPQ), muestran una activación NF- κ B similar a la producida en ausencia del inhibidor (TPA). **C**, densitometría que muestra los niveles relativos de unión de AP-1 al ADN. Para ello, las intensidades de las bandas correspondiente al complejo ADN-AP-1 fueron digitalizadas mediante el escáner *Storm 840 Phospho-Image System* (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) y sus intensidades cuantificadas usando el software ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics). Los distintos niveles de activación han sido obtenidos tomando como referencia un nivel basal de activación de los ratones controles *parp-1*^{+/+} correspondiente a 100 unidades. Las barras de error representan el error estándar de las medias (s.e.m) correspondientes a tres experimentos independientes. * $P < 0.01$ respecto del resto de condiciones. **D**, densitometría que muestra los niveles relativos de unión de NF- κ B al ADN. Para ello, las intensidades de las bandas correspondiente al complejo ADN-NF- κ B fueron digitalizadas mediante el escáner *Storm 840 Phospho-Image System* (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) y sus intensidades cuantificadas usando el software ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics). Los distintos niveles de activación han sido obtenidos tomando como referencia un nivel basal de activación de los ratones controles *parp-1*^{+/+} correspondiente a 100 unidades. Las barras de error representan el error estándar de las medias (s.e.m) correspondientes a cuatro experimentos independientes. * $P < 0.01$ respecto del resto de condiciones.

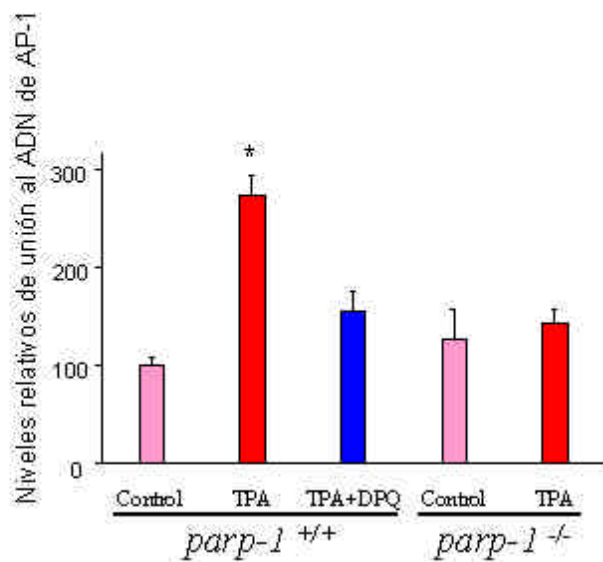
A



B



C



D

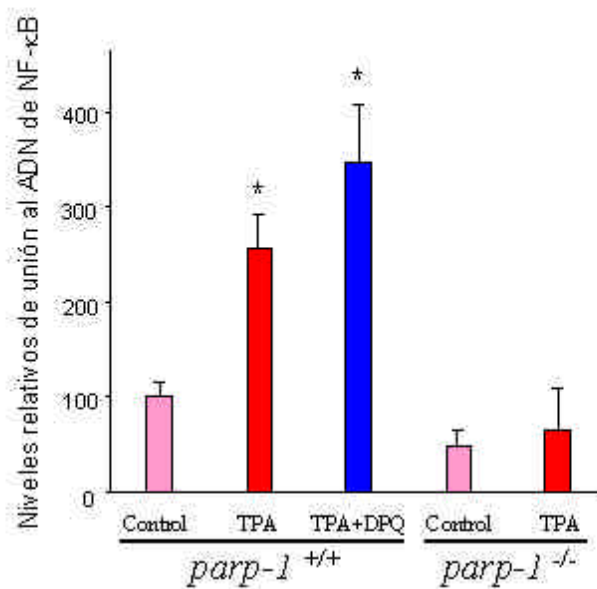


Fig. II-6. Actividad transcripcional dependiente del factor de transcripción NF- κ B en presencia de TPA + DPQ. Ensayo de expresión de un gen chivato de luciferasa bajo el control de un promotor dependiente de NF- κ B. Una vez co-transfectados fibroblastos murinos embrionarios obtenidos de ratones *parp-1^{+/+}* con 1.0 μ g del plásmido NF- κ B/Luciferasa y 0.1 μ g del plásmido β -galactosidasa, fueron tratados con acetona (situación control), TPA (12 μ g) o bien con la mezcla TPA (12 μ g) + DPQ (30 μ g) en un volumen final de 3 ml de medio DMEM suplementado con un 10 % de FBS, durante 24 horas. Los resultados fueron expresados en unidades relativas de luz por segundo (RLU/seg). La normalización de los resultados se llevó a cabo a través de las medidas de la eficiencia de transfección de las diferentes muestras mediante la actividad β -galactosidasa. Las barras de error representan el error estándar de las medias (s.e.m) de dos experimentos independientes. * $P < 0.05$ respecto de la situación control.

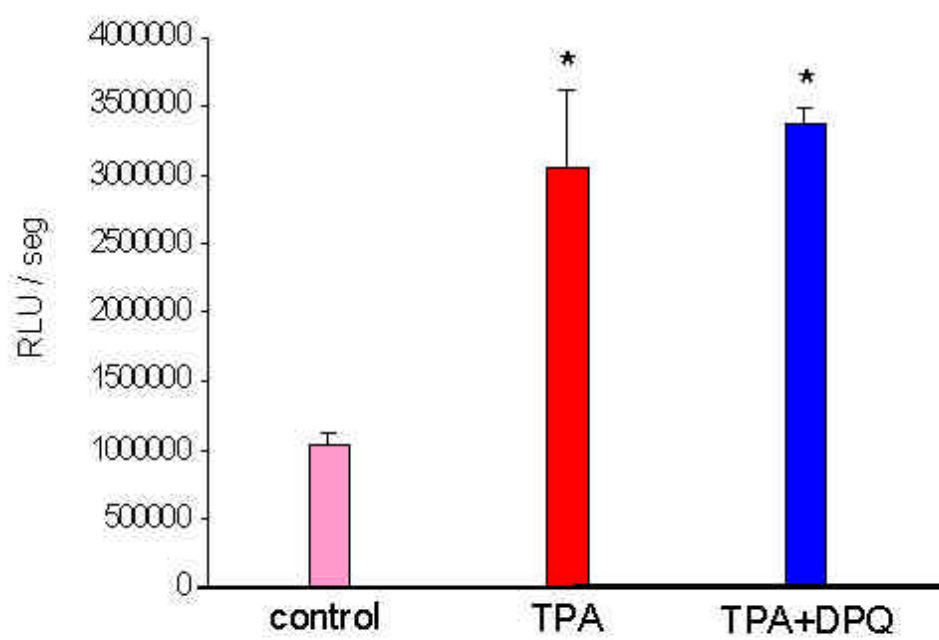


Tabla II-1. Resultados final del proceso de carcinogénesis química en ratones salvajes tratados simultáneamente con DPQ.

tratamiento simultáneo con DPQ	% ratones desarrollan papilomas	Nº ratones desarrollan tumor / ratones totales	Nº medio de tumores por ratón *
NO	90.0	9/10	4.6
SI	69.2	9/13	1.7

* Estas diferencias resultaron ser estadísticamente significativas con una $P < 0.05$ (test de Mann-Whitney)

Tabla II-2. Porcentaje y número total de papilomas con diferentes tamaños según su diámetro al final del proceso de carcinogénesis

diámetro tumor	n° total de papilomas inducidos		% de papilomas	
	TPA (N =10)	TPA+DPQ (N =13)	TPA	TPA+DPQ
>5 mm	6	2	16.2	8.7
1-5 mm	31	12	83.8	52.2
<1 mm	0	9	0	39.1

CAPÍTULO III

EI BLOQUEO DE LA POLI-ADP-RIBOSILACIÓN MODULA LA EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL DURANTE EL PROCESO DE CARCINOGENÉISIS EPIDÉRMICA.

3.1 RESUMEN

A partir de la realización de experimentos de carcinogénesis, basados en la administración sobre las pieles de los ratones del iniciador tumoral DMBA más la aplicación semanal del promotor tumoral TPA junto al inhibidor (DPQ) de la actividad enzimática de PARP, se ha podido concluir que la inhibición farmacológica de PARP redundaba en una menor susceptibilidad a la inducción de tumores de tipo epitelial.

El uso de inhibidores de la reacción enzimática de poli-ADP-ribosilación durante el proceso de carcinogénesis química epitelial supone, por tanto, un buen modelo tumoral para el establecimiento de diferencias de expresión génica en situaciones de bloqueo de la reacción de poli-ADP-ribosilación. En este sentido, el estudio de la expresión génica diferencial mediante la tecnología de los *microarrays de cDNA* es un método idóneo para la detección diferencial de cantidades globales de ARN mensajero durante las etapas claves del desarrollo tumoral. En estas etapas tempranas de promoción tumoral y mediante el uso del inhibidor DPQ se ha podido constatar mediante análisis de *microarrays* una importante desregulación génica que afecta fundamentalmente a genes involucrados en fenómenos de inflamación, angiogénesis y transducción de señales. Las mayores diferencias encontradas afectan a genes como *nfkbi2*, *s100a9*, *hif1a*, además de otros genes con funciones importantes en carcinogénesis. Estas diferencias han sido confirmadas mediante PCR en tiempo real.

Los datos obtenidos nos permiten proponer, en virtud del estudio de expresión génica diferencial durante el proceso de carcinogénesis, tanto en presencia de DPQ como en ausencia de PARP-1, que la inhibición o la delección genética de PARP-1 se asocia a cambios de expresión génica relacionados con desarrollo tumoral. Estos cambios parecen, en gran medida, ser dependientes de la capacidad de PARP-1 para coactivar los factores de transcripción NF- κ B y AP-1.

3.2 INTRODUCCIÓN

El proceso de tumorigénesis se puede entender como un complejo proceso que contiene múltiples etapas, en las cuales una serie de cambios genéticos van a producir la desregulación de la homeostasis celular que conlleva a alteraciones tanto en el control del ciclo celular, proliferación y diferenciación como en la integridad genómica, reparación del ADN e inducción de la apoptosis. Por tanto, el conocimiento de los mecanismos moleculares necesarios en el proceso de tumorigénesis puede ser esencial para el establecimiento de terapias destinadas a la prevención y tratamiento del cáncer. En concreto, la identificación y caracterización de genes involucrados en este proceso y que se activan tras el estímulo oncogénico puede ofrecer una buena aproximación experimental al conocimiento del desarrollo tumoral. En este contexto, el modelo murino de inducción de la carcinogénesis mediante el uso de sustancias químicas es uno de los mejores sistemas para el estudio *in vivo* de la carcinogénesis epitelial (Yuspa, 1994), constituyendo una importante herramienta para el estudio y comprensión de los fenómenos implicados en las distintas etapas del proceso de inducción y promoción tumoral; modelo que puede ser un ejemplo de las neoplasias humanas. En este sistema experimental, el proceso de desarrollo de tumores malignos tipo carcinomas puede ser dividido en tres etapas denominadas, iniciación, promoción y progresión. Mientras las alteraciones genéticas son cruciales en las etapas iniciación y progresión, la etapa de promoción tumoral, proceso limitante del desarrollo tumoral, se caracteriza fundamentalmente por eventos epigenéticos (Marks y Furstenberger, 1990). Los cambios originados en esta etapa de promoción tumoral a nivel de expresión de genes (expresión ARN mensajeros) están estrechamente relacionados con cantidades de proteínas sintetizadas y por tanto con niveles de actividad proteica. Por tanto, se pueden considerar estos cambios a nivel genético como una herramienta para detectar potenciales genes oncogénicos. En este sentido, el estudio de agentes inhibitorios de la expresión de genes potencialmente oncogénicos puede contribuir al establecimiento de nuevas terapias anti-neoplásicas.

Numerosos estudios realizados con anterioridad han intentado detectar cambios en la expresión de genes en procesos tumorales utilizando técnicas de Northern Blot. Actualmente, nuevas técnicas experimentales han surgido para la detección de cantidades globales de ARN mensajero, como es el caso del establecimiento de la tecnología de los *microarrays* de oligonucleótidos y ADNc (Schena y col., 1995; Lockhart y col., 1996). Utilizando esta técnica se ha podido describir un incremento o una disminución en los niveles de expresión génica en los procesos de carcinogénesis, especialmente en tumores epiteliales (Yokota, 2000; Schlingemann y col., 2003). Estos estudios han contribuido a describir diferencias globales de expresión génica en las etapas iniciales de promoción tumoral. En cambio, el estudio que se presenta en este capítulo se centra en el papel del inhibidor de PARP (DPQ) y en el efecto que esta inhibición ejerce sobre la expresión de genes potencialmente oncogénicos en las etapas tempranas de promoción tumoral utilizando la tecnología de los *microarrays* de oligonucleótidos.

Los resultados muestran una importante diferencia en la expresión de genes relacionados con procesos tumorales tanto en ausencia de PARP-1 como inhibiendo farmacológicamente su actividad durante las etapas iniciales de promoción tumoral. Este estudio de expresión génica reviste un particular interés por la posibilidad del uso de inhibidores químicos de PARP-1 como una nueva línea de desarrollo de fármacos con actividad antitumoral en el desarrollo de tumores de origen epitelial.

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 Ratones y protocolo de promoción tumoral.

Ratones *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* tratados con el inhibidor de la actividad enzimática de poli-ADP-ribosilación de PARP (DPQ) fueron sometidos simultáneamente a un protocolo químico de DMBA/TPA destinado a la obtención del ARN mensajero para estudios de expresión génica diferencial en las etapas iniciales de promoción tumoral. Para tal fin, y al igual que en el capítulo anterior, se llevó a cabo un corto protocolo de iniciación/promoción tumoral idéntico al descrito en el estudio de la activación de NF- κ B y AP-1 en las etapas tempranas del proceso de promoción tumoral, tanto en presencia como en ausencia del inhibidor de la actividad enzimática de PARP. Para ello, una única dosis de DMBA (25 μ g) más cuatro aplicaciones de 12 μ g TPA en presencia o ausencia de 30 μ g DPQ fueron administrados sobre las pieles de los ratones, previamente afeitadas, en un intervalo de una semana, de tal forma que dos grupos de ratones formados por cinco ratones cada uno (un ratón *parp-1^{+/+}* control para la aplicación de acetona, un ratón *parp-1^{+/+}* para el tratamiento con el carcinógeno y el promotor tumoral, otro ratón *parp-1^{+/+}* para el tratamiento con el carcinógeno y el promotor tumoral junto al inhibidor de PARP-1, un ratón *parp-1^{-/-}* control para la aplicación de acetona y otro ratón *parp-1^{-/-}* para el tratamiento con el carcinógeno y el promotor tumoral) fueron tratados un miércoles con 100 μ l DMBA, o en su caso con 100 μ l de acetona, jueves y viernes tratados con 200 μ l de TPA o TPA + DPQ, o en su caso con 200 μ l de acetona, se dejaron descansar el fin de semana, posteriormente, lunes y martes se trataron con 200 μ l de TPA o TPA + DPQ, o en su caso con 200 μ l de acetona, y 24 horas después de la última aplicación de TPA o TPA + DPQ fueron sacrificados según los métodos de eutanasia del Servicio de animalario del CSIC y a continuación diseccionada la piel tratada para su conservación en N₂ en espera de la obtención del ARN total.

3.3.2 Extracción, purificación y precipitación del ARN.

Para la extracción del ARN total procedente de las biopsias de pieles de ratón obtenidas según el apartado anterior se procedió de igual forma a la descrita en la sección de materiales y métodos correspondiente al capítulo I. Es decir, las muestras de aproximadamente 1 cm² provenientes de su conservación en N₂ líquido se introdujeron en un mortero-triturador preparado específicamente para la disgregación de material biológico. El material resultante de la disgregación mecánica se introdujo en un tubo eppendorf de 1.5 ml tratado con DEPC (Sigma) conteniendo 1 ml de Trizol (Gibco) para su posterior procesado. Dado que la calidad del ARN utilizado es crítica para un marcaje correcto del ADNc del *microarray*, se llevó a cabo una purificación y digestión con ADNasas del ARN obtenido. Por ello, una vez obtenido el precipitado que constituye el ARN total se procedió a su purificación mediante el uso de columnas utilizando el *Rneasy Mini Kit* (Qiagen) y tratamiento posterior con ADNasas (*RNase-Free DNase Set*, Qiagen) según instrucciones del fabricante. Al final de este proceso se obtuvo 100 µl de eluido, el cual se sometió a un proceso de precipitación. Para ello, se añadió entre 0.2-0.4 µl de acrilamida lineal (5 µg/µl, Ambion), 0.5 volúmenes (50µl) de AcNH₄ 7.5M (Merck) y 2.5 volúmenes (250 µl) de etanol absoluto (Merck). A continuación se dejó reposar durante toda la noche a -20 °C. Al día siguiente se centrifugó la mezcla a 13.000 r.p.m. durante 30 minutos a 4 °C para separar el precipitado. Se lavó a continuación el precipitado obtenido varias veces con 500 µl de etanol al 70 % y se centrifugó de nuevo durante 5 minutos a 13.000 r.p.m. Se repitió de nuevo otra vez el lavado con etanol y se dejó secar al aire. El precipitado obtenido finalmente se resuspendió en 20 µl de agua-DEPC, se incubó 5 minutos a T^a ambiente y posteriormente durante 5 minutos a 55 °C para facilitar la resuspensión del ARN total.

A continuación, de cada muestra se recogen 0.5 µl de ARN (dilución 1:200) para su cuantificación en el espectrofotómetro (Eppendorf). El resto, se conserva a -80°C hasta su utilización. La concentración de ARN se calculó sabiendo que una unidad de absorbancia medida a 260 nm equivale a 40 µg/ml de muestra. También se obtuvo la relación entre absorbancia a 260 nm y absorbancia a 280 nm (ABS_{260}/ABS_{280}) para determinar el grado de pureza de las muestras. Ocurre que para ensayos de hibridación de *microarrays* son

necesarias cantidades de ARN total superiores a 4 µg/µl, como quiera que el resultado de obtención de ARN fue para algunos de los puntos problemas a estudiar bastante inferior a esta cantidad (la cantidad de ARN total obtenida osciló entre 0.3 - 9.0 µg/µl), se decidió realizar una amplificación de todo el ARN obtenido con la finalidad de obtener ARN mensajero amplificado, del cual sólo era necesario 2.5 µg por cada reacción de hibridación.

3.3.3 Amplificación de ARN mensajero (aRNA) a partir de ARN total.

El análisis de los niveles de expresión génica diferencial a nivel de ARN se ha llevado a cabo mediante la tecnología de los *microarrays*. Dado que la calidad y cantidad del ARN utilizado es crítica para un marcaje correcto del ADNc del *microarray*, por ello, fue necesario una etapa previa de transcripción inversa a partir de ARN total destinada a la obtención ARNm amplificado utilizando el cebador T7-dT (5' -TCT AGT CGA CGG CCA GTG AAT TGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCG T₂₁- 3', Ambion) que contiene un sitio de unión para la ARN polimerasa T7 (Van Gelder y col., 1990; Eberwine, 1996). Para ello, entre 2 – 4 µg de ARN total fueron incubados con 0.5 µl de cebador T7-dT (0.5 µg/µl) en un volumen final de 10 µl para la síntesis de la primera de las hebras del ADNc utilizando el *SuperScript Choice for cDNA synthesis kit* (Gibco) según las recomendaciones del fabricante. Para la síntesis de la segunda hebra del ADNc se utilizó la actividad enzimática de la ADN polimerasa I (*SuperScript Choice for cDNA synthesis kit*, Gibco) en un volumen final de reacción de 75 µl conteniendo una unidad de ARNasas y 20 unidades de polimerasas. Posteriormente se realizó la extracción en fenol/cloroformo (Ambion) del ADNc sintetizado utilizando las columnas *Phase Lock gel 0.5 ml Light* (Eppendorf) según las recomendaciones aportadas por el fabricante. A continuación, se precipitó el ADNc (150 µl) con 0.5 volúmenes (75 µl) de AcNH₄ 7.5M (Merck), 2.5 volúmenes (375 µl) de etanol absoluto (Merck) y 1 µl de acrilamide lineal (5 µg/µl, Ambion) de igual forma a la descrita anteriormente para el ARN total pero con la salvedad de que el precipitado obtenido fue disuelto en 8 µl de agua-DEPC.

La segunda etapa de este proceso, una vez sintetizado ADNc de doble cadena con el sitio de unión para la ARN polimerasa T7, fue la realización de la

reacción de transcripción *in vitro* (IVT) para la obtención de ARNm amplificado. Para ello, se utilizó el *MegaScript T7 kit* (Ambion), de tal modo que para cada reacción de IVT fue necesario 8 μ l de ADNc de doble cadena, 2 μ l de tampon 10X T7, 2 μ l de cada desoxirribonucleótido (ATP, CTP, GTP y UTP, 100 mM) y 2 μ l de la enzima ARN polimerasa T7. Las mezclas de IVT se incubaron durante toda la noche a 37 °C en un termociclador de PCR (Eppendorf). Al día siguiente se trataron las muestras con 1 μ l de ADNasas (*RNase-Free DNase Set*, Qiagen) durante 30 minutos a 37 °C para eliminar el ADNc molde, y también, se procedió a la eliminación de los desoxirribonucleótidos no incorporados en la reacción de IVT mediante la extracción del ARNm amplificado usando Trizol (Gibco) y las columnas *Phase Lock gel 2 ml Heavy* (Eppendorf) según las recomendaciones del fabricante y posterior precipitación usando el protocolo descrito anteriormente para la extracción, purificación y precipitación de ARN a partir de Trizol. El precipitado obtenido fue resuspendido en 12 μ l de agua-DEPC.

Por último, se realizó una cuantificación y chequeo del ARNm amplificado (aRNA) utilizando sendos análisis espectrofotométricos y electroforéticos, destinados a medir la cantidad/pureza y viabilidad/tamaño del aRNA obtenido, respectivamente. La relación de densidad óptica A_{260}/A_{280} del aRNA resultó estar en torno al valor 2, valores aceptables de pureza de ARN para la realización de los análisis de expresión génica. Para la visualización de los transcritos se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (*Seakem Le agarose*, Cambrex) añadiéndole bromuro de etidio (Sigma) hasta una concentración final de 0.5 μ g/ml. A continuación se cargó 1 μ l de las muestras con 6 – 7 μ l de buffer de carga (0.25% de azul de bromofenol, 0,25% de xilencianol, 30 % de glicerol en agua). Se dejó correr a 60 voltios durante 1/2 hora aproximadamente en la cubeta de electroforesis de ADN (Bio-rad), tras lo cual se visualizó mediante exposición a luz ultravioleta usando un transiluminador UV (302 nm) acoplado a una cámara digital (Bio-rad). En este caso debido al considerable rendimiento del proceso de obtención de aRNA no fue necesario el uso del bioanalizador para medir la muestra.

3.3.4 Preparación del cDNA fluorescente para *microarrays* a partir de ARN mensajero amplificado (aRNA).

Esta técnica junto a la hibridación y lectura de los *microarrays* y anterior amplificación del ARN mensajero han sido llevada a cabo en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) en el área de Patología Molecular bajo la dirección del Dr. Miguel Angel Piris y la Dra. Raquel Villuendas, además de la inestimable ayuda del personal técnico. Para el marcaje fluorescente de la sonda de ratón (cDNA) que posteriormente se hibridará con los oligonucleótidos del *microarray* es necesario, de nuevo, otra reacción de retro-transcripción o transcripción inversa a partir del aRNA obtenido anteriormente para sintetizar cDNA como sonda, pero en este caso, entre los nucleótidos aportados para tal reacción, uno de ellos, se encuentra marcado bien con el fluorocromo cianina 3 (Cy3, fluorescencia verde) o bien con cianina 5 (Cy5, fluorescencia roja). Para ello, se distinguieron dos tipos de muestras (aRNA), por un lado, las muestras de referencia o controles (ratones *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* tratados con sólo acetona), que serían marcados con Cy3, y las muestras problemas (ratones *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* tratados con TPA o TPA + DPQ) que serían marcados con Cy5. Una tarea importante fue la de asignar en cada grupo de ratones, a cada muestra problema su respectivo control. Esto se realizó de tal forma que para los ratones *parp-1^{+/+}* tratados con TPA y TPA + DPQ se les asignó la misma muestra control (ratón *parp-1^{+/+}* tratados con sólo acetona). De igual forma se actuó con los ratones *parp-1^{-/-}*, aunque en este caso no se utilizó ningún ratón tratado con TPA más inhibidor, dado que estos ratones son deficientes genéticamente en *parp-1*.

La reacción de retro-transcripción fue llevada a cabo utilizando el *SupertScriptTM II Rnase H Reverse Transcriptase Kit* (Invitrogen) de tal forma que 2.5 µg de aRNA, 1.5 µg de *random* hexámeros (Promega), 0.5 µl de dNTPs (25 mM de dATP, dCTP, dGTP y 5 mM dTTP, Fermentas), 1.5 µl de dUTP-Cy3 o dUTP-Cy5 (10 mM) (según sea aRNA de muestra control o problema, Amersham), 5 µl *First-strand buffer* (5x) (*SupertScriptTM II Rnase H Reverse Transcriptase Kit*, Invitrogen), 2.5 µl de DTT (0.1 M) (*SupertScriptTM II Rnase H Reverse Transcriptase Kit*, Invitrogen), 0.75 µl de inhibidor de ARNasas (*Rnasin ribonuclease inhibitor*, Promega) y 1.25 µl de la enzima transcriptasa inversa *SuperScript II* (200 U/µl, *SupertScriptTM II Rnase H Reverse Transcriptase Kit*,

Invitrogen) en un volumen final de 20 µl, fueron utilizados para sintetizar cDNA marcado tras incubación de la mezcla a 37 °C durante 2 horas.

Posteriormente se realizó la degradación del aRNA molde mediante hidrólisis alcalina añadiendo 12.5 µl de NaOH (0.1 N) sobre las muestras, incubación a 70 °C durante 10 minutos y posterior neutralización del pH (adición de otros 12.5 µl de HCl 0.1 N). A continuación, se realizó la purificación del cDNA marcado utilizando las columnas *CyScribe™ GFXTM Purification Kit* (Amersham) mediante el protocolo descrito por el proveedor. Hasta este momento el cDNA marcado obtenido a partir de 2.5 µg de aRNA de la muestra control y problema habían sido manipulados de forma independiente. A partir de ahora, ambos cDNA marcados respectivamente con dUTP-Cy3 y dUTP-Cy5 se combinan para hibridarse conjuntamente. Por tanto, los 60 µl de cada uno de los cDNAs marcado y purificado usando las columnas de *GFX* son combinados para su posterior precipitación conjunta. También se añadió a la mezcla de cDNAs 20 µl de *Mouse COT-1 DNA* (1 µg/µl, Invitrogen) como agente bloqueante de los sitios no específicos en las hibridaciones. La precipitación de la mezcla se realizó utilizando 1/10 volúmenes de acetato sódico 3 M (Merck) y 2.5 volúmenes de etanol 95-100% (Merck) tal y como se ha descrito anteriormente. El precipitado obtenido fue resuspendido en 42 µl de tampón de hibridación 1x (*Microarray hybridization buffer*, Ambion). Esta cantidad resultó ser suficiente para cubrir la superficie del cristal del *array* a hibridar (aproximadamente 22 x 60 mm). Antes de proceder a la hibridación de los cristales del *array*, se añadió a la mezcla de cDNAs 2 µl de una mezcla de agentes bloqueadores (10 µg de ADN poli-dA y 4 µg de ARN de levaduras, Invitrogen). Finalmente se desnaturalizaron las muestras marcadas para favorecer la hibridación mediante la incubación de las mismas a 95 °C durante 3 minutos.

3.3.5 Hibridación de los *microarrays*.

Previo a la hibridación de los *microarrays* se realizó el lavado de los cristales que contienen el *oncochip* de ratón. Este *oncochip* (*The mouseChip CNIO 15.4K*) es un *microarray* de cDNA que ha sido especialmente diseñado para el diagnóstico de diferencias de expresión génica por la Unidad de

Genómica del CNIO, tomando como referencia los clones descritos en el *National Institute on Aging/NIH Mouse 15K cDNA Clone Set Array* (<http://lgsun.grc.nia.nih.gov/>). Este *microarray* contiene 21168 pocillos o *spots*, de los cuales 15803 son secuencia únicas de cDNA, distribuidas en 4615 clones de secuencias de genes implicados en diversos procesos, tales como cáncer, angiogénesis, apoptosis, transducción de señales y procesos de estrés celular y 11096 clones para genes desconocidos o con función desconocida. 1661 de los genes presentes en el *microarray* están representados al menos por dos diferentes secuencias de cDNA. Además, se incluyen diversos controles de hibridación y normalización compuesto por cDNAs proveniente de *Arabidopsis thaliana* y *Saccharomyces cerevisiae*, cDNAs de genes de control interno de expresión (*housekeeping*) procedente de ratón y humano. La versión de los cristales de *mouseChip CNIO 23K* utilizado fue la 2.4, y en total se utilizaron seis cristales (del nº 031103.60 al 031103.65, ambos inclusivos) para seis hibridaciones. Es decir, una primera hibridación fue realizada usando la mezcla de cDNAs marcadas provenientes del ARN de ratones *parp-1^{+/+}* controles *versus* tratados con TPA, de igual forma una segunda hibridación se llevó a cabo utilizando ARN de ratones *parp-1^{+/+}* controles *versus* tratados con TPA en presencia del inhibidor DPQ, y una tercera hibridación se realizó con el cDNAs de ratones *parp-1^{-/-}* control *versus* tratados con TPA. Otras tres idénticas hibridaciones fueron también realizadas en paralelo usando otro grupo de ratones de otro experimento independiente.

El lavado de los cristales tiene como objetivo evitar los fenómenos de "cometas" tras la hibridación. Por ello, una vez extraído los cristales de sus respectivas cámaras de vacío se incuban en agitación suave usando un agitador orbital durante 5 minutos a temperatura ambiente en una solución de SDS (sodio dodecil sulfato, Sigma) al 0,1%. A continuación, se enjuagan los cristales con agua abundante y se introducen en un microondas durante 3 minutos a potencia máxima para desnaturalizar las sondas (oligonucleótidos) impresas en el cristal. Posteriormente se enjuaga de nuevo con agua abundante y se introduce a continuación en una cubeta con 200 ml de solución de pre-hibridación (40 ml de 20x SSC- cloruro sódico y citrato sódico- , 2 ml de SDS-Sigma al 10 %, 400 µl de albúmina sérica bovina-Sigma al 10 % y agua hasta completar los 200 ml) durante 45-60 minutos en un horno de hibridación

a la temperatura de 65 °C, se enjuaga de nuevo con agua abundante y se centrifugan a 500 g los cristales para su secado durante 5 minutos. Una vez secos los cristales se introducen en sus respectivas cámaras de hibridación (Corning).

A continuación, se lleva a cabo la hibridación de los cristales mediante el depósito de la muestra marcada (aproximadamente 45 µl) sobre la cara impresa del *microarray* con la ayuda de una micropipeta. Para evitar una distribución heterogénea de la muestra marcada se aplicó la mezcla de hibridación en varias zonas del área impresa del cristal. Rápidamente, para evitar la evaporación y precipitación de la solución de hibridación y de forma manual se colocó un cubre objetos especial (*Hybri-slips* 22x60 mm, Sigma) para que solape con la superficie impresa. Posteriormente, se cerró la cámara de incubación y se incubó en un horno de hibridación a 42 °C en oscuridad durante 15-20 horas.

Una vez finalizado el periodo de incubación de la hibridación se procedió a un nuevo lavado de los cristales hibridados. Durante los lavados se evitó en todo momento el secado de los cristales para evitar así un fuerte ruido de fondo. Asimismo, todos los lavados se realizaron en condiciones de oscuridad. Para ello, se abrió la cámara de incubación evitando movimientos bruscos que desplazaran el cubre objetos colocado encima del *microarray*, y se despegó el cubre objetos de la superficie del cristal mediante la inmersión de éste en una cubeta con 50 ml de tampón de lavado 1 (SSC 2x y SDS al 0.5 %) precalentado a 42 °C. Una vez despegados los cubre objetos, se realizó un primer lavado de 15 minutos con 600 ml de tampón 1. Se dejó 10 minutos en la estufa a 42°C y luego 5 minutos en el agitador orbital a temperatura ambiente. Se repitió dos veces más el mismo lavado con tampón 1. A continuación se llevaron a cabo 3 lavados más de 15 minutos cada uno con el tampón de lavado 2 (SSC 0.5x y SDS al 0.5 %). Se dejó 10 minutos en la estufa a 42°C y 5 minutos en el agitador orbital a temperatura ambiente en cada uno de los lavados. Finalmente, se centrifugaron los cristales a 800g durante 5 minutos para su definitivo secado. Se protegieron los cristales de la luz guardándolos en un envase adecuado (cajas opacas para porta objetos, Shandon) en espera de su lectura en el escáner.

3.3.6 Lectura y análisis de los datos de la hibridación con *microarrays*.

La intensidad de fluorescencia de las hibridaciones realizadas correspondiente a los fluorocromos Cy3 (máxima emisión a 565 nm) (cDNA hibridado de la muestra control) y Cy5 (máxima emisión a 667nm) (cDNA hibridado de la muestra problema) para cada uno de los *spots* de cada uno de los cristales fueron escaneados usando el escáner *Scanarray 5000 XL* (GSI Lumonics Kanata, Ontario, Canada) y cuantificado usando el software *GenePix Pro 4.0* (Axon Instruments Inc., Union City, CA). Una vez escaneados y cuantificados los cristales, se les aplicó una herramienta informática denominada DN MAD (*Diagnosis and Normalization for MycroArray Data*) destinada a normalizar los resultados (<http://dnmad.bioinfo.cnio.es/>) (Tamames y col., 2002; Herrero y col., 2003). Una vez normalizados los resultados, sólo se consideraron aquellas diferencias en la abundancia de ARN que suponían un incremento tanto positivo como negativo superior a dos veces (*two-fold* > 1 ó *two-fold* < 1) entre las condiciones de reposo (muestra control) y las condiciones de tratamiento (TPA o TPA + DPQ) reproducidas en ambas hibridaciones realizados con los diferentes grupos de animales para la misma condición. En todos los *microarrays* hibridados, el incremento en los niveles de fluorescencia emitida por el fluorocromo Cy3 (fluorescencia verde) sobre Cy5 (fluorescencia roja), o viceversa, se corresponde con un aumento de hibridación del cDNA control respecto al cDNA problema, o viceversa, lo que conlleva un aumento en la misma proporción en la cantidad de transcritos iniciales.

3.3.7 PCR en tiempo real.

La reacción de PCR en tiempo real se llevó a cabo en el termociclador *iCycler iQ detection system* (Bio-Rad) usando los reactivos *iQ SYBR Green Supermix 2x* (Bio-Rad). Este *kit* contiene el agente intercalante SYBR Green específico de ADN de doble cadena, de tal forma que, conforme se va sintetizando ADN, se va uniendo a él y emite fluorescencia (absorción a 497 nm y emisión a 520 nm) que es recogida por el sistema detector en cada uno de los ciclos de la PCR. Estos agentes intercalantes son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de

doble cadena. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación (Wittwer y col., 1997). Los termocicladores para llevar a cabo la PCR a tiempo real incorporan un lector de fluorescencia para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realiza la amplificación (Higuchi y col., 1993). En la PCR a tiempo real de Bio-Rad el programa informático *iCycler* va registrando el incremento de fluorescencia (proporcional al aumento de ADN) en cada ciclo, y esta información se refleja gráficamente en curvas de cinética de la reacción para cada una de las muestras y controles. El ciclo de la PCR en el que se empieza a detectar el aumento de fluorescencia se denomina ciclo umbral (Ct, de *threshold cycle*) y es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN presente en la muestra. Por tanto comparando los Ct de las distintas muestras a ensayar se puede calcular el incremento de una determinada muestra respecto a una condición control.

Este sistema de detección tiene la ventaja de que la optimización de las condiciones de la reacción es relativamente fácil. El principal inconveniente del SYBR es su baja especificidad, debido a que se unen de manera indistinta a productos generados inespecíficamente o a dímeros de cebadores, muy frecuentes en la PCR. Por ello y para detectar posibles inespecificidades, el sistema de PCR en tiempo real *iCycler iQ detection system* (Bio-Rad) posee un sistema de análisis denominado análisis de *Melting Point* o curva de desnaturalización por calor que es necesario para interpretar los resultados con el fin de asegurar la especificidad de los mismos (Ririe y col., 1997). En este análisis, las curvas de desnaturalización por calor de muestras positivas muestran un sólo pico definido a temperaturas superiores a 81.5 °C. Sin embargo, en muestras negativas, se observan otros picos a temperaturas inferiores a 81 °C, correspondientes a dímeros de cebadores generados durante la amplificación. Para validar los resultados obtenidos, también se realizan curvas patrón destinadas a comprobar el efecto de duplicación del ADN en cada ciclo de la PCR, independientemente de la concentración del ADN utilizada, de tal modo que esta recta patrón obtenida con diluciones

seriadas debe de tener un coeficiente de correlación > 0.98 y una pendiente cuyo valor oscile entre $(3.2 - 3.4) \pm (0.1)$, además de una eficiencia de PCR próxima al 100 %. Para evitar estas inespecificidades también es recomendable iniciar la reacción de síntesis de ADN a temperaturas elevadas (*hot-start PCR*) lo cual disminuye de forma notable el riesgo de amplificaciones inespecíficas.

Para la realización de la PCR en tiempo real, 0.250 μg del aRNA obtenido para los ensayos de *microarrays* fueron utilizados para la obtención de ADN complementario (ADNc) mediante transcripción inversa utilizando los reactivos aportados por el *Kit iScript cDNA Synthesis* (Bio-Rad), con oligos d(T)₁₆ y hexámeros aleatorios como cebadores y la enzima MMLV como transcriptasa inversa, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La transcripción reversa se llevó a cabo usando el programa térmico definido por el fabricante consistente en incubaciones a 25°C durante 5 minutos (pre-incubación), 42 °C durante 30 minutos (transcripción reversa), 85 °C durante 5 minutos (inactivación del enzima) y refrigeración a 4 °C. Las reacciones de PCR en tiempo real se llevaron a cabo, tal y como se ha comentado anteriormente, usando el *kit* comercial *iQ SYBR Green Supermix 2x* (Bio-Rad). Cada reacción de SYBR Green (volumen total 25 μl) se realizó por triplicado utilizando para cada una de ellas 12.5 μl de reactivos *Supermix 2x*, 0.5 μM de cada uno de los cebadores tanto sentido como antisentido, 1 μl de ADNc y cantidad suficiente de agua hasta completar los 25 μl de reacción. Otra serie de reacciones utilizando 1 μl de agua en vez de ADNc fueron realizadas conjuntamente como control negativo de la reacción de amplificación. Para verificar que el fluorocromo SYBR Green sólo detectó un producto de PCR, todas las reacciones se sometieron al protocolo de disociación por calor después del último ciclo (40 ciclos) de la PCR (Ririe *et al.*, 1997). El perfil térmico utilizado para cada reacción de PCR fue el preestablecido en el software *iCycler iQ detection system* (Bio-Rad), con la salvedad de que la temperatura utilizada para la etapa de hibridación de la PCR correspondiente a las temperaturas óptimas de hibridación de cada uno de los cebadores utilizados, se puso a punto utilizando diferentes gradientes de temperaturas y observando en cual de ellas se producía un menor valor del Ct para cada curva de amplificación junto a una óptima curva de desnaturalización. Aquella temperatura de hibridación óptima obtenida para cada uno de los cebadores

fue utilizada en cada una de las etapas de hibridación de la PCR. La detección directa de los productos de PCR se monitorizó midiendo el incremento en la fluorescencia causada por la unión del colorante SYBR Green al ADN de cadena doble y calculando el valor Ct correspondiente a cada una de las muestras, como se describió previamente (Wittwer y col., 1997). Todas las muestras fueron normalizadas respecto a un gen de referencia (*housekeeping*) usado como control interno para la normalización de los datos. Ocurre que existían evidencias, tanto por los resultados del *microarray* como por otros trabajos (Zhong y col., 1999) en cuanto a la expresión variable del gen de referencia *GAPDH* bajo condiciones de hipoxia y carcinogénesis. De entre todos los genes *housekeeping* revisados bajo las anteriores condiciones el *18S rRNA* junto el *28S rRNA* fueron los menos variable (*28S* y *18S* se transcriben en un mismo ARNr 45S que es después cortado para obtener los distintos ARNr) y por ello, se decidió utilizar el *18S rRNA* como gen de referencia para los procesos de normalización (Burbach y col., 2003).

Para realizar el estudio cuantitativo de expresión génica mediante PCR en tiempo real se utilizó el método de comparación del valor de la Ct obtenido para los distintos genes, entre los ARN procedentes de ratones *parp-1^{+/+}* controles *versus* tratados con TPA, *parp-1^{+/+}* controles *versus* tratados con TPA en presencia del inhibidor DPQ y ratones *parp-1^{-/-}* controles *versus* tratados con TPA. Los ensayos fueron realizados con el ARN obtenido de las pieles de los ratones 24 horas después del tratamiento con una única dosis de DMBA (25 µg) más cuatro aplicaciones de 12 µg TPA durante una semana y en presencia o ausencia de 30 µg DPQ, según fuese el caso. El valor de la Ct del gen de interés, tanto en la situación control como en la muestra problema, en los anteriores grupos, fue normalizado de acuerdo a la expresión del gen de referencia *18S rRNA*. Para calcular el número de veces de inducción de un gen de interés tras el tratamiento de promoción tumoral respecto a la situación sin tratar (aplicación de sólo acetona) se realizó, según el método de comparación de las Ct (Livak y Schmittgen, 2001), el siguiente cálculo: nº veces de inducción = $2^{-\Delta\Delta C_t}$, donde $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t \text{ muestra problema}} - \Delta C_{t \text{ muestra control}}$ para un determinado gen de interés. Aquí, $\Delta C_{t \text{ muestra problema}}$ es el valor de la Ct de la muestra problema para un determinado gen normalizado según la expresión del gen

$18S\ rRNA$ y $\Delta C_{t\text{ muestra control}}$ es el valor de la C_t de la muestra control sin tratar para ese mismo gen normalizado según la expresión del gen $18S\ rRNA$. Para la validación del cálculo del $\Delta\Delta C_t$ es necesario que las curvas patrón, tanto del gen de referencia como del gen a estudiar, cumpla los requisitos de eficiencia de PCR y coeficiente de correlación descritos anteriormente.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Análisis de la expresión génica diferencial dependiente de PARP-1 en el proceso de carcinogénesis.

El análisis de la expresión génica mediante el uso de la tecnología de los "biochips" posibilita la cuantificación simultánea de la expresión de un número elevado de genes. También permite una aproximación cualitativa comprobando cuál es el patrón de expresión. Además, se puede estudiar la función de los genes al facilitar la identificación de aquellos que están activados de forma diferencial cuando se comparan dos condiciones, por ejemplo, un tejido sano y otro afectado por algún tipo de patología. En este sentido, en este análisis se ha analizado la expresión de aproximadamente unos 15000 genes murinos, de los cuales 4615 corresponden a secuencias de genes implicados en diversos procesos, tales como cáncer, angiogénesis, apoptosis, transducción de señales y procesos de estrés celular.

Para averiguar si la inhibición farmacológica de la actividad enzimática de PARP o bien la delección genética del gen *parp-1* afecta a los patrones de expresión génica durante los procesos de carcinogénesis, se procedió a realizar un análisis de la expresión génica diferencial a nivel de ARN mediante la tecnología de los *microarrays* de cDNA, usando para ello ARN proveniente de las pieles de ratones salvajes controles, tratados con carcinógenos y promotores tumorales (DMBA + TPA) y ratones tratados en presencia del inhibidor de PARP. Otro lote de ratones genéticamente deficientes en PARP-1 fue también tratado para este fin con DMBA + TPA, según se describe en la sección de materiales y métodos de este capítulo. La integridad del ARN total utilizado para este estudio se analizó por electroforesis en gel de agarosa, comprobándose por la presencia de las bandas 18S y 28S del ARN ribosomal la ausencia de degradación del mismo (fig. III-1A). Posteriormente también se analizó mediante geles de agarosa la viabilidad del aRNA resultante de la reacción de amplificación del ARN total (fig. III-1B) destinado al marcaje de la sonda a hibridar sobre el *microarray*.

Dada la complejidad molecular que suponen los procesos tumorales, la tumorigénesis disminuida que se observa tanto en los ratones tratados con el

inhibidor de la actividad enzimática de PARP como en los ratones deficientes en PARP-1 tras la aplicación del protocolo de carcinogénesis química, nos hace pensar que tanto la inhibición enzimática como la delección genética de PARP-1 puede desencadenar alteraciones en la expresión de ciertos genes y que el efecto sobre la tumorigénesis observado sea el resultado conjunto de todas estas modificaciones. Con este propósito se llevó a cabo el análisis mediante el uso de *microarrays* de cDNA de patrones de expresión génica diferencial entre ratones salvajes controles *versus* tratados con DMBA+TPA o DMBA+TPA+DPQ y ratones *parp-1* knockout controles *versus* tratamiento con DMBA+TPA en las etapas tempranas de promoción tumoral, proceso limitante del desarrollo tumoral.

El experimento se realizó por duplicado utilizando dos lotes de ratones diferentes que fueron sometidos al mismo tratamiento con idénticos reactivos. A partir del aRNA obtenido procedente del ARN total extraído de las pieles de los ratones tratados con el protocolo de carcinogénesis química, en presencia o ausencia del inhibidor DPQ, o sin tratar (ratones controles; tratamiento con el vehículo acetona), se llevó a cabo el marcaje del cDNA resultante del proceso de retrotranscripción bien con Cy3 (verde; cDNA procedente de aRNA de muestras controles) o bien con Cy5 (rojo; cDNA procedente de aRNA de muestras tratadas) para la realización de la hibridación conjunta de ambas sondas sobre el *microarray*, tal y como se representa de forma esquemática en la figura III-2. Una información más detallada sobre el tipo de tratamiento realizado se describe en la sección de materiales y métodos de este capítulo. Para la realización de este análisis de expresión génica diferencial se han considerado sólo aquellos cambios en los niveles de ARN que suponen una diferencia en los niveles de expresión superiores a dos veces (*two-fold* > 1 ó *two-fold* < 1) y que se han reproducido en ambos grupos de ratones. Según este criterio, un total de 96 genes diferentes se han encontrado globalmente alterados en cuanto a su expresión génica respecto a su estado basal en condiciones controles. De ellos, la expresión de 73 resultó estar alterada (41 inducidos y 32 reprimidos) en las pieles de los ratones salvajes tratados con DMBA+TPA, 45 genes (21 inducidos y 24 reprimidos) en pieles de ratones salvajes tratados simultáneamente con el inhibidor DPQ y 34 genes (11

inducidos y 23 reprimidos) en pieles de ratones *parp-1* knockout tratados con DMBA+TPA (fig. III-3).

3.4.2 Efecto de la inhibición de la actividad enzimática de PARP-1.

En la tabla III-1 y III-2 se muestran los genes diferencialmente expresados en las condiciones especificadas en el apartado anterior. Es posible agrupar estos genes en diferentes categorías de acuerdo a su actividad funcional, destacando entre ellos un número importante de genes con funciones relacionadas con los procesos de transcripción, apoptosis, proliferación celular, transducción de señales, angiogénesis, respuesta inmune, transporte, estrés oxidativo, metabolismo y adhesión celular.

Aquellos genes inducidos al menos dos veces (*two-fold* > 1) en los ratones salvajes durante las etapas tempranas de promoción tumoral y que aparecen por duplicado en ambos lotes de ratones incluyen a un importante número de genes asociados con la patología tumoral tanto en humanos como en ratones, entre ellos:

Axl (*AXL receptor tyrosine kinase*) (Wimmel y col., 2001),
CtsL (*cathepsin L*) (Niedergethmann y col., 2004),
Eno 1 (*enolase 1*) (Jiang y col., 1997),
Hif1a (*hypoxia inducible factor 1 alpha*) (Quintero y col., 2004),
Ier3 (*immediate early response 3*, también llamado *lex-1*) (Wu, 2003),
Klf5 (*kruppel like factor 5*) (Nandan y col., 2004),
S100a9 (*S100 calcium binding protein A9*) (Gebhardt y col., 2002),
Tnc (*tenascin C*) (Kalembeyi y col., 2003),
Ugcg (*UDP-glucose ceramide glucosyl transferase*), (Liu y col., 2001),
Lgals7 (lectin, galactose binding, soluble 7) (Moisan y col., 2003),
Tfrf (*tranferrin receptor*) (Ryschich y col., 2004),
Map17 (*membrane-associated protein 17*) (Kocher y col., 1996),
Lyzs (*lysozyme*) (Serra y col., 2002),
Expi (*extracellular proteinase inhibitor*) (Morrison y Leder, 1994),
Trps1 (*trichorhinophalangeal syndrome 1*), (Savinainen y col., 2004)
Npc1 (*Niemann Pick type C1*) (Radin y col., 2001) y

Sgk (*serum/glucocorticoid regulated kinase*) (Buse y col., 1999);

además de numerosos genes relacionados con procesos de estrés oxidativo, respuesta inmune e inflamación, tales como *Gpx1* (*glutathione peroxidase 1*), *Gsta4* (*glutathione s-transferase alpha 4*), *Gsto1* (*glutathione s-transferase omega 1*), *IL 18* (*interleukin 18*), *Nfkbiz* (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta*), *Glrx1* (*glutaredoxin 1*), *Soat-1* (*sterol O-acyltransferase*), *Ctla2b* (*cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 b*), *Gp49a* (*glycoprotein 49 A*), *Ly6e* (*lymphocyte antigen 6 complex*), *Dbnl* (*debrin-like*) y otros como el propio *S100A9* (Kitamura y col., 2000; Yamamoto y col., 2004; Denizot y col., 1989; Hori y col., 2004; Vandal y col., 2003; Arm y col., 1991). También a destacar es la inducción del gen *Pold2* (*polymerase (DNA directed), delta 2, regulatory subunit*), componente del complejo enzimático ADN polimerasa delta con funciones en replicación, recombinación y reparación del ADN en eucariotas (Hindges y Hubscher, 1997). Con la excepción de *CtsL* (*cathepsin L*), todos los anteriores genes fueron inducidos en una mayor proporción en los ratones salvajes tratados con DMBA+TPA en comparación con aquellos ratones tratados simultáneamente con el inhibidor DPQ o en ausencia de PARP-1 (tabla III-1). En algunos casos, tanto la presencia del inhibidor como la ausencia de PARP-1 reprimían total o parcialmente la expresión de genes implicados en fenómenos de iniciación, promoción, progresión y transformación tumoral.

Algunos de los anteriores genes (tabla 2 y tabla 3) son regulados por NF- κ B (*nfkbiz*, *lex-1*, *tenascin C*, *lysozyme*, *procollagen type I alpha2*) (Pahl, 1999; Ito y col., 2004; Novitskiy y col., 2004) y AP-1 (*tenascin C*, *procollagen type I*, *s100 family members*, *Pold2*) (Schlingemann y col., 2003; Perez y col., 2000), factores de transcripción que se encuentran deficientemente activados cuando se inhibe la actividad enzimática de poli-ADP-ribosilación de PARP o en condiciones de ausencia de PARP-1, tal y como se ha descrito en el capítulo anterior de esta tesis. Este hecho está en consonancia con la hipótesis que se presenta en este capítulo, que formulamos a continuación: la deficiente activación de determinados factores de transcripción origina el bloqueo de la expresión de genes relacionados con el proceso de tumorigénesis y explica la

disminución en la multiplicidad tumoral observada en ausencia o en condiciones de inhibición de PARP-1.

3.4.3 *Hif1a*, *S100a9* y *Nfkbzi*: tres importantes genes en el desarrollo tumoral y la inflamación.

De la anterior lista de genes diferencialmente inducidos (tabla III-1) en el proceso de carcinogénesis, tres de ellos (*Hif1a*, *S100a9* y *Nfkbzi*) han centrado nuestro mayor interés debido a su relevancia en este proceso y a la coincidencia de su deficiente inducción tras tratamiento simultáneo con DPQ o en ausencia de PARP-1, hecho puesto de manifiesto por duplicado en sendos grupos de ratones tanto mediante el uso de *microarrays* como por PCR cuantitativa en tiempo real (fig. III-4).

La proteína HIF-1 (o Factor Inducido por Hipoxia), es un factor de transcripción que estimula a la célula para sobrevivir en condiciones de hipoxia, fenómeno frecuente en los procesos de tumorigénesis, induciendo la expresión de genes que intervienen en glicolisis (como por ejemplo la *Enolasa 1*), angiogénesis (*VEGF*) y eritropoyesis. HIF-1 se une a una secuencia específica del ADN, presente en los promotores de genes inducidos por hipoxia, consta de 2 subunidades, la alfa y la beta, siendo la proteína alfa específicamente inducida por hipoxia (Semenza, 1999). La inhibición de la expresión de *hif1a* se produce, según se deriva de los resultados mostrados anteriormente, tras el uso de DPQ o en ausencia de PARP-1 (fig. III-4). Por tanto, el bloqueo de la inducción de *hif1a* (en nuestro caso mediante el uso de inhibidores de PARP) puede suponer una nueva estrategia a considerar en la terapia anti-tumoral (Yeo y col., 2004).

Otro de los genes diferencialmente inducido tras tratamiento con DMBA + TPA es el *S100a9*, también conocido como calgranulina B. Este gen codifica para una proteína de pequeño peso molecular de unión a calcio con importantes funciones en la transducción de señales, comunicación intercelular e inflamación (Donato, 2001). Recientemente ha sido descrito en su promotor un sitio TRE (*TPA response element*) para la unión del factor de transcripción AP-1 (Schlingemann y col., 2003). Dada la importancia que los fenómenos de inflamación tienen en el desarrollo de la tumorigénesis epitelial, actuando como

promotores de este proceso (Coussens y Werb, 2002) y dado los importantes niveles de inducción de esta proteína obtenidos durante el proceso de carcinogénesis, tanto mediante *microarray* como por PCR en tiempo real (fig. III-4), sería importante considerar la inhibición de la expresión de este gen como fenómeno de resistencia al desarrollo tumoral (Gebhardt y col., 2002). En este sentido, tanto los ratones deficientes en *parp-1* tratados con DMBA+TPA y ratones salvajes tratados simultáneamente con DPQ muestran resistencia a este fenómeno (según lo visto en el capítulo I y II de esta tesis) y además presentan fuerte represión en la inducción de los anteriores genes (fig. III-4).

Nfkbiz, también denominado *Mail* (*molecule possessing ankyrin repeats induced by lipopolysaccharide*) es otro de los genes diferencialmente expresados en el proceso de carcinogénesis, cuya expresión es reprimida con el uso de DPQ y en condiciones de ausencia de PARP-1 (fig. III-4). Ha sido identificado como un nuevo componente de la familia de proteínas I κ B, regulado por NF- κ B, que se encuentra principalmente expresado en linfocitos B y macrófagos (Kitamura y col., 2000; Kitamura y col., 2003) con funciones importantes en la regulación de la transcripción y respuesta inmune. Su inducción es indispensable para la expresión de una serie de genes dependientes de la vía de señalización TLR (*Toll-like receptor*) (Yamamoto y col., 2004), desencadenándose a través de esta vía la activación de NF- κ B y AP-1 para producir una exacerbada respuesta inflamatoria (Aderem y Ulevitch, 2000; Foletta y col., 1998). Por tanto, el freno de esta vía inflamatoria a través del bloqueo de la inducción de *Nfkbiz*, tal y como sucede con el uso de inhibidores de PARP y en ausencia de PARP-1, podría ser también considerado un objetivo molecular de la terapia anti-tumoral.

3.4.4 Genes cuya expresión resulta reprimida en el proceso de carcinogénesis química.

En la tabla III-2 se muestran los genes reprimidos al menos dos veces en cuanto a su expresión génica en ambos experimentos de carcinogénesis. Un número importante de estos genes que están relacionados con distintos procesos tumorales aparecen reprimidos sólomente en ausencia de PARP-1 o

cuando se inhibe la actividad enzimática de PARP. Un ejemplo de ellos son los siguientes genes:

Col1a (*procollagens type I*) (O'Brien y col., 1998),
Col3a1 (*procollagens type III*) (Narita y col., 1993),
Igfbp5b (*insulin-like growth factor binding protein 5*) (Monga y col., 2003),
Mt2 (*metallothionein2*) (Rao y col, 2003),
Purb (*purina rich element binding protein B*), (Lezon-Geyda y col., 2001)
Sp1(*trans-acting transcription factor 1*) (Wang y col, 2003) y
Fasn (*fatty acid synthase*) (Menendez y col., 2005).

Algunos de los genes que aparecen reprimidos solamente en los ratones salvajes en ausencia del inhibidor de PARP y cuya desregulación tiene gran importancia en los fenómenos tumorales son *fgfr2* (*fibroblast growth factor 2*), para el cual está descrito que su pérdida de expresión se acompaña de progresión maligna en tumores de próstata tanto humanos como de ratón (Yasumoto y col., 2004) y *Tia1* (*cytotoxic granule-associated RNA binding protein 1*) cuya desregulación promueve la sobre expresión del enzima COX-2 (Dixon y col., 2003), enzima ampliamente expresada en diversos tumores.

3.4.5 Estudio de la expresión génica mediante PCR en tiempo real.

Para confirmar los datos obtenidos mediante los ensayos de *microarrays* en respuesta a la carcinogénesis, se llevó a cabo un análisis por PCR a tiempo real usando el método de *comparación de las Ct* (Livak y Schmittgen, 2001). En la figura III-4, como se vió anteriormente, se mostraban 3 genes (*hif1a*, *S100a9* y *Nfkbiz*) diferencialmente expresados en los ensayos de *microarrays* que han sido analizados para su confirmación o validación mediante PCR en tiempo real. Aunque los datos obtenidos mediante ambas técnicas (tabla 2 y fig. III-4) no coinciden en valores absolutos, si reflejan la misma tendencia en cuanto a la inducción de la expresión de los anteriores genes en las pieles de los ratones salvajes y bloqueo de la expresión en ausencia de PARP-1 o mediante la inhibición de la actividad enzimática de PARP. Según nuestra experiencia, los ensayos de PCR en tiempo real, como ensayos más precisos que los

microarrays, por lo general tienden a mostrar una mayor diferencia de expresión en comparación con los ensayos de *microarrays*.

Además de los genes anteriores, la expresión génica de otro grupo de genes relacionados con procesos tumorales (*Pecam-1*, *CtsL*, *CtsB*, *Igfbp3*, y *Spp1*) han sido también analizados mediante PCR en tiempo real (fig III-5) utilizando para ello los cebadores mostrados en la tabla III-3. En este caso, la realización de los ensayos de PCR para estos genes obedece a un intento de análisis más preciso y exhaustivo de determinados genes con funciones muy importantes en el desarrollo de las distintas patologías tumorales:

- *Pecam 1* (*Platelet endothelial cell adhesion molecule precursor 1*), es un gen que codifica para una proteína transmembrana de tipo I con funciones en la adhesión celular, regulación de la migración celular y transducción de señales intracelulares mediadas por GTPasas. Su sobre expresión se ha identificado con fenómenos de angiogénesis, sugiriendo que la interacción intercelular de estas proteínas son necesarias para la formación de nuevos vasos (DeLisser y col., 1997). Este gen no aparece en la lista de genes inducidos (tabla III-1), ya que su expresión en uno de los experimentos de *microarrays* no alcanzó el valor mínimo de 2 veces de inducción, criterio elegido para esta selección. Pero, dada la importancia de este gen en los procesos de migración celular y angiogénesis, procesos fundamentales en carcinogénesis, y debido a que sus valores de inducción obtenidos mediante análisis de *microarrays* estaban muy próximos a los criterios de selección (valores de 3.14 y 1.75 de inducción en la piel de los ratones salvajes en sendos experimentos de carcinogénesis, y no inducción en los ratones tratados con DPQ y en ausencia de PARP-1) se decidió por ello someterlo a estudio de expresión génica mediante PCR en tiempo real. Los resultados de PCR muestran la misma tendencia que la obtenida mediante el *array* en cuanto a su expresión génica, pero al igual que sucede con los anteriores genes estudiados, con el uso de la PCR estas diferencias se aumentan aún más, es decir, se produce una fuerte inducción con el tratamiento de carcinogénesis en la expresión de *Pecam-1* en la piel de los ratones salvajes y un bloqueo de esta inducción en los ratones tratados en ausencia de PARP-1 o con el uso del inhibidor de PARP (fig III-5).

- *CtsL* (*cathepsin L*), codifica para un cisteín-proteasa de localización lisosomal con gran importancia en el catabolismo proteico intracelular. Entre sus sustratos se incluyen el colágeno y la elastina. Su sobreexpresión se ha relacionado con la transformación maligna de diversos tumores (Kane y Gottesman, 1990). Debido a que los resultados del *array* indicaban una mayor expresión de este gen en los ratones salvajes durante la carcinogénesis y en condiciones de inhibición enzimática de PARP, por ello, decidimos hacer un estudio más preciso y exhaustivo de la expresión de este gen mediante PCR en tiempo real. En este caso, los resultados del ensayo de PCR no coincidían con los obtenidos mediante *microarray*, es decir, en ambos experimentos de carcinogénesis sobre los ratones salvajes y en ausencia de inhibidores de PARP se producía una importante inducción de *CtsL* (hasta 8 veces de inducción respecto a los ratones controles), hecho que no se repetía en presencia de DPQ (fig. III-5).

- *CtsB* (*cathepsin B*), es otro gen que da lugar a una proteasa cuya función principal es degradar componentes de la matriz extracelular, además de activar a otra serie de proteasas para esta función. Este gen se sobreexpresa en diversos tumores, tales como pulmón, próstata, colon, mama y estómago (Hughes y col., 1998). El interés de estudio por PCR en tiempo real se debe a las mismas consideraciones expuestas con respecto a *Pecam-1*, es decir, a la importancia de la sobreexpresión de este gen en los procesos de carcinogénesis y al hecho de que no aparece inducido por duplicado en el análisis mediante *microarray*. Los resultados obtenidos con el uso de la PCR en tiempo real para *CtsB* se asemejan bastante a los conseguidos para *CtsL*, mostrando idénticos niveles de inducción en los ratones salvajes tratados con DMBA+TPA e idénticos niveles de bloqueo de la expresión en presencia del inhibidor DPQ (fig. III-5).

- *Igfbp3* (*insulin-like growth factor binding protein 3*), es un gen cuya expresión se encuentra regulada por el factor de transcripción HIF-1a con funciones importantes en la regulación de la proliferación, apoptosis y progresión tumoral, cuya sobre expresión se ha relacionado con cáncer de próstata (Huynh y col., 1998; Huynh y col., 2001) y recientemente con carcinomas de esófago (Takaota y col, 2004). Al igual que ocurre con algunos de los genes anteriores, este gen sólo aparece inducido en el *array* en un único

experimento de carcinogénesis en ausencia de DPQ, mientras, en el resto de condiciones de estudio aparece reprimido por duplicado, por ello, el interés de estudio mediante PCR en tiempo real. Los resultados de PCR indican en ambos experimentos una fuerte inducción de este gen en los ratones salvajes en ausencia de DPQ y un bloqueo de expresión mediante el uso del inhibidor (fig. III-5).

- *Spp1* (*secreted phosphoprotein 1*) o también conocida como *OPN* (*osteopontin*) es un gen de gran importancia en los procesos de angiogénesis (Takahashi y col., 2002), tumorigénesis y metástasis (Rittling y Chambers, 2004), hasta tal punto que para ciertas patologías tumorales (colon, próstata, ovario) se considera como un marcador tumoral (Agrawal y col., 2003). En el *array* realizado la inducción de este gen, al igual que los anteriores, sólo era detectada en un único experimento en ausencia de DPQ. Por tanto, se decidió hacer PCR en tiempo real para comprobar de una forma más exhaustiva la expresión de este gen en las condiciones de estudio. Los resultados indican una inducción de aproximadamente 7 veces en ausencia de DPQ y niveles basales de expresión cuando se trata simultáneamente con DPQ (fig. III-5).

3.5 DISCUSIÓN

Tal y como se ha discutido en los capítulos anteriores, la proteína PARP-1 puede regular la respuesta celular en condiciones de estrés modulando la respuesta inflamatoria a través de la regulación de la activación de diversos factores de transcripción y, por tanto, interfiriendo en la correspondiente transcripción génica (D'Amours y col., 1999). La influencia de PARP-1 sobre la actividad transcripcional de estos factores de transcripción puede ser debida a una interacción directa (proteína-proteína) de PARP-1 con estos factores de transcripción o a través de modificaciones postraduccionales de estos factores mediante la actividad enzimática de poli-ADP-ribosilación de PARP-1 (Andreone y col., 2003). En este sentido, factores de transcripción como AP-2 (Kannan y col., 1999), B-MYB (Cervellera y Sala, 2000), Oct-1 (Nie y col., 1998), YY-1 (Oei y col., 1997) y TEF-1 (Butler y Ordahl, 1999) han sido descritos como proteínas que interaccionan directamente con PARP-1. Por otro lado, otros factores de transcripción como p53 (Wesierska-Gadek y Schmid, 2001), fos (Amstad y col., 1992) y enzimas como las ARN polimerasas I y II (D'Amours y col., 1999) han sido también descritas como proteínas que sufren modificaciones postraduccionales por poli-ADP-ribosilación.

Uno de los aspectos aún no completamente esclarecido, respecto a la importancia de PARP-1 como cofactor transcripcional, es el conocimiento del papel que juega la actividad enzimática de PARP-1 en el proceso de formación de los complejos de transcripción junto a otras proteínas y su unión al ADN. Para NF- κ B se sabe que la actividad transcripcional de este factor se encuentra mermada en células deficientes en PARP-1 cuando están sometidas a estímulos pro-inflamatorios (Oliver y col., 1999; Hassa y col., 2001). Numerosos grupos de investigación, incluido el nuestro, han demostrado que el uso de inhibidores de PARP no tiene efecto sobre la activación de NF- κ B, en cambio, las células y ratones carentes de la proteína PARP-1 muestran una dramática disminución o deficiencia en la activación de este factor de transcripción. Pero, esta no es la situación para otros factores de transcripción co-regulados por PARP-1, como es el caso de AP-1, para el cual, su unión al ADN es en gran parte dependiente de la actividad enzimática de PARP (Andreone y col., 2003).

Los resultados obtenidos en esta tesis en cuanto a la expresión génica en las etapas tempranas de promoción tumoral, tanto con el uso del inhibidor de PARP como en situaciones de ausencia de PARP-1, indican un considerable efecto de tales condiciones sobre la transcripción génica debido a la deficiente activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, aunque, no podemos descartar otras vías de actuación, como por ejemplo la inactivación de otros factores de transcripción y/o a través de efectos generales sobre la estructura de la cromatina derivados del bloqueo de la actividad enzimática de PARP-1, actividad que es necesaria puesto que facilita el proceso de transcripción, tal y como ha sido recientemente demostrado (Kim y col., 2004).

En los procesos tumorales el conocimiento de los mecanismos moleculares necesarios para la promoción/progresión tumoral es fundamental para el desarrollo de nuevas terapias destinadas a prevenir la progresión o el tratamiento del cáncer. Tal y como se ha descrito en la introducción de este capítulo, la identificación y caracterización de genes involucrados en el proceso de carcinogénesis que se activan tras estímulo oncogénico puede representar una buena aproximación experimental al conocimiento del desarrollo tumoral y por ende contribuir al establecimiento de nuevas formas de tratamiento antineoplásico inhibiendo la expresión y la función de genes que favorezcan la transformación y/o progresión tumoral. En este sentido, los resultados de expresión génica obtenidos en el modelo de carcinogénesis murina con el uso del inhibidor (DPQ) de la actividad enzimática de PARP-1 nos revelan un importante papel modulador de la actividad enzimática de PARP-1 en la expresión de ciertos genes (tales como *Hif1a*, *Pecam-1* y probablemente también la *osteopontina*) involucrados en procesos cruciales en las neoplasias como son los fenómenos de angiogénesis (Carmeliet y Jain, 2000) y otros genes con funciones importantes en procesos de transcripción, apoptosis, proliferación celular, transducción de señales, respuesta inmune, transporte, estrés oxidativo, metabolismo y adhesión celular. Aunque *Pecam-1* y *osteopontina* en principio no cumplen los criterios de selección elegidos para el análisis de *microarrays*, ya que como se ha comentado anteriormente no aparecían inducidos al menos dos veces en ambos experimentos de carcinogénesis en los ratones salvajes, en cambio, su estudio por PCR muestra

en ambos casos un importante bloqueo de su expresión en presencia de DPQ (fig. III-5).

Además, otro gran bloqueo de la expresión génica mediante el uso del DPQ en los procesos de carcinogénesis afecta, según este modelo, a la proteína calgranulina B. Esta proteína es específica de epitelios, células mieloides y endotelios, acumulándose en sitios donde se produce inflamación crónica. Se ha propuesto una interacción funcional de esta proteína con el receptor de membrana RAGE (Hofmann y col., 1999), receptor implicado en inflamación, crecimiento tumoral y metástasis (Taguchi y col., 2000). El tratamiento con TPA estimula la liberación de esta proteína al espacio extracelular donde actúa como un potente agente quimiotáctico sobre el componente inflamatorio, además de funciones en la regulación de la adhesividad celular y migración transendotelial de leucocitos (Kerkhoff y col., 1998). Trabajos recientes muestran que el tratamiento con TPA sobre la piel de ratones induce rápidamente la sobre expresión de esta proteína (Schlingemann y col., 2003) y esta inducción está descrita que es dependiente de la activación de la ruta de la MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) vía proteína-quinasa C (PKC_{α}) (Gebhardt y col., 2002). Según estos autores, AP-1 es el factor de transcripción que regula la expresión de las calgranulinas puesto que: i) AP-1 es un conocido efector de la ruta dependiente de PKC_{α} ; ii) el promotor de la calgranulina B posee sitios de unión para AP-1; y iii) la inducción de la transcripción de *S100a9* se reprime por inhibidores de la ruta de activación de AP-1. El considerable efecto que el inhibidor de PARP tiene sobre el bloqueo de la inducción de *S100a9* (tabla III-2 y fig. III-4) está en consonancia con la posible interacción que la poli-ADP-ribosilación pueda tener en el proceso de modulación de la ruta de la MAPK en la activación de AP-1 (Amstad y col., 1992; Cerutti y col., 1992). Tal y como se discutió en el capítulo II, uno de los principales niveles de regulación de la actividad de AP-1 depende del control de la abundancia de los componentes del dímero de AP-1. En este sentido, Andreone y col. (2003) ya describían un gran desequilibrio a nivel de proteínas entre las subunidades c-Jun y c-Fos con el uso de inhibidores de PARP.

El estudio de microarrays ha demostrado también en uno de los experimentos de carcinogénesis una gran represión a nivel de mensajero de la expresión de *fos* (datos no mostrados) cuando se inhibía la actividad

enzimática de PARP y también en ausencia de PARP-1. Estos resultados nos hacen postular que las modificaciones postraduccionales por poli-ADP-ribosilación a través de PARP-1 son fundamentales en la ruta de las MAPK para la regulación de la composición del dímero Jun-Fos.

De nuestro trabajo se deduce que PARP-1 es fundamental en el control y regulación de los diferentes eventos que ocurren durante la carcinogénesis epidérmica; alteraciones que conducen hacia el cambio funcional y diferencial de la epidermis durante este proceso oncogénico. Aunque los mecanismos moleculares por los que PARP-1 puede regular la carcinogénesis epitelial no se conocen con exactitud, parece ser, según los resultados expuestos en esta tesis, que la interacción de la proteína con otros factores de transcripción, como NF- κ B y AP-1 (Hsu y col., 2000), puede ser clave en la regulación de la expresión génica diferencial necesaria para el desarrollo de la carcinogénesis.

No es esta la primera vez que se utiliza la tecnología de los *microarrays* con la finalidad de estudiar las funciones biológicas de PARP-1 durante un proceso determinado. Anteriormente, otros grupos de investigación han estudiado diferencias de expresión génica utilizando esta herramienta en fibroblastos salvajes *versus* fibroblastos deficientes en PARP-1 (Simbulan-Rosenthal y col., 2000), también en células gliales derivadas de ratones *parp-1*^{+/+} *versus* *parp-1*^{-/-} estimuladas con LPS (Ha y col., 2002), y en células endoteliales *parp-1*^{+/+} *versus* *parp-1*^{-/-} tanto en condiciones basales como tras tratamiento con TNF- α (Carrillo y col., 2004). Estos últimos autores tras el tratamiento con TNF- α de células endoteliales obtienen una expresión génica diferencial básicamente inflamatoria y dependiente de PARP-1, dato que concuerda con el papel coactivador de PARP-1 en la activación de NF- κ B. De todas formas, en estos trabajos hay evidencias suficientes sobre el papel de PARP-1 en la modulación de la expresión génica para pensar que tal regulación es dependiente tanto del tipo celular a estudiar como específica de tejido.

La inhibición de PARP, como se ha visto, podría ser de gran utilidad en el diseño de nuevas terapias. Actuar sobre PARP-1 no sólo representa una vía para prevenir procesos de reparación del ADN durante el tratamiento clásico con quimioterapia y/o radiación. También, y de forma simultánea, puede

representar una efectiva terapia para bloquear la expresión de genes claves en el proceso de promoción/progresión tumoral.

En los últimos años, diferentes grupos han descrito los beneficios que la inhibición de PARP conlleva en la potenciación de los clásicos tratamientos anti-neoplásicos, tanto en radio como quimioterapia (Miknyoczki y col., 2003; Tentori y col., 2002; Bowman y col., 1998). En esta tesis, además, se muestra cómo la inhibición de la actividad enzimática de PARP, mediante la administración del inhibidor DPQ durante el proceso de carcinogénesis, posee propiedades anti-tumorales. El efecto del DPQ sobre la multiplicidad, retraso, incidencia y tamaño tumoral, son ejemplos de cómo, mediante la inhibición de PARP-1, se consigue actuar o interferir sobre el crecimiento tumoral.

Como se ha mostrado también en esta memoria, la delección genética de PARP-1 previene la inducción de la proliferación celular en respuesta a TPA, con un claro efecto en la latencia, incidencia y multiplicidad de los tumores desarrollados en estas condiciones (capítulo I). No está claro si la proliferación de un grupo de células por sí sola causa cáncer, pero parece cierto que una proliferación sostenida de células en un ambiente inflamatorio (derivado de una exacerbada respuesta celular a agentes promotores que causan daños oxidativos) donde se incrementa la liberación de radicales libres derivados de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno producidas durante la respuesta inflamatoria, potencia extraordinariamente el riesgo de padecer cáncer (Coussens y Werb, 2002). En este sentido, los ratones doblemente deficientes en p53 y PARP-1 muestran un fenotipo mucho menos sensible al desarrollo de tumores (Conde y col., 2001) en comparación con los ratones *p53*^{-/-} *parp-1*^{+/+} debido, en gran parte, a la disminución del estrés oxidativo que estos ratones manifiestan en ausencia de PARP-1.

Según nuestro estudio, la inhibición o eliminación genética de PARP-1 interfiere fundamentalmente con la promoción de tumores de origen epitelial. En estos tumores de origen epitelial los procesos inflamatorios juegan un papel primordial durante las etapas de promoción, etapas cruciales en el desarrollo del tumor, donde la inflamación actuaría como un potente estimulador del proceso tumoral, potenciando los efectos promotores (Coussens y Werb, 2002). Por otra parte, lo anteriormente expuesto, junto a la acumulación de daños en el ADN en ausencia de PARP-1, podría explicar el hecho de que los

ratones *parp-1*^{-/-} en presencia de agentes mutagénicos como las nitrosaminas (Tsutsumi y col., 2001) muestren una mayor incidencia en tumores de origen distinto al epitelial. Tal es el caso de los sarcomas hepáticos, hemangiomas y adenomas pulmonares de procedencia mesenquimal, derivados del tratamiento con nitrosaminas. En estos ejemplos de neoplasias los procesos inflamatorios carecen de tanta relevancia como agentes promotores en comparación con los observados en tumores de origen epitelial (Tsutsumi y col., 2001). Los beneficios de la inhibición de los procesos de reparación del ADN en la terapia anti-tumoral han sido bien descritos durante los últimos años por el laboratorio de la Dra. Nicola Curtin, y en este contexto, también ha sido bien caracterizada la función de PARP-1 como enzima reparadora (Calabrese y col., 2004). Recientemente, trabajos de nuestro grupo de investigación han mostrado también el beneficio que la inhibición farmacológica de PARP tiene en la terapia anti-tumoral en células tumorales humanas muy resistentes al tratamiento con doxorubicina (Muñoz-Gámez y col., 2005). Históricamente, una primera generación de inhibidores de PARP, como la 3-aminobenzamida (3-AB), fue utilizada como aproximación terapéutica en el tratamiento anti-tumoral, pero resultó carente de actividad, especificidad, y propiedades farmacológicas suficientes para su evaluación pre-clínica como potenciador de la sensibilidad del tumor al tratamiento con radio o quimioterapia. En cambio, una nueva generación de inhibidores más potentes y altamente específicos está siendo actualmente utilizada en humanos como potenciadores de la quimio y radioterapia (Calabrese y col., 2004).

Recientemente, nuevas evidencias del acoplamiento molecular entre la inflamación y cáncer ha sido demostrada por investigadores de la Universidad de California, San Diego (Greten y Karin, 2004). En este trabajo se demuestra cómo la inactivación de un gen implicado en el proceso inflamatorio puede reducir dramáticamente el desarrollo de tumores gastrointestinales en ratones. Estos investigadores encontraron que la deficiente expresión del gen *IKK β* , un gen que codifica para una quinasa implicada en el proceso de activación de NF- κ B y por tanto en fenómenos inflamatorios, suprime la incidencia del cáncer y el crecimiento tumoral en ratones. Debido a que la inflamación crónica contribuye a la tumorigénesis de una gran cantidad de diversos cánceres, estos investigadores eligieron uno de estos cánceres (el cáncer asociado a colitis-

CAC), como un modelo para el estudio de la importancia de los fenómenos inflamatorios en cáncer. En este modelo demuestran cómo los tumores inducidos químicamente se forman de manera más precoz en un ambiente inflamatorio (Greten y col., 2004).

Es ahora evidente, que la inflamación juega un papel fundamental en el desarrollo de tumores de origen epitelial, y estos tumores son los que presentan una mayor incidencia en la población humana. Por tanto, aquellas terapias destinadas a frenar los procesos inflamatorios en el transcurso de estas patologías pueden ejercer una acción coadyuvante en el tratamiento del cáncer. En las fases tempranas del desarrollo de un tumor epitelial, los factores pro-inflamatorios liberados junto a la presencia masiva de células inflamatorias en la zona donde se está produciendo la promoción tumoral crean un ambiente idóneo de estrés oxidativo local que promueve lesiones en el ADN, además de procesos angiogénicos y, en definitiva, favorecen el crecimiento tumoral.

Por ello, una eficiente inhibición de PARP-1 puede ser beneficiosa en la terapia anti-tumoral a través del efecto reductor que esta inhibición posee tanto sobre el estrés oxidativo (Conde y col., 2001) como en la activación de factores pro-inflamatorios y pro-angiogénicos, además de su uso como monoterapia en tumores con inactivación de las rutas de reparación por recombinación homóloga (Farmer y col., 2005; Bryant y col., 2005). En este sentido, el equipo del Dr. Hannah Farmer, del Instituto de Investigación del Cáncer, en Reino Unido, ha demostrado que el uso de inhibidores de PARP en células tumorales con mutaciones en BRCA1 y BRCA2 (dos importantes proteínas que participan en la reparación del ADN por recombinación homóloga) produce inestabilidad cromosómica, detención del ciclo celular y apoptosis (Farmer y col., 2004). Parece ser que este proceso se debe a que la inhibición de PARP origina daños en el ADN que suelen repararse por recombinación homóloga. Los resultados del trabajo ilustran cómo las diferentes vías cooperan para reparar el daño y sugiere que la inhibición de la reparación del ADN puede permitir el diseño de terapias específicas menos tóxicas para el control del cáncer.

3.6 REFERENCIAS

- Aderem, A. & Ulevitch, R.J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**, 782-7 (2000).
- Agrawal, D. et al. Osteopontin identified as colon cancer tumor progression marker. *C R Biol* **326**, 1041-3 (2003).
- Amstad, P.A., Krupitza, G. & Cerutti, P.A. Mechanism of c-fos induction by active oxygen. *Cancer Res* **52**, 3952-60 (1992).
- Andreone, T.L., O'Connor, M., Denenberg, A., Hake, P.W. & Zingarelli, B. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 regulates activation of activator protein-1 in murine fibroblasts. *J Immunol* **170**, 2113-20 (2003).
- Bowman, K.J., White, A., Golding, B.T., Griffin, R.J. & Curtin, N.J. Potentiation of anti-cancer agent cytotoxicity by the potent poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors NU1025 and NU1064. *Br J Cancer* **78**, 1269-77 (1998).
- Bryant, H. E. et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* **434**, 913-917 (2005).
- Burbach, G.J., Dehn, D., Del Turco, D. & Deller, T. Quantification of layer-specific gene expression in the hippocampus: effective use of laser microdissection in combination with quantitative RT-PCR. *J Neurosci Methods* **131**, 83-91 (2003).
- Buse, P. et al. Cell cycle and hormonal control of nuclear-cytoplasmic localization of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase, Sgk, in mammary tumor cells. A novel convergence point of anti-proliferative and proliferative cell signaling pathways. *J Biol Chem* **274**, 7253-63 (1999).
- Butler, A.J. & Ordahl, C.P. Poly(ADP-ribose) polymerase binds with transcription enhancer factor 1 to MCAT1 elements to regulate muscle-specific transcription. *Mol Cell Biol* **19**, 296-306 (1999).
- Calabrese, C.R. et al. Anticancer chemosensitization and radiosensitization by the novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor AG14361. *J Natl Cancer Inst* **96**, 56-67 (2004).
- Carmeliet, P. & Jain, R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**, 249-57 (2000).
- Carrillo, A. et al. Transcription regulation of TNF-alpha-early response genes by poly(ADP-ribose) polymerase-1 in murine heart endothelial cells. *Nucleic Acids Res* **32**, 757-66 (2004).
- Cerutti, P., Shah, G., Peskin, A. & Amstad, P. Oxidant carcinogenesis and antioxidant defense. *Ann N Y Acad Sci* **663**, 158-66 (1992).
- Cervellera, M.N. & Sala, A. Poly(ADP-ribose) polymerase is a B-MYB coactivator. *J Biol Chem* **275**, 10692-6 (2000).
- Conde, C. et al. Loss of poly(ADP-ribose) polymerase-1 causes increased tumour latency in p53-deficient mice. *Embo J* **20**, 3535-43 (2001).
- Coussens, L.M. & Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* **420**, 860-7 (2002).

- D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I. & Poirier, G.G. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* **342** (Pt 2), 249-68 (1999).
- DeLisser, H.M. et al. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol* **151**, 671-7 (1997).
- Dixon, D.A. et al. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the translational silencer TIA-1. *J Exp Med* **198**, 475-81 (2003).
- Donato, R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* **33**, 637-68 (2001).
- Eberwine, J. Amplification of mRNA populations using aRNA generated from immobilized oligo(dT)-T7 primed cDNA. *Biotechniques* **20**, 584-91 (1996).
- Farmer, H. et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* **434**, 917-921 (2005).
- Foletta, V.C., Segal, D.H. & Cohen, D.R. Transcriptional regulation in the immune system: all roads lead to AP-1. *J Leukoc Biol* **63**, 139-52 (1998).
- Gebhardt, C. et al. Calgranulins S100A8 and S100A9 are negatively regulated by glucocorticoids in a c-Fos-dependent manner and overexpressed throughout skin carcinogenesis. *Oncogene* **21**, 4266-76 (2002).
- Greten, F.R. et al. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* **118**, 285-96 (2004).
- Greten, F.R. & Karin, M. The IKK/NF-kappaB activation pathway-a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett* **206**, 193-9 (2004).
- Ha, H.C., Hester, L.D. & Snyder, S.H. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 dependence of stress-induced transcription factors and associated gene expression in glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3270-5 (2002).
- Hassa, P.O., Covic, M., Hasan, S., Imhof, R. & Hottiger, M.O. The enzymatic and DNA binding activity of PARP-1 are not required for NF-kappa B coactivator function. *J Biol Chem* **276**, 45588-97 (2001).
- Herrero, J. et al. GEPAS: A web-based resource for microarray gene expression data analysis. *Nucleic Acids Res* **31**, 3461-7 (2003).
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. & Watson, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* **11**, 1026-30 (1993).
- Hindges, R. & Hubscher, U. DNA polymerase delta, an essential enzyme for DNA transactions. *Biol Chem* **378**, 345-62 (1997).
- Hofmann, M.A. et al. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* **97**, 889-901 (1999).
- Hsu, T.C., Young, M.R., Cmarik, J. & Colburn, N.H. Activator protein 1 (AP-1)- and nuclear factor kappaB (NF-kappaB)-dependent transcriptional events in carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* **28**, 1338-48 (2000).

- Hughes, S.J. et al. A novel amplicon at 8p22-23 results in overexpression of cathepsin B in esophageal adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12410-5 (1998).
- Huynh, H., Alpert, L., Alaoui-Jamali, M.A., Ng, C.Y. & Chan, T.W. Co-administration of finasteride and the pure anti-oestrogen ICI 182,780 act synergistically in modulating the IGF system in rat prostate. *J Endocrinol* **171**, 109-18 (2001).
- Huynh, H., Pollak, M. & Zhang, J.C. Regulation of insulin-like growth factor (IGF) II and IGF binding protein 3 autocrine loop in human PC-3 prostate cancer cells by vitamin D metabolite 1,25(OH)₂D₃ and its analog EB1089. *Int J Oncol* **13**, 137-43 (1998).
- Ito, T. et al. Transcriptional regulation of the MAIL gene in LPS-stimulated RAW264 mouse macrophages. *Gene* **342**, 137-43 (2004).
- Jiang, B.H., Agani, F., Passaniti, A. & Semenza, G.L. V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression. *Cancer Res* **57**, 5328-35 (1997).
- Kalembeiy, I. et al. Tenascin-C upregulates matrix metalloproteinase-9 in breast cancer cells: direct and synergistic effects with transforming growth factor beta1. *Int J Cancer* **105**, 53-60 (2003).
- Kane, S.E. & Gottesman, M.M. The role of cathepsin L in malignant transformation. *Semin Cancer Biol* **1**, 127-36 (1990).
- Kannan, P., Yu, Y., Wankhade, S. & Tainsky, M.A. PolyADP-ribose polymerase is a coactivator for AP-2-mediated transcriptional activation. *Nucleic Acids Res* **27**, 866-74 (1999).
- Kerkhoff, C., Klempt, M. & Sorg, C. Novel insights into structure and function of MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9). *Biochim Biophys Acta* **1448**, 200-11 (1998).
- Kim, M.Y., Mauro, S., Gevry, N., Lis, J.T. & Kraus, W.L. NAD⁺-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1. *Cell* **119**, 803-14 (2004).
- Kitamura, H., Kanehira, K., Okita, K., Morimatsu, M. & Saito, M. MAIL, a novel nuclear I kappa B protein that potentiates LPS-induced IL-6 production. *FEBS Lett* **485**, 53-6 (2000).
- Kitamura, H. et al. Bacterial lipopolysaccharide-induced expression of the I kappa B protein MAIL in B-lymphocytes and macrophages. *Arch Histol Cytol* **66**, 53-62 (2003).
- Kocher, O., Cheresch, P. & Lee, S.W. Identification and partial characterization of a novel membrane-associated protein (MAP17) up-regulated in human carcinomas and modulating cell replication and tumor growth. *Am J Pathol* **149**, 493-500 (1996).
- Leali, D. et al. Osteopontin (Eta-1) and fibroblast growth factor-2 cross-talk in angiogenesis. *J Immunol* **171**, 1085-93 (2003).
- Lezon-Geyda, K., Najfeld, V. & Johnson, E.M. Deletions of PURA, at 5q31, and PURB, at 7p13, in myelodysplastic syndrome and progression to acute myelogenous leukemia. *Leukemia* **15**, 954-62 (2001).

- Lin, S.C. et al. Regulation of IGFBP-5 expression during tumourigenesis and differentiation of oral keratinocytes. *J Pathol* **198**, 317-25 (2002).
- Liu, Y.Y., Han, T.Y., Giuliano, A.E. & Cabot, M.C. Ceramide glycosylation potentiates cellular multidrug resistance. *Faseb J* **15**, 719-30 (2001).
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-8 (2001).
- Lockhart, D.J. et al. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* **14**, 1675-80 (1996).
- Marks, F. & Furstenberger, G. The conversion stage of skin carcinogenesis. *Carcinogenesis* **11**, 2085-92 (1990).
- Marti, H.H. et al. Isoform-specific expression of hypoxia-inducible factor-1alpha during the late stages of mouse spermiogenesis. *Mol Endocrinol* **16**, 234-43 (2002).
- Martin-Oliva, D. et al. Crosstalk between PARP-1 and NF-kappaB modulates the promotion of skin neoplasia. *Oncogene* (2004).
- Menendez, J.A., Decker, J.P. & Lupu, R. In support of fatty acid synthase (FAS) as a metabolic oncogene: extracellular acidosis acts in an epigenetic fashion activating FAS gene expression in cancer cells. *J Cell Biochem* **94**, 1-4 (2005).
- Miknyoczki, S.J. et al. Chemopotiation of temozolomide, irinotecan, and cisplatin activity by CEP-6800, a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor. *Mol Cancer Ther* **2**, 371-82 (2003).
- Moisan, S. et al. Upregulation of galectin-7 in murine lymphoma cells is associated with progression toward an aggressive phenotype. *Leukemia* **17**, 751-9 (2003).
- Morrison, B.W. & Leder, P. neu and ras initiate murine mammary tumors that share genetic markers generally absent in c-myc and int-2-initiated tumors. *Oncogene* **9**, 3417-26 (1994).
- Munoz-Gamez, J.A. et al. PARP inhibition sensitizes p53-deficient breast cancer cells to doxorubicin-induced apoptosis. *Biochem J* **386**, 119-25 (2005).
- Nandan, M.O. et al. Kruppel-like factor 5 mediates the transforming activity of oncogenic H-Ras. *Oncogene* **23**, 3404-13 (2004).
- Narita, T., Funahashi, H., Satoh, Y. & Takagi, H. Procollagen type III N-peptide and type IV collagen 7S-domain in the sera of breast cancer patients. *Surg Today* **23**, 682-6 (1993).
- Nie, J. et al. Interaction of Oct-1 and automodification domain of poly(ADP-ribose) synthetase. *FEBS Lett* **424**, 27-32 (1998).
- Niedergethmann, M. et al. Prognostic impact of cysteine proteases cathepsin B and cathepsin L in pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* **29**, 204-11 (2004).
- O'Brien, K.P. et al. Various regions within the alpha-helical domain of the COL1A1 gene are fused to the second exon of the PDGFB gene in dermatofibrosarcomas and giant-cell fibroblastomas. *Genes Chromosomes Cancer* **23**, 187-93 (1998).

- Oei, S.L. et al. Interaction of the transcription factor YY1 with human poly(ADP-ribosyl) transferase. *Biochem Biophys Res Commun* **240**, 108-11 (1997).
- Oliver, F.J. et al. Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *Embo J* **18**, 4446-54 (1999).
- Perez, A., Leon, A. & Lee, M.Y. Characterization of the 5'-flanking region of the gene encoding the 50 kDa subunit of human DNA polymerase delta. *Biochim Biophys Acta* **1493**, 231-6 (2000).
- Quintero, M., Mackenzie, N. & Brennan, P.A. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) in cancer. *Eur J Surg Oncol* **30**, 465-8 (2004).
- Radin, N.S. Killing cancer cells by poly-drug elevation of ceramide levels: a hypothesis whose time has come? *Eur J Biochem* **268**, 193-204 (2001).
- Rao, P.S., Jaggi, M., Smith, D.J., Hemstreet, G.P. & Balaji, K.C. Metallothionein 2A interacts with the kinase domain of PKCmu in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **310**, 1032-8 (2003).
- Ririe, K.M., Rasmussen, R.P. & Wittwer, C.T. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* **245**, 154-60 (1997).
- Rittling, S.R. & Chambers, A.F. Role of osteopontin in tumour progression. *Br J Cancer* **90**, 1877-81 (2004).
- Robson, P., Stein, P., Zhou, B., Schultz, R.M. & Baldwin, H.S. Inner cell mass-specific expression of a cell adhesion molecule (PECAM-1/CD31) in the mouse blastocyst. *Dev Biol* **234**, 317-29 (2001).
- Ryschich, E. et al. Transferrin receptor is a marker of malignant phenotype in human pancreatic cancer and in neuroendocrine carcinoma of the pancreas. *Eur J Cancer* **40**, 1418-22 (2004).
- Savinainen, K.J. et al. Expression and copy number analysis of TRPS1, EIF3S3 and MYC genes in breast and prostate cancer. *Br J Cancer* **90**, 1041-6 (2004).
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W. & Brown, P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**, 467-70 (1995).
- Schlingemann, J. et al. Profile of gene expression induced by the tumour promotor TPA in murine epithelial cells. *Int J Cancer* **104**, 699-708 (2003).
- Semenza, G.L. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 551-78 (1999).
- Serra, C. et al. Expression and prognostic significance of lysozyme in male breast cancer. *Breast Cancer Res* **4**, R16 (2002).
- Simbulan-Rosenthal, C.M. et al. Misregulation of gene expression in primary fibroblasts lacking poly(ADP-ribose) polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11274-9 (2000).
- Taguchi, A. et al. Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature* **405**, 354-60 (2000).

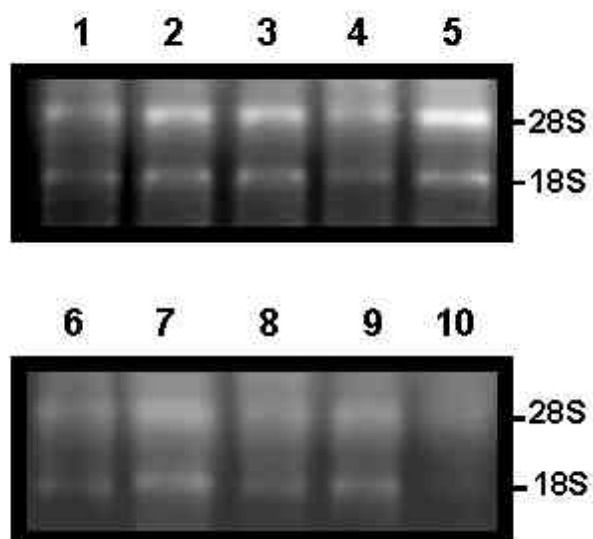
- Takahashi, F. et al. Osteopontin induces angiogenesis of murine neuroblastoma cells in mice. *Int J Cancer* **98**, 707-12 (2002).
- Takaoka, M. et al. Epidermal growth factor receptor regulates aberrant expression of insulin-like growth factor-binding protein 3. *Cancer Res* **64**, 7711-23 (2004).
- Tamames, J. et al. Bioinformatics methods for the analysis of expression arrays: data clustering and information extraction. *J Biotechnol* **98**, 269-83 (2002).
- Tentori, L. et al. Combined treatment with temozolomide and poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor enhances survival of mice bearing hematologic malignancy at the central nervous system site. *Blood* **99**, 2241-4 (2002).
- Tsutsumi, M. et al. Increased susceptibility of poly(ADP-ribose) polymerase-1 knockout mice to nitrosamine carcinogenicity. *Carcinogenesis* **22**, 1-3 (2001).
- Van Gelder, R.N. et al. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 1663-7 (1990).
- Virag, L. & Szabo, C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* **54**, 375-429 (2002).
- Wang, L. et al. Transcription factor Sp1 expression is a significant predictor of survival in human gastric cancer. *Clin Cancer Res* **9**, 6371-80 (2003).
- Waters, K.M., Safe, S. & Gaido, K.W. Differential gene expression in response to methoxychlor and estradiol through ERalpha, ERbeta, and AR in reproductive tissues of female mice. *Toxicol Sci* **63**, 47-56 (2001).
- Wesierska-Gadek, J. & Schmid, G. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 regulates the stability of the wild-type p53 protein. *Cell Mol Biol Lett* **6**, 117-40 (2001).
- Wimmel, A., Glitz, D., Kraus, A., Roeder, J. & Schuermann, M. Axl receptor tyrosine kinase expression in human lung cancer cell lines correlates with cellular adhesion. *Eur J Cancer* **37**, 2264-74 (2001).
- Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A. & Rasmussen, R.P. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* **22**, 130-1, 134-8 (1997).
- Wu, M.X. Roles of the stress-induced gene IEX-1 in regulation of cell death and oncogenesis. *Apoptosis* **8**, 11-8 (2003).
- Yasumoto, H., Matsubara, A., Mutaguchi, K., Usui, T. & McKeegan, W.L. Restoration of fibroblast growth factor receptor2 suppresses growth and tumorigenicity of malignant human prostate carcinoma PC-3 cells. *Prostate* **61**, 236-42 (2004).
- Yeo, E.J., Chun, Y.S. & Park, J.W. New anticancer strategies targeting HIF-1. *Biochem Pharmacol* **68**, 1061-9 (2004).
- Yokota, J. Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis* **21**, 497-503 (2000).
- Yuspa, S.H. The pathogenesis of squamous cell cancer: lessons learned from studies of skin carcinogenesis--thirty-third G. H. A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res* **54**, 1178-89 (1994).

- Zhong, H. & Simons, J.W. Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* **259**, 523-6 (1999).

3.7 FIGURAS Y TABLAS

Fig. III-1. Análisis de la integridad del ARN utilizado en los ensayos de *microarray* mediante electroforesis en geles de agarosa. **A**, detección electroforética de las bandas 18S y 28S del ARN ribosomal como criterio de viabilidad del ARN total obtenido. Cada panel muestra la integridad del ARN correspondiente a los dos grupos de ratones utilizados en estos ensayos (panel superior, nº del 1 al 5; panel inferior, nº del 6 al 10). **B**, viabilidad del aRNA obtenido mediante el proceso de amplificación del ARN total destinado al marcaje de la sonda (cDNA) a hibridar sobre el *microarray*. La señal obtenida corresponde a los numerosos transcritos de diferentes tamaños obtenidos en la reacción de amplificación.

A



B

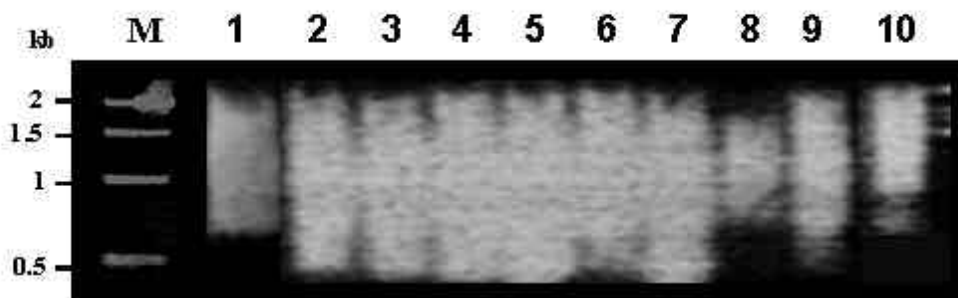


Fig. III-2. Representación esquemática de la tecnología de *microarrays*. En este esquema están representada de una forma básica las distintas etapas necesarias en este proceso: marcaje del cDNA fluorescente a partir de ARN, hibridación de los *microarrays*, lectura y análisis de datos.

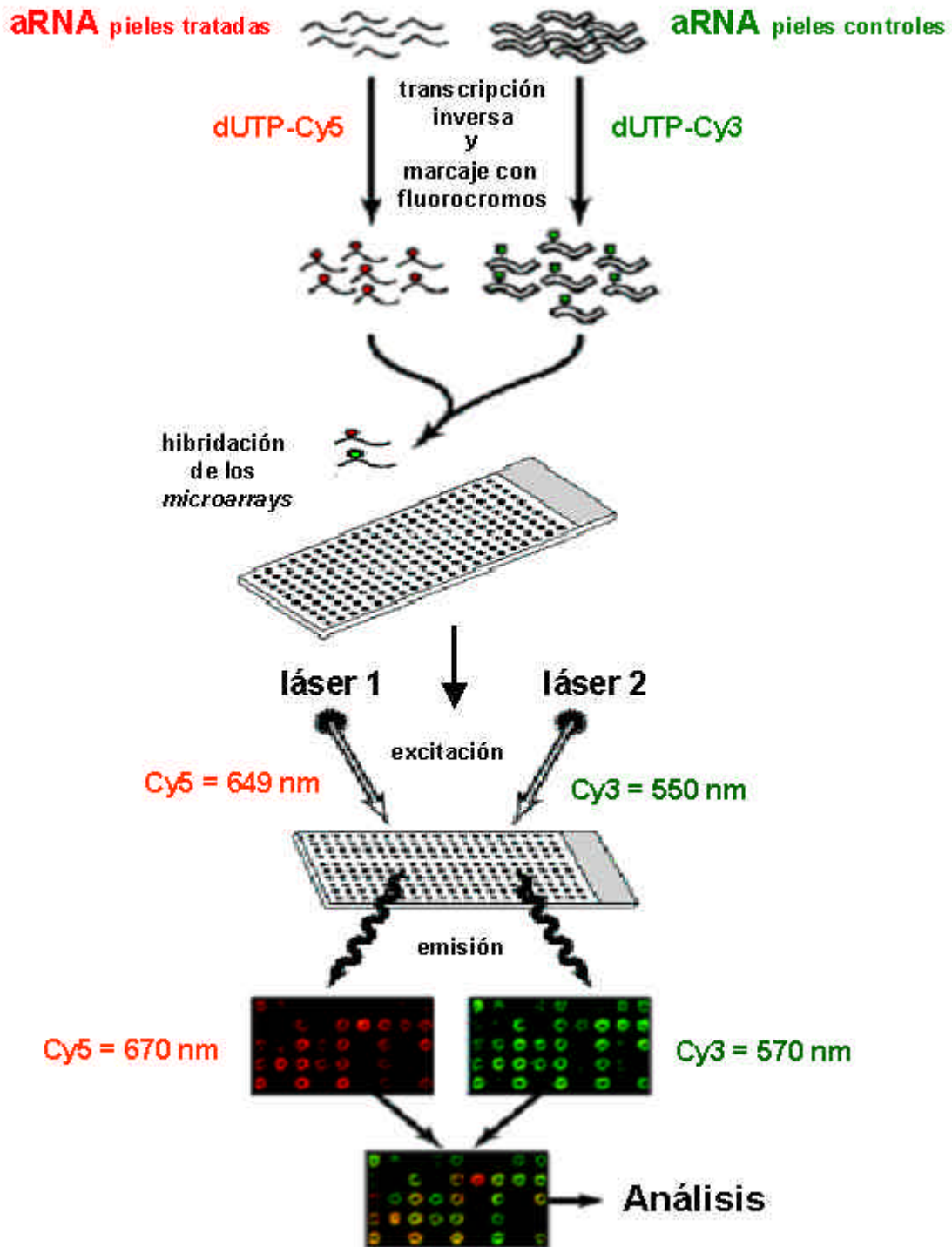


Fig. III-3. Histograma que muestra el número global de genes inducidos y reprimidos al menos 2 veces en la piel de los ratones *parp-1*^{+/+} y *parp-1*^{-/-} tratados con DMBA + TPA durante una semana (en presencia o ausencia del inhibidor DPQ), respecto a los ratones controles, usando para ello la tecnología de los *microarrays*.

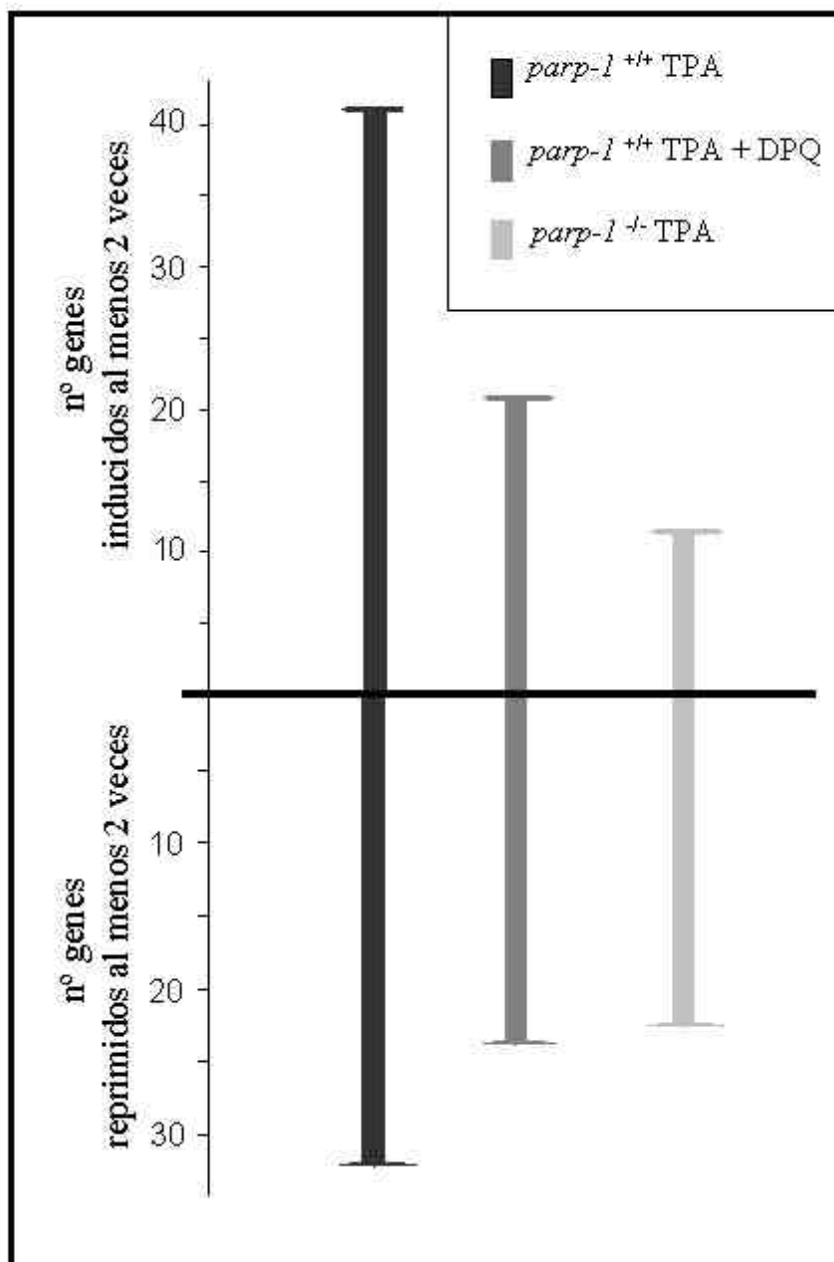
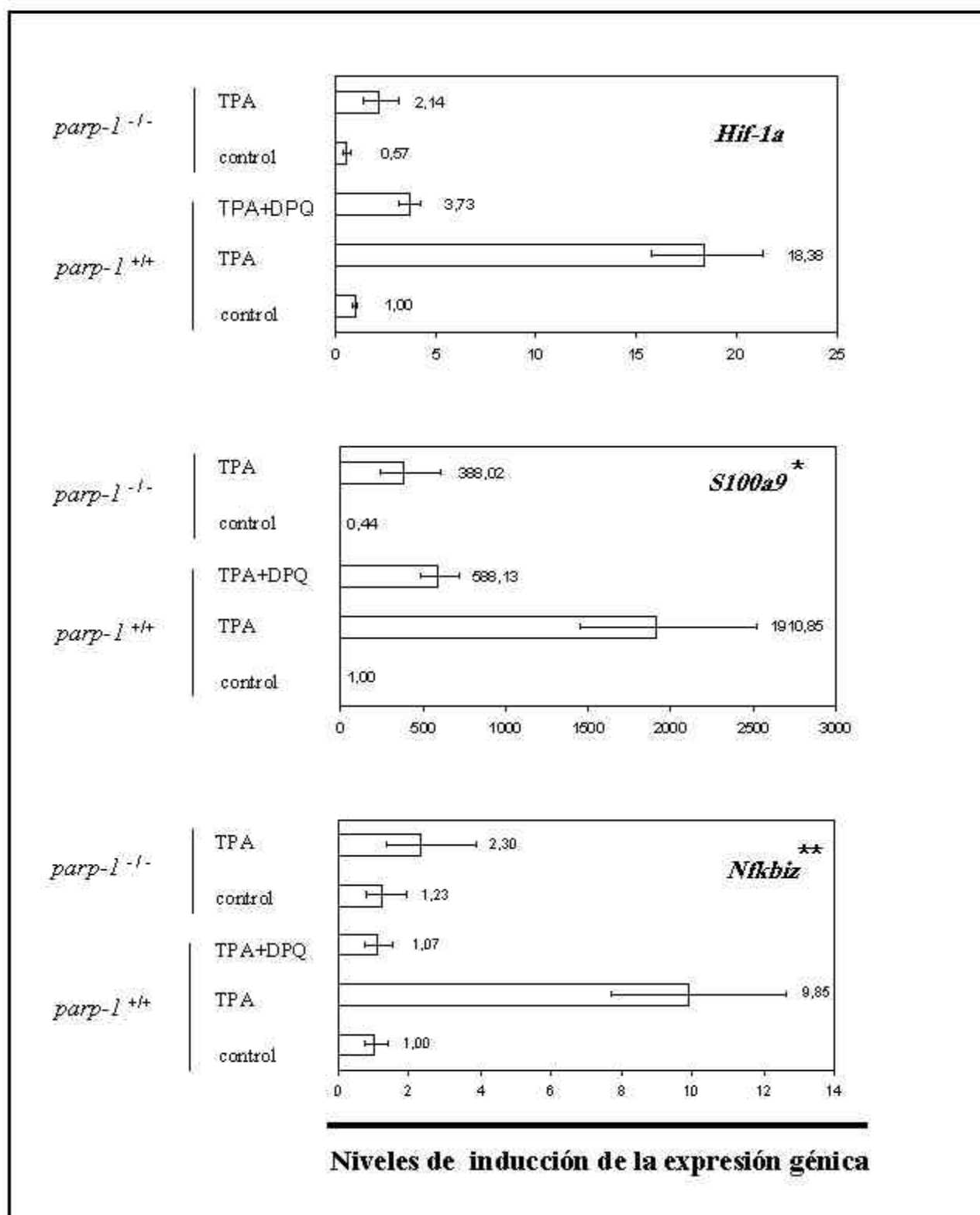


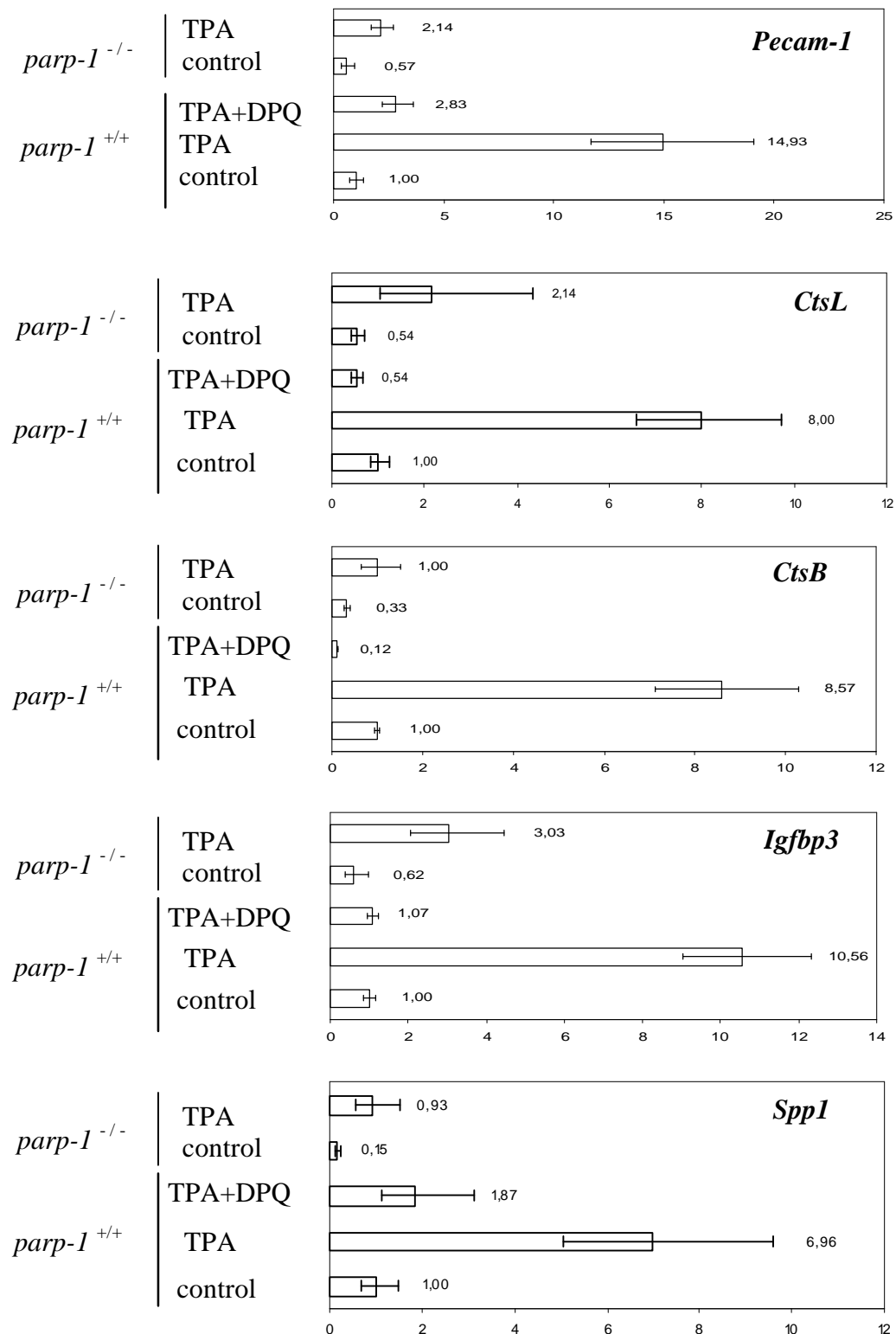
Fig. III-4. Niveles de expresión génica de *S100a9*, *hif1a* y *Nfkbiz* mediante PCR en tiempo real en la piel de los ratones *parp-1*^{+/+} y *parp-1*^{-/-} tratados con DMBA + TPA durante una semana (en presencia o ausencia del inhibidor DPQ) y ratones controles. Las barras de error representan el intervalo de confianza del valor de inducción obtenido. La figura muestra los valores de inducción obtenidos para cada gen correspondiente a un único experimento realizado por triplicado. Otro segundo experimento fue realizado obteniéndose la misma tendencia en la inducción para cada uno de los genes y condición de estudio.



* gen regulado por AP-1

** gen regulado por NF-κB

Fig. III-5. Niveles de expresión génica de *Pecam 1*, *CtsL*, *CtsB*, *Igfbp3* y *Spp1* mediante PCR en tiempo real en la piel de los ratones *parp-1*^{+/+} y *parp-1*^{-/-} tratados con DMBA + TPA durante una semana (en presencia o ausencia del inhibidor DPQ) y ratones controles. Las barras de error representan el intervalo de confianza del valor de inducción obtenido. La figura muestra los valores de inducción obtenidos para cada gen correspondiente a un único experimento realizado por triplicado. Otro segundo experimento fue realizado obteniéndose la misma tendencia en la inducción para cada uno de los genes y condición de estudio.



Niveles de inducción de la expresión génica

Tabla III-1. Lista de genes inducidos al menos dos veces en la piel de los ratones *parp-1*^{+/+} y *parp-1*^{-/-} tratados con DMBA + TPA durante una semana (en presencia o ausencia del inhibidor DPQ), respecto a los ratones controles, usando para ello la tecnología de los *microarrays* (wt TPA, *parp-1*^{+/+} tratados con DMBA+TPA; wt T + D, *parp-1*^{+/+} tratados con DMBA más TPA+DPQ; ko TPA, *parp-1*^{-/-} tratados con DMBA+TPA)

Símbolo	Nombre del gen	Niveles expresión			Clasificación Funcional (<i>Gene Ontology Biological Process</i> ; http://www.ebi.ac.uk/GO/)
		wt TPA	wt T + D	ko TPA	
<i>Alb1</i>	<i>albumin 1</i>	2,00			transporte
<i>Cntn4</i>	<i>contactin 4</i>	2,00			adhesión celular y transporte
<i>Axl</i>	<i>AXL receptor tyrosine kinase</i>	2,46	2,14		crecimiento celular, regulación del ciclo celular y fosforilación de proteínas
<i>Bmp15</i>	<i>bone morphogenetic protein 15</i>	3,48	3,03	2,30	crecimiento celular
<i>Ckmt1</i>	<i>creatine kinase mitochondrial 1</i>	2,83	2,30		función desconocida
<i>Ctla2b</i>	<i>cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 beta</i>	3,25			función desconocida
<i>Ctsb</i>	<i>cathepsin B</i>		2,14		proteólisis
<i>Ctsl</i>	<i>cathepsin L</i>	2,64	5,28		proteólisis
<i>Dbnl</i>	<i>drebrin-like</i>	2,14			respuesta inmune, transducción de señales y endocitosis
<i>Degs</i>	<i>degenerative spermatocyte homolog</i>	2,64			función desconocida
<i>Eno1</i>	<i>enolase 1, alpha non-neuron</i>	2,14	2,14		glucólisis
<i>Expi</i>	<i>extracellular proteinase inhibitor</i>	3,25			función desconocida
<i>Ly6g6c</i>	<i>lymphocyte antigen 6 complex, locus G6C</i>		2,14		función desconocida
<i>Glrx1</i>	<i>glutaredoxin 1 (thioltransferase)</i>	7,46	5,28	3,25	transporte de electrones
<i>Gltp</i>	<i>glycolipid transfer protein</i>	2,14			transporte de lípidos
<i>Gm2a</i>	<i>GM2 ganglioside activator protein</i>	2,30			metabolismo de los esfingolípidos
<i>Gp49a</i>	<i>glycoprotein 49 A</i>	3,25		2,14	función desconocida
<i>Gpx1</i>	<i>glutathione peroxidase 1</i>	3,48			respuesta a estrés oxidativo y a especies reactiva de oxígeno e inducción de apoptosis
<i>Gpx2</i>	<i>glutathione peroxidase 2</i>		6,96	5,28	respuesta a especies reactiva de oxígeno
<i>Gsta4</i>	<i>glutathione S-transferase, alpha 4</i>	3,25			función desconocida
<i>Gsto1</i>	<i>glutathione S-transferase omega 1</i>	2,64			metabolismo
<i>Hdc</i>	<i>histidine decarboxylase</i>	3,25	2,64		función desconocida
<i>Hif1a</i>	<i>hypoxia inducible factor 1, alpha subunit</i>	2,46			transducción de señales
<i>Hsd3b4</i>	<i>hydroxysteroid dehydrogenase-4, delta5-3-beta</i>	2,14			biosíntesis de esteroides
<i>Ier3</i>	<i>immediate early response 3</i>	2,64		2,46	función desconocida
<i>Il18</i>	<i>interleukin 18</i>	3,73		3,03	respuesta inmune
<i>Itgb4bp</i>	<i>integrin beta 4 binding protein</i>		2,14		transducción de señales y biosíntesis de proteínas
<i>Klf5</i>	<i>Kruppel-like factor 5</i>	2,64			regulación de la transcripción
<i>Krt1-18</i>	<i>keratin complex 1, acidic, gene 18</i>		2,14		organización del citoesqueleto y biogénesis
<i>Krt2-8</i>	<i>keratin complex 2, basic, gene 18</i>		2,46		organización del citoesqueleto, biogénesis y proteólisis
<i>Lcn2</i>	<i>lipocalin 2</i>	2,83	3,48	4,29	transporte
<i>Lgals7</i>	<i>lectin, galactose binding, soluble 7</i>	4,29	2,46	2,30	apoptosis
<i>Ly6e</i>	<i>lymphocyte antigen 6 complex, locus E</i>	2,30			respuesta inmune
<i>Lyzs</i>	<i>lysozyme</i>	3,03			metabolismo de los carbohidratos, catabolismo de la pared celular, citólisis y respuesta inmune
<i>Nfkbiz</i>	<i>* nuclear factor of kappa light...</i>	3,03			regulación de la transcripción e inflamación
<i>Map17</i>	<i>membrane-associated protein 17</i>	3,48	2,14	2,46	función desconocida
<i>Mglap</i>	<i>matrix gamma-carboxyglutamate (gla) protein</i>		2,30		regulación de la mineralización de los huesos
<i>Npc1</i>	<i>Niemann Pick type C1</i>	2,30			transporte del colesterol
<i>Pold2</i>	<i>polymerase (DNA directed), delta 2, regulatory subunit</i>	2,30			replicación del ADN
<i>Ppob</i>	<i>protective protein for beta-galactosidase</i>	2,14			proteólisis
<i>S100a9</i>	<i>S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)</i>	36,76	13,00	10,56	señalización intercelular y respuesta inmune
<i>Sgk</i>	<i>serum/glucocorticoid regulated kinase</i>	2,64	2,83		apoptosis y fosforilación de proteínas
<i>Slc34a2</i>	<i>solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2</i>	2,64			transporte
<i>Soat1</i>	<i>sterol O-acyltransferase 1</i>	2,14			transporte del colesterol
<i>Tagln2</i>	<i>transgelin 2</i>		2,30		desarrollo del músculo
<i>Tnc</i>	<i>tenascin C</i>	3,73		2,46	función desconocida
<i>Tfrc</i>	<i>transferrin receptor</i>	2,46			endocitosis, homeostasis del hierro y proteólisis
<i>Trps1</i>	<i>trichorhinophalangeal syndrome I (human)</i>	2,00			regulación de la transcripción
<i>Ucp2</i>	<i>uncoupling protein 2, mitochondrial</i>		2,64		transporte mitocondrial
<i>Ugcg</i>	<i>UDP-glucose ceramide glucosyltransferase</i>	2,46			desarrollo de la epidermis, biosíntesis de glucosilceramidas y glicosfingolípidos

* nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta

Tabla III-2. Lista de genes reprimidos al menos dos veces en la piel de los ratones *parp-1*^{+/+} y *parp-1*^{-/-} tratados con DMBA + TPA durante una semana (en presencia o ausencia del inhibidor DPQ), respecto a los ratones controles, usando para ello la tecnología de los *microarrays* (wt TPA, *parp-1*^{+/+} tratados con DMBA+TPA; wt T + D, *parp-1*^{+/+} tratados con DMBA más TPA+DPQ; ko TPA, *parp-1*^{-/-} tratados con DMBA+TPA)

Símbolo	Nombre del gen	Niveles expresión			Clasificación Funcional (<i>Gene Ontology Biological Process</i> ; http://www.ebi.ac.uk/GO/)
		wt TPA	wt T + D	ko TPA	
<i>Anapc7</i>	<i>anaphase promoting complex subunit 7</i>			-2,64	ciclo celular, mitosis, citoquinesis y ubiquitinización
<i>Arl6ip</i>	<i>ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein 1</i>	-2,14			transducción de señales
<i>Bcl2l</i>	<i>Bcl2-like 1</i>	-2,30			regulación de la apoptosis
<i>Calmbp1</i>	<i>calmodulin binding protein 1</i>		-2,30		mitosis
<i>Calm2</i>	<i>calmodulin 2</i>	-2,00			ciclo celular y transducción de señales
<i>Catns</i>	<i>catenin src</i>		-3,03		adhesión celular
<i>Ccnd1</i>	<i>cyclin D1</i>	-2,64	-2,14	-2,46	regulación del ciclo celular y fosforilación
<i>Ccnd2</i>	<i>cyclin D2</i>	-4,00	-2,83	-2,83	regulación del ciclo celular
<i>Cla3</i>	<i>cerebellar ataxia 3</i>	-2,46	-2,14		función desconocida
<i>Col1a1</i>	<i>procollagen, type I, alpha 1</i>		-2,83	-3,03	adhesión celular y transporte
<i>Col1a2</i>	<i>procollagen, type I, alpha 2</i>		-3,73	-2,83	adhesión celular y transporte
<i>Col3a1</i>	<i>procollagen, type III, alpha 1</i>		-2,83	-2,30	adhesión celular y transporte
<i>Epb4.14b</i>	<i>erythrocyte protein band 4.1-like 4b</i>	-2,30			transporte
<i>Fasn</i>	<i>fatty acid synthase</i>			-2,30	biosíntesis de ácidos grasos
<i>Fgfr2</i>	<i>fibroblast growth factor receptor 2</i>	-2,46			señalización intercelular, regulación proliferación, fosforilación y transducción de señales
<i>Gclc</i>	<i>glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit</i>	-2,46			biosíntesis
<i>Hbb-b1</i>	<i>hemoglobin, beta adult major chain</i>	-2,64			hematopoyesis y transporte de oxígeno
<i>Hbb-y</i>	<i>hemoglobin Y, beta-like embryonic c</i>	-2,14			transporte de oxígeno
<i>Hmgb1</i>	<i>high mobility group box 1</i>	-2,46			condensación del ADN, transporte y biosíntesis de óxido nítrico
<i>Hmgb2</i>	<i>high mobility group box 2</i>	-2,30	-2,30		condensación del ADN y regulación de la transcripción
<i>Ikb3</i>	<i>inhibitor of DNA binding 3</i>	-2,46	-2,46		regulador negativo de la transcripción dependiente de <i>Pol II</i>
<i>Igfbp5</i>	<i>insulin-like growth factor binding protein 5</i>		-2,14	-2,46	regulación del crecimiento celular
<i>Itm2a</i>	<i>integral membrane protein 2A</i>			-2,83	función desconocida
<i>Stmn1</i>	<i>stathmin 1</i>	-4,00	-3,25		señalización intracelular y despolimerización microtubular
<i>Mki67</i>	<i>antigen identified by monoclonal antibody Ki 67</i>	-2,30	-2,30	-2,14	proliferación celular y meiosis
<i>Mt2</i>	<i>metallothionein 2</i>	-2,30	-2,30	-3,25	homeostasis del zinc y transducción de señales mediada por óxido nítrico
<i>Myef2</i>	<i>myelin basic protein expression factor 2, repressor</i>	-2,64			función desconocida
<i>Mylpf</i>	<i>* myosin light chain, phosphorylatable...</i>			-2,46	biogénesis, organización citoesqueleto y desarrollo muscular
<i>Nap111</i>	<i>nucleosome assembly protein 1-like 1</i>	-2,46	-2,14		ensamblaje del nucleosoma
<i>Psmb5</i>	<i>proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 5</i>			-2,46	catabolismo proteico dependiente de ubiquitinización
<i>Purb</i>	<i>purine rich element binding protein B</i>	-2,14	-3,25	-3,25	función desconocida
<i>Pvrl3</i>	<i>poliovirus receptor-related 3</i>	-3,48	-3,25	-3,73	adhesión celular
<i>Slc4a2</i>	<i>solute carrier family 4 (anion exchanger), member 2</i>	-3,03			transporte de iones
<i>Smarca5</i>	<i>** SWI/SNF related, matrix associated...</i>	-2,14	-2,14		remodelado, ensamblaje y desempaquetamiento de la cromatina
<i>Sox4</i>	<i>SRY-box containing gene 4</i>	-2,83			regulación de la transcripción
<i>Spr</i>	<i>sepiapterin reductase</i>	-2,83	-2,46	-3,03	metabolismo y biosíntesis
<i>Sp1</i>	<i>trans-acting transcription factor 1</i>		-2,14	-2,30	regulador positivo de la transcripción
<i>Tera</i>	<i>teratocarcinoma expressed, serine rich</i>	-2,64	-2,64	-2,00	función desconocida
<i>Tia1</i>	<i>cytotoxic granule-associated RNA binding protein 1</i>	-2,46			apoptosis
<i>Tm4sf6</i>	<i>transmembrane 4 superfamily member 6</i>	-2,83			función desconocida
<i>Tnfrsf19</i>	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily member 19</i>	-2,46	-2,83	-2,83	función desconocida
<i>Ttc3</i>	<i>tetratricopeptide repeat domain 3</i>	-2,14	-2,14	-2,14	función desconocida
<i>Tubb5</i>	<i>tubulin, beta 5</i>	-2,14			procesos dependientes de microtúbulos
<i>Ube2s</i>	<i>ubiquitin-conjugating enzyme E2S</i>			-2,64	modificación y ubiquitinización de proteínas
<i>Utm</i>	<i>utrophin</i>			-2,46	transducción de señales, desarrollo y contracción muscular, quimiotaxis
5830426105Rik	<i>RIKEN cDNA 5830426105 gene</i>	-2,14	-2,46	-2,30	proliferación celular

* *myosin light chain, phosphorylatable, fast skeletal muscle*

** *SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin*

Tabla III- 3 Cebadores utilizados en los ensayos de PCR en tiempo real

Nombre	secuencia (5' → 3')	tamaño amplicón	Ref./UniSTS number ^A
18S rRNA-sen. 18S rRNA-antis.	CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA GCT GGA ATT ACC GCG GCT	181 pb	Burbach y col., 2003
S100a9-sen. S100a9-antis.	TCA TCG ACA CCT TCC ATC AA GAT CAA CTT TGC CAT GAG CA	227 pb	Gebhardt y col., 2002
Hif1a-sen. Hif1a-antis.	TTT CTG GGC AAA CTG TTA TAA CCC CAT GTA TTT GTT C	371 pb	Marti <i>et al.</i> 2002
Nfkbiz-sen. Nfkbiz-antis.	GCT CAT TCC ACC TTA GAG ATG C TTT GAT AAT GCC CGA CAA GA	236 pb	161605
Pecam 1-sen. Pecam 1-antis.	AGG GGA CCA GCT GCA CAT TAG G AGG CCG CTT CTC TTG ACC ACT T	452 pb	Robson y col., 2001
Igfbp3-sen. Igfbp3-antis.	GAC ACC CAG AAC TTC TCC TCC CAT ACT TGT CCA CAC ACC AGC	220 pb	143488
CtsB-sen. CtsB-antis.	CAA CGT GGA GGT GTC TGC TGA A TGT CCA GAA GTT CCA TGC TCC AG	110 pb	Waters y col., 2001
CtsL-sen. CtsL-antis.	CTG TTC CCA TTT TTA CAT GG TTC CAG ACT CAG AAT TAA GC	200 bp	141443
Spp1-sen. Spp1-antis.	TGT GTC CTC TGA AGA AAA GGATGAC TCT GTG GCA TCA GGATAC TGT TCA	350 bp	Leali y col., 2003

^AUniSTS es una base de datos de secuencias de ADN correspondiente a diferentes genes (*sequence target sites, STSs*). Estas STSs han sido descritas por PCR usando parejas de cebadores definidos en esta base de datos con un identificación concreta (UniSTS number)

CONCLUSIONES

Primera. Los ratones genéticamente deficientes en *parp-1* son menos susceptibles a la aparición y desarrollo de tumores de piel tipo papilomas tras tratamiento de carcinogénesis química epitelial. Esto es debido, en gran parte, a que en ausencia de PARP-1 hay una deficiencia en la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1 y, por tanto, no pueden ser expresados los genes bajo su control, necesarios para el crecimiento tumoral.

Segunda. Los papilomas desarrollados por los ratones *parp-1 knockout* presentan una disminución de marcadores inflamatorios tales como presencia de infiltrado inflamatorio y mastocitos.

Tercera. Durante las etapas tempranas de promoción tumoral los queratinocitos de la epidermis de los ratones genéticamente deficientes en *parp-1* presentan una proliferación celular similar a la llevada a cabo en condiciones basales.

Cuarta. El uso del inhibidor de la actividad enzimática de PARP (DPQ) durante el proceso de carcinogénesis química epitelial ocasiona un retraso temporal en la aparición de tumores, una disminución del número de tumores desarrollados y de su tamaño medio.

Quinta. Los papilomas que se han desarrollado en presencia del inhibidor de la actividad enzimática de PARP muestran un menor recambio celular, además de una acusada disminución en los marcadores inflamatorios.

Sexta. La activación de NF- κ B no se encuentra mermada al inhibir la actividad enzimática de PARP mediante DPQ. En cambio, el factor de transcripción AP-1 si muestra una activación deficiente al inhibir la actividad enzimática de PARP durante el proceso de carcinogénesis química epitelial.

Séptima. La expresión génica diferencial en la piel de los ratones durante la promoción tumoral en condiciones salvajes y de delección genética de *parp-1* e inhibición de la actividad enzimática de PARP revela que 96 genes se encuentran globalmente alterados en cuanto a su expresión génica respecto a su estado basal. De ellos, la expresión de 73 genes está alterada (de los cuales 41 se encuentran inducidos y 32 reprimidos) en las pieles de los ratones salvajes, 45 genes (de los cuales hay 21 inducidos y 24 reprimidos) en pieles de ratones salvajes tratados simultáneamente con el inhibidor DPQ y 34 genes (11 de ellos inducidos y 23 reprimidos) en pieles de ratones *parp-1* knockout .

Octava. Las pieles de los ratones salvajes muestran durante la promoción tumoral expresión génica de un importante número de genes asociados con patologías tumorales, procesos de estrés oxidativo, respuesta inmune, inflamación y angiogénesis que no se observan en ausencia de PARP-1 o con el uso del inhibidor de PARP.

Conclusión final. La pérdida de función de la proteína PARP-1 interfiere en el proceso de carcinogénesis química retrasando el crecimiento tumoral. Esto se debe en parte a que la inhibición o la delección genética de PARP-1 está asociada a cambios de expresión génica relacionados con el desarrollo tumoral. Por otro lado, la inhibición de la actividad enzimática de PARP puede ser de gran utilidad en el diseño de nuevas terapias anti-neoplásicas tanto por su capacidad de prevenir procesos de reparación del ADN durante el tratamiento clásico con quimioterapia y/o radiación, como por representar una efectiva terapia para bloquear la expresión de genes claves en el proceso de promoción/progresión tumoral.

ABREVIATURAS

3-ABA: 3-Aminobenzamida

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AP-1: *Activator protein 1*

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ácido mensajero

ATP: Adenosina 5'-trifosfato

BER: *Base Escisión Repair*

BRCT: *BRCA1 C-terminus*

BrdU: Bromodesoxiuridina

DBD: *DNA binding domain*

DEPC: Dietilpirocarbonato

DMBA: 7,12-dimetilbenzo[a]-antraceno)

DMEM: Medio mínimo esencial Dulbecco

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPQ: 3,4-Dihidro-5-[4-(1-piperidinil)butoxi]-1(2H)-isoquinolinona

cDNA: ADN complementario

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ERK: Quinasas activadas por señales extracelulares

FBS: Suero bovino fetal

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

HEPES: N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(1-ácido etanofulfónico)

HMG: *High Mobility Group proteins*

IC₅₀: *Inhibitory concentration 50%*

IgG: Inmunoglobulina G

JNK: c-Jun N-terminal quinasa

LPS: Lipopolisacárido

LZ: *Leucine Zipper* (cremallera de leucina)

2-ME: 2-Mercaptoetanol

MAPK: Quinasas activadas por mitógenos

NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido

NF-κB: *nuclear factor κB*

NLS: Señal de localización nuclear

dNTP: Desoxinucleótido trifosfato

Oct-1: Factor de transcripción octámero

PARP: Poli-ADP-ribosa polimerasa

PARG: Poli-ADP-ribosa glicohidrolasa

PAS: *Periodic Acid Schiff*

pb: Pares de bases

PBS : Solución tamponadora de Fosfatos

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

aRNA: ARN mensajero amplificado

RT-PCR: PCR en tiempo real

SDS: Sodio dodecil sulfato

SSBR: *Single Strand Break Repair*

SSC: *Saline-Sodium Citrate*

TE: Tris/EDTA

TEF-1: *Transcription Enhancer Factor-1*

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina

TNF-α: Factor de necrosis tumoral α

TRAIL: *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*

TPA: 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato

XRCC1: *X-ray cross complementing factor 1*

YY-1: Ying-Yang-1